

Non-alcoholic fatty liver disease. Mind the gaps

Citation for published version (APA):

Verhaegh, P. L. M. (2021). *Non-alcoholic fatty liver disease. Mind the gaps: pathophysiology and non-invasive diagnosis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken. <https://doi.org/10.26481/dis.20210428pv>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20210428pv](https://doi.org/10.26481/dis.20210428pv)

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:

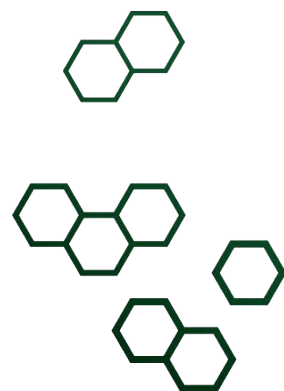
www.umlib.nl/taverne-license

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

Summary

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most widespread liver disease in Western society; about 25% of the global population has NAFLD. The term NAFLD comprises both simple steatosis and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Simple steatosis is a more benign form of fat accumulation, present in the majority of patients. NASH is a chronic inflammatory state that develops in about 30% of NAFLD patients and can progress to severe liver disease, such as cirrhosis, liver failure and hepatocellular cancer. Its pathophysiology is multifactorial and not yet fully understood. Overweight and obesity are major risk factors for NAFLD, as is also true for other related serious non-communicable diseases, including diabetes mellitus and cardiovascular disease. All these diseases are linked to each other and their prevalence is expected to increase even further the coming years due to the western lifestyle, that is characterised by overeating and sedentary behaviour, leading to an obesity epidemic. In this thesis we have focussed on the pathophysiology of NAFLD and non-invasive diagnosis of NASH.

The pathophysiology of NAFLD is complex and not yet completely understood. Several theories have been proposed to explain the progression of NAFLD. The most recent concept states that simple steatosis and NASH are two independent conditions caused by insulin resistance. In **chapter 2**, we studied the ultrastructural differences between NAFLD patients with and without NASH to find leads that might fill the gaps in the pathophysiology of NAFLD. Liver biopsy samples of 37 NAFLD patients were studied using light microscopy and transmission electron microscopy (TEM). TEM enables visualisation of the smallest details within liver cells, with a zoom mode of 1.000-1.500.000 times. Using preservation techniques recently developed by our department, we were able to study the fenestrae in liver sinusoidal endothelial cells. These are very small openings in the cells lining the smallest blood vessels in the liver, that serve as a sieve. We showed that patients without NASH had an increased loss of fenestration (*i.e.*, defenestration) compared to NASH patients. This study provides additional new insights in pathophysiology of NAFLD: one could speculate that defenestration might be a protective mechanisms seen in simple steatosis, which is lacking in NASH.

In **chapter 3** and **4**, we focussed on the role of serum ferritin in NAFLD. In **chapter 3**, we performed an extensive literature search to investigate whether

hyperferritinaemia in NAFLD is an expression of iron overload or inflammation. These data show that in the majority of cases hyperferritinaemia in NAFLD seems to be related to inflammation. However, a limitation of the studies included in this review was the heterogeneity with regards to objectives, study population and methods used. Therefore, we studied the relation between serum ferritin, NAFLD severity and iron in a group of biopsy proven NAFLD patient, in collaboration with the Universitair Ziekenhuis Antwerpen (UZA) (**chapter 4**). It was shown that serum ferritin was associated with having NASH with significant fibrosis (F2-4) and p.C282Y or p.H63D heterozygosity, in the presence and absence of hepatocellular iron.

Not only the liver is affected in NAFLD, extrahepatic organs can also be affected. In **chapter 5**, we studied fat accumulation in the skeletal muscle (myosteatosi) in relation to hepatic fat accumulation and the presence of fibrosis in a well-characterised cohort of NAFLD patients. Chemical shift Magnetic Resonance Imaging (MRI) was used to measure the muscle fat fraction (MFF). In addition, the hepatic fat fraction (using MRI), liver stiffness (using FibroScan®) and appendicular skeletal muscle mass (using Dual-energy X-ray absorptiometry) were measured. We found that myosteatosi did not correlate with the degree of hepatic steatosis or fibrosis, but it was positively correlated with total body fat percentage and body mass index (BMI). Insulin resistance (measured as HOMA-IR) was correlated with hepatic steatosis and fibrosis. These findings suggest that fat accumulation in the muscle does not correspond with hepatic disease severity.

