

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Radiologie
Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
Direktor: Prof. Dr. med. T. J. Vogl

**3.0 Tesla Protonen-Magnetresonanztomographie
(1H-MRS) der akuten alkoholinduzierten Fettleber –
Korrelation mit Histologie, biochemischer Untersuchung und
laborchemischen Parametern**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Daniel Keese

aus Hildesheim

Frankfurt am Main, 2014

Dekan:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent:	Dr. med. habil. Hüdayi Korkusuz
Korreferent:	Prof. Dr. Christoph Sarrazin
Tag der mündlichen Prüfung:	28.11.2015

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	Alkoholinduzierter Leberschaden.....	7
1.1.1	Ätiologie und Pathophysiologie.....	7
1.1.2	Alkoholdehydrogenase	8
1.1.3	Hepatisches mikrosomales Ethanol-oxidierendes System.....	9
1.2	Epidemiologie / Binge-Drinking	10
1.3	Die Stadien des alkoholischen Leberschadens	11
1.3.1	Steatosis hepatis	11
1.3.2	Steatohepatitis	12
1.3.3	Leberfibrose	12
1.3.4	Leberzirrhose	12
1.4	Diagnostik der Fettleber.....	13
1.4.1	Serologische Parameter.....	14
1.4.2	Bildgebende Verfahren	15
1.4.2.1	Sonographie	15
1.4.2.2	Computertomographie	16
1.4.2.3	Magnetresonanztomographie.....	18
1.4.2.4	Magnetresonanzspektroskopie.....	22
1.4.3	Biochemische Lipidbestimmung nach FOLCH.....	22
1.4.4	Histopathologie	23
1.5	Fragestellung.....	26
2	GRUNDLAGEN DER MAGNETRESONANZSPEKTROSKOPIE	27
3	MATERIAL UND METHODEN.....	32
3.1	Versuchstiere	32
3.2	Versuchsablauf.....	32
3.2.1	Isofluran-Narkose.....	34
3.2.2	Blutentnahme zur Bestimmung serologischer Parameter	34
3.2.3	Magnetresonanz-Methoden.....	34
3.2.3.1	Magnetresonanztomographie	35
3.2.3.2	¹ H-Magnetresonanzspektroskopie.....	36
3.2.4	Entnahme der Leber	40
3.2.5	Biochemische Analyse der Triglyceride nach FOLCH	40
3.2.6	Histopathologie	41
3.3	Statistische Analyse	42

4	ERGEBNISSE	43
4.1	Histopathologische Auswertung	43
4.2	Auswertungen der serologischen Parameter	44
4.2.1	Aspartat-Aminotransferase	44
4.2.2	Alanin-Aminotransferase	44
4.2.3	De-Ritis-Quotient.....	45
4.2.4	Gamma-Glutamyl-Transferase.....	45
4.3	Auswertung der biochemischen Messungen.....	46
4.4	Auswertungen der ¹ H-MRS-Messungen.....	46
4.5	Korrelative Zusammenhänge der ¹ H-Spektroskopie mit histopathologischer Auswertung, biochemischer Triglyceridbestimmung sowie serologischer Messung	48
4.5.1	Korrelative Zusammenhänge zwischen ¹ H-MRS-Messungen und serologischer Diagnostik.....	48
4.5.2	Korrelation des spektroskopisch gemessenen Fettgehalts mit der biochemischen Triglyceridbestimmung nach FOLCH	50
4.5.3	Korrelation des spektroskopisch gemessenen Fettgehalts mit der histologisch gemessenen Verfettung.....	50
5	DISKUSSION.....	53
6	SCHLUSSFOLGERUNG.....	60
7	ZUSAMMENFASSUNG	61
8	SUMMARY	63
	LITERATURVERZEICHNIS	65
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
	TABELLENVERZEICHNIS.....	77
	CURRICULUM VITAE.....	78
	DANKSAGUNG.....	80
	SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG	81

1 EINLEITUNG

Die Fettleber (*Steatosis hepatis*; engl.: *fatty liver disease*, FLD) zählt zu den häufigsten Lebererkrankungen überhaupt [1] und wird in zwei Gruppen unterteilt: die alkoholische Fettleber (engl.: *alcoholic fatty liver disease*, AFLD) und die nicht-alkoholische Fettleber (engl.: *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD). Eine der häufigsten Ursachen für eine Leberschädigung stellt neben Diabetes Mellitus und Adipositas vor allem ein hoher Alkoholkonsum dar [2]. Alkohol – das alltagssprachliche Wort für Ethanol (C_2H_5OH) – hat neben euphorisierenden, entspannenden und sedierenden Eigenschaften bereits in mäßigen Mengen toxische Wirkungen auf den menschlichen Organismus. Neben zahlreichen funktionellen Störungen kann Ethanol zu erheblichen Veränderungen an unterschiedlichen Organen mit entsprechenden Krankheitsbildern führen. Neben extrahepatischen Erkrankungen wie Psychosen, Epilepsien, Kleinhirn- und Großhirnatrophie, Polyneuropathie, Kardiomyopathie, Pankreatitis, Gastritis, Mallory-Weiß-Syndrom sind dies vor allem die verschiedenen Stadien alkoholinduzierter Lebererkrankungen. Hervorzuheben sind zudem ein deutlich gesteigertes Karzinomrisiko sowie die Alkoholembryopathie bei Neugeborenen [3]. Diese durch Alkohol verursachten Krankheitsbilder haben die Relevanz der Beteiligung verschiedener Fachdisziplinen in Diagnostik und Therapie in den letzten Jahren deutlich erhöht. Von enormer klinischer Bedeutung ist die Tatsache, dass Alkohol nach Aufnahme und Verteilung im Körper vorwiegend in der Leber abgebaut wird und zu einer Akkumulation von Triglyceriden in den Hepatozyten führt [4]. Die akute alkoholinduzierte Fettleber stellt dabei das früheste Stadium des Erkrankungskreises dar. Die diagnostischen Möglichkeiten in dieser initialen Phase der Erkrankung sind bis heute noch nicht ausreichend geklärt, obwohl gerade zu diesem Zeitpunkt eine Frühdiagnose, verbunden mit einer therapeutischen Alkoholabstinenz, eine Reversibilität der Erkrankung ermöglicht und als vorrangiges Ziel gilt [5].

Nachweis sowie Quantifizierung von Leberfett spielen zudem in vielen klinischen Situationen eine wichtige Rolle: Eine Verlaufskontrolle bei Leberfunktionsstörungen, die präoperative Diagnostik von Leber-Lebendspendern vor Transplantation oder die Überwachung von Tumorpatienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen, sind nur einige Beispiele für die Relevanz eines möglichst genauen und schnellen Informationsgewinns über den Grad der intrahepatischen Verfettung [6].

In den letzten Jahren findet die In-vivo-Magnetresonanztomographie als nicht-invasives Diagnoseverfahren in der klinischen Diagnostik und Forschung zunehmend Verwendung. Bei degenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) sowie

bei Lebertumoren und experimentell induzierten Leberzirrhosen konnte die MR-Spektroskopie bereits erfolgreich angewendet werden [7, 8]. Der Goldstandard in der Diagnostik der Fettleber ist nach wie vor die invasive Leberbiopsie [9-11]. Umso mehr besteht ein hoher Bedarf an nicht invasiven Verfahren zur qualitativen und quantitativen Beurteilung des gesamten Organs.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Detektion und Quantifizierung intrahepatischen Fettgehalts im Rahmen einer akuten alkoholinduzierten Fettleber. Diskutiert werden der Goldstandard der histopathologischen Diagnostik sowie biochemische und labordiagnostische Verfahren. Zudem werden die Vorteile und Grenzen der bildgebenden Verfahren von Sonographie (US), Computertomographie (CT) und Bildgebung mittels Magnetresonanz (MR) erörtert. Der Schwerpunkt der Arbeit liegt schließlich auf der Evaluation der Protonen-MR-Spektroskopie für die Erfassung einer alkoholinduzierten Fettleber im initialen Stadium.

1.1 Alkoholinduzierter Leberschaden

Das normale Gewicht einer gesunden Leber beträgt bei einem erwachsenen Menschen ca. 1.5 kg. Bereits in der gesunden Leber lässt sich ein Fettgehalt von 0.5 bis 1.5 % des Feuchtgewichts nachweisen. Die erste erkennbare, durch Alkoholkonsum verursachte hepatische Veränderung besteht in der progressiven Akkumulation von Fett. Als Folge entsteht eine Leberzellverfettung (alkoholische Steatose) bzw. eine akute Fettleber (Steatosis hepatis) und bei anhaltendem Alkoholkonsum eine alkoholische Steatohepatitis (ASH). Diese kann in eine perivenuläre und später zur Brückenfibrose übergehen. Als finales Stadium des alkoholischen Leberschadens steht in der Regel die irreversible mikronoduläre alkoholische Leberzirrhose, auch Laënnec-Zirrhose genannt. Die Stadien des alkoholischen Leberschadens werden in Kapitel 1.4 genauer erläutert.

1.1.1 Ätiologie und Pathophysiologie

Auftreten sowie Schweregrad eines alkoholbedingten Leberschadens hängen von verschiedenen Faktoren wie Geschlecht, genetischen Aspekten, Ernährung sowie der Menge und Dauer der Alkoholeinnahme ab. Als kritische Alkoholmenge für das Auftreten einer akuten Fettleber wird eine Grenze von 40 g reinen Alkohols pro Tag für Männer angesehen. Für Frauen liegt die Grenze unter diesem Wert bei ca. 20 g pro Tag [12]. Dabei entsprechen 1.5 l Bier, 0.2l Whisky, 0.75l Wein und 0.5l Sherry jeweils 60 g reinem Alkohol. Genetische Faktoren spielen bei der Entwicklung eines alkoholischen

Leberschadens zusätzlich eine Rolle. Erstens besteht eine erbliche, aber schwierig zu erfassende Beziehung zu Trinkgewohnheiten [13], zweitens ergeben sich genetisch bedingte Unterschiede zwischen Individuen und Bevölkerungsgruppen in der Aktivität des enzymatischen Alkoholabbaus über die Alkoholdehydrogenase und des mikrosomalen Ethanol-oxidierenden Systems. Auch kann eine inadäquate Ernährungssituation (z. B. Protein- und Vitaminmangel) die schädigende Wirkung des Alkohols in der Leber verstärken. Darüber hinaus spielen Virusinfektionen (Hepatitis B, Hepatitis C) eine zusätzlich schädigende Rolle [4].

Ethanol bedingt in der Leber ein Missverhältnis zwischen Fettsäureoxidation und Fettsäuresynthese zugunsten einer vermehrten Bildung von Triglyceriden und deren hepatozellulärer Einlagerung. Der Metabolismus von Ethanol umfasst dabei vorwiegend drei Enzymsysteme. Der First-Pass-Metabolismus, d. h. der Abbau des Ethanols während bzw. vor der ersten Passage durch die Leber, steuert das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH), das sich sowohl in der Magenschleimhaut als auch in der Leber befindet. Den zweiten bedeutsamen Weg stellt das mikrosomale Ethanol-oxidierende System (MEOS) dar, das durch das Cytochrom-P450-Enzym CYP2E1 geprägt ist und vor allem bei Personen mit chronischem Alkoholkonsum in den Vordergrund tritt. Ein weiterer Abbauprozess verläuft über das unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid in den Peroxisomen lokalisierte Enzym Katalase. Der quantitative Beitrag dieses letzten Stoffwechselwegs ist jedoch gering [4].

