

Is the gut the key to obesity?

Citation for published version (APA):

Verdam, F. J. (2012). *Is the gut the key to obesity? the involvement of the intestine in obesity, type 2 diabetes mellitus and fatty liver disease in man*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2012

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Document license:

Unspecified

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.

9.1 SUMMARY

This thesis focuses on the role of factors related to the intestine in human obesity and its comorbidity. The introduction emphasizes the extent of the epidemic of obesity, type 2 diabetes mellitus (T₂DM), and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Chapter 1** also provides an overview on current treatment options for severe obesity and an update of the literature on the putative role of the intestine in obesity. Various methods to assess intestinal permeability are reviewed in **Chapter 2**. Intestinal permeability can be either assessed directly, for example by means of protein or sugar-based tests, or indirectly, for example by measuring the extent of bacterial translocation, or antibodies against bacterial components.

Intestinal permeability of various parts of the gastrointestinal tract was then assessed by means of a multi-sugar mixture in obese and lean individuals, as described in **Chapter 3**. Gastroduodenal permeability was found to be increased in obesity. In line with previous reports, the microbiota composition in obesity was characterized by an increased Firmicutes/Bacteroidetes ratio. Interestingly, a positive relation between microbiota composition and markers for intestinal and systemic inflammation was observed, implying that the microbiota inhabiting the intestine in obesity might have a pro-inflammatory effect. This is supported by animal studies showing that a shift towards a 'lean microbiota profile' by means of pro- or prebiotic administration induces diminished bacterial translocation and subsequent inflammatory tone.

Microbiota composition is known to be regulated by Paneth cells by secretion of antimicrobial peptides. Interestingly, it was previously reported that mice deficient for one of these peptides have a microbiota composition similar to that observed in obesity (in **Chapter 3**). Therefore, Paneth cell characteristics were investigated in **Chapter 4**. A reduced number of bactericidal peptides was observed in Paneth cells of obese subjects. In spite of these lowered protein levels, gene expression levels were upregulated. This phenomenon has been associated with a cellular stress response related to the endoplasmic reticulum (ER). The presence of this stress response in the small intestine of obese subjects could indeed be confirmed both at the protein level and by means of electron microscopy.

The second part of this thesis describes the potential association between the comorbidity of obesity and factors related to the intestine. Literature data show that rats with T2DM have an increased intestinal cell mass, longer villi, and mucosal hypertrophy. Therefore in **Chapter 5**, plasma markers for intestinal cell mass and turnover were investigated in the context of human T2DM. These markers showed an increased enterocyte mass, enterocyte loss and turnover in subjects with obesity-induced diabetes. Moreover, these parameters were positively related to the extent of chronic hyperglycemia.

In **Chapter 6** NAFLD, another comorbidity of obesity, is investigated. NAFLD ranges from from hepatic steatosis, which is considered to be benign, to more severe stages such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Based upon the fact that hepatic inflammation in obese mice is related to enhanced intestinal permeability and increased levels of microbial compounds (lipopolysaccharide, LPS) in the portal vein, we investigated the potential involvement of LPS in human NASH in **Chapter 6**. Since measuring relatively low plasma levels of LPS is notoriously challenging and easily confounded by β -glucans derived from the liver, we measured systemic antibodies to LPS. These antibody titers were observed to be higher in obese subjects with NASH compared to obese subjects with healthy livers. This strongly suggests that hepatic endotoxin exposure, as reflected by increased systemic antibody levels to LPS, plays a role in the development of human NASH.

Histological scoring of a liver biopsy is currently the gold standard to diagnose NAFLD and NASH; there is an evident need for less invasive diagnostic methods. Previous studies illustrated that NASH is characterized by accumulation of oxidative products, production of chemokines, and hepatic infiltration and activation of neutrophils. Since inflammatory compounds have also been shown to be detectable in exhaled air, we investigated the feasibility of analyzing exhaled air as a diagnostic instrument to predict the absence or presence of NASH (**Chapter 7**). A panel of three volatile organic compounds was shown to accurately reflect the presence of hepatic inflammation. These data first need to be confirmed in a larger cohort, but could lead to less invasive screening in high risk populations for NASH, and contribute to an earlier identification of NASH.