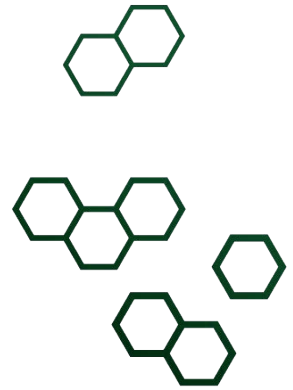
To date, liver biopsy is the most sensitive test for detecting and staging steatosis, inflammation and fibrosis in NAFLD. Steatosis and fibrosis can also be reliably diagnosed using non-invasive techniques. However, liver biopsy is the only reliable method to diagnose NASH. Its invasiveness and risk of complications make it unsuitable for diagnosing large populations or for monitoring the disease. To investigate the reliability of non-invasive markers for NASH, we performed a systematic literature search and meta-analyses on available non-invasive diagnostic blood markers and scores for NASH (**chapter 6**). An extensive overview of all available markers/scores was provided with calculated pooled sensitivity and specificity. A reliable non-invasive marker or score to differentiate NASH from simple steatosis was not identified. Due to the multifactorial pathophysiology of NASH, it is unlikely that a single non-invasive marker will be able to diagnose NASH. Several scoring systems and – omics

approaches that combined markers that are specific for different pathophysiological processes in NASH, such as inflammation, lipid metabolism, fibrogenesis, showed promising findings (being a sensitivity and specificity >80%). However, for the time being, a non-invasive marker for NASH is not yet available in clinical practice.

NAFLD is a prevalent liver disease, which numbers will only continue to grow the coming years. Depending on the study population, the prevalence of NASH within a NAFLD population can vary. Within bariatric studies the prevalence of NASH has been shown to vary largely. In **chapter 7**, we studied a cohort of patients undergoing bariatric surgery showing zero patients had NASH. We suggest the preoperative crash diet (low-caloric diet) might be the cause of this. Preoperative diet interventions are common but not obligatory, therefore, this diet might at least partly explain the differences between prevalence of NASH in bariatric studies. We advocate proper mentioning of preoperative diet interventions in bariatric studies.

General practitioners (GPs), as gatekeepers of our health care system, are going to play a major role in the challenge to adequately identify and manage NAFLD patients at population level. Due to the high prevalence and overall low to moderate severity of NAFLD, GPs will encounter most of these patients and become actively involved in the screening and management of patients. In **chapter 8**, we describe the results of a survey conducted amongst GPs, to investigate the knowledge and practices concerning NAFLD in the Dutch GP practice. A total of 64 GPs completed the questionnaire. The acronyms NAFLD and NASH were not known by 34% and 53% of the GPs, respectively. Although 63% of the GPs acknowledged NAFLD as an important health problem, most GPs never (33%) or rarely (63%) screened for its presence. The results indicate the need for increased awareness and knowledge on NAFLD in primary care, which was endorsed by 84% of the GPs. Bridging the gap between hepatologists and primary care is necessary to improve detecting and managing NAFLD patients.

Finally, in **chapter 9**, we provide an overview of the findings of this thesis, discussing new insights and future perspectives, focussing on pathophysiology, non-invasive diagnosis and bridging the gap to primary care.