Alle drei Wege haben gemeinsam, dass am Ende des Ethanolabbaus Acetaldehyd entsteht. Dieses giftige Zwischenprodukt muss schließlich durch die in den Mitochondrien lokalisierte Aldehyddehydrogenase (ALDH) zu Acetat metabolisiert werden. Die drei Wege des Alkoholabbaus werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.1.2 Alkoholdehydrogenase

Die humane ADH ist ein zinkhaltiges Enzym mit einem Molekulargewicht von 80000 dalton und im Lappchenzentrum der Leber lokalisiert. Verschiedene Isoformen von ADH kodieren für mindestens sieben verschiedene ADH-Gene. Funktionales ADH existiert als Dimer und kann in fünf verschiedene Klassen (I–V) eingeteilt werden. Die hepatische Form des ADH (Klasse I) besteht aus A-, B-, und C-Untereinheiten, die von drei verschiedenen ADH-Genen (ADH1A, ADH1B und ADH1C) kodiert werden. Durch die Oxidation von Ethanol durch die ADH unter Einfluss von NAD^+ entstehen $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Acetaldehyd, das weiter zu Acetat umgewandelt, in den Citratzyklus

eingespeist und dort zu Kohlendioxid (CO₂) und Wasser (H₂O) verstoffwechselt wird (siehe Abbildung 1). Die Überflutung der Leberzellen mit Stoffwechselprodukten der Alkoholoxidation und die Erhöhung des NADH/NAD-Quotienten führen zu einer Hemmung der Beta-Oxidation und des Citratzyklus sowie zu einer Förderung der Fettsäuresynthese und Akkumulation von Triglyceriden. Folgen sind eine Hyperlaktazidämie, eine Laktatazidose, eine Hyperurikämie und eine Ketose mit Verfettung der Leberzellen. Das hochtoxische Acetylaldehyd schädigt zusätzlich die Mikrotubuli und Mitochondrien. Acetat begünstigt die Leberzellverfettung [14].

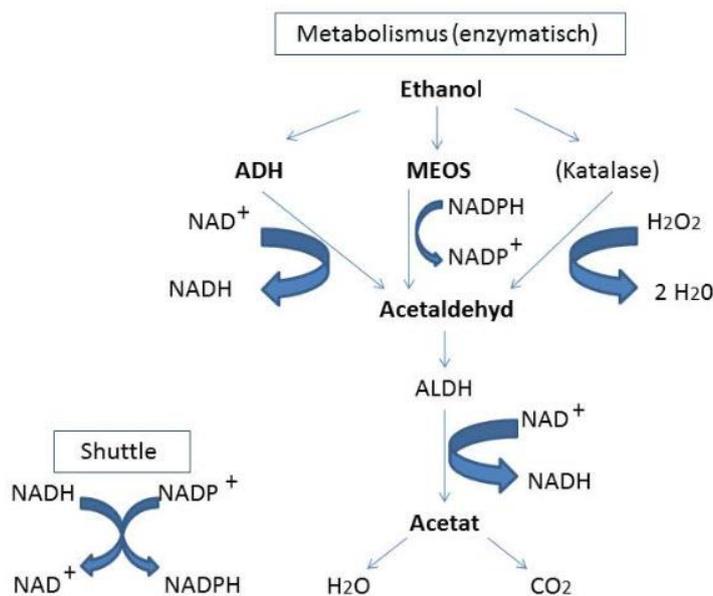


Abbildung 1: Diagrammschema über den Metabolismus von Ethanol
 ADH – Alkoholdehydrogenase, MEOS – mikrosomales, Ethanol-oxidierendes System, ALDH – Aldehyddehydrogenase (modifiziert nach Setshedi [15])

1.1.3 Hepatisches mikrosomales Ethanol-oxidierendes System

Das Mikrosomale Ethanol-oxidierende System (MEOS) – neuerdings als Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) bezeichnet – ist als ein ADH-unabhängiger Weg des Ethanolstoffwechsels im glatten endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen lokalisiert und wird vor allem nach chronischem Alkoholkonsum proliferiert [15]. Das induzierte CYP2E1 spielt bevorzugt bei der Produktion freier Radikale eine vorrangige Rolle. Der Alkoholmetabolismus im CYP2E1 bewirkt u. a. die Bildung toxischer Hydroxyäthylradikale, die mit einer verstärkten Lipidperoxidation einhergehen – weitere Schäden in den Hepatozyten sind die Folge [16].

1.2 Epidemiologie / Binge-Drinking

Hinsichtlich der Lebererkrankungen und der Mortalität belegt die Mehrzahl der epidemiologischen Studien eine unmittelbare Beziehung zur Menge des Alkoholverbrauchs [17, 18]. Aus einer Studie aus dem New England Journal of Medicine aus dem Jahr 2009 [19] geht hervor, dass exzessiver Alkoholkonsum die dritthäufigste vermeidbare Todesursache in den USA darstellt. In Deutschland konnte seit den 1950er Jahren ein kontinuierlicher Anstieg der Mortalität als Folge alkoholbedingter Leberschäden bis Mitte der 80er Jahre verzeichnet werden [20, 21]; Vergleichbares galt für alle anderen europäischen Länder, Japan sowie Australien [22]. Seither scheint die Tendenz gleichbleibend oder leicht fallend. Im europäischen Vergleich belegt Deutschland bezüglich des jährlichen Alkoholkonsums pro Einwohner einen Platz in der Spitzengruppe. Die Zahl der alkoholgefährdeten Menschen wird hierzulande auf ca. neun Millionen, die Gesamtzahl an Menschen mit einer alkoholischen Lebererkrankung auf ca. sechs Millionen geschätzt. Die Lebenserwartung wird durch Alkoholmissbrauch um bis zu 20 Jahre vermindert, die Selbstmordgefährdung ist um das Zwölfwache erhöht, die Mortalität um den Faktor drei [23]. Hinsichtlich Folgeerkrankungen wird die akute Fettleber zudem mit der Entstehung von Adipositas, gesteigerter Insulinresistenz und dem metabolischen Syndrom in Zusammenhang gebracht [4, 13], was die Bedeutsamkeit der exakten Bestimmung von Risikopatienten vor allem im Initialstadium unterstreicht.

Vor allem unter jungen Menschen ist der Alkoholmissbrauch unverhältnismäßig stark ausgeprägt. Laut einer aktuellen Studie der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) wurden im Jahr 2012 ca. 26000 Kinder und Jugendliche im Alter zwischen 10 und 19 Jahren aufgrund akuter Alkoholintoxikation stationär in einem deutschen Krankenhaus behandelt – ein Anstieg im Vergleich zum Jahre 2008 um 1.6 % [24]; und seit dem Jahr 2000 eine Steigerung von 170 % [25]. Am intensivsten ist der Alkoholkonsum in der Altersgruppe der 18- bis 25-Jährigen. Der Studie zufolge trinken 40 % dieser Gruppe regelmäßig, also mindestens einmal wöchentlich Alkohol. Vor allem die kurzfristige exzessive Alkoholaufnahme, auch als „Binge-Drinking“ bzw. Rauschtrinken bezeichnet, ist unter Jugendlichen und jungen Erwachsenen weit verbreitet. Definiert wird Rauschtrinken dabei in der Regel über die Anzahl von Gläsern oder Drinks, die bei einer einzigen Gelegenheit getrunken werden. Meistens wird die Grenze von fünf Gläsern oder mehr als Kriterium angegeben [26]. In vielen Studien werden für Frauen geringere Grenzwerte definiert; gebräuchlich sind hier vier Gläser oder mehr

[27]. Das National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) definiert Binge-Drinking als Konsum von mehr als fünf alkoholischen Getränken (60-70 g reiner Alkohol) bei Männern bzw. mehr als vier alkoholischen Getränken (40-60 g reiner Alkohol) bei Frauen innerhalb von zwei Stunden, der zum Anstieg des Blutalkoholspiegels auf über 0.8 Promille führt [28]. Etwa 17 % der Jugendlichen zwischen 12 und 17 Jahren trinken sich einmal im Monat in einen Rausch. Unter den 18- bis 25-Jährigen liegt dieser Wert sogar bei 44% – zwei Prozentpunkte mehr als in der letzten Studie aus dem Jahr 2010 [24].

1.3 Die Stadien des alkoholischen Leberschadens

1.3.1 Steatosis hepatis

Die Deutsche Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) definiert die akute alkoholische Fettleber als „eine variable Einlagerung von Lipiden (v. a. Triglyceriden) in die Hepatozyten“ [29]. Bei einer Beteiligung von > 5 % der Hepatozyten spricht man von einer Verfettung bzw. einer leichten Form der Steatosis hepatis [30]. Ethanol als ein obligates Lebertoxin kann bemerkenswerterweise schon bei einer akuten Alkoholintoxikation als Folge eines Binge-Drinking zu einer signifikanten Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten führen [31]. Zusätzlich retinieren Flüssigkeit sowie Exportproteine in die Hepatozyten; resultierend zeigt sich makroskopisch eine vergrößerte Leber durch Einlagerung von Wasser, Lipiden und Eiweiß [13]. Nach den Kriterien der histologischen Untersuchung lässt sich allgemein eine makrovesikuläre von einer mikrovesikulären sowie gemischt-tropfigen Form unterscheiden. Klinisch geht die akute Fettleber zunächst nicht mit einer Funktionseinschränkung des Organs einher und verursacht zumeist auch keine Beschwerden. In etwa der Hälfte der Fälle finden sich intermittierende Abdominalbeschwerden wie Völlegefühl, Übelkeit, Abgeschlagenheit und Müdigkeit [32]. Diese Beschwerden stehen eher in Zusammenhang mit einer alkoholbedingten Schädigung des oberen Gastrointestinaltrakts und des Pankreas als mit einer hepatischen Schädigung. Bei einer Fettleber ist das Leitsymptom die Hepatomegalie. Hauterscheinungen wie *Spider naevi* oder ein Palmarerythem finden sich in diesem Erkrankungsstadium bei etwa 20–30 % der Patienten [33]. Ein Ikterus tritt beim Zieve-Syndrom oder vereinzelt bei Patienten mit Cholestase und mikrovesikulärer Verfettung nach exzessivem Alkoholenuss auf [34]. Rechtsseitige Oberbauchschmerzen sind ein Zeichen dafür, dass die Leber bereits vergrößert ist und zu einer Dehnung der Leberkapsel geführt hat [4].

1.3.2 Steatohepatitis

Die alkoholische Steatohepatitis (ASH) ist ein deutlich fortgeschrittenes Stadium der alkoholassozierten Lebererkrankungen. Sie umfasst klinisch ein breites Spektrum mit asymptomatischen Stadien, aber auch lebensbedrohliche Verläufe mit entsprechend schlechter Prognose. Wesentliche Unterschiede zur Steatosis hepatis bestehen im histologischen Erscheinungsbild. Während die Fettleber vorwiegend hepatozytäre Schädigungen aufweist, findet sich bei der Steatohepatitis auch eine Beteiligung der Nichtparenchymzellen. Histologisch ist die ASH durch die Anwesenheit von Steatose (makro- und/oder mikrovesikulär), hepatozellulärer Schädigung (Ballonierung, Apoptose) und Infiltration der Leberläppchen durch mehrkernige Neutrophile definiert [35]. Zudem finden sich Mallory-Denk-Körper, Megamitochondrien, perisinoidale Fibrose, vereinzelte Eisenablagerungen, Proliferation hepatischer Vorläuferzellen und intraparenchymale Cholestase [36, 37]. Durch den Hauptbefund einer Nekrose ist die ASH deutlich von der alkoholischen Steatosis hepatis abzugrenzen.

