Nonalcoholic fatty liver disease

Citation for published version (APA):

De Munck, T. (2021). *Nonalcoholic fatty liver disease: exploring the role of extrahepatic pathophysiological factors*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.
<https://doi.org/10.26481/dis.20210531tm>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20210531tm](https://doi.org/10.26481/dis.20210531tm)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Despite extensive research worldwide, the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is still not completely understood. In the last two decades, it has become clear that NAFLD development and progression to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the result of multiple parallel factors acting synergistically. These factors include dietary habits, genetic predisposition, bile acid regulation, gut microbiome and disturbances in glucose and lipid metabolism and are commonly studied in the context of NAFLD. Since, NAFLD is believed to be part of systemic metabolic dysfunction, we studied the role of less investigated extrahepatic aspects (e.g. the gut, brown adipose tissue and muscle) in NAFLD development and progression.

NAFLD is frequently studied in patients with obesity undergoing bariatric surgery as NAFLD and NASH prevalence in this population is expected to be 91% and 37% respectively. In addition, a liver biopsy can safely be obtained during surgery to confirm the diagnosis. **Chapter 2** describes the liver and metabolic health of 20 bariatric patients. Unexpectedly, we found NAFLD in 65% of the patients and none of the patients had NASH. We hypothesized that the absence of NASH could be caused by the administration of the 4-week, food based, pre-operative low-calorie diet (so-called “crash diet”) in our cohort. This crash diet is routinely prescribed in most bariatric centres to decrease operation time and limit post-operative complications, however its effect on NAFLD severity is unclear yet. Due to the cross-sectional design of the study, lack of liver biopsy at baseline (before start crash diet) and limited number of patients the effect of a crash diet on liver health could not be investigated. Our findings do however support the concept that NAFLD is a highly dynamic disease which can fluctuate between NASH, simple steatosis and normal liver histology. Mechanistically, crash diet associated alterations in gut microbiome and intestinal permeability (IP) together with a negative energy balance may induce NASH remission. Therefore, we concluded that all pre-operative interventions need to be taken in account when researching NAFLD, as they may lead to bias in NAFLD biomarker and pathophysiology research.

In **chapter 3** we reviewed the current literature on *in vivo* intestinal permeability (IP) data in NAFLD patients. Fourteen studies investigating IP by means of urinary recovery of orally administered substances or serum zonulin in NAFLD patients were included. In general the number and quality of the included studies was low. Furthermore, thirteen studies focused on small intestinal permeability and none on colonic permeability. We demonstrated that small intestinal permeability was increased in NAFLD compared to healthy control subjects and appears to be positively associated with the degree of hepatic steatosis. Only six studies with a

low number of included subjects and substantial heterogeneity between studies compared IP between patients with simple steatosis and NASH. Consequently, the association between IP and the presence of NASH in NAFLD patients is unclear. In line, based on the limited amount of data, no association between IP and the presence of hepatic inflammation or fibrosis was observed.

In **chapter 4** we studied *in vivo* site-specific IP in NAFLD patients and healthy control subjects. Site-specific (gastroduodenal, small intestinal, colonic and whole gut) IP was assessed by means of a validated multi-sugar test. In addition, dietary composition (food frequency questionnaire), systemic inflammatory markers and the degree of hepatic steatosis (magnetic resonance imaging) and fibrosis (transient elastography) were analysed in all these NAFLD patients. In total, fifty-two NAFLD patients and forty-six healthy control subjects were included in this study. In this cross-sectional study small intestinal, colonic and whole gut permeability were increased in NAFLD patients compared to healthy control subjects. As hepatic fibrosis is the most important risk factor of liver-related mortality we compared site-specific IP between NAFLD patients with significant fibrosis ($n = 31$) and without significant fibrosis ($n = 15$). After adjustment for age, sex and BMI colonic permeability was observed to be increased in NAFLD patients with significant fibrosis compared to NAFLD patients without fibrosis. Finally, in this study, no association between IP and the degree of hepatic steatosis, dietary composition and systemic inflammatory parameters was observed.

