

# Neue Einblicke in die Bedeutung des Mikrobioms bei NASH: Kalorienextraktion, Alkoholproduktion und Inflammation

Fast erwartungsgemäß hält nun die rasch expandierende Mikrobiom-Forschung mit ihren rasanten Entwicklungen nach Adipositas und Diabetes nun auch auf dem Gebiet der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) ihren Einzug. Dies mag einerseits am engen metabolischen Zusammenhang dieser Erkrankungen im Sinne des Metabolischen Syndroms, andererseits auch an einer langen Tradition in Bezug auf Konzepte zur Bedeutung der Darm-Leber-Achse bei Lebererkrankungen liegen.

Die NAFLD umfasst ein Krankheitspektrum, welches von der simplen (relativ benignen) Steatose (NAFL) über die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH; Progression von einer NAFL zu NASH in etwa 20-25%) bis zur hepatischen Fibrose und Zirrhose (Progression einer NASH zu Zirrhose in etwa 10-20%) mit inhärentem Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom (HCC; Progression einer Zirrhose zum HCC in etwa 2-7%) reicht (Abb. 1). Die Diagnose beruht auf dem Ausschluss eines täglichen Alkoholkonsums von > 20 (Frauen) bis 30 (Männer) Gramm, sowie der Exklusion anderer Hepatopathien. In Europa hat die NAFLD mit einer Prävalenz von bis zu 44% und der daraus resultierenden Mortalität (Blachier M, *J Hepatol* 2013; 58: 593) bereits epidemische Ausmaße im Sinne einer „Volkserkrankung“ erreicht.

Die NAFLD kann als die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms gesehen werden und ist daher mit Insulinresistenz/Diabetes, Hyperlipidämie, Hypertonie oder kardiovaskulären Erkrankungen eng verbunden. Dabei stellt die NAFLD nicht nur eine

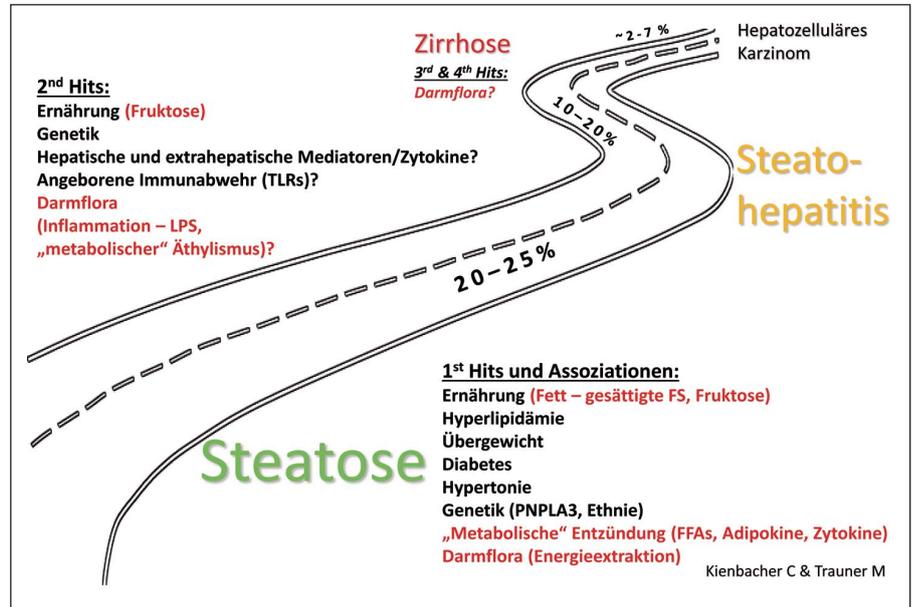


Abb. 1: „On the road to NASH“: Natürlicher Verlauf und Spektrum einer Volkserkrankung (nach dem Konzept der Multihit-Hypothese; Tilg H & Moschen AR, *Hepatology* 2010; 52:1836).

bloße Assoziation, sondern auch einen unabhängigen Risikofaktor für diese Erkrankungen dar (Anstee QM, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; [Epub ahead of Print]; Zelber-Sagi S, *Liver Int* 2013 [Epub ahead of print]). Im ersten Schritt entsteht über eine vermehrte hepatische Lipideinlagerung eine Fettleber (NAFL). Es wird derzeit davon ausgegangen, dass weitere „Hits“ (z. B. Endotoxinämie, Ischämie, Medikamente, etc.) im Sinne einer „multiplen parallel Hit“-Hypothese (Tilg H, *Hepatology* 2010; 52:1836) zur NASH führen (Abb. 1).

NAFLD und NASH sind mit bakteriellem Überwuchs im Dünndarm, Darmpermeabilität und konsekutiv erhöhten Inflammationsparametern assoziiert. Möglicherweise führt die Translokation von Bakterien(-Bestandteilen)/Endotoxinen dabei zu vermehrter Inflammation. Sowohl eine (niedrig-gradige) „metabolische Entzün-

dung“ aus dem Fettgewebe als auch aus dem Darm („metabolische Endotoxinämie“) kann hier zur Insulinresistenz beitragen (Abb. 1 + 2).