In **Chapter 8**, all findings are placed in the context of the current literature and future research lines are provided. Overall, this thesis emphasizes two important aspects: microbiota composition, Paneth cells, and intestinal and systemic inflammation are involved in obesity. Secondly, intestinal epithelial proliferation is likely to play a role in the postprandial increased glucose levels in obesity-induced diabetes, and bacterial compounds may well play a role in the pathogenesis of human NASH.

9.2 SOMMAIRE

Cette thèse s'est concentrée sur le rôle des facteurs intestinaux dans la genèse de l'obésité et des troubles associés tels le diabète de type 2 (T2DM) et la stéatose hépatique non alcoolique, dont l'ampleur épidémique est soulignée dans le **Chapitre 1**. Il décrit aussi les traitements possibles de l'obésité sévère puis présente des données récentes chez l'animal comme chez l'homme montrant l'implication de l'intestin dans le développement de l'obésité.

La genèse de cette pathologie semble être ainsi associée à une augmentation de la perméabilité intestinale, dont plusieurs méthodes d'évaluation sont décrites dans le **Chapitre 2**. En effet, la perméabilité intestinale peut être évaluée soit directement au moyen de sucres ou de protéines, soit indirectement en mesurant par exemple l'étendue de la translocation bactérienne ou des anticorps contre des composés d'origine bactérienne.

Au cours de nos expériences décrites au **Chapitre 3**, la perméabilité intestinale du tractus gastro-intestinal fut évaluée au moyen d'un mélange de plusieurs sucres dans une population de patients minces et obèses. Nous avons pu observer que les patients obèses montraient une perméabilité gastroduodénale accrue et une modification de la flore intestinale caractérisée par une augmentation du ratio Firmicutes / Bactéroïdètes, en accord avec des études précédemment publiées. Nos expériences ont également pu mettre en évidence qu'une relation existait entre la composition de la flore intestinale et des marqueurs de l'inflammation locale mais aussi systémique. Ces résultats suggèrent que des changements de composition de la flore peuvent induire une réponse inflammatoire intestinale au cours de l'obésité. Il a été montré chez des animaux obèses qu'une normalisation de la flore bactérienne altérée réduisait la translocation bactérienne mais aussi le développement d'une réponse inflammatoire.

Le **Chapitre 4** présente la fonction des cellules de Paneth chez l'homme. Ces cellules régulent la composition de la flore en sécrétant des peptides antimicrobiens. L'importance de leurs rôles dans le maintien de la flore intestinale a été confirmée par des études récentes montrant que des souris déficientes en au moins un de ces

peptides présentait une modification de la flore intestinale similaire à celle observée au cours de l'obésité au **Chapitre 3**. Nous avons pu observer que ces cellules chez les patients obèses contenaient moins de peptides bactéricides malgré des niveaux augmentés de leurs expressions géniques. Ce phénomène était associé à un stress du réticulum endoplasmique, une structure cellulaire constituée de tubules, de vésicules et de citernes, responsable de la synthèse des protéines. Cette modification cellulaire au niveau de l'intestin grêle des patients obèses fut confirmée par des observations en microscopie électronique mais aussi par des mesures d'expression protéique.

La deuxième partie de cette thèse décrit la relation entre les troubles associés à l'obésité et des facteurs de risques intestinaux. Des études précédentes ont montré que des rats diabétiques de type 2 présentaient une augmentation de la masse du tissu intestinal, caractérisée par une augmentation du nombre des villosités et une hypertrophie de la muqueuse. Le **Chapitre 5** détaille les résultats des mesures de concentrations de marqueurs plasmatiques associés à la perte ainsi qu'au renouvellement des cellules absorbantes intestinales dans le contexte du diabète de type 2 humain. Les patients obèses et diabétiques présentaient une muqueuse plus abondante caractérisée par une augmentation simultanée de la perte et de renouvellement des entérocytes, phénomène non observé chez les gens obèses mais non diabétiques. Ces marqueurs intestinaux étaient de plus positivement corrélés à une hyperglycémie chronique.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à un autre trouble associé à l'obésité décrit au cours du **Chapitre 6**, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). Les premiers stades de cette pathologie du foie sont caractérisés par une stéatose et considérés comme bénins, mais peuvent progresser jusqu'à des stades plus sévères tels que la stéato-hépatite non alcoolique (NASH). Observée chez des souris obèses, l'inflammation hépatique semble être liée à l'augmentation de la perméabilité intestinale résultante probablement d'une modification des jonctions serrées, et des niveaux accrus d'une endotoxine d'origine bactérienne, le lipopolysaccharide (LPS), dans la veine porte. **Chapitre 6** résume donc notre volonté de comprendre l'implication potentielle du LPS dans la NASH humaine. Nous avons choisi de mesurer