1.3.3 Leberfibrose

Bei anhaltendem Alkoholkonsum stellt die Leberfibrose das dritte Stadium der alkoholischen Lebererkrankungen dar. Zusätzliche Trigger wie Adipositas, virale Infektionen (vor allem Hepatitis C) oder lebertoxische Medikamente können ihre Entstehung beschleunigen. Der Prozess ist durch eine quantitativ und qualitativ stark veränderte Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix charakterisiert, die sich vor allem im subendothelialen Raum zwischen den Hepatozyten und den die Sinusoide auskleidenden Endothelzellen (Disse-Raum) befindet. Die Erhöhung des Bindegewebsanteils erfolgt dabei im Sinne eines Reparaturmechanismus mit Narbenbildung. Als Folge der Fibrosierung kommt es zu einem Verlust der Mikrovilli der Hepatozyten und damit zu einer weiteren Schädigung der Leberfunktion. Die zusätzliche Aktivierung sogenannter Kupfer-Zellen führt zu einer Freisetzung freier Sauerstoffradikale und proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1). Falls die anhaltende Schädigung des Organs nicht rechtzeitig gestoppt wird, kann der Wundheilungsprozess den progredienten Leberzelluntergang nicht kompensieren und trägt zum weiteren Verlust von Leberparenchym bei [38].

1.3.4 Leberzirrhose

Die Leberzirrhose stellt das Endstadium der alkoholischen Lebererkrankungen dar und ist angesichts des Umbaus der normalen Leberarchitektur mit einer Akkumulation von

Narbengewebe, einer Abnahme des Gefäßquerschnitts und knotiger, irregulärer Hepatozytenregeneration trotz eines tendenziellen Abbaus fibrotischen Gewebes irreversibel. Histologisch erscheint die Leberzirrhose meist mikronodulär aufgrund des inhibitorischen Effekts von Ethanol auf die Hepatozytenproliferation. Das Zusammenspiel der molekularen Aspekte der Fibrogenese, der vaskulären Veränderung während der Leberzirrhoseentstehung und der Verlust von Leberparenchym resultiert schließlich im Verlust der Entgiftungskapazität sowie im portalen Hochdruck [38].

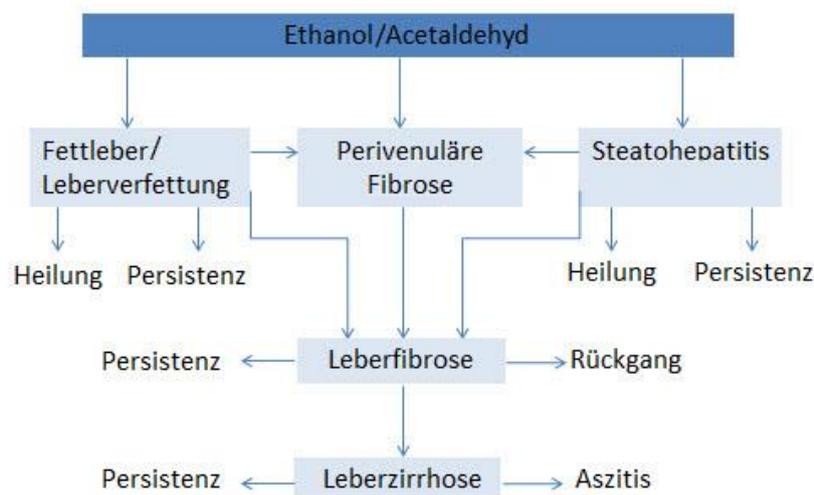


Abbildung 2: Stadien und klinischer Verlauf alkoholbedingter Lebererkrankungen

1.4 Diagnostik der Fettleber

Im Rahmen einer endgültigen Diagnosestellung geben Blutserumparameter einen ersten Hinweis auf das Vorliegen einer alkoholischen Lebererkrankung. Eine nicht invasive Detektion einer Fettleber ist mit verschiedenen bildgebenden Verfahren wie Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie, sowie -spektroskopie möglich. Teilweise werden diese Methoden bisher im Rahmen von Studien zur nicht invasiven Quantifizierung des Leberfettgehalts herangezogen und befinden sich im präklinischen Status [41]. Die Biopsie von Leberparenchym mit anschließender histologischer Aufarbeitung gilt als Goldstandard in der Detektion und Quantifizierung einer Fettleber [9] und bietet den Vorteil, zwischen einfacher Steatosis und Steatohepatitis zu unterscheiden [39, 40]. Ebenso kann die biochemische Aufbereitung von Lebergewebe zur quantitativen Lipidbestimmung verwendet werden.

1.4.1 Serologische Parameter

Bei aktiv trinkenden Patienten mit alkoholinduzierter Fettleber findet sich in 80–90 % eine Erhöhung der Serumtransaminasen. Meist sind die Werte der Aspartataminotransferase (AST bzw. ASAT/GOT) deutlicher erhöht als die der Alaninaminotransferase (ALT bzw. ALAT/GPT) [38, 42]. Die erhöhte Aktivität der AST im Serum ist Ausdruck einer alkoholbedingten Leberzellschädigung, da diese sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien der Hepatozyten lokalisiert ist. Durch Schädigung der Mitochondrien gelangt die AST in das Zytoplasma, wo sie zusammen mit der zytoplasmatischen AST in den Blutkreislauf übergeht. Eine akute Alkoholfuhr von 3 bis 4 g/kg Körpergewicht kann bereits nach 24 Stunden zu einem vorübergehenden Anstieg der AST bei Gesunden führen [43]. Generell ist anzumerken, dass eine erhöhte AST auch in allen anderen Stadien sowohl alkoholbedingter als auch nicht alkoholbedingter Lebererkrankungen nachzuweisen ist. Darüber hinaus findet sich eine erhöhte AST-Aktivität bei kardialen Erkrankungen und Skelettmuskelschädigungen.

Seltener und in geringerer Ausprägung findet sich bei Patienten mit einer Fettleber eine ALT-Erhöhung. ALT befindet sich lediglich im Zellplasma und ist wie die AST bei späteren Stadien der alkoholischen Lebererkrankungen erhöht. Die Normwerte von ALT, AST für Frauen und Männer sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die alleinige Bestimmung der AST und der ALT hat für die Fettleber eine geringe Spezifität und Sensitivität. Erst der Quotient aus AST und ALT (De-Ritis-Quotient) im Serum gibt differentialdiagnostisch Hinweise auf einen alkoholinduzierten Leberschaden und grenzt diesen von einem nicht-alkoholinduzierten Leberzellschaden ab. Die Alkoholspezifität wird dabei mit Werten von $AST/ALT > 2$ angezeigt [44]. Allerdings lässt sich weder der Schweregrad der Einzelzellschädigung noch der Umfang der Gewebeschädigung sicher aus der Höhe der Serumaktivität der freigesetzten Enzyme abschätzen [45].

Die gesteigerte Synthese der Gamma-Glutamyltransferase (GGT/ γ -GT) im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten ist der häufigste pathologische Laborbefund bei Patienten mit alkoholinduzierter Fettleber. Neben einer Aktivitätssteigerung im Serum findet sich darüber hinaus auch eine Erhöhung der Aktivität im Lebergewebe, wenngleich in unterschiedlichen Studien sehr große Unterschiede bezüglich seiner Sensitivität und Spezifität auftreten [46-49]. Grund hierfür ist, dass die GGT-Aktivität auch bei zahlreichen alkoholunabhängigen Erkrankungen und Einnahme enzyminduzierter Arzneimittel wie Phenobarbital und Phenytoin ansteigt [50]. Weitere Leberparameter wie

freie Triglyceride, Cholinesteraseaktivität im Serum, Carbohydrat-defizientes Transferin (CDT) und das mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV) sind oftmals erst nach chronischem Alkoholkonsum erhöht [51].

Tabelle 1: Referenzbereiche der Leberenzyme AST und ALT in IFCC-Einheiten pro Liter

Enzym	Frauen	Männer
AST	unter 35 U/l	unter 50 U/l
ALT	unter 35 U/l	unter 50 U/l

1.4.2 Bildgebende Verfahren

1.4.2.1 Sonographie

Liegt laborchemisch und klinisch ein erster Verdacht auf eine alkoholinduzierte Fettleber vor, ist die Sonographie als nicht invasive, kostengünstige und weit verbreitete Methode die bildgebende Diagnostik der ersten Wahl [52]. Das gesunde Leberparenchym zeigt sonographisch eine homogene Echotextur mit Echogenität gleich oder etwas größer als die der normalen Nierenrinde und der Milz. Die intrahepatischen Gefäße sowie das Zwerchfell sind leicht erkennbar. Bei der Fettleber findet sich eine weitgehend gleichmäßig gesteigerte Echogenität des Leberparenchyms [53]. Grund hierfür ist eine erhöhte Reflektivität des Leberparenchyms verursacht durch intrazelluläre Lipidakkumulation; zudem ist die Sichtbarkeit der Gefäßwände und des Zwerchfells verringert [54].

Die qualitative Einstufung der Steatosis hepatis mittels Ultraschall ist in der Literatur wie folgt definiert:

1. *mild*: gekennzeichnet durch leicht erhöhte Leberechogenität und klare Darstellung von Leber- und Portalvenenwand;
2. *moderat*: mit erhöhter Leberechogenität und Verschleierung der Leber- und Portalvenenwände;
3. *schwer*: mit erhöhter Echogenität sowie signifikanter posteriorer Abschattung, welche die Darstellung und Bewertung des tiefen Leberparenchyms erschwert [53].

Der Versuch, die Menge intrahepatischen Fetts mittels Ultraschalls quantitativ zu bestimmen, zeigte in Studien eine geringere Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit im Vergleich zur qualitativen Bewertung einer Steatose [55, 56]. Auch Sensitivität und

Spezifität im Rahmen einer qualitativen Diagnostik sind in zahlreichen Studien unterschiedlich bewertet. Bisher zeigten sich Differenzen zwischen 60 und 94 % in der Sensitivität und eine Spanne von 66 bis 95 % in der Spezifität [55, 57-60], wobei sich die Sensitivität durch verbesserte technische Geräte und zunehmende Erfahrung mit der Methode in den letzten Jahren verbessert hat [61, 62]. Trotz der vielen Vorteile wie einfache Handhabung, leichte Zugänglichkeit, Fehlen ionisierender Strahlung und geringere Kosten hat das Verfahren praktische Einschränkungen wie ein kleines Sichtfeld, Betreiber- und Geräteabhängigkeit sowie eine geringe Empfindlichkeit für die Unterscheidung zwischen Lebersteatose, Fibrose und Leberzirrhose. Zudem fehlen eine Reproduzierbarkeit und die exakte Quantifizierung der Fettansammlung. Besonders im Bereich geringradiger Verfettungen unter 30 % zeigt sich sonographisch eine geringe Sensitivität in der Bewertung einer frühen Verfettung [63, 64]. Auch technische Fortschritte wie „Harmonic Imaging“ und vierdimensionale Darstellung bieten keine wesentlichen Vorteile für die Diagnose und Quantifizierung einer Fettleber. Dennoch bleibt die Ultraschalldiagnostik eine etablierte Methode für die primäre Diagnosefindung bei klinischen Symptomen einer Lebererkrankung [65].

1.4.2.2 Computertomographie

Seit Einführung der Computertomographie (CT) in den 1970er Jahren stellt diese eine schnelle und wichtige Methode dar, um akute und chronische Erkrankungen der Leber zu erkennen und zu screenen [66]. Besonders der Einsatz von Mehrzeilen-Computertomographen mit 128 Detektorzeilen und mehr bieten Vorteile einer ultraschnellen Datenakquisition und einer hohen Ortsauflösung. Die Nativ-Darstellung ist im Hinblick auf die Beurteilung einer Fettleber das sensitivste CT-Verfahren und beruht auf der einfachen Messung der Leberdämpfung, ausgedrückt in Hounsfield-Units (HU) [67]. Die Messung der Dämpfung nutzt die physikalische Eigenschaft von Röntgenstrahlen, um in das Lebergewebe einzudringen. Die Leberdämpfungswerte verhalten sich dabei umgekehrt proportional zur Menge an Leberfett [68].