In der Adipositas- und Diabetes-Forschung wurde die Bedeutung des Darm-Mikrobioms bereits eindrucksvoll gezeigt. Da diese Krankheitsentitäten mit der NAFLD epidemiologisch und im klinischen Alltag eng verbunden sind, scheint es naheliegend, die direkte Auswirkung der Darmflora auf die NAFLD zu untersuchen. Das Darm-Mikrobiom und seine Zusammensetzung entwickelt sich im Menschen von Geburt an, ist dabei abhängig vom Wirts-Genom, von der Ernährung, anderen Life-Style-Faktoren (z. B. Umgebungseinflüsse wie Hygienebedingungen und Medikamenteneinnahme) und beträgt etwa das Zehnfache unserer eigenen Zellzahl (Ley RE, *Cell* 2006; 124:837; Qin J, *Nature* 2010; 464: 59). Darüber hinaus stellen die gesamt-

ten uns symbiotisch besiedelnden Mikroben (Metagenom) einen zusätzlichen Genpool dar, der unser humanes (nukleäres und mitochondriales) Genom um etwa das 150-fache („third genome“) übertrifft und um wesentliche Stoffwechselforgänge erweitert, die unser eigener Metabolismus nicht oder nur bedingt zu leisten vermag (Jia W, *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:123).

Die physiologische Funktion des Darm-Mikrobioms beinhaltet unter anderem die Bildung von kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs = short chain fatty acids) aus komplexen Kohlehydraten der Nahrung, (sekundären) Gallensäuren (welche neben ihrer Funktion in der Fettverdauung wichtige hormonelle Signalmoleküle im Darm darstellen [Halilbasic E, Trauner M, *J Hepatol* 2013; 58:155]), Cholinmetaboliten und Vitaminen (K, Cobalamin, Biotin, Folsäure, Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin). Damit leistet unsere Darmflora einen wesentlichen Beitrag zur Gesundheit, aber auch zu Erkrankungen (Nicholson JK, *Science* 2012; 336:1262; Clemente JC, *Cell* 2012; 148:1258). Weiters sind SCFAs Liganden für G-Protein bindende Rezeptoren (GPCRs; Gpr41, Gpr43) an enteroendokrinen Darmepithelzellen, die Peptid YY exprimieren, welches die Darmmotilität inhibiert (Abb. 2). Dies erhöht über eine verlängerte Transitzeit zusätzlich die Extraktion von Energie aus der Nahrung (Sonnenburg JL, *Science* 2005; 307:1955; Übersichten: Tilg H, *Gastroenterology* 2009; 136:1476; Tilg H, *J Clin Invest* 2011; 121:2126).

Ein Adipositas-assoziiertes Mikrobiom (mit einer Verschiebung von Bacteroides [anaerob, Gram-negativ mit LPS] zu Firmicutes [Gram-positiv]) wurde bereits gezeigt, dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine Veränderung der Verstoffwechslungskapazität zugeführter Nahrung durch die Mikroben

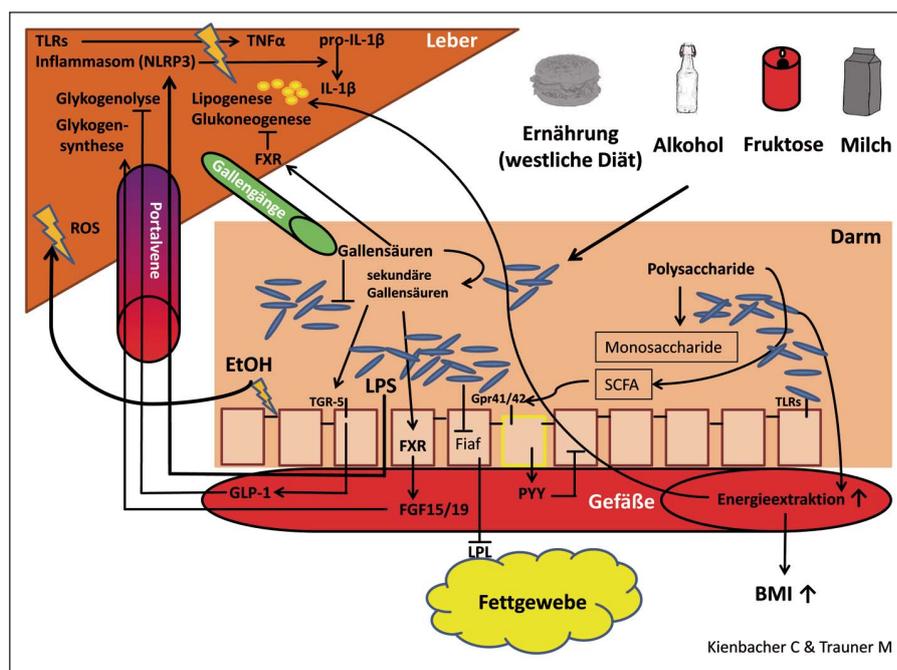


Abb. 2: Einfluss von Ernährung auf das Mikrobiom mit multiplen metabolischen Auswirkungen (Kienbacher C, Trauner M).