les anticorps systémiques dirigés contre le LPS car sa mesure directe très sensible est perturbée par la présence de bêta-glucanes dérivés du foie. Les anticorps dirigés contre le LPS étaient plus élevés chez les patients obèses présentant une stéato-hépatite non alcoolique en comparaison avec les niveaux mesurés chez les patients obèses avec des foies sains. Ces résultats suggèrent que l'exposition hépatique aux endotoxines joue un rôle dans le développement des stéato-hépatites non alcooliques chez l'homme.

Les stéatoses hépatiques non alcooliques et stéato-hépatites non alcooliques sont actuellement diagnostiquées par des scores histologiques de biopsies du foie, et il semblait nécessaire de mettre au point une méthode moins invasive. De précédentes études ont montré que la stéato-hépatite non alcoolique est associée à une inflammation hépatique caractérisée par l'accumulation de produits d'oxydation, la production de chimiokines et l'activation des neutrophiles. Comme des composés inflammatoires sont également détectables dans l'air expiré, nous avons étudié la faisabilité de l'analyse de l'air expiré comme un outil de diagnostic pour prédire la présence d'une stéato-hépatite non alcoolique (**Chapitre 7**). Les composés organiques volatils pourraient ainsi refléter la présence d'inflammation hépatique et permettre une détection précoce de la maladie. Ces données doivent néanmoins être confirmées sur une plus grande population.

Dans le **Chapitre 8**, l'ensemble des résultats fut replacé dans le contexte de la littérature actuelle, dans le but de discuter l'orientation de futures recherches. Premièrement, cette thèse met l'accent sur l'importance de la composition de la flore intestinale, la fonction des cellules de Paneth, et l'inflammation systémique au cours du développement de l'obésité. Dans un second temps, il a pu être mis en évidence que le renouvellement de l'épithélium intestinal est important au cours de l'obésité associée au diabète, pouvant jouer un rôle notamment dans l'élévation des niveaux de glucose postprandiale. Finalement, le rôle prépondérant des endotoxines bactériennes fut démontré dans la genèse des stéato-hépatites non alcooliques chez l'homme.

9.3 NEDERLANDSE SAMENVATTING

Overgewicht en obesitas worden geclassificeerd middels de internationaal erkende standaard 'Body Mass Index' (BMI, het aantal kilogram gedeeld door lengte in meter in het kwadraat), een begrip dat in de 19e eeuw geïntroduceerd werd door de Belgische statisticus Adolphe Quételet. Bij het Kaukasische ras spreken we van overgewicht vanaf een BMI van 25kg/m^2 of meer en van ernstig overgewicht of obesitas vanaf een BMI van 30kg/m^2 .

Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie zijn er naar schatting in 2015 ruim twee miljard volwassenen met overgewicht en ruim 700 miljoen met obesitas, men spreekt van een zogenaamde pandemie (wereldwijde epidemie). In Nederland heeft ruim de helft van de mensen overgewicht en het aantal mensen met obesitas is de afgelopen drie decennia verdubbeld. De provincie Limburg kent de hoogste incidentie van obesitas (ruim 13% in 2008-2009 volgens het Centraal Bureau van de Statistiek).

In de inleiding van dit proefschrift (**Hoofdstuk 1**) wordt de omvang en de ernst beschreven van de overgewicht-epidemie en van de aandoeningen die gepaard gaan met overgewicht. Deze aandoeningen, bijvoorbeeld diabetes type 2 (T2DM) en niet-alcoholische vette leverziekte (NAFLD), worden ook wel co-morbiditeiten genoemd. T2DM wordt gekenmerkt door verhoogde glucosewaarden in het bloed ten gevolge van een toegenomen glucoseproductie door de lever en verminderde opname van glucose in de weefsels. Een chronisch verhoogde bloedglucosewaarde kan onder meer leiden tot bloedvatafwijkingen, blindheid en voetproblemen zoals infecties en misvormingen. Bovendien gaat dit vaak samen met een verstoring van het vetmetabolisme en met de ontwikkeling van de leverziekte NAFLD. Deze aandoening kan variëren van relatief onschuldige vervetting tot ernstige ontsteking van de lever, die op haar beurt weer kan resulteren in het ontwikkelen van leverfalen en leverkanker.