Für die Beurteilung einer Fettleber werden die Dämpfungswerte zwischen Leber und Milz gemessen. Im Nativ-CT weist die gesunde Leber HU-Werte zwischen 50 und 57 auf. Diese liegen etwa 8 bis 10 HU höher als die einer gesunden Milz; eine Tatsache, die auf das Vorhandensein von Glykogen in der Leber zurückzuführen ist [67]. Liegt die Dämpfung unter dem gemessenen Wert der Milz, gilt eine Leberverfettung als wahrscheinlich. Die geringere Dämpfung einer Leber mit intrahepatischen Verfettungen wird

dabei mit der vermehrten Ansammlung von Triglyceriden und Cholesterin in den Hepatozyten erklärt [69]. In einer Studie von Limanond et al. [70] wurde eine Leber-Milz-Dämpfungsdifferenz von mehr als 5 HU als Indikator für das Fehlen einer signifikanten grobtropfigen Steatose (0 bis 5 %) beschrieben; eine Differenz von -10 bis 5 HU als Hinweis auf eine leichte bis mäßige Leberverfettung (6–30 %). Eine Spezifität von 100 % für den Nachweis mittelschwerer bis schwerer grobtropfiger Steatose (> 30 %) lag vor, wenn die Leber-Milz-Dämpfungsdifferenz weniger als -10 HU betrug. Ebenso berichteten Park et al. [71] eine Spezifität von 100 % für den Nachweis einer Steatose von mehr als 30 % bei einer Leber-Milz-Dämpfungsdifferenz von weniger als -9 HU. Die Sensitivität für die Diagnose einer grobtropfigen Steatose von mehr als 30 % blieb jedoch zwischen 73 % und 82 % [70-72].

Für eine qualitative Beurteilung des Leberverfettungsgrads wird in der Literatur auf Basis der Leberdämpfung zusätzlich die Visualisierung der Lebergefäße (Portalvene, Lebervenen) hinzugezogen und ein 5-Punkte-Grading-System vorgeschlagen [72]:

- Grad 1: Lebergefäße zeigen eine geringere Dämpfung als das periphere Leberparenchym;
- Grad 2: Lebergefäße zeigen eine geringere Dämpfung als das Leberparenchym im mittleren Bereich der Leber;
- Grad 3: Lebergefäße zeigen eine geringere Dämpfung als das Leberparenchym im zentralen Drittel der Leber;
- Grad 4: Lebergefäße zeigen die gleiche Dämpfung wie das Leberparenchym;
- Grad 5: Lebergefäße zeigen eine höhere Dämpfung als das Leberparenchym.

Lee et al. [72] beschrieben die Methode der visuellen Einstufung der Leberverfettung als ähnlich genau wie das (semi-)quantitative Verfahren (Subtraktion der Milzdämpfung von der Leberdämpfung). In beiden Methoden wurde eine zuverlässige Möglichkeit für die Diagnose einer grobtropfigen Leberverfettung von 30 % oder mehr in Lebendspendern vor Lebertransplantation gesehen.

Die Darstellung der Leber mittels Kontrastmittelanreicherung zeigt im Vergleich zum Nativ-CT eine nochmals geringere Sensitivität (50–83 %) in der Beurteilung des intrahepatischen Fettgehalts [73]. Begründet wird dies dadurch, dass die Dämpfungseigenschaften von verschiedenen Faktoren des Kontrastmaterials abhängen. Die Art des Kontrastmittels (ionische gegenüber nicht ionischen Kontrastmitteln; Jodkonzentration), Volumen und Injektionsrate sowie die Verzögerung des Scanvorgangs nach Injektion

können diversen Einfluss auf die Leberdämpfung haben und feine Unterschiede in der Dämpfung maskieren [74].

Die Weiterentwicklung von „Dual Source“-Scannern erlaubt die Akquisition sog. „Dual-Energy“-Untersuchungen. Die hierbei eingesetzten Computertomographen bestehen aus zwei um 90° versetzten Röntgenröhren mit gegenüberliegendem Detektorsystem, die mit unterschiedlichen Energieintensitäten betrieben werden können (in der Regel 80 und 140 kVp). Die unterschiedlichen Dämpfungseigenschaften verschiedener Gewebe bei unterschiedlichen Energieniveaus sind nützlich für die Unterscheidung zwischen Körpergewebsarten wie Knochen oder Fett. Ergebnisse in der Literatur zeigen zum aktuellen Zeitpunkt jedoch keinen Vorteil der „Dual-Energy“-Technik gegenüber der „Single-Energy“-Technik zur genauen Bestimmung des Grads der intrahepatischen Verfettung [75].

Obwohl zusammenfassend native CT-Bilder gut mit dem Nachweis einer Lebersteatose korrelieren, bietet die aktuelle CT-Technik insbesondere für kleine Fraktionen von Fettinfiltrationen keine genaue und zuverlässige Methode [71]. Wenn der Einsatz der Computertomographie klinisch indiziert ist, sollte die Untersuchung mit möglichst geringer Strahlenbelastung durchgeführt werden; gerade bei Kindern und Jugendlichen ist diese wegen der hohen Strahlenexposition deutlich limitiert [76].

1.4.2.3 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine der empfindlichsten Modalitäten zur Detektion und Charakterisierung von Fettinfiltration innerhalb der Leber [77].

Wenn magnetisch aktive Kerne wie Wasserstoffatome in ein Magnetfeld gebracht werden, richten sie ihre magnetischen Momente parallel zur Achse des Magnetfelds (typischerweise als z -Achse bezeichnet) aus. Magnetresonanz tritt auf, wenn diese in Längsrichtung ausgerichteten Kerne durch einen Hochfrequenzimpuls (HF-Puls) von der entsprechenden Energie angeregt werden und sich in die Quer- oder xy -Ebene lagern (siehe Abbildung 3). In Folge der Anregung präzedieren diese Kerne um die z -Achse mit einer charakteristischen Frequenz, bekannt als Larmorfrequenz oder Resonanzfrequenz [68]. Diese Rotationsbewegungsfrequenz f , die sowohl von der Art des Kerns als auch von der Stärke des statischen Magnetfelds B_0 abhängig ist, wird durch die Larmor-Gleichung beschrieben:

$$f = \gamma \times B_0, \text{ wobei } \gamma \text{ spezifisch ist für den infrage kommenden Kern.}$$

Der spezifische Wert für Wasserstoffprotonen beträgt 42.6 MHz/Tesla, wobei 1 MHz = 1×10^6 Umdrehungen/Sekunde und Tesla (T) die Einheit der magnetischen Feldstärke beschreibt (1 T = 10000 Gauß) [68]. Gerade Wasserstoff spielt für die medizinische Bildgebung eine entscheidende Rolle: Nur Wasserstoff hat im Körper ein so großes Vorkommen und überdies weitere günstige Kernspin-Eigenschaften, dass eine hochauflösende räumliche Bildgebung menschlichen Gewebes möglich ist. Wird nun ein im 90° -Winkel eingestrahktes rotierendes Magnetfeld eingebracht, führt dies zu einer Auslenkung der ausgerichteten Kerne um 90° in Bezug auf z . Aufgrund dieser Quermagnetisierung M_{xy} wird ein Signal in einer Empfangsspule im MRT-Gerät erzeugt, das die Rekonstruktion der Bildinformation ermöglicht. Die Repetitionszeit (TR) bezeichnet dabei die Zeit zwischen zwei 90° -Impulsen; die Zeit zwischen 90° -Impuls und Detektion des Empfangssignals wird als Echozeit (TE) angegeben. Bei aktuellen Bildgebungssequenzen kann ein reduzierter Pulswinkel (*flip-angle*) verwendet werden, sodass die Spins nicht mehr um 90° , sondern um einen kleineren Winkel, z. B. 40° , ausgelenkt werden [68].

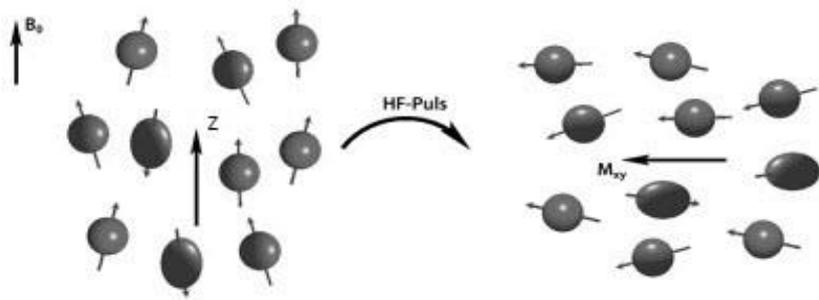


Abbildung 3: Nach Einstrahlen eines HF-Pulses präzedieren die Protonen in Phase und die Magnetisierung wird um 90° in die Transversalebene gebracht (aus Schneider [78])

Nach Ende eines Impulses erreichen die Protonen wieder ihren Gleichgewichtszustand (in B_0 -Richtung), indem sie ihre Energie an die Umgebung bzw. an benachbarte Nichtwasserstoffatome abgeben; es baut sich wieder die anfängliche Längsmagnetisierung auf – bezeichnet wird dieser Vorgang auch als longitudinale Relaxation oder T1-Relaxation. Die Relaxationskonstante T1 ist u. a. von der Magnetfeldstärke B_0 abhängig und bezeichnet die Dauer, die ein Gewebe braucht, um ca. 37 % der ursprünglichen Longitudinalmagnetisierung zu relaxieren [79].

Zusätzlich verlieren die Kerne nach Abschalten des Hochfrequenzimpulses ihre phasensynchrone Kreisbewegung. Der damit verbundene Rückgang der Transversal- bzw. Quermagnetisierung wird als T2-Relaxation bezeichnet. Die T2-Zeit gibt an, wann die

Transversalmagnetisierung auf 37 % des ursprünglichen Werts abgenommen hat [79] (siehe Abbildung 4 und 5). Die T2-Relaxationszeit ist dabei eine gewebespezifische Zeitkonstante, die durch die Messung der Signalintensität bei verschiedenen Echozeiten bestimmt wird (siehe auch Kapitel 3.2.3.2).

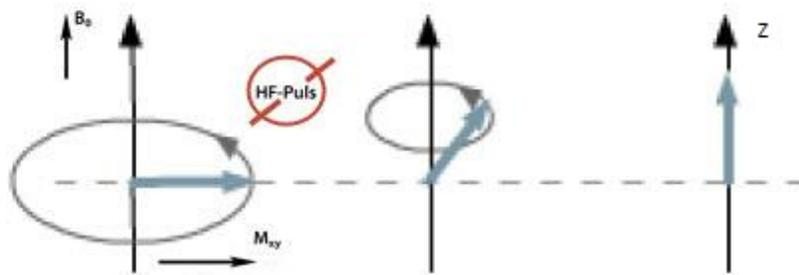


Abbildung 4: T1-Relaxation: Übergang der Längsmagnetisierung (longitudinale Magnetisierung) in ihren Gleichgewichtszustand (modifiziert nach Pabst [80])

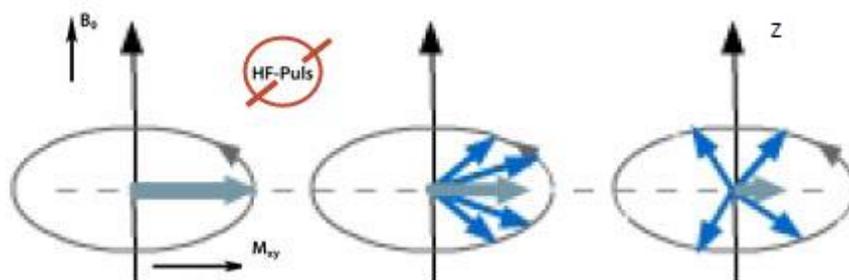


Abbildung 5: T2-Relaxation: Übergang der Quermagnetisierung (transversale Magnetisierung) in ihren Gleichgewichtszustand
 Verlust der Gleichphasigkeit der Spins (Dephasierung) und damit Verschwinden des Summenvektors (grau) in der xy-Ebene (modifiziert nach Pabst [80])

T1- und T2-Relaxation sind voneinander unabhängig und laufen gleichzeitig ab. Bei kurzer TR ist die Zeit, die zwischen zwei Anregungen bleibt, um die Longitudinalrelaxation wiederherzustellen, entsprechend verkürzt. Dies hat zur Folge, dass einige Gewebe nur unvollständig in den Gleichgewichtszustand zurückkehren. Bei der folgenden Anregung steht somit nur ein Teil der longitudinalen Magnetisierung zur Verfügung. Dieser Teil ist umgekehrt proportional zur T1-Konstante – das MR-Signal zeigt eine starke T1-Abhängigkeit – man erhält ein T1-gewichtetes Bild. Die Wahl einer langen TR bewirkt entsprechend eine vollständige Rückkehr der longitudinalen Magnetisierung – eine T1-Abhängigkeit kann so vermieden werden. Organewebe von Leber oder Niere weisen bei einer Feldstärke von 3.0 T eine Längsrelaxationszeit T1 in der Größenord-

nung von etwa 1500 ms auf. Fettgewebe relaxiert wesentlich schneller mit $T_1 = 365$ ms, freie Flüssigkeit mit T_1 -Werten bis 3 s dagegen deutlich langsamer.