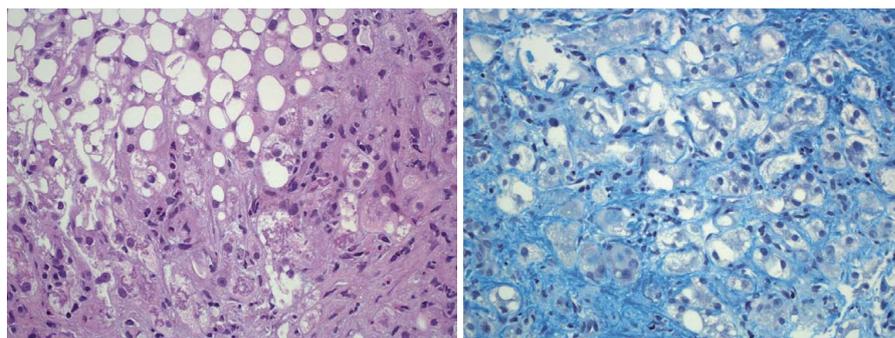


Abb. 3: Zwei typische histopathologische Bilder einer NASH mit Steatose, Ballonierung mit Mallory-Denk-Körpern und perizellulärer Maschendrahtfibrose (freundlicherweise von Prof. Fritz Wrba, Klinisches Institut für Pathologie, Medizinische Universität Wien zur Verfügung gestellt).

(z. B.: Ley RE, *Nature* 2006, 444:1022; Turnbaugh PJ, *Nature* 2006, 457:480; Tilg H, *J Clin Gastroenterol* 2010, 44:16; Murphy EF, *Gut* 2010, 59:1635; Turnbaugh PJ, *J Physiol* 2009; 587.17:4153; Musso G, *Curr Opin Lipidol* 2010; 21:76; Li M, *PNAS* 2008; 105:2117). Somit hilft das Darm-Mikrobiom, Energie aus der Nahrung zu extrahieren und für den späteren Gebrauch in Geweben zu speichern und hat damit einen wesentlichen Einfluss auf unsere Energiehomöostase (Bäckhed F, *PNAS* 2004; 101:15718; Cani PD, *Diabetes* 2008; 57:1470). Umgekehrt zeigen Diät, Lifestyle- und andere Umgebungsfaktoren Einfluss auf die Zusammensetzung

des Mikrobioms (Abb. 2), welches sich wiederum auf den Wirts-Metabolismus auswirkt („The hybrid science of diet“; Shanahan F, *Am J Clin Nutr* 2011; 94:1).

Die NASH ist von der alkoholischen Steatohepatitis (ASH) histologisch/morphologisch nicht eindeutig unterscheidbar (Abb. 2). Histologisch wird eine NASH durch mikro- und/oder makrovesikuläre Verfettung (> 5%), hepatozelluläre Ballonierung, Leberzellnekrosen und -apoptosen mit Infiltration neutrophiler Granulozyten und resultierender (Maschendraht-)Fibrose charakterisiert. Diese histopathologi-

## 1. Intestinal microbiota in patients with non-alcoholic fatty liver disease.

Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, et al.

Hepatology 2013 [Epub ahead of print]

Department of Pediatrics, Hospital for Sick Children; Toronto General Hospital, University Health Network; Toronto, Canada.

Despite evidence that the intestinal microbiota (IM) is involved in the pathogenesis of obesity, the IM composition of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has not been well characterized. This prospective, cross-sectional study was aimed at identifying differences in IM between adults with biopsy-proven NAFLD (simple steatosis [SS] or non-alcoholic steatohepatitis [NASH]) and living liver donors as healthy controls (HC). Fifty subjects were included: 11 SS, 22 NASH and 17 HC. One stool sample was collected from each participant. Quantitative realtime polymerase chain reaction was used to measure total bacterial counts, *Bacteroides/Prevotella* (herein referred to as Bacteroidetes), *C. leptum*, *C. coccoides*, bifidobacteria, *E. coli* and Archaea in stool. Clinical and laboratory data, foodrecords, and activity logs were collected. Patients with NASH had a lower percentage of Bacteroidetes (Bacteroidetes to total bacteria

counts) compared to both SS and HC ( $p=0.006$ ) and higher fecal *C. coccoides* compared to those with SS ( $p=0.04$ ). There were no differences in the remaining microorganisms. As body mass index (BMI) and dietary fat intake differed between the groups ( $p<0.05$ ), we performed linear regression adjusting for these variables.

The difference in *C. coccoides* was no longer significant after adjusting for BMI and fat intake. However, there continued to be a significant association between the presence of NASH and lower percentage Bacteroidetes even after adjusting for these variables ( $p=0.002$ ; 95% CI= -0.06 to -0.02).

**CONCLUSION:** There is an inverse and diet-/BMI-independent association between the presence of NASH and percentage Bacteroidetes in the stool, suggesting that the IM may play a role in the development of NAFLD.

schen Beschreibungen überschneiden sich jedoch häufig, wenn auch quantitative Unterschiede in der Ausprägung beobachtet werden können. Mallory-Denk-Körper können bei beiden Entitäten vorkommen (Cortez-Pinto H, *Dig Dis Sci* 2003; 48:1909).