In **Hoofdstuk 1** wordt ook ingegaan op de behandelingsmogelijkheden voor obesitas en op de huidige literatuur over de vermeende rol van de darm. Belangrijke functies van de darm zijn enerzijds de absorptie van vocht en de opname en vertering van

voeding. Anderzijds vormt de darmwand de barrière tussen het lumen van de darm (het externe milieu) en de bloedbaan (het interne milieu). Deze barrière is essentieel om de gastheer te beschermen tegen de invasie van potentieel schadelijke stoffen, zoals toxinen, bacteriën en virussen. In proefdieren is aangetoond dat een verhoogde darmwand-doorgankelijkheid, een verhoogde passage van bacteriële producten door de darmwand en een veranderde darmflora een rol spelen bij de ontwikkeling van overgewicht.

In **Hoofdstuk 2** worden verschillende testen beschreven die een indicatie geven van de doorgankelijkheid van de darmwand. Deze doorgankelijkheid kan gekwantificeerd worden met behulp van directe en indirecte methoden. Een voorbeeld van een directe methode is het bepalen van de doorlaatbaarheid van de darmwand voor specifieke suikers of eiwitten. Een indirecte methode is bijvoorbeeld het meten van de hoeveelheid antilichamen gericht tegen bacteriële producten in het bloed. Aansluitend wordt in **Hoofdstuk 3** bij proefpersonen met en zonder overgewicht de doorgankelijkheid van verschillende delen van het maag-darmstelsel gerapporteerd. Deze doorgankelijkheid, gemeten met een suikertest, bleek in vergelijking met slanke proefpersonen bij mensen met ernstig overgewicht verhoogd voor wat betreft de maag en de twaalfvingerige darm.

In dierstudies zijn aanwijzingen gevonden dat de doorgankelijkheid van de darmwand beïnvloed wordt door de darmflora. Met de term darmflora worden de micro-organismen (voornamelijk bacteriën) bedoeld die zich in het maag-darmstelsel bevinden. De humane darmflora bestaat met name uit twee groepen bacteriën; de Firmicutes en de Bacteroidetes. Gebaseerd op bevindingen van een verhoogde darmwand-doorgankelijkheid en een veranderde darmflora bij dieren met overgewicht, onderzochten we bij proefpersonen de bacteriële samenstelling in de ontlasting. Mensen met ernstig overgewicht bleken een karakteristieke darmflora te hebben, die gekenmerkt wordt door een veranderde verhouding tussen Firmicutes en Bacteroidetes. In de ontlasting van deze mensen werden meer Firmicutes ten opzichte van Bacteroidetes aangetroffen. Dit komt overeen met resultaten uit andere humane studies en werd bovendien gesterkt doordat we ook een verband vonden tussen de verhouding van deze bacteriën en de BMI.

Aansluitend bepaalden we de hoeveelheid calprotectine, een eiwit dat geproduceerd wordt door witte bloedcellen, in de ontlasting. In het geval van ontsteking reageren witte bloedcellen door calprotectine uit te scheiden. Het gehalte calprotectine in de ontlasting wordt daarom beschouwd als een maat voor de ernst van ontsteking in de darm. In **Hoofdstuk 3** werden met name bij die mensen aanwijzingen voor ontsteking gevonden, die gekarakteriseerd werden door een verhoogde verhouding van Firmicutes ten opzichte van Bacteroidetes in de flora. Dit suggereert dat het hebben van obesitas en van een darmflora zoals die in obese mensen wordt gevonden, samengaat met de aanwezigheid van ontsteking in de darm.

Tenslotte werd ook in het bloed het gehalte van een eiwit gemeten dat de mate van ontsteking weergeeft (C-reactief proteïne ofwel CRP). Er bleek ook een verband te bestaan tussen enerzijds de hoeveelheid CRP in het bloed en anderzijds de verhouding van Firmicutes ten opzichte van Bacteroidetes. De darmflora van mensen met obesitas lijkt zowel samen te gaan met de aanwezigheid van lokale ontsteking (in de darm) als met algehele ontsteking (in het bloed). Dit is van belang omdat in muizen is aangetoond dat de co-morbiditeiten van obesitas zich ontwikkelen in aanwezigheid van systemische ontsteking. Bovendien bleek recent dat de ernst van deze ontsteking teruggedrongen kan worden door beïnvloeding van de darmflora met zogenaamde pre- of probiotica in muizen. Toekomstig onderzoek moet uitwijzen of dit bij mensen ook mogelijk is.