Im T2-gewichteten Bild (lange TR und TE) wirkt sich vor allem die im Vergleich zur T_1 -Zeit kürzere T_2 -Zeit aus. Gewebe oder Substanzen mit langer T_2 -Zeit wie z. B. Flüssigkeit verfügen länger über eine Quermagnetisierung als umgebendes Gewebe und erscheinen deshalb im T2-gewichteten Bild hell [79].

Eine spezielle Methode zur Quantifizierung des Leberfettgehalts ist die *chemical shift MRT*. Mit der chemischen Verschiebung (*chemical shift*) wird eine leicht abweichende Resonanzfrequenz für gleichartige Atomkerne beschrieben, die an unterschiedlichen Molekülen oder Molekülorten gebunden sind. So beträgt der Frequenzunterschied zwischen der Resonanz der Methylenprotonen von Fettsäureketten und der von Wasserprotonen 450 Hz bei einer äußeren Feldstärke von 3.0 T, sodass ein Umlaufzeitunterschied (*chemical shift*) von 4.6 ms zwischen beiden Protonenarten resultiert. Dies impliziert, dass die Magnetisierungsvektoren von Fett und Wasser alle 4.6 ms gleich ausgerichtet sind (*in-phase*). Folglich stehen sie in der Hälfte der Zeit (2.3 ms) genau entgegengesetzt zueinander (*out-of-phase*). Während das normale Leberparenchym ähnliche Signalintensitäten auf *in-phase* und *out-of-phase*-Bildern zeigt, weist eine Fettleber eine verminderte Signalintensität auf *out-of-phase*-Bildern auf, die in Gegenwart schwerer Fettinfiltrationen deutlicher wird [81, 82].

Für die MR-tomographische Messung von Leberfett werden in der klinischen Anwendung routinemäßig Gradientenechosequenzen (GRE-Sequenzen) verwendet. Diese sind durch einen Verzicht von einem zusätzlichen 90° -Impuls charakterisiert. Anstelle dessen wird ein alpha-Impuls eingestrahlt. Die Spins werden in Folge mit Hilfe eines alpha-Winkels (*flip*-Winkel) zum magnetischen Hauptfeld B_0 ausgelenkt. Ein Flip-Winkel von weniger als 90° verringert die Menge der Magnetisierung in die transversale Ebene. Folglich ergibt sich eine schnellere Erholung der Längsmagnetisierung mit kürzerer TR- und TE-Zeit, sowie einer insgesamt verkürzten Messzeit [81]. Mit schnellen GRE-Sequenzen, die eine Dual-Echo-Technik mit Wasser-Fett-Kalibrierung kombinieren, ist es zudem möglich auch leichte Fettleberformen (10 % Verfettung oder mehr) zu erfassen. Neuere Studien zeigen, dass fettgesättigte schnelle *spin-echo*-Sequenzen (SE-Sequenzen) der GRE-Bildgebung vor allem in Gegenwart einer Leberzirrhose überlegen sind [77].

Der Einsatz der MR-Bildgebung für den Nachweis und die Quantifizierung einer Fettleber bietet vor allem den Vorteil, auf ionisierende Strahlung zu verzichten. Zudem lässt

sich die Leber in ihrer Gesamtheit erfassen. Einschränkungen beziehen sich auf den routinemäßigen Einsatz und umfassen die potenzielle Variabilität der Ergebnisse aufgrund der Unterschiede in den MR-Systemen, Scan-Parametern und Methoden der weiteren Analyse. Darüber hinaus stellt die MR-Bildgebung nach wie vor ein relativ teures Verfahren dar – ein Faktor, der die Eignung für wiederholte Auswertungen und Überwachungen von Behandlungsverläufen begrenzt [83]. Obwohl die MR-Bildgebung eine hohe Sensitivität für den Nachweis von Fett besitzt, ermöglicht sie keine absolute Quantifizierung der Leberfettkonzentration [68].

1.4.2.4 Magnetresonanzspektroskopie

Die Magnetresonanztechnik kann nicht nur für die bildgebende Diagnostik verwendet werden. Unabhängig von den zugrunde liegenden anatomischen Merkmalen kann sie im Rahmen der Magnetresonanzspektroskopie (MRS) Informationen biochemischer Prozesse erfassen und stellt eine weitere nicht invasive Methode zum Nachweis spezifischer Metaboliten dar. Historisch konzentrierte man sich zunächst auf die Phosphor (³¹P)-Spektroskopie. Im Zuge der technischen Weiterentwicklung wurden dann Voraussetzungen für Spektroskopien anderer Kerne – insbesondere Wasserstoff – geschaffen [84]. In der klinischen Routine bisher noch nicht etabliert ist die MR-Spektroskopie zur Quantifizierung intrahepatischen Fettgehalts [5]. Dabei lassen sich erhöhte Peaks der Lipide als direkter Nachweis eines erhöhten Fettgehalts in den Hepatozyten darstellen. Somit ist die MR-Spektroskopie die einzige zur quantitativen Bestimmung des exakten prozentualen Fettgehalts geeignete nicht invasive Methode [85] auf deren Grundlage sich alle Ergebnisse dieser Arbeit beziehen. Die ¹H-MR-Spektroskopie wird in Kapitel 2.1 ausführlich beschrieben.

1.4.3 Biochemische Lipidbestimmung nach FOLCH

Die FOLCH-Extraktion ist eines der häufigsten verwendeten und bekanntesten Extraktionsverfahren. Es beruht auf dem Dreiphasensystem Wasser–Chloroform–Methanol und gilt als sehr exakt und universell verwendbar, erfordert allerdings einen hohen Zeitaufwand, da zum einen ein gründliches Durchmischen des Extraktionsmittels mit der Analytenlösung und zum anderen die Zugabe von Puffern und letztendlich eine Zentrifugation erforderlich sind, um die entstehenden Phasen voneinander zu trennen. Die obere wässrige Phase enthält dabei die polaren Komponenten, in der Interphase sind die Proteine zu finden, die untere, überwiegend chloroformische Phase enthält die gelösten

Lipide. Letztere kann im Weiteren zur spektrophotometrischen Messung herangezogen werden [86].

1.4.4 Histopathologie

Makroskopisch ist die alkoholinduzierte Fettleber vergrößert und weist eine gelbliche, glatte Oberfläche mit teigiger Konsistenz auf [68, 87].

Die erste perkutane Leberbiopsie („Leberblindpunktion“) wurde von Paul Ehrlich schon im Jahr 1883 durchgeführt [88]. Weitere Verbreitung fand die Methode erst in den 1930er Jahren [89, 90]. Die histologischen Kriterien einer nicht-alkoholinduzierten Fettleber wurden im Jahr 1980 initial von Ludwig et al. veröffentlicht [91], die histologische Erkrankungsdefinition später erweitert [92]. Histologisch findet sich im Hämatoxylin-Eosin-Schnitt (HE-Schnitt) meist eine makrovesikuläre Ablagerung einzelner Fettvakuolen im Zytoplasma der Hepatozyten mit in die Peripherie verdrängten Zellkernen. In seltenen Fällen betrifft die Fetteinlagerung sämtliche Hepatozyten eines Azinus. Folge sind eine Hepatomegalie und laborchemische Zeichen einer Cholestase. Ein direkter Fettnachweis in den Leberpräparaten gelingt nach Alkoholfixierung und anschließender Sudan-Färbung der Schnitte. Sogenannte Resorptionsknötchen finden sich in unregelmäßigen Abständen in den Leberläppchen, die aus vereinzelt neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Kupffer-Zellen und Histozyten bestehen. Histologisch können die Krankheitsbilder der alkoholinduzierten Steatosis, Steatohepatitis und Leberfibrose bzw. Leberzirrhose kombiniert nachweisbar sein. Von einer isolierten Verfettung der Leber spricht man nur dann, wenn sich keine histologischen Kriterien späterer Stadien zeigen. Die Variante der Leberverfettung mikrovesikulären Typs (Fetttröpfchen $< 1 \mu\text{m}$) wird als alkoholische *foamy degeneration* beschrieben und findet sich gelegentlich nach exzessivem Alkoholgenuss [93]. Bei dieser Störung finden sich zusätzlich fokale Leberzellnekrosen und histologische Zeichen einer schwer verlaufenden Cholestase. Darüber hinaus kann eine geringe perivenuläre Fibrose nachweisbar sein, ohne dass Zeichen einer Steatohepatitis vorliegen. Die perivenuläre Fibrose entwickelt sich dabei um die terminalen hepatischen Venolen durch Ablagerung von Bindegewebe, das von aktivierten Myofibroblasten synthetisiert wird. Gerade bei Beginn des Alkoholkonsums fehlt diese Eigenschaft jedoch, sodass die perivenuläre Fibrose einen entscheidenden prognostischen Hinweis auf einen fortbestehenden Alkoholkonsum darstellt. Zusätzlich können Megamitochondrien nach Alkoholexzessen – als eosinophile Strukturen im Zytoplasma – beobachtet werden [38].

Die wichtigsten histologischen Kriterien einer Fettleber sind das Vorhandensein grobtropfiger Verfettung der Hepatozyten mit Verschiebung der Kerne an den Rand der Zelle, Degeneration und Ballonierung von Hepatozyten und gemischt-lobuläre Nekrose [94]. Weitere Merkmale wie perisinusoidale-perizelluläre Fibrose, Mallory-Körperchen, Megamitochondrien und glycogenierte Kerne können vorhanden sein, sind zur Diagnose aber nicht immer erforderlich [95]. Ferner können atypische Merkmale wie überwiegend portalbasierte Nekrose und Fibrose vorhanden sein. Dieses Muster wurde häufig bei kindlichen Lebern beobachtet; es ist aber derzeit noch unklar, ob es ein frühes Stadium der Steatohepatitis repräsentiert oder eine deutlich schwerwiegendere Lebererkrankung darstellt [96]. Sowohl bei einer alkoholinduzierten (AFLD) als auch bei einer nicht-alkoholinduzierten Fettlebererkrankung (NAFLD) finden sich teilweise die beschriebenen Merkmale, sodass eine sichere Differenzialdiagnose AFLD/NAFLD im Allgemeinen nicht allein nach histologischen Kriterien erfolgen kann [97], (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Histologische Merkmale zur Differenzialdiagnostik der alkoholischen (AFLD) und nicht alkoholischen Fettleber (NAFLD)

Befund	AFLD	NAFLD
Steatose	+	++
Ballonierung	++	++
Lobuläre Entzündung	++	+ / ++
Portale granulozytäre Entzündung	++	- / +
Mallory-Denk-Bodys	+++	+
Satellitose	+++	-
Akute Cholestase	+	-
Sklerosierende hyaline Nekrose	++	-
Obliterative venöse Okklusion	++	-

Nach wie vor gilt die Leberbiopsie als Goldstandard bei der Sicherung der Diagnose sowie der Bestimmung der entzündlichen Aktivität und möglichen Fibrose einer Fettlebererkrankung [9]. Nach der deutschen Leitlinie der AWMF sollte die Indikation zur Biopsie den möglichen Informationsgewinn durch die Biopsie und seine Konsequenzen

im Vergleich zu Aufwand und Komplikationsrate berücksichtigen und daher im klinischen Kontext gestellt werden. „Eine allgemeine Empfehlung zur Leberbiopsie bei möglicher oder gesicherter Fettlebererkrankung kann derzeit nicht gegeben werden“ [29].