Die (Alkohol-)Anamnese (mittels validierter Fragebögen, z. B. AUDIT-C, SIAC) und laborchemische Parameter (z. B. CDT, MCV, uETG [Staufer K, *Hepatology* 2011, 54:1640]) spielen daher bei der Differentialdiagnose im klinischen Alltag und vor allem auch bei Studiendesigns in der NAFLD eine wesentliche Rolle. Aufgrund dieses sehr ähnlichen histologischen Erscheinungsbildes erwächst auch die Vermutung einer gemeinsamen oder zumindest überlappenden Pathophysiologie (z. B. oxidativer Stress).

Systemische Effekte des Mikrobioms dürften neben der metabolischen Endotoxämie in erster Linie durch Metaboliten des Darm-Mikrobioms bedingt

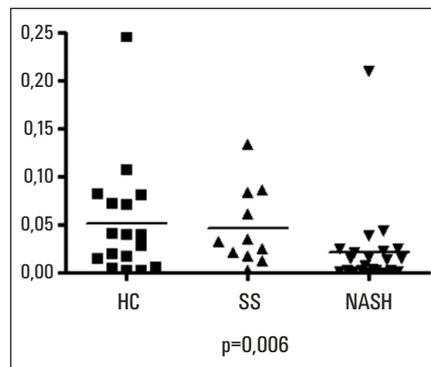


Abb. 4: Verschiebung des Mikrobioms in der NAFLD: Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) haben prozentuell zur fekalen Gesamtbakterienzahl weniger Bacteroidetes im Stuhl verglichen mit Patienten mit simpler Steatose (SS) und gesunden Kontrollen (HC). N=17 HC, 11 SS, 22 NASH; y-Achse: Ratio Bacteroidetes: Gesamtbakterienzahl im Stuhl (Mouzaki M, *Hepatology* 2013, doi: 10.1002/hep.26319 [Epub ahead of print]).

sein. Die Relevanz des Mikrobioms auf die Darm-Leber-Achse in der NAFLD (Miele L, *Curr Pharm Design* 2013; 19 [Epub ahead of print]) wird sowohl durch Maus- wie auch Humanstudien immer deutlicher (z. B. Abu-Shanab A, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:691).

Die drei ausgewählten Arbeiten versuchen nun ein NAFLD-spezifisches Mikrobiom zu definieren. Noch bedeutender aber erscheint, dessen Metaboliten wie Ethanol, als mögliche (patho-) physiologische Erklärungen für die Krankheitsprogression genauer unter die Lupe zu nehmen.

In einer prospektiven Querschnittsstudie beschäftigten sich Mouzaki et al. (siehe Abstract 1) mit einem für die NAFLD spezifischen Mikrobiom mittels quantitativer real-time-PCR (qrt-PCR; „wie viel ist von welchen Bakterien vorhanden“). Die Gruppen setzten sich aus Patienten mit simpler Steatose (n=11), NASH (n=22) (mittels Leberbiopsie diagnostiziert) und „gesunden“ Lebend-Leber-Organ Spendern (n=17) zusammen. Unter statistischer Kontrolle von möglichen Einflussfaktoren auf das Mikrobiom wie Diät, BMI und Bewegung wurde bei NASH-Patienten eine signifikant niedrigere Anzahl an Bacteroidetes gefunden. Diese Ergebnisse stehen in Ein-

## 2. Characterization of gut microbiomes in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH.

Zhu L, Baker SS, Gill C, et al.

Hepatology 2013; 57:601-9

Digestive Diseases and Nutrition Center, Department of Pediatrics, State University of New York at Buffalo, Buffalo, NY 14214, USA.

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a serious liver disease associated with obesity. Characterized by metabolic syndrome, hepatic steatosis, and liver inflammation, NASH is believed to be under the influence of the gut microflora. Here, the composition of gut bacterial communities of NASH, obese, and healthy children was determined by 16S ribosomal RNA pyrosequencing. In addition, peripheral blood ethanol was analyzed to monitor endogenous ethanol production of patients and healthy controls. UniFrac-based principle coordinates analysis indicated that most of the microbiome samples clustered by disease status. Each group was associated with a unique pattern of enterotypes. Differences were abundant at phylum, family, and genus levels between healthy subjects and obese patients (with or without NASH), and relatively fewer differences were observed between obese and the NASH microbiomes. Among those taxa with greater

than 1% representation in any of the disease groups, Proteobacteria, Enterobacteriaceae, and Escherichia were the only phylum, family and genus types exhibiting significant difference between obese and NASH microbiomes. Similar blood-ethanol concentrations were observed between healthy subjects and obese non-NASH patients, but NASH patients exhibited significantly elevated blood ethanol levels.