Zoals hierboven beschreven is de darmflora veranderd in dieren en mensen met obesitas. Omdat de zogenaamde Panethcellen in de darm een grote invloed hebben op de samenstelling van de darmflora, was het onderzoeken van deze cellen een logische volgende stap. Panethcellen zijn gelokaliseerd in de crypten van de dunne darm en produceren bacterie-dodende ofwel antimicrobiële eiwitten. Deze eiwitten spelen een rol in de bescherming van de gastheer tegen de bacteriën die zich in het lumen van de darm bevinden. De Panethcellen van obese patiënten bleken minder antimicrobiële eiwitten te bevatten, zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**. De oorzaak hiervan zou gelegen kunnen zijn in een verstoring van de functie van het Endoplasmatisch Reticulum (ER). Het ER waarborgt de correcte aanmaak van eiwitten in een cel. Onder meer door middel van elektronenmicroscopie zagen we dat

de functie van het ER in Panethcellen van obese patiënten verstoord was, dit wordt ook wel ER stress genoemd. Omdat er een verband werd gevonden werd tussen enerzijds deze verstoorde functie en anderzijds de hoeveelheid antimicrobiële eiwitten, is het aannemelijk dat een oorzaak van het lagere eiwitgehalte in obese proefpersonen gelegen is in de verminderde functie van het ER van Panethcellen.

In proefdieren met overgewicht en in proefdieren met T2DM zijn kwantitatieve en kwalitatieve veranderingen in de darmflora beschreven. Bovendien bevat het bloed van muizen die T2DM ontwikkelen naar aanleiding van het consumeren van een vetrijk dieet, een hogere concentratie bacteriële producten. Deze producten zijn oorspronkelijk afkomstig uit het darmlumen. Daarnaast hebben ratten met T2DM langere darmvlokken, meer en grotere dunne darmcellen, en grotere cellen in de crypten van de dunne darm. Op basis van deze resultaten uit dierstudies werd de darmmassa en het verlies van darmcellen in obese mensen met en zonder T2DM onderzocht (**Hoofdstuk 5**). Obese personen met T2DM bleken -in vergelijking met obese personen zonder suikerziekte- een verhoogde massa en een verhoogd verlies van dunne darmcellen te hebben. De verhouding tussen de massa en het verlies van dunne darmcellen was ook groter bij obese mensen met T2DM in vergelijking met obese mensen zonder T2DM. Dit wijst erop dat er sprake is van een snellere vervanging van afgestorven darmcellen (turnover) bij obese mensen met T2DM. Juist deze dunne darmcellen zijn verantwoordelijk voor de absorptie van voedingsstoffen. Dieren met een verhoogde celmassa hebben inderdaad ook een verhoogde absorptiecapaciteit. Op basis van de resultaten beschreven in **Hoofdstuk 5** is het plausibel dat de dunne darm van obese mensen met T2DM ook een verhoogde absorptiecapaciteit heeft.

In de laatste hoofdstukken van dit proefschrift wordt dieper ingegaan op de meest voorkomende leverziekte NAFLD. Leververvetting, het vroege stadium van NAFLD, wordt beschouwd als goedaardig. Een aanzienlijk deel van de patiënten ontwikkelt echter een gevorderd stadium dat wordt gekenmerkt door leverontsteking, ook wel niet-alcoholische steatohepatitis (NASH) genoemd. Deze leverontsteking kan leiden tot levercirrose, leverfibrose en leverfalen. Levercirrose treedt op als leverweefsel dusdanig ernstig beschadigd is, dat herstel niet meer mogelijk is. Naar aanleiding van deze beschadiging sterven levercellen af en ontstaat fibrose oftewel littekenweefsel.

Zowel de oorzaken van NAFLD als de factoren die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van NASH zijn nog niet volledig opgehelderd. Het is wel aangetoond dat dieren met NASH een verhoogde doorgankelijkheid van de darmwand hebben. Hierdoor kunnen bacteriële producten vanuit het lumen van de darm (het externe milieu) door de darmwand heen de gastheer binnendringen (het interne milieu). Normaal gesproken worden deze bacteriële producten via de bloedvaten naar de lever getransporteerd en aldaar uit het bloed gefilterd. Dieren met NASH hebben inderdaad een hogere concentratie van bepaalde bestanddelen van bacteriën, ook wel lipopolysaccharide (LPS) of endotoxine genoemd, in het bloed.