The interplay between adipose tissue and liver, the so-called adipose tissue-liver axis, was studied in **chapter 5-7**. Brown adipose tissue (BAT) has the capacity to use exogenous glucose and fatty acids to generate heat and might be a beneficial mediator in the development and treatment of NAFLD. In addition, BAT secretes regulatory molecules - also called “batokines” that might target the liver. In **chapter 5** we assessed molecular changes in BAT during the development and the dietary and surgical treatment of NASH. This longitudinal study is not feasible in NAFLD patients because a surgical intervention is needed to obtain BAT. Therefore, we performed this study in a NASH mouse model in which male C57BL/6J mice develop the complete spectrum of NASH after 12 weeks high fat-high sucrose diet (HF-HSD). Interestingly, we observed an increased expression of genes related to lipid metabolism and energy expenditure in BAT after only 4 weeks HF-HSD compared to 4 weeks normal chow diet (NCD). At this timepoint, HF-HSD mice did not have any sign of NAFLD. In the presence of NASH after 20 weeks HF-HSD, no difference in gene expression regarding lipid metabolism or energy expenditure in BAT was observed anymore compared to 20 weeks NCD mice (no NASH). Finally, we observed a significant decrease in BAT gene expression of the *batokine* neuregulin 4 (Nrg4) after 20 weeks HF-HSD compared with NCD. BAT Nrg4 gene expression was restored by dietary intervention and Roux-en-Y

gastric bypass (RYGB). The result of this study shows that BAT is hallmarked by dynamic alterations in the gene expression profile during the development and treatment of NASH.

Pre-clinical studies in mice point to a protective role of Nrg4 for the development and progression of NAFLD. Based on these studies Nrg4 was observed to limit insulin resistance, to negatively regulate hepatic de novo lipogenesis and to limit NAFLD progression to NASH and hepatic fibrosis. Similar, Nrg4 was decreased in the occurrence of NASH in our mouse model. Therefore, in **chapter 6** we translated these findings to humans by investigating circulating Nrg4 levels in NAFLD patients compared to healthy control subjects. In this study we did not find any association between circulating Nrg4 levels and NAFLD presence or severity. Furthermore, circulating Nrg4 levels were not different between NAFLD patients with or without type 2 diabetes and were not correlated with circulating pro-inflammatory cytokines. In addition, liver and visceral adipose tissue (VAT) of fifteen obese patients was collected during bariatric surgery. In this study group, microarray analyses of 82 genes related to the Nrg4-ErbB signalling pathway in liver and VAT was performed. None of these genes were significantly different between obese patients with normal liver histology, simple steatosis and NASH. Therefore, our study findings do not support the pre-clinical finding that Nrg4 deficiency associates with increased hepatic lipogenesis and NAFLD progression.

In **chapter 7** we quantified the muscle fat fraction as a measure for myosteatorsis, by chemical shift MRI in NAFLD patients. Myosteatorsis is believed to be a precursor of insulin resistance, which plays a key role in the complex pathophysiology of NAFLD. Therefore, myosteatorsis might be an early manifestation of NAFLD disease progression. In this study we investigated the association between the degree of myosteatorsis and NAFLD related hepatic and systemic variable. We did not observe any association between the muscle fat fraction and the degree of hepatic steatorsis, fibrosis or insulin sensitivity. As an MRI cannot discriminate between intermyocellular-intrafascial adipose tissue and intramyocellular lipid (IMCL) accumulation, and IMCL is believed to be more crucial for insulin resistance development, this may have influenced our results.

In **chapter 8**, the main findings of this thesis were presented and new insights and future perspectives in the field of NAFLD research were discussed. NAFLD is believed to be part of systemic metabolic dysfunction and therefore a change in nomenclature to metabolic associated fatty liver (MAFLD) has been proposed. In line, studies investigating the role of numerous extrahepatic factors, such as the gut, BAT and muscle, in NAFLD development and progression are needed.

Samenvatting

Ondanks veelvuldig onderzoek is de pathogenese van niet-alcoholische leververvetting (NAFLD) nog steeds niet volledig begrepen. In de afgelopen twee decennia is het duidelijk geworden dat de ontwikkeling van NAFLD en de progressie naar niet-alcoholische steatohepatitis (NASH) het resultaat is van meerdere parallel aan elkaar lopende factoren die synergetisch werken. Factoren die vaak worden bestudeerd in de context van NAFLD zijn voedingsgewoonten, genetische aanleg, galzuurregulatie, het microbioom van de darm en verstoringen in suiker- en vetstofwisseling. Er wordt aangenomen dat NAFLD deel uitmaakt van een systemische metabole disfunctie. Daarom hebben wij in deze thesis de rol van minder onderzochte extrahepatische aspecten (bijv. de darm, bruin vetweefsel en spieren) in de ontwikkeling en progressie van NAFLD bestudeerd.