**CONCLUSIONS:** The increased abundance of alcohol-producing bacteria in NASH microbiomes, elevated blood-ethanol concentration in NASH patients, and the well-established role of alcohol metabolism in oxidative stress and, consequently, liver inflammation suggest a role for alcohol-producing microbiota in the pathogenesis of NASH. We postulate that the distinct composition of the gut microbiome among NASH, obese, and healthy controls could offer a target for intervention or a marker for disease.

klang mit früheren Studien in der Adipositas (Ley RE, *Nature* 2006, 444:1022; Turnbaugh PJ, *Nature* 2006, 457:480) und „metabolischer Endotoxämie“ (Cani PD, *Diabetes* 2007, 56:1761; Cani PD, *Gut* 2009; 58:1091). Für die Interpretation der Daten ist es wichtig zu bedenken, dass die Verwendung der qrt-PCR zur Quantifizierung lediglich die Detektion bekannter Spezies und somit nur eingeschränkte (indirekte) Rückschlüsse auf (patho)physiologische, systemische und vor allem funktionelle Relevanz zulässt. **Im Gegensatz dazu erlaubt nur die (nicht zum Einsatz gekommene) direkte Sequenzierung des jeweiligen Genoms aller im Stuhl vorhandenen Bakterien - (Metagenom: „welche bakteriellen Gene, mit welchen Eigenschaften [z. B. Enzyme] sind vorhanden“).**

In der nächsten Arbeit (siehe Abstract 2) wurde ein möglicher Einfluss der Darmflora auf den (peripheren) Blutalkohol-

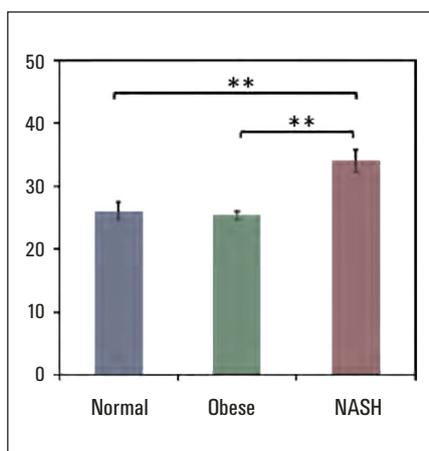


Abb. 5: Signifikant erhöhte Blutalkoholspiegel bei Kindern/Jugendlichen mit NASH: Erhöhte Serum-Ethanol-Konzentration in NASH-Patienten. Serum-Ethanol ( $\mu\text{M}$ ) von Gesunden (Normal,  $n=10$ ), adipösen Patienten ( $n=7$ ), und NASH-Patienten ( $n=13$ ) wurden mittels eines Ethanol-Assay-Kits von BioVision (Milpitas, CA) gemessen.

Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts. Signifikante Unterschiede wurden zwischen den drei Gruppen gefunden ( $P < 0.001$ ; ANOVA) (Zhu L, *Hepatology* 2013; 57:601).

\*\*  $< 0.001$ ; Tukey's honest significance test

spiegel gezeigt. Dies ist angesichts der kontroversiell diskutierten Rolle niedriger Alkoholmengen bei NASH nach wie vor ein heißes Thema.

In dieser Arbeit wurde mit Kindern und Jugendlichen eine interessante Population betrachtet. Es wurde angenommen, Alkoholkonsum als möglichen Störfaktor damit weitgehend ausschließen zu können: Gesunde (BMI:  $20.4 \pm 0.1$ ; Alter:  $14.4 \pm 1.8$ ), Übergewichtige (BMI:  $33.4 \pm 0.3$ ; Alter:  $12.7 \pm 3.2$ ) und Kinder mit NASH (BMI:  $34.0 \pm 0.4$ ; Alter:  $13.6 \pm 3.5$  (!)). Hierbei wurden zwischen Gesunden und den beiden anderen Gruppen Unterschiede auf Phylum-, Familie- und spezifischer Genus-Ebene im Mikrobiom gefunden, wobei sich lediglich Proteobacteria, Enterobacteriaceae und Escherichia zwischen NAFLD und der Gruppe mit Übergewicht unterschieden. Jede der Gruppen konnte einem spezifischen Enterotyp, NASH-Mikrobiome häu-

figer dem Enterotyp 2 (*Prevotella* Typ; *Arumugam M, Nature 2011; 473:174*) zugeordnet werden.

Im Gegensatz zu Vorarbeiten (*Ley RE, PNAS 2005; 102:11070; Nature 2006; 444:1022; Turnbaugh PJ, Nature 2006, 457:480 u. a.*) waren Bacteroides in Übergewichtigen und NASH-Kindern stark erhöht und Firmicutes verringert. Actinobacteria und Proteobacteria zeigten sich in allen drei Gruppen unterschiedlich vertreten. Enterobacteriaceae und Escherichia sind (unter anderen) Alkohol-produzierende Bakterien, welche in der NASH-Gruppe stark vermehrt vertreten waren. In diesen Kindern/Jugendlichen konnte auch ein signifikant erhöhter Alkoholspiegel im peripheren (!) Blut (ca. 35 µMol; Abb. 5) nachgewiesen werden. Entsprechend einem eher „niedrig-gradig metabolischen Äthylismus“.