Es gibt einige wichtige Einschränkungen der Leberbiopsie. Zum einen ist sie als invasives Verfahren eine offensichtliche Belastung für den Patienten. Zum anderen können leichte, aber auch schwerwiegende Komplikationen auftreten [99, 100]. Darüber hinaus sind Entnahmefehler möglich, sodass die geringe Probenmenge den tatsächlichen Zustand der gesamten Leber nicht sicher widerspiegelt. Die Biopsie ist zudem kein präziser Marker für den stetig fortschreitenden Um- und Abbauprozess. Weiterhin interpretieren Pathologen histologische Proben häufig unterschiedlich, wobei eine Variabilität sowohl zwischen den Gutachtern untereinander als auch beim einzelnen Gutachter bei 10 bis 20 % der Biopsien auftritt [101].

1.5 Fragestellung

Eine Studie wie die im Folgenden beschriebene zu ¹H-spektroskopischen In-vivo-Messungen einer akuten alkoholinduzierten Fettleber nach 48 Stunden mittels 3.0 T-Technik wurde bisher noch nicht publiziert.

Wie vorangehend angeführt kann eine akute Fettleber subklinisch, asymptomatisch oder fulminant mit den Symptomen eines akuten Leberversagens verlaufen. Erhöhte laborchemische Parameter oder sonographische Befunde mit ihrer Interobserver-Variabilität und fehlender Abstufung des Verfettungsgrads bleiben oft ohne richtungsweisendes Ergebnis. Nach wie vor ist der Goldstandard zur Diagnose einer Fettleber die Gewinnung einer Leberbiopsie mit anschließender histopathologischer Aufarbeitung. Andere nicht invasive diagnostische Methoden wie die Magnetresonanztomographie sowie -spektroskopie haben in den letzten Jahren großes Interesse geweckt – zum einen wegen der im Vergleich zum CT fehlenden Strahlenbelastung, zum anderen, da speziell mittels ¹H-MRS eine exakte Quantifizierung des Fettgehalts möglich ist und somit eine gute Abgrenzung zu anderen Stadien eines alkoholbedingten Leberschadens herausgearbeitet werden kann. Der Einsatz der Magnetresonanztomographie in der Diagnostik der Fettleber hat sich durch klinische wie auch tierexperimentelle Studien nach und nach etabliert, jedoch basiert die Mehrzahl der Studien auf der Diagnosefindung bei nicht-alkoholinduzierter Leberverfettung oder einer Verfettung nach chronischem und nicht wie vorliegend nach akutem Alkoholkonsum.

Die Hauptziele der vorliegenden Dissertation waren:

- 1) zu überprüfen, ob am Tiermodell eine akute alkoholinduzierte Fettleber quantitativ mittels 3.0 T-MR-Tomographen und anschließender Spektroskopie dargestellt werden kann;
- 2) zu überprüfen, ob spektroskopisch ermittelte Lipidkonzentrationen mit den Serumkonzentrationen der laborchemisch gemessenen Leberparameter korrelieren;
- 3) statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen einer spektroskopisch darstellbaren Leberzellverfettung und dem Goldstandard der histopathologischen und biochemischen Diagnostik nachzuweisen und somit
- 4) tierexperimentelle Daten zu Sensitivität und Spezifität der ¹H-MRS bei akuter alkoholinduzierter Fettleber zu erstellen.

2 GRUNDLAGEN DER MAGNETRESONANZSPEKTROSKOPIE

Die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) ist eine analytische Methode, die die Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten in Gewebeproben ermöglicht. Im Unterschied zur MR-Bildgebung, bei der vor allem die Wiedergabe anatomischer Strukturen im Vordergrund steht, liefert die MR-Spektroskopie Informationen über die chemische Zusammensetzung des Gewebes. Somit ist eine nicht invasive Untersuchung des Stoffwechsels in-vivo möglich [29]. MRS hat ihren Ursprung in der kernmagnetischen Resonanz (engl. *nuclear magnetic resonanz* – NMR), die erstmals 1946 von den Nobelpreisträgern Edward Purcell und Felix Bloch beschrieben wurde. Zu dieser Zeit wurde NMR nur von Physikern zum Zwecke der Bestimmung der atomaren magnetischen Momente der Kerne verwendet. Erst Mitte der 1970er Jahre wurden erste MR-spektroskopische Messungen zu diagnostischen Zwecken in-vivo durchgeführt. Lauterbur, Mansfield und Grannell führten Gradienten in ein Magnetfeld ein, um den Ort des ausgesendeten Signals zu bestimmen und dann in einem Bild zu reproduzieren. In-vivo-NMR-MRT und NMR-Spektroskopie wurden entsprechend in MRT bzw. 1H-MRS umbenannt, da der Begriff „nuklear“ fälschlicherweise mit der Nuklearmedizin assoziiert wurde. Während der 1980er Jahre wurden die ersten medizinischen MRT-Scanner für den klinischen Einsatz zur Verfügung gestellt. Seitdem konnten durch ständige Verbesserungen vor allem höhere Feldstärken erreicht werden [102].

MR-Spektren können aus verschiedenen Kernen gewonnen werden, einschließlich Phosphor (^{31}P), Fluor (^{19}F), Kohlenstoff (^{13}C) und Natrium (^{23}Na). Für klinische diagnostische Zwecke werden vor allem Wasserstoffprotonen (^1H) verwendet. Größter Vorteil ist das Vorkommen von Wasserstoff in allen biologisch relevanten Metaboliten. Darüber hinaus liefert der Wasserstoffkern aufgrund seiner großen Sensitivität im Vergleich zu anderen Kernen ein höheres MR-Signal und ermöglicht – bei kürzerer Untersuchungszeit – eine bessere räumliche Auflösung [29]. Die ^1H -MRS erfordert HF-Spulen und ein dediziertes Softwarepaket. Für Nicht-Protonen müssen HF-Spulen zusätzlich mit der Larmorfrequenz anderer Kerne abgestimmt und ein passender Vorverstärker, Hybriden und Breitband-Leistungsverstärker verwendet werden. Nach wie vor ist das Haupteinsatzgebiet das ZNS: Hier gibt es umfangreiche Erfahrungen vor allem bei der Untersuchung neurometabolischer Erkrankungen, Demenzen und Raumforderungen [103, 104].

Zur konventionellen MRT-Messung werden klinisch verschiedene Feldstärken eingesetzt, vor allem im Bereich von 0.2 bis 3.0 T. Höhere Feldstärkeeinheiten haben den

Vorteil eines höheren Signal-Rausch-Verhältnisses, eine bessere Auflösung und kürzere Aufnahmezeiten [79, 102].

Wie die Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie basiert auch die MR-Spektroskopie auf den Signalen, die Kernspins in einem Magnetfeld abgeben, sobald sie durch einen Impuls angeregt werden. Änderungen des Magnetfelds bewirken eine Änderung der bereits oben beschriebenen Larmorfrequenz: $\gamma \times B_0$. Der Faktor γ stellt dabei die charakteristische Kern-Konstante dar (siehe auch Kapitel 1.4.2.3). Somit besitzt jede Atomkernart ihre eigene charakteristische Resonanzfrequenz. Die Wechselwirkungen der Kerne untereinander und mit ihrer Umgebung bewirken eine Änderung des lokalen Magnetfelds und führen damit zu einer Änderung der Spin-Frequenz. In einer homogenen Substanz, wie destilliertem Wasser, haben alle Kernspins – unter Voraussetzung eines ideal homogenen äußeren Magnetfelds – exakt dieselbe Frequenz. In einem Gewebe aus verschiedenen biochemischen Komponenten ist dies jedoch nicht der Fall. Abhängig von der chemischen Struktur des Moleküls, in das ein Kernspin eingebaut ist, registriert der Kernspin eine geringfügig vom äußeren Magnetfeld abweichende Feldstärke. Verursacht wird dieser Effekt durch die den Atomkern umgebende Elektronenwolke, die durch das Magnetfeld am Kernort zu einem kleinen Teil abgeschirmt wird. Diese mikroskopischen Störfelder unterscheiden sich meist in ihren chemischen Verbindungen. Folglich wirkt auf die Kerne effektiv ein lokales, individuell minimal unterschiedliches Magnetfeld, das in Abhängigkeit von ihrer Molekülbindung zu geringgradigen Frequenzunterschieden führt [29, 105]. Die absolute Verschiebung Δf der Resonanzfrequenz, die durch eine Abschirmung σ verursacht wird, ist proportional zur Stärke des äußeren Magnetfelds:

$$B_0: \Delta f = \sigma \times f_0 = \sigma \times \gamma \times B_0$$

Die resultierende Resonanzfrequenz eines Kernspins lässt sich quantitativ wie folgt ausdrücken:

$$f = f_0 - \Delta f = (1 - \sigma) \gamma \times B_0.$$

Nach Anlegen eines HF-Impulses wird die Amplitude des zurückkehrenden Signals gemessen. Es entsteht ein Summensignal auf der Zeitachse. Zentraler Schritt in der Nachbearbeitung ist die Fourier-Transformation, die das Zeitsignal in ein Frequenzspektrum umwandelt und als parts per million (ppm) quantifiziert. Nun können Metabo-

litens-Peaks in dem Spektrum identifiziert werden. Diese Peaks entsprechen den Kern-Resonanzfrequenzen auf der Ordinatenachse (siehe Abbildung 6).