Samenvatting

Samenvatting

Niet-alcoholische vetleverziekte (NAFLD) is de meest voorkomende leverziekte in westerse landen. Wereldwijd komt NAFLD bij ongeveer 25% van de bevolking voor. De term NAFLD omvat zowel leververvetting (steatose) als leverontsteking (NASH; niet-alcoholische steatohepatitis). Bij leververvetting is er sprake van vetophoping in de levercellen. Als leververvetting aanhoudt kan dit leiden tot leverontsteking. Leverontsteking ontstaat bij ongeveer 30% van de patiënten met leververvetting en kan op den duur levercirrose en leverkanker tot gevolg hebben. Bij levercirrose is er ernstige schade aan de lever die ertoe kan leiden dat de lever op den duur minder goed functioneert. NAFLD is het gevolg van een ongezonde leefstijl, die gekenmerkt wordt door een calorierijke voeding en weinig lichaamsbeweging. Overgewicht en obesitas zijn dan ook belangrijke risicofactoren voor het ontwikkelen van leververvetting. De precieze manier waarop leverontsteking ofwel NASH, ontstaat in patiënten met leververvetting is echter nog niet helemaal bekend. In dit proefschrift worden drie onderwerpen met betrekking tot NAFLD besproken, namelijk i) factoren die mogelijk een rol spelen bij het ontstaan van leverontsteking, ii) het vaststellen van leverontsteking op een niet belastende manier en iii) de rol van de huisarts in het diagnosticeren van NAFLD.

Het ontstaan van leververvetting en NASH is complex en nog niet volledig duidelijk. Verschillende theorieën zijn beschreven om het ontstaan van NASH te verklaren. De meest recente theorie stelt dat leververvetting en NASH twee onafhankelijke aandoeningen zijn, die veroorzaakt worden door insuline resistentie. In **hoofdstuk 2** hebben we de endotheelcellen van de lever bestudeert met behulp van een elektronenmicroscop. Deze endotheelcellen bevatten kleine openingen ofwel fenestrae genaamd. Via deze fenestrae kan de lever stoffen opnemen en uitscheiden (als een soort zeef). Onderzoek van leverbiopten van patiënten met leververvetting en NASH met een elektronenmicroscop, heeft aangetoond dat deze fenestrae vrijwel geheel afwezig zijn bij patiënten met alleen leververvetting. Dit duidt mogelijk op een beschermingsmechanisme van de lever tegen overtollige vetten en andere schadelijke stoffen, dat ontbreekt bij patiënten die NASH ontwikkelen.

In **hoofdstuk 3** en **4**, wordt de rol van ferritine in NAFLD onderzocht. Ferritine is een eiwit dat betrokken is bij de opslag van ijzer in de lichaamscellen, en komt in een kleine hoeveelheid voor in het bloed. Ferritine waardes kunnen niet alleen

verhoogd zijn door een teveel aan ijzer in het lichaam, ontsteking kan ook tot verhoogde ferritine waardes leiden. Een deel van de patiënten met NAFLD heeft een verhoogde ferritine waarde (hyperferritinemie). **Hoofdstuk 3** beschrijft een literatuuronderzoek naar de oorzaak van hyperferritinemie in NAFLD patiënten. Hieruit bleek dat hyperferritinemie in NAFLD patiënten, in de meerderheid van de gevallen, een uiting is van ontsteking. Het literatuuronderzoek had echter beperkingen, waaronder de variatie tussen de verschillende onderzoeken met betrekking tot gebruikte meetmethodes en studiepopulatie. Om deze reden hebben we de relatie tussen ferritine, de ernst van de NAFLD en ijzerstapeling in leverbiopten bestudeerd in een grote groep NAFLD patiënten in samenwerking met het Universitair Ziekenhuis Antwerpen (UZA) (**hoofdstuk 4**). Dit onderzoek toonde dat verhoogde ferritine waardes geassocieerd waren met het hebben van leverontsteking met verlittekening (fibrose) van de lever en met het hebben van een mutatie in de genen (p.C282Y en p.H63D heterozygotie) die een rol spelen bij erfelijke ijzerstapelingsziekten (hereditaire hemochromatose). De diagnostische nauwkeurigheid van ferritine is echter onvoldoende om als marker voor NASH met fibrose te kunnen dienen.

Niet alleen de lever is aangedaan bij NAFLD, ook andere organen dan de lever worden beïnvloed. In **hoofdstuk 5** werd de relatie tussen vetophoping in de spieren (myosteatoze) en leversteatoze en -fibrose onderzocht in een cohort van goed gekarakteriseerde NAFLD patiënten. Insuline resistentie speelt een belangrijke rol in de ontwikkeling van leververvetting en wordt gelinkt aan ophoping van vet in de spieren (myosteatoze). Myosteatoze werd gemeten middels een MRI scan. Leversteatoze, -fibrose en skeletspiermassa werden gemeten met respectievelijk een MRI scan, FibroScan® en DEXA-scan. Wij vonden geen relatie tussen myosteatoze en de mate van steatoze of fibrose van de lever. Myosteatoze was wel geassocieerd met het percentage totaal lichaamsvet en BMI (body mass index). Insuline resistentie (gemeten middels HOMA-IR) was geassocieerd met lever steatoze en fibrose.