Die Rolle von Alkohol auf die Integrität der Tight-Junctions (z. B. *Gao B, AJP Gastr L 2011; 300:516*), sowie direkte toxische Leberzellschädigung und ROS Produktion ist gut dokumentiert (z. B. *Xu J, J Hepatol 2011; 55:673*). Dabei wurde bereits vor langem in-vitro gezeigt, dass 1 g E. coli in einer Stunde 0.8 g Ethanol produzieren (*Dawes EA, Biochim Biophys Acta 1956; 622: 253*). Bei etwa 1-2 Litern Colon-Inhalt könnte die endogene Alkoholproduktion zu einem wesentlichen „Hit“ in der NASH beitragen. In der vorliegenden Arbeit konnte aus ethischen Gründen selbstverständlich nur das periphere Blut für Surrogatmessungen herangezogen werden, was den Ethanolspiegel in der Portalvene nach bereits erfolgter Metabolisierung in der Leber natürlich nur indirekt reflektiert.

Mit der vorgestellten Arbeit kommt Ethanol als relevanter Metabolit in der NAFLD (erneut) ins Spiel. Einerseits wegen eines möglichen schädigenden

Mechanismus hinsichtlich der Darmintegrität, andererseits müssen sie hepatisch aus der systemischen Zirkulation metabolisiert werden und könnten dabei (zusätzliche) hepatotoxische Reize bedeuten (*Abu-Shanab A, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010; 7:691*). Somit scheinen mikrobielle Stoffwechselprodukte wie Ammoniak, Ethanol, Acetaldehyd, Phenole und Benzodiazepine wesentliche Einflussfaktoren auf Gesundheit und Krankheit darzustellen.

Im Gegensatz zu einer zusätzlich schädigenden Wirkung von Ethanol aus der Darmflora wurde von Risikoreduktion einer NAFLD-Progression durch moderaten Alkoholenuss (Definition in dieser Studie: < 20 g/Tag; < 3 Drinks an Alkohol konsumierenden Tagen; > 6 Gläser Alkohol > monatlich) berichtet. Die Odds-Ratio, eine NASH zu entwickeln, lag dabei sogar bei beeindruckend niedrigeren 0,56 (95% CI 0,39 – 0,84) im Vergleich zu Personen, die angaben, nie Alkohol zu trinken. Dies gilt auch für Fibrose und Ballonierung. Die Odds-Ratios sanken in dieser Arbeit sogar bei steigender Alkoholmenge innerhalb (!) der Bandbreite (< 1x wöchentlich: 0,54 [0,38-0,79] ≥ 2x wöchentlich: 0,24 [0,10-0,55] mit einer signifikanten dose-response [ $p < 0.0001$ ]) eines moderaten Alkoholkonsums weiter ab (*Dunn W, J Hepatol 2012; 57:384*). Ähnliche Ergebnisse, neben einer Risikoreduktion für kardiovaskuläre Erkrankungen (*King DE, Am J Med 2008; 121:201; Di Castelnuovo A, Arch Intern Med 2006; 166:2437*), zeigten weitere Arbeiten (z. B. *NHANES III*; bis zu 10 g/Tag; *Dunn W, Hepatology 2008; 47:1947*). Aufgrund des Querschnitts- und Assoziationscharakters dieser Arbeiten bleibt die direkte mechanistische Antwort und Empfehlung für unsere NAFLD-Patienten hinsichtlich Hepatotoxizität versus -protektion noch offen (*Liangpunsakul S, Chalasani N, Am J Gastroenterol 2012;*

107:976). Dabei spielt eine verbesserte Insulinsensitivität durch moderaten Alkoholenuss eine mögliche Rolle (z. B. *Howard AA, Ann Intern Med 2004; 140:211*). Die offiziell propagierte Harmlosigkeitsgrenze des österreichischen Gesundheitsministeriums liegt bei 16g Alkohol pro Tag für Frauen und 24g für Männer und orientiert sich dabei an den Empfehlungen des britischen Health Education Councils und der WHO (z. B. *Anderson P, WHO Regional Publications 1990; European Series, 32, Copenhagen*).

In der letzten zu besprechenden Arbeit (*siehe Abstract 3*) widmeten sich die Autoren der Fragestellung der direkten Analyse metabolischer Produkte der Darmflora aus dem Stuhl von Patienten mit NAFLD.

Um der Frage nach den direkten mikrobiellen Stoffwechselprodukten in unterschiedlichen Krankheitsentitäten gerecht zu werden, wurde in dieser Arbeit die Darmflora von gesunden Probanden (BMI <25; n=30; Alkoholkonsum < 20g/Tag) versus übergewichtigen (BMI > 30) NAFLD-Patienten (n=30) mittels Next-Generation Multi-tag 454 Pyrosequencing analysiert. Dabei wurden einerseits vermehrt Lactobacilli und Bakterien der Gruppe Firmicutes, andererseits mehr Ester in Einklang mit Zhu et al. (alle flüchtigen organischen Bakterienprodukte wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie/GC-MS analysiert) im Stuhl von NAFLD-Patienten nachgewiesen. Proteobacteria waren auch hier mit NAFLD assoziiert.

### Die Arbeiten im Kontext

Die vorgestellten Arbeiten geben die ersten (methodisch) modernen Einblicke in spezifische Zusammensetzungen und mögliche pathophysiologische Auswirkungen des Mikrobioms auf den

### 3. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with non-alcoholic fatty liver disease.

Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, et al.