De prevalentie van NAFLD en NASH bij patiënten met obesitas die bariatrische chirurgie ondergaan wordt geschat op respectievelijk 91% en 37%. Daarom wordt NAFLD vaak onderzocht bij patiënten uit deze populatie. Bovendien kan tijdens de operatie veilig een leverbiopsie worden verkregen om de diagnose te bevestigen. **Hoofdstuk 2** beschrijft de metabole en hepatische gezondheid van 20 bariatrische patiënten. Onverwacht werd de diagnose NAFLD maar gesteld bij 65% van deze patiënten en geen van de patiënten had NASH. Onze hypothese is dat de afwezigheid van NASH in onze studie zou kunnen worden verklaard door de toepassing van het 4 weken durende caloriearme dieet (het zogenaamde “crashdieet”) voor de operatie. Dit crashdieet wordt routinematig voorgeschreven in de meeste bariatrische centra om de operatietijd te verkorten en het risico op postoperatieve complicaties te beperken. Het effect hiervan op de ernst van NAFLD is echter nog onduidelijk. Vanwege de cross-sectionele opzet van het onderzoek, het ontbreken van een leverbiopsie vóór aanvang van het crashdieet, en het beperkte aantal patiënten kon het effect van een crashdieet op de lever niet worden onderzocht. Onze bevindingen ondersteunen echter het concept dat NAFLD een zeer dynamische ziekte is welke kan fluctueren tussen NASH, leververvetting zonder ontsteking en normale leverhistologie. Crashdieet-gerelateerde veranderingen in onder anderen de intestinale permeabiliteit (IP) samen met de sterk verminderde calorie-inname kunnen bijdragen aan NASH remissie op korte termijn. Daarom concludeerden we dat bij het onderzoek naar NAFLD in de bariatrische populatie rekening moet worden gehouden met alle preoperatieve interventies. Preoperatieve interventies kunnen namelijk de uitkomsten van NAFLD biomarker studies en pathofysiologisch onderzoek beïnvloeden.

In **hoofdstuk 3** bespreken we de huidige literatuur met betrekking tot *in vivo* intestinale permeabiliteit (IP) bij NAFLD patiënten. Er werden veertien onderzoeken

geïnccludeerd die de IP analyseerde bij NAFLD patiënten door het meten van de uitscheiding van oraal toegediende stoffen in de urine of door het analyseren van zonuline concentraties in het bloedserum. Over het algemeen bleek het aantal en de kwaliteit van de geïnccludeerde onderzoeken laag. Bovendien waren dertien studies gericht op de permeabiliteit van de dunne darm en geen enkele op de permeabiliteit van de dikke darm. We toonden aan dat de permeabiliteit van de dunne darm verhoogd is in NAFLD patiënten in vergelijking met gezonde personen. Daarnaast vonden we een positieve associatie tussen de hoeveelheid leververvetting en de permeabiliteit van de dunne darm. Slechts zes onderzoeken met een laag aantal proefpersonen en met een substantiële heterogeniteit onderling vergeleken de IP tussen patiënten met eenvoudige steatose en NASH. Als gevolg hiervan is het verband tussen de IP en de aanwezigheid van NASH bij NAFLD patiënten onduidelijk. Op basis van de beperkte hoeveelheid gegevens werd er geen verband tussen de IP en de aanwezigheid van leverontsteking of leverfibrose waargenomen.

In **hoofdstuk 4** werd een gevalideerde multi-suiker test gebruikt om de gastroduodenale, dunne darm-, colon- en de volledige maagdarm-permeabiliteit te onderzoeken in NAFLD patiënten en gezonde controlepersonen. Daarnaast werd bij alle NAFLD patiënten de voedingssamenstelling (voedselfrequentievragenlijst), systemische ontsteking markers en de mate van leververvetting (Magnetic Resonance Imaging (MRI)) en fibrose (transiënte elastografie) geanalyseerd. In totaal werden tweeënvijftig NAFLD patiënten en zesenvestig gezonde personen in deze studie geïnccludeerd. In dit cross-sectionele onderzoek was de permeabiliteit van de dunne darm, de dikke darm en de gehele darm verhoogd bij NAFLD patiënten in vergelijking met gezonde controlepersonen. Omdat leverfibrose de belangrijkste risicofactor is voor lever-gerelateerde sterfte, hebben we de IP tussen NAFLD patiënten met significante fibrose ($n = 31$) en zonder significante fibrose ($n = 15$) vergeleken. Na correctie voor leeftijd, geslacht en BMI werd een verhoogde colonpermeabiliteit waargenomen bij NAFLD patiënten met significante fibrose in vergelijking met NAFLD patiënten zonder fibrose. Ten slotte werd in deze studie geen verband waargenomen tussen de IP en de mate van leververvetting, voedingssamenstelling en systemische ontstekingsparameters.