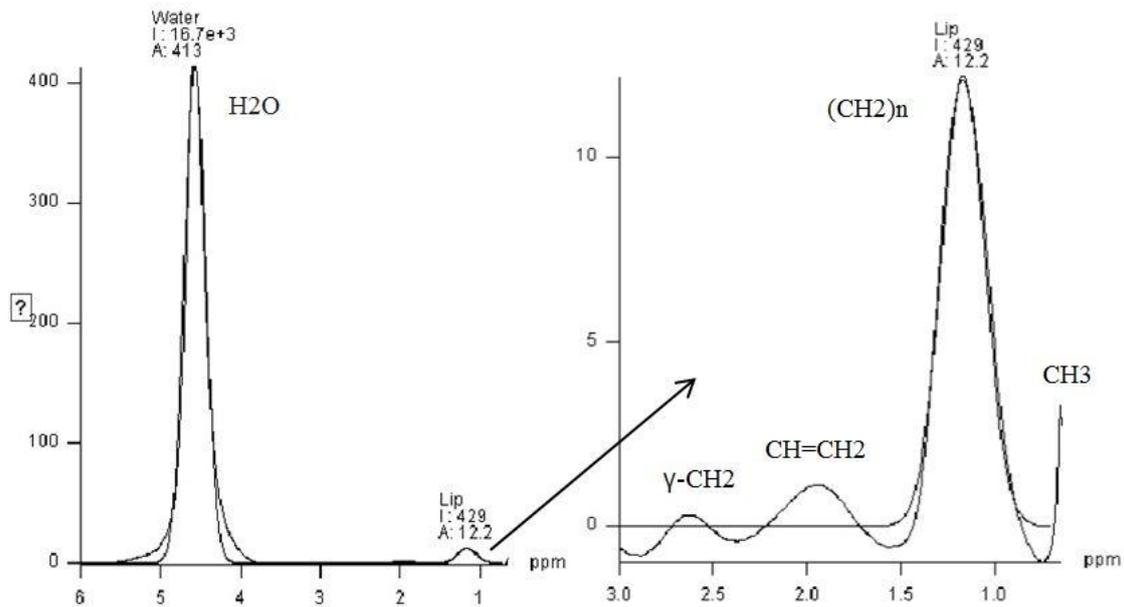


Abbildung 6: Typisches MR-Spektrum mit Vergrößerung des Lipid-Peaks einer Ratte mit leichter Leberverfettung; Ordinatenachse mit Amplitude; Abszisse mit der Frequenz der entsprechenden Metaboliten

Zuordnungen: $(\text{CH}_2)_n$: gesättigte Lipide bei 1.3 ppm; $\text{CH}=\text{CH}_2$: ungesättigte Lipide bei 2.0 ppm; CH_3 : mobile Lipide bei 0.6 ppm; $\gamma\text{-CH}_2$: Glutamat/Glutamin bei 2.6 ppm; H_2O : Wasser bei 4.6 ppm. I, Integral; A, Amplitude

Die chemische Verschiebung (*chemical shift*) sorgt dafür, dass verschiedene chemische Komponenten leicht unterschiedliche Resonanzfrequenzen haben. Damit lassen sich in einem Spektrum diverse chemische Komponenten identifizieren und quantifizieren. Einige Metaboliten wie zum Beispiel Lactat haben Dubletts, Tripletts oder Multipletts statt einzelner Peaks. Diese Spitzen werden nach unten zu komplexeren Gipfeln aufgebrochen und lassen sich durch die sogenannte J-Kopplung, auch Spin-Spin-Kopplung, erklären. Dieses Phänomen tritt auf, wenn die molekulare Struktur eines Metaboliten derart beschaffen ist, dass die Protonen in verschiedenen Atomgruppen (z. B. CH_3 - und CH_2 -) sitzen. Diese Gruppen haben jeweils leicht abweichende lokale magnetische Felder, sodass die verschiedenen Protonengruppen mit ihrer bestimmten Frequenzcharakteristik ein Multipllett-Peak ergeben [102]. In Tabelle 3 sind die chemischen Verschiebungen der Metaboliten aufgeführt, die sich in der Leber MR-spektroskopisch dektieren lassen.

Tabelle 3: Zuordnung der spektroskopischen Peaks zu ihren hepatischen Metaboliten mit den verwandten Abkürzungen

<i>Chemical shift</i> in parts per million (ppm)	Zuordnung der chemischen Verschiebung	Abkürzung
4.2–4.8	Wasser	(H ₂ O)
3.4–3.9	Glukose/Glykogen	(Glyk/Gluc)
3.0–3.2	Phosphormonoester	(PME)
2.2–2.6	Glutamat/Glutamin	(γ -CH ₂)
1.9–2.3	Methylgruppen der Lipide (ungesättigte Lipide)	(CH ₂ = CH-CH ₂)
1.2–1.5	Aliphatische Methylengruppen der Lipide (gesättigte Lipide)	(CH ₂) _n
0.6–0.8	Methylgruppen der Lipide („mobile Lipide“)	(CH ₃)

Die spektrale Auflösung wird vor allem durch drei Faktoren bestimmt: Erstens ist die transversale Relaxationszeit (T₂) des Metaboliten umgekehrt proportional zur idealen Peakbreite. Zweitens steigt die *B₀*-Trennung zwischen zwei Peaks (in Hz) linear mit der magnetischen Feldstärke. Unter Einbeziehung makroskopischer Einflüsse, wie z. B. Magnetfeldinhomogenitäten, findet man – drittens – für das gemessene Spektrum eine Mischform, die anteilig aus Lorentz- und Gaußfunktionen besteht. Maximale Homogenität wird durch das Einstellen der DC-Ströme (Gleichstrom) in der Gradientenspule und der Raumtemperatur in den Shim-Spulen erreicht. Dieser Prozess wird als „Shimming“ bezeichnet, historisch abgeleitet aus einer Zeit, als Magnetresonanz-Forscher an resistiven Magneten an der „Bereinigung“ der Magnetfelder arbeiteten.

Die am häufigsten verwendeten ¹H-MRS-Techniken sind die *STimulated Echo Acquisition Mode* (STEAM) und *Point-RESolved Spectroscopy* (PRESS). Beide haben sich besonders für die Einzelvolumenspektroskopie (*single voxel spectroscopy*, SVS) etabliert [106-111]. Um ein einzelnes Spektrum aus einem kleinen Zielvolumen (*volume of interest*, VOI) zu erhalten, werden mit Hilfe von Schichtselektionsgradienten nacheinander drei zueinander senkrechte Schichten angeregt, wobei deren Schnittpunkt das VOI definiert. Nur in diesem Schnittvolumen erfahren die Spins alle drei Pulse und tragen zum MR-Signal bei. Das bessere Signal-Rausch-Verhältnis wird mit der PRESS-Sequenz erzeugt [106]. Mittels Integration wird die relative Signalintensität errechnet, die ein Maß der Teilchenkonzentration darstellt. Durch Aufsummieren der Datenaquisition sowie häufige Wiederholungen wird die Messgenauigkeit gesteigert.

Ähnlich der Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie wird das MR-Signal in der Spektroskopie von den Sequenzparametern TR und TE beeinflusst. Vor allem die Echozeit hat entscheidenden Einfluss darauf, welche Stoffwechselprodukte im Spektrum sichtbar sind. Durch unterschiedliche T₂-Zeiten der Metaboliten ist die Signalabnahme innerhalb der TE-Zeit unterschiedlich ausgeprägt. Bei langen Echozeiten (135 ms oder mehr) können nur diejenigen Substanzen (wie Kreatinin, Laktat, aber auch Lipide) nachgewiesen werden, die auch lange T₂-Zeiten besitzen. Die Signale anderer Stoffwechselprodukte, darunter Glutamat/Glutamin, sind bei langer Echozeit wegen ihrer schnellen T₂-Relaxation zu gering. Um auch diese Substanzen darzustellen, müssen Sequenzen mit kurzen Echozeiten (30 ms oder weniger) verwendet werden [29].

Um eine qualitative Interpretation und quantitative Auswertung der Spektren zu ermöglichen, sind nach der Aufnahme des MR-Signals bestimmte Nachverarbeitungsschritte durchgeführt nötig, die im klinischen Einsatz mithilfe der Auswertungssoftware des MR-Geräts weitgehend automatisiert ablaufen. Vor allem bei pathologischen Spektren, bei denen „normale“ Peaks fehlen oder zusätzliche Peaks auftreten, ist häufig auch eine manuelle Optimierung der Nachbearbeitung erforderlich, um eine optimale Darstellung der Spektren zu erhalten. Zunächst wird das gemessene MR-Zeitsignal mit einer Gauß- oder Exponentialfunktion multipliziert, um das Rauschen zu verringern. Anschließend erfolgt das sogenannte *zero filling*, bei dem der nicht betrachtete „Rest“ des Signals mit Nullen aufgefüllt wird und einer Interpolation zwischen den Datenpunkten im Frequenzspektrum entspricht. Da häufig Verzerrungen der Grundlinie aufgrund von Streuverlusten oder systematische Probleme der Messapparatur auftreten, wird eine sogenannte Basislinienkorrektur durchgeführt. Dabei wird ein an die Daten angepasster Bereich (ohne zusätzliche Signale) vom Spektrum subtrahiert. Abschließend erfolgt eine Phasendrehung, um ein reines Absorptionsspektrum zu erhalten. Schließlich werden durch Integration die Flächen unter den Peaks als Maß für die Konzentration der entsprechenden Metaboliten bestimmt [29].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

Das untersuchte Kollektiv umfasste 40 männliche Lewis-Ratten (bestellt bei Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere waren 6 bis 8 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 250 bis 300 g. Alle Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22 ± 2 °C, einer durchschnittlichen relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 10 % und einem definierten Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter. Die maximale Anzahl pro Käfig betrug 6 adulte Tiere. An 10 Tieren wurde in Vorversuchen die Injektion von Ethanol und somit die Induktion einer alkoholinduzierten Fettleber erlernt und optimiert. Weitere 10 Tiere dienten der Optimierung der magnetresonanztomographischen Darstellung der Rattenleber, da die im klinischen Alltag bewährten MRT-Sequenzen an die besonderen physiologisch-anatomischen Bedingungen der Versuchstiere angepasst werden mussten. Um einen biochemischen sowie histopathologischen Vergleich vor und nach Ethanolgabe zu erhalten, wurde an diesen 10 Tieren vor den spektroskopischen Messungen die Leber extrahiert und histopathologisch sowie biochemisch untersucht. In die tatsächliche Studienphase gingen also insgesamt 30 Tiere ein, aufgeteilt in eine Kontrollgruppe (10 Tiere) und eine Versuchsgruppe (20 Tiere). Alle Versuche wurden durch das Regierungspräsidium Darmstadt unter der Genehmigungsnummer F 86/14 genehmigt.

3.2 Versuchsablauf

Alle Versuchstiere wurden vor und nach Ethanolgabe laborchemisch und spektroskopisch untersucht. 24 Stunden nach der zweiten Ethanolgabe wurde zusätzlich der Goldstandard der histologischen sowie biochemischen Untersuchung durchgeführt. Um einen paarweise spektroskopischen und laborchemischen Vergleich zu haben, entsprachen die 20 Tiere der Versuchsgruppe vor Ethanolgabe den 20 Tieren der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe. Zur erleichterten Identifizierung erhielten die Versuchstiere Ohrmarken (Ohrmarken, A. Hartenstein – Laborbedarf, Deutschland; 9×13 mm, Best.-Nr. OLT). Gemäß Reboucas et al. [112] wurde jeder Ratte der Versuchsgruppe eine Dosis von 9.3 g/kg Körpergewicht 50 %-igen Ethanols (Zentralapotheke, Universitätsklinikum Frankfurt) zweimal mit einem Abstand von 24 Stunden zwischen den Anwendungen verabreicht. Die Anwendung erfolgte gastral mit einer geraden, 2×80 mm (Durchmes-

ser × Länge) großen Knopfkanüle aus Edelstahl (Param GmbH, Hamburg, Deutschland, PZN:04917497) (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: Gastrale Ethanolapplikation über eine Knopfkanüle

Im Folgenden ist eine Übersicht des Versuchsablaufs dargestellt. Für eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Methoden sei auf den jeweiligen Abschnitt verwiesen:

Kontrollgruppe:

Tag 0: Narkose von 10 Ratten mit Isofluran
Explantation der Leber
Biochemische Bestimmung der Lipide nach FOLCH
Histologische Fettbestimmung

Versuchsgruppe:

Tag 1: Narkose von 20 Ratten mit Isofluran
Spektroskopische Messung der hepatischen Lipidkonzentration
3 ml Blutentnahme zur Bestimmung von AST, ALT und GGT
Tag 2: Erste Ethanolgabe
Tag 3: Zweite Ethanolgabe
Tag 4: Narkose der 20 Ratten mit Isofluran
Spektroskopische Messung der hepatischen Lipidkonzentration
3 ml Blutentnahme zur Bestimmung von AST, ALT und GGT
Explantation der Leber
Biochemische Bestimmung der Lipide nach FOLCH
Histologische Fettbestimmung

3.2.1 Isofluran-Narkose

Eine stabile Narkose der Ratten erfolgte mit einem 2.2%-Isofluran-O₂-Gemisch bei 1 l O₂/min. Zunächst wurden die Tiere in einen Glaszylinder mit Knopfdeckel gesetzt, in dem sich mit Isofluran (Isofluran Baxter, Baxter Deutschland GmbH) getränkter Zellstoff befand. Sobald die Tiere keine aktive Bewegung mehr zeigten, wurden sie aus dem Glaszylinder entnommen und über eine angefertigte Maske (schräg abgeschnittene Perfusorspritzenkolben (Perfusorspritze 50 ml, Braun, Dispomed, Herst.-Nr. 03040010) mittels Isofluran-Vaporisator (Dräger Vapor 19.3, Dräger, Lübeck, Deutschland) in Narkose gehalten. Die Verbindung zwischen Vaporisator und Maske erfolgte mittels eines handelsüblichen Schlauchsystems. Nach zwei bis drei Minuten war eine ausreichende Narkosetiefe – kontrolliert durch eine ausbleibende Reaktion auf Schmerzreize – erreicht und die Ratte konnte auf den MRT-Tisch umgelagert werden.