Clin Gastroenterol Hepatol 2013, pii: S1542-3565(13)00272-3

Department of Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

**BACKGROUND AND AIMS:** The histopathology of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is similar to that of alcoholic liver disease. Colonic bacteria are a source of many metabolic products, including ethanol and other volatile organic compounds (VOC) that may have toxic effects on the human host after intestinal absorption and delivery to the liver via the portal vein.

Recent data suggest that the composition of the gut microbiota in obese human beings is different from that of healthy-weight individuals. The aim of this study was to compare the colonic microbiome and VOC metabolome of obese NAFLD patients (n = 30) with healthy controls (n = 30).

**METHODS:** Multitag pyrosequencing was used to characterize the fecal microbiota. Fecal VOC profiles were measured by gas chromatography-mass spectrometry.

**RESULTS:** There were statistically significant differences in liver biochemistry and metabolic parameters in NAFLD. Deep sequencing of the fecal microbiome revealed over-representation of Lactobacillus species and selected members of phylum Firmicutes (Lachnospiraceae; genera, Dorea, Robinsoniella, and Roseburia) in NAFLD patients, which was statistically significant. One member of phylum Firmicutes was under-represented significantly in the fecal microbiome of NAFLD patients (Ruminococcaceae; genus, Oscillibacter). Fecal VOC profiles of the 2 patient groups were different, with a significant increase in fecal ester compounds observed in NAFLD patients.

**CONCLUSIONS:** A significant increase in fecal ester VOC is associated with compositional shifts in the microbiome of obese NAFLD patients. These novel bacterial metabolomic and metagenomic factors are implicated in the etiology and complications of obesity.

Metabolismus beziehungsweise toxische Endprodukte bei NAFLD-Patienten. Gleichzeitig kann man aber deutlich die Ambiguität der Ergebnisse erkennen, die bereits aus Ergebnissen in der Fettleibigkeit und dem Diabetes bekannt sind. Hierbei stellen sowohl die höchst unterschiedlichen Studiendesigns, Gruppengrößen, bekanntermaßen hohe intra- und interindividuelle Unterschiede der Darmflora, möglicherweise nicht kontrollierte/kontrollierbare Einflussfaktoren (Bewegung, Umgebung, Ernährung), die Auswertungsmethoden auf unterschiedlichen Ebenen (Phylum, Familie, Genus; da Auswertungen auf oberen Ebenen gleichzeitige Genus-Anstiege und Abfälle im selben Phylum nicht erfassen würde), wie auch die unterschiedlichen zum Einsatz gekommenen Methoden zur Charakterisierung und Quantifizierung des Mikrobioms eine mögliche Grundlage für die Heterogenität der Ergebnisse dar (*rezente Methodenübersicht und Diskussion:*

*Fraber MH Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012; 9:312*). Lipopolysaccharide und Ethanol scheinen derzeit die wichtigsten negativen „Reize“ aus dem Mikrobiom in der NAFLD-Pathogenese und Progression zu sein.

Die besprochenen Arbeiten, wie auch eine vorläufig als Poster auf der EASL präsentierte Arbeit (*Ratzl V, EASL 2013:1363*), zeigen jedenfalls eine mögliche Bedeutung der Darmflora als prognostischen Risikomarker auf, was auch in (fernerer) Zukunft möglicherweise als zusätzlicher non-invasiver Marker in einem Panel neben dem Nash-Test und dergleichen diagnostische/prognostische Relevanz bekommen könnte. Als weiterer wesentlicher Punkt scheint neben einem spezifischen Mikrobiom die Diversität der mikrobiellen Zusammensetzung eine bedeutende Rolle zu spielen. Dabei konnte eine geringere Diversität im Zusammenhang mit Krankheitsverläufen ge-

bracht werden (*z. B. Eckburg PB, Science 2005; 308:1635*). Aktuell scheinen die Kosten für die Mikrobiomanalysen für den diagnostischen Einsatz bei „Volkserkrankungen“ wie der NAFLD jedenfalls noch zu hoch.

In einer weiteren rezenten Arbeit wurde die Bedeutsamkeit von äußeren Einflussfaktoren auf das Mikrobiom bei älteren Personen verdeutlicht (*Claesson MJ, Nature 2012; 488:178; ELDERMET Konsortium: <http://eldermet.ucc.ie>*). Hierbei unterschied sich die Darmflora wesentlich, je nachdem, ob sich die untersuchten älteren Personen vornehmlich zu Hause, in Tageskliniken, in Rehabilitationseinrichtungen oder im Altersheim aufhielten. Unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten haben einen wichtigen Einfluss, wobei Cholin und L-Carnitin (rotes Fleisch) (*Koeth RA, Nature Med 2013; 19:576*) in der Nahrung relevante Komponenten darstellen dürften (*Spencer MD, Gas-*

troenterology 2011; 40:976). Ein gefäß-toxischer Einfluss des Metaboliten Phosphatidylcholin (Lecithin) konnte ebenfalls rezent gezeigt werden (*Tang WH, NEJM 2013; 368:1575; Editorial: Loscalzo J, NEJM 2013; 368:1647; Wang Z, Nature 2011; 472:57*).