De wisselwerking tussen vetweefsel en de lever, de zogenaamde vetweefsel-lever as, wordt bestudeerd in **hoofdstuk 5-7**. Bruin vetweefsel (BAT) heeft het vermogen om suiker en vetzuren te gebruiken om warmte te genereren en zou een gunstige factor kunnen zijn bij de ontwikkeling en behandeling van NAFLD. Bovendien scheidt BAT regulerende moleculen af, ook wel "batokines" genoemd, die de lever zouden kunnen beïnvloeden. In **hoofdstuk 5** hebben we moleculaire veranderingen in BAT onderzocht tijdens de ontwikkeling en behandeling (dieet of bariatrische ingreep) van NASH. Deze longitudinale studie was niet haalbaar bij

NAFLD patiënten omdat een chirurgische ingreep nodig is om BAT te verkrijgen. Daarom hebben we deze studie uitgevoerd bij muizen waarin mannelijke C57BL/6J muizen het volledige spectrum van NASH ontwikkelen na 12 weken vetrijk en sucroserijk dieet (HF-HSD). We vonden een verhoogde expressie van genen gerelateerd aan de vetstofwisseling en energieverbruik in BAT na slechts 4 weken HF-HSD in vergelijking met 4 weken normaal voer (NCD). Op dit tijdstip hadden HF-HSD muizen geen enkel teken van NAFLD. Genexpressie gerelateerd aan de vetstofwisseling of energieverbruik in BAT was niet verschillend tussen muizen met NASH (na 20 weken HF-HSD) en muizen zonder NASH (na 20 weken NCD). Ten slotte zagen we een significante afname in BAT genexpressie van het batokine neureguline 4 (Nrg4) na 20 weken HF-HSD in vergelijking met NCD. BAT Nrg4-genexpressie werd hersteld door middel van een dieetinterventie of een bariatrische ingreep. Het resultaat van deze studie laat zien dat BAT wordt gekenmerkt door dynamische veranderingen in het genexpressieprofiel tijdens de ontwikkeling en behandeling van NASH.

Preklinische studies bij muizen wijzen op een beschermende rol van Nrg4 in de ontwikkeling en progressie van NAFLD. Op basis van deze studies werd gesuggereerd dat Nrg4 insulineresistentie beperkt, lipogenese in de lever negatief reguleert en progressie van NAFLD naar NASH en leverfibrose verminderd. Daarom hebben we in **hoofdstuk 6** deze bevindingen naar mensen proberen te vertalen door circulerende Nrg4 waardes bij NAFLD patiënten te onderzoeken en te vergelijken met gezonde personen. In deze studie hebben we geen verband gevonden tussen circulerende Nrg4 waardes en de aanwezigheid of ernst van NAFLD. Bovendien waren circulerende Nrg4 waardes niet verschillend tussen NAFLD patiënten met of zonder type 2 Diabetes Mellitus. Daarnaast werd leverweefsel en visceraal vetweefsel (VAT) van vijftien patiënten met obesitas verzameld tijdens een bariatrische ingreep. In deze studiegroep werd een microarray-analyse uitgevoerd van 82 genen gerelateerd aan de Nrg4-ErbB-signaleringsroute in leverweefsel en VAT. Geen van deze genen was significant verschillend tussen obese patiënten met een normale leverhistologie, leververvetting zonder ontsteking en NASH. De preklinische bevinding dat Nrg4 deficiëntie geassocieerd is met een verhoogde lipogenese in de lever en NAFLD progressie werden dan ook niet ondersteund door onze bevindingen.

In **hoofdstuk 7** analyseerde we de hoeveelheid spiervetvetting (of myosteatoze) door middel van MRI bij NAFLD patiënten. Uit onderzoek blijkt dat spiervetvetting een belangrijke rol kan spelen bij het ontstaan van insulineresistentie, welke een sleutelrol heeft in de complexe pathofysiologie van NAFLD. Daarom kan spiervetvetting een vroege manifestatie zijn van NAFLD progressie. In deze studie onderzochten we de associatie tussen de mate van spiervetvetting en NAFLD gerelateerde hepatische en systemische factoren. We zagen geen

verband tussen de mate van spiervetvetting en de mate van levervetvetting, leverfibrose of insulinegevoeligheid. Een beperking van MRI als meetinstrument voor spiervetvetting is dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen intermyocellulair-intrafasciaal vetweefsel of intramyocellulaire lipide (IMCL) accumulatie. Aangezien en er wordt aangenomen dat met name IMCL cruciaal is voor de ontwikkeling van insulineresistentie kan dit onze resultaten hebben beïnvloed.

In **Hoofdstuk 8** werden de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift gepresenteerd en werden nieuwe inzichten en toekomstperspectieven op het gebied van NAFLD onderzoek besproken. Aangenomen wordt dat NAFLD deel uitmaakt van systemische metabole disfunctie. Derhalve werd reeds een wijziging van de nomenclatuur naar metabole geassocieerde levervetvetting (MAFLD) voorgesteld door een internationaal groep van experts. Er zijn dan ook meer studies nodig die de rol van talrijke extrahepatische factoren bij de ontwikkeling en progressie van NAFLD onderzoeken.