Tot op heden is het uitvoeren van een leverbiopt de meest betrouwbare manier om de mate van NAFLD vast te stellen. Leversteatoze en -fibrose kunnen echter ook betrouwbaar met niet-belastende technieken vastgesteld worden, bijvoorbeeld de FibroScan®. NASH kan alleen op een betrouwbare manier worden vastgesteld met behulp van het leverbiopt. Een leverbiopt is echter een belastend (invasief) onderzoek en er bestaat een risico op complicaties. Hierdoor is het geen geschikte manier om grote groepen te onderzoeken of om patiënten

over de tijd te volgen. **Hoofdstuk 6** beschrijft een literatuuronderzoek met meta-analyse naar de betrouwbaarheid van niet-invasieve onderzoeken, met name bloedonderzoek, om NASH vast te stellen. Ondanks dat vele markers voor het vaststellen van NASH onderzocht zijn, bleek geen van deze onderzoeken in staat om NASH op een betrouwbare manier vast te stellen. Aangezien er vele verschillende factoren betrokken zijn bij het ontstaan van NASH lijkt het waarschijnlijk dat een combinatie van verschillende bloedonderzoeken wel kan leiden tot een betrouwbare diagnose van NASH. Aanvullend onderzoek is nodig om dit uit te zoeken.

NAFLD is een veelvoorkomende aandoening en gedacht wordt dat de aantallen alleen maar zullen groeien de komende jaren, aangezien overgewicht en obesitas steeds meer voorkomen. Het voorkomen van NASH in een groep van NAFLD patiënten varieert afhankelijk van de gekozen studiepopulatie. In **hoofdstuk 7** onderzoeken we het voorkomen van NASH in een groep patiënten met fors overgewicht die een operatie ondergaan om gewicht te verliezen (bariatrische ingreep). In deze groep bleek geen van de patiënten NASH te hebben. Andere onderzoeken in een gelijksoortige patiëntengroep toonden dat NASH vaker voorkwam in deze groep. Gedacht wordt dat het crash dieet dat in Nederland voorafgaand aan de bariatrische ingreep gevolgd wordt, het ontbreken van NASH in deze groep, ten minste deels, verklaard. Om deze reden is het belangrijk om preoperatieve diëten duidelijk te beschrijven in toekomstige studies.

Aangezien NAFLD vaak een goedaardig beloop heeft en slechts een deel van de patiënten NASH en de gevolgen van NASH (fibrose/cirroze en leverkanker) ontwikkelt, spelen huisartsen een belangrijke rol bij het identificeren en opvolgen van NAFLD patiënten. In **hoofdstuk 8** worden de resultaten van een vragenlijst over de kennis en werkwijze rondom NAFLD in de huisartsenpraktijk beschreven. De vragenlijsten werden ingevuld door 64 huisartsen in Zuid-Limburg. Het bleek dat de termen NAFLD en NASH onbekend waren bij respectievelijk 34% en 53% van de huisartsen. Hoewel huisartsen aangeven NAFLD een belangrijk gezondheidsprobleem te vinden, screenen de meeste huisartsen nooit (33%) of zelden (63%) naar de aanwezigheid van NAFLD. De resultaten laten zien dat er behoefte is aan meer bewustzijn en kennis rondom NAFLD in de huisartsenzorg. Dit werd onderschreven door 84% van de huisartsen. Het is nodig om het gat tussen huisartsen en hepatologen te verkleinen om de identificatie en opvolging van NAFLD patiënten te verbeteren.

Tot slot wordt in **hoofdstuk 9** een overzicht van de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift gegeven. Daarnaast worden verschillende concepten geïntegreerd en worden toekomstperspectieven besproken.