### (Noch) neuere Weiterentwicklungen in der Mikrobiom- und Gallensäuren-Forschung

Noch einen Schritt über die physiologisch wohl aussagekräftigere Darstellung der unterschiedlichen enzymatischen Funktionen des uns bevölkernden „Superorganismus“ geht die Gruppe aus Göteborg um Fredrik Bäckhed (derzeit noch) im Mausmodell nach, indem der Einfluss des Mikrobioms auf sekundäre Gallensäurezusammensetzung analysiert wurde. Interessanterweise beeinflusst auch das Darm-Mikrobiom den Stoffwechsel über bakterielle Dekonjugation und Dehydroxylierung mit der Bildung hydrophoberer sekundärer Gallensäuren. Keimfreie Tiere haben dadurch einen hydrophileren Gallensäurepool mit höherem Anteil von Tauro-Beta-Muricholsäure, einem natürlichen FXR-Antagonisten, welcher das FGF15 (Maus)/19(human)-Signalling (Abb. 2) aus dem Darm hemmt (*Sayin SI, Cell Metab 2013, 17:225*). Umgekehrt steigern Nahrungsfette (welche z. B. in der Milch enthalten sind) die Taurin-Konjugierung von Gallensäuren, was speziellen Bakterien (*Bilophila wadsworthia*) einen Überlebensvorteil verschafft. Durch die konsekutive Bildung toxischer Metabolite (z. B. H<sub>2</sub>S aus schwefelreichem Taurin) und Stimulation des Immunsystems wird eine Kolitis ausgelöst (*Devkota S, Nature 2012; 487:104*), was z. B. die lang bekannte As-

soziation zwischen Milchkonsum und CED erklären könnte.

Die metabolischen Effekte von Gallensäuren in Darm und Leber sind mittlerweile ebenfalls sehr gut charakterisiert. **Da Gallensäuresignalling (inklusive intestinaler Signale wie FGF15/19) in der Regulation des hepatischen Glukose- und Lipidstoffwechsels eine entscheidende Rolle spielt (Abb. 2), trägt seine metabolisch-regulatorische Funktion wesentlich zum Gleichgewicht in der NAFLD bei.** Darüber hinaus konnten bakteriostatische Wirkungen im Darm, wie auch inflammationsmodulierende Effekte in der Leber gezeigt werden (*Übersicht: Halilbasic E, J Hepatol 2013; 58:155*).

### Wohin geht die Reise?

Zusammengefasst zeigt die Mikrobiom-Forschung zusätzliche relevante und neue Wege für unser Verständnis der Pathogenese, Diagnose, Prognose und Therapie der NAFLD und metabolischer Erkrankungen auf. Vor kurzem gelang es Vrieze et al. (*Gastroenterology 2012; [Epub ahead of print]*) die Diversität des Mikrobioms von Übergewichtigen mittels Stuhltransplantation von Normalgewichtigen zu erhöhen und damit nach 6 Wochen eine verbesserte Insulinsensitivität zu erzielen. Offen bleiben bei derartigen Interventionen einige Fragen zur Langzeitwirkung – z. B., wie oft müssen diese Interventionen wiederholt werden, ist eine vorherige „Ablation“ mittels Breitband-Antibiose wirksamer (oder sogar schädlich), sind mögliche Nebenwirkungen zu bedenken („Cytokine Storm“ durch Stuhltransplantation – mögliche Induktion/Aggravation einer NASH

in vorbestehender NAFLD durch massive Inflammation?) und schlussendlich die Durchführbarkeit bzw. Entwicklung einfacherer Methoden (Stichwort: „Pille“ mit definiertem „gesunden“ Mikrobiom). Die zukünftige Mikrobiom/Metagenom- und Metabolom-Forschung wird höchstwahrscheinlich weitere Therapieoptionen durch Pro-, Prä- und Synbiotika, (synthetischen) Gallensäure(-Derivaten) in der Primär- und Sekundärprophylaxe mit sich bringen. Als mögliches Caveat hat die Arbeit von Zhu et al. gezeigt, dass pathogene Keime wie *Clostridium* über alle Gruppen gleich verteilt waren, welche „möglicherweise nur auf eine Intervention von außen warten“ (Stichwort: Antibiotika-assoziierte Kolitis), um einen (Über)Lebensvorteil zu erhalten.

Die beobachteten Unterschiede in der Darmflora von Gesunden, Fettleibigen und NAFLD/NASH-Patienten zeigen jedenfalls einen eindrucksvollen Zusammenhang zwischen dem Darm-Mikrobiom und Lebererkrankungen auf.

Diese Arbeit wurde durch Mittel des „Medizinisch-Wissenschaftlichen Fonds des Bürgermeisters der Bundeshauptstadt Wien“ (an Prof. Dr. Trauner) unterstützt.

Interessenskonflikte:

CK erhielt Reiseunterstützung von Yakult; MT: Keine.

**Univ. Ass. Ing. Mag.  
Dr. Christian Kienbacher  
Prof. Dr. Michael Trauner**

Klinische Abteilung für  
Gastroenterologie und Hepatologie  
Universitätsklinik für  
Innere Medizin III  
Medizinische Universität Wien  
christian.a.kienbacher@  
meduniwien.ac.at  
michael.trauner@meduniwien.ac.at