In **Hoofdstuk 6** is onderzocht of LPS ook betrokken is bij de progressie van de vroege stadia van NAFLD naar NASH in mensen. Het is echter gecompliceerd om LPS in het bloed betrouwbaar te meten. Bovendien zijn de bloedvaten die van de darm naar de lever leiden zijn slecht toegankelijk. Om op een zo min mogelijk belastende manier een indruk te krijgen van de concentratie LPS in het bloed tussen de darm en de lever, hebben we gebruik gemaakt van het feit dat het lichaam op de aanwezigheid van LPS reageert met het aanmaken van antilichamen. De concentratie van deze antilichamen tegen LPS in het bloed weerspiegelt de activiteit van het immuunsysteem tegen LPS. Bovendien is voor het meten van de concentratie antilichamen tegen LPS niet perse bloed nodig uit de bloedvaten tussen de darm en lever. Bij patiënten die middels een operatie werden behandeld voor hun overgewicht is toestemming verkregen om bloed en een leverbiopt af te nemen om te kunnen onderzoeken of er een relatie is tussen de ernst van de leverziekte en de hoogte van de concentratie antilichamen tegen LPS. De ernst van NAFLD is door middel van microscopische beoordeling van het leverbiopt geclassificeerd, en vervolgens afgezet tegen de concentraties van antilichamen tegen LPS. Die concentraties in het bloed bleken inderdaad hoger te zijn bij mensen met NASH vergeleken met mensen zonder NASH. Dit suggereert dat LPS een rol speelt bij de ontwikkeling van NASH.

Het beoordelen van een leverbiopt onder de microscoop is op dit moment de gouden standaard om NAFLD en de ernst ervan te diagnosticeren. Echter, de afname van een leverbiopt gaat gepaard met ongemak, een risico op complicaties en hoge kosten. Daarnaast is mede gezien het vele voorkomen van deze ziekte het nemen van een

leverbiopt niet geschikt om te screenen op NAFLD. De recente literatuur adviseert om een leverbiopt af te nemen bij elke obese patiënt die geopereerd wordt en bij alle obese patiënten met risicofactoren. Erkende risicofactoren zijn bijvoorbeeld een hoge bloeddruk en bepaalde verhoogde bloedwaarden, zoals van glucose, insuline, en bepaalde enzymen die de leverfunctie weerspiegelen. Echter, indien er alleen biopten afgenomen worden bij patiënten met deze risicofactoren, blijkt een groot aantal patiënten met NASH te worden gemist. Bovendien wordt er dan ook soms een leverbiopt afgenomen bij mensen die wel risicofactoren hebben, maar geen NASH. Het is dus van belang om een nauwkeuriger, minder invasieve methode te vinden om zowel de aanwezigheid als de afwezigheid van NASH beter te kunnen voorspellen.

Eerder bleek dat de aanwezigheid van ontstekingsprocessen in de longen kan worden aangetoond door het meten van organische stoffen in uitgeademde lucht. Omdat bij NASH ontstekingscomponenten ook een prominente rol spelen, richtten we ons in **Hoofdstuk 7** op de mogelijkheid om de aanwezigheid van NASH te voorspellen op basis van ademanalyse. De ernst van deze leverziekte in obese patiënten werd gerelateerd aan meetbare componenten in de uitademingslucht, zogenaamde Volatile Organic Compounds. De aanwezigheid van NASH bleek op deze manier met een nauwkeurigheid van 90% te voorspellen en de afwezigheid met een nauwkeurigheid van 69%. Deze getallen zijn hoog in vergelijking met de eerder beschreven bloedwaarden, hetgeen betekent dat op basis van deze ademhalingsstest veel nauwkeuriger kan worden voorspeld of iemand wel of geen NASH heeft. Deze bevindingen zullen nog uitvoerig moeten worden getoetst voordat van klinische toepassing sprake kan zijn, maar deze test zou in de toekomst als hulpmiddel ingezet kunnen worden om te screenen op NASH en om te beoordelen of een behandeling van een patiënt met NASH aanslaat.