3.2.2 Blutentnahme zur Bestimmung serologischer Parameter

Vor der ersten und 24 Stunden nach der zweiten gastral Ethanolapplikation wurden nach Abschluss der spektroskopischen Messungen ca. 3 ml Blut durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus entnommen, um die Serumspiegel von AST, ALT sowie GGT zu bestimmen. Dem narkotisierten Tier wurde eine Glaspipette (Pasteur-Pipette 2 ml, Carl Roth, Herst.-Nr. 4522.1) in den medialen Augenwinkel (am Augapfel vorbei) eingeführt und der Venenkomplex im Innern der Augenhöhle angestochen, sodass sich Blut in der Kapillare sammelte. Nach Herausziehen der Kapillare wurde Zellstoff auf die Wunde aufgedrückt, um die Blutung zu stillen und die Einstichstelle zu schließen. Das entnommene Blut wurde anschließend in ein Serumröhrchen (Kabe Labortechnik, Deutschland, Art.-Nr. 078002) transferiert. Um eine Koagulation in der Glaspipette zu vermeiden, wurde diese zuvor mit Heparin (B. Braun Melsungen AG, Deutschland, PZN: 2540309) gespült. Die Untersuchungen wurden im Zentrallabor der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Universitätsmedizin Frankfurt am Main mit den handelsüblichen Kits durchgeführt.

3.2.3 Magnetresonanz-Methoden

Die spektroskopischen Untersuchungen der Ratten wurden an einem 3.0 T-Ganzkörper-Kernspin-Tomographen vom Typ Magnetom Trio (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) mit Spektroskopie-Zusatz durchgeführt.

3.2.3.1 Magnetresonanztomographie

Vor der spektroskopischen Messung wurden bildgebende Sequenzen von der zu untersuchenden Leber durchgeführt. Die Bildgebung diente in erster Linie der Platzierung des Volume Of Interest (VOI) im Bereich des Leberparenchyms. Als Spule wurde eine multifunktionale Acht-Kanal-Spule (Clothespin-Spule, CPC) aus zwei Spulenpaaren mit jeweils vier Kanal-Arrays (Noras MRI Products, Höchberg, Deutschland) verwendet. Die Ratten wurden wie oben beschrieben narkotisiert und in der *head-first-supine-position* in Rückenlage im MRT positioniert (siehe Abbildung 8). Zur diagnostischen Darstellung der Leber wurde eine dreidimensionale T1-gewichtete Sequenz der Firma Siemens („f13d_vibe“) mit folgenden Parametern verwendet: TR: 10.7 ms, TE: 2.75 ms (*in-phase*, IP) und 6.125 ms (*out-of-phase*, OP), Flip-Winkel: 9°, averages: 20, *field of view* (FOV): 100 mm; *slice thickness*: 1 mm. Es handelte sich hierbei um eine Variante einer in transversaler Orientierung gerichteten 3D-GRE-Sequenz. Die hier verwendete VIBE-Sequenzvariante führt zur Verringerung von Artefakten bzw. zur Verbesserung der Bildqualität und zeichnet sich durch sehr kurze Echozeiten aus.

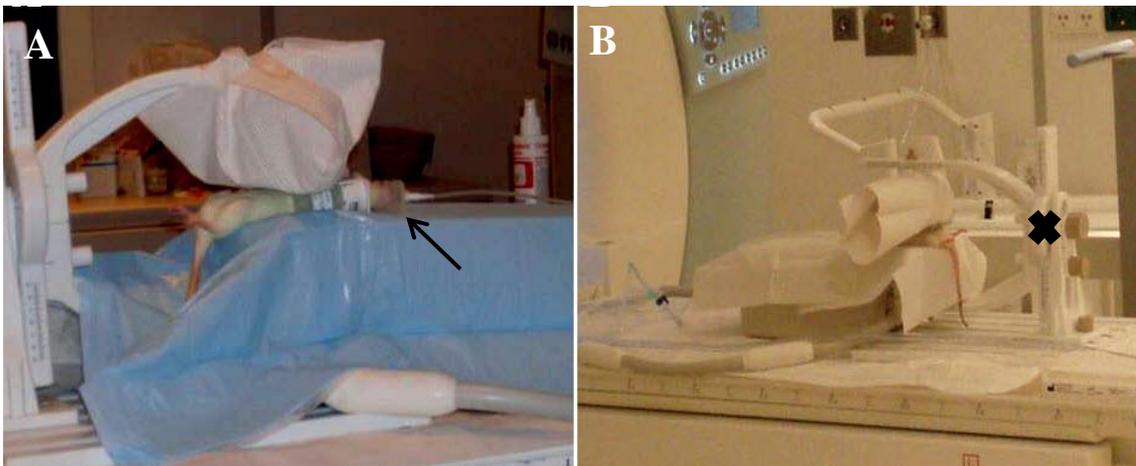


Abbildung 8: Versuchstier in *head-first-supine-position* im 3.0 T-MRT vor Messbeginn
Pfeil in A zeigt den schräg abgeschnittenen Perfusorspritzenkolben mit Schlauchsystem;
Kreuz in B markiert die Clothespin-Spule

Zur korrekten Platzierung des VOI dienten Lokalisationssequenzen, T1-gewichtete Sequenzen in transversaler (TSE, TR = 684 ms, TE = 20 ms) und koronarer (TSE, TR = 745 ms, TE = 20 ms) Ebene sowie eine T2-Sequenz in transversaler (TSE, TR = 4820 ms, TE = 79 ms) Ebene. Die eingesetzte Turbo-Spin-Echo-Technik (TSE) diente als Variante der konventionellen Spin-Echo-Technik. Bei einer gewöhnlichen Spin-Echo-Sequenz wird pro Anregung (90°-Impuls) ein Echo ausgelesen. Die Turbo-Spin-Echo-Sequenz impliziert pro Anregung zusätzliche 180°-HF-Impulse, sodass meh-

rere Echos erzeugt und empfangen werden. Die aufeinanderfolgenden Echos pro Anregung werden als Echo-Train (Puls-Zug) bezeichnet, ihre Anzahl als Turbo-Faktor. Da nun bei jeder Anregung mehrere Echos ausgelesen werden, wird die notwendige Zahl an Echos zum Bildaufbau schon viel früher erreicht und die Gesamtmesszeit verkürzt sich um den Turbofaktor. Vorteile der TSE sind somit eine reduzierte Messzeit, eine höhere Auflösung als die SE, geringere Suszeptibilitätsartefakte sowie die starken Fettsignale auch bei langer effektiver TE-Zeit.

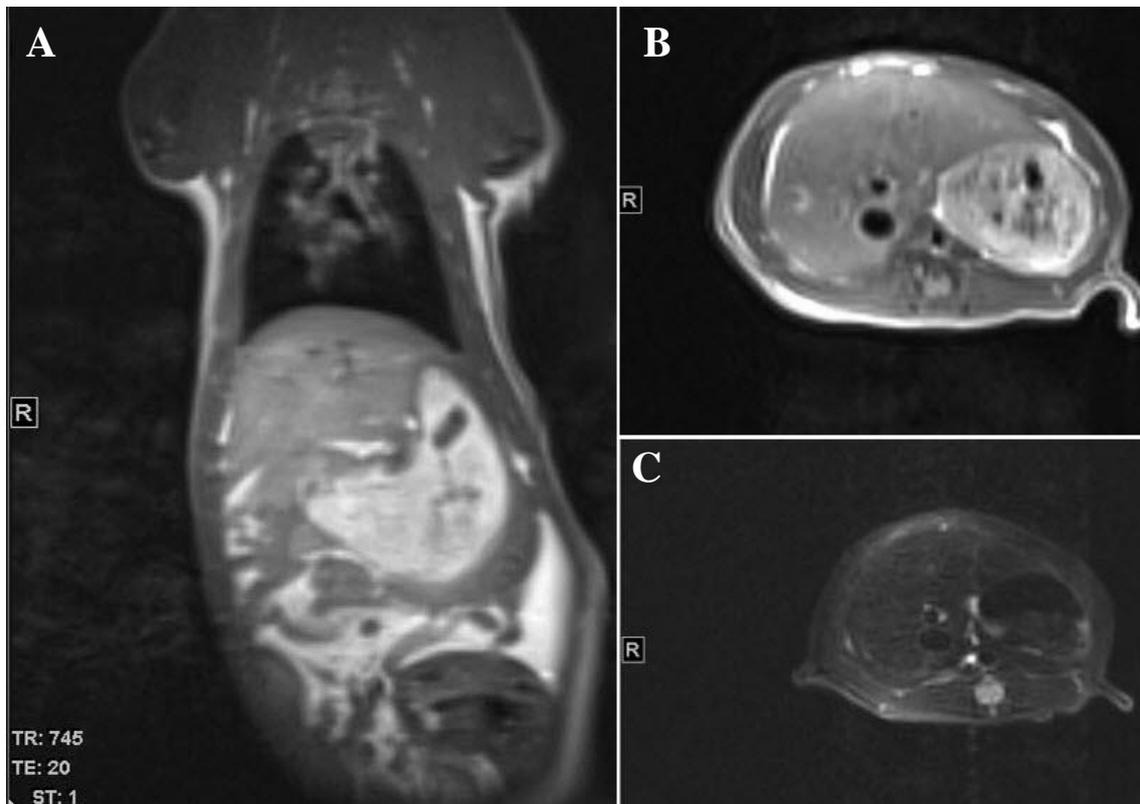


Abbildung 9: A: T1-gewichtetes MRT-Bild eines Versuchstiers in koronarer Ebene (TR = 745 ms, TE = 20 ms); B: T1-gewichtetes MRT-Bild der Leber in transversaler Ebene (TR = 648 ms, TE = 20 ms). C: T2-gewichtetes MRT-Bild der Leber in transversaler Ebene (TR = 4820 ms, TE = 79 ms)

3.2.3.2 ¹H-Magnetresonananzspektroskopie

Die Vorbereitung der spektroskopischen Messung erfolgte durch automatisches Shimming – individuell durch interaktives Shimming ergänzt – sowie durch Gradientenbestimmung. Zur Erhebung der Spektroskopiedaten wurde weder der Tomograph noch die Spulenkombination gewechselt, sodass der Aufbau dem der vorangegangenen MRT-Untersuchung entsprach. Bei jedem Tier wurde ein Voxel mit einer konstanten Größe von 10 × 10 × 10 mm individuell in der Leber platziert und versucht, Blutgefäße sowie Areale mit Partialvolumeneffekten und Bewegungsartefakten auszuschließen, um eine

größtmögliche Erfassung homogenen Leberparenchyms zu gewährleisten (siehe Abbildung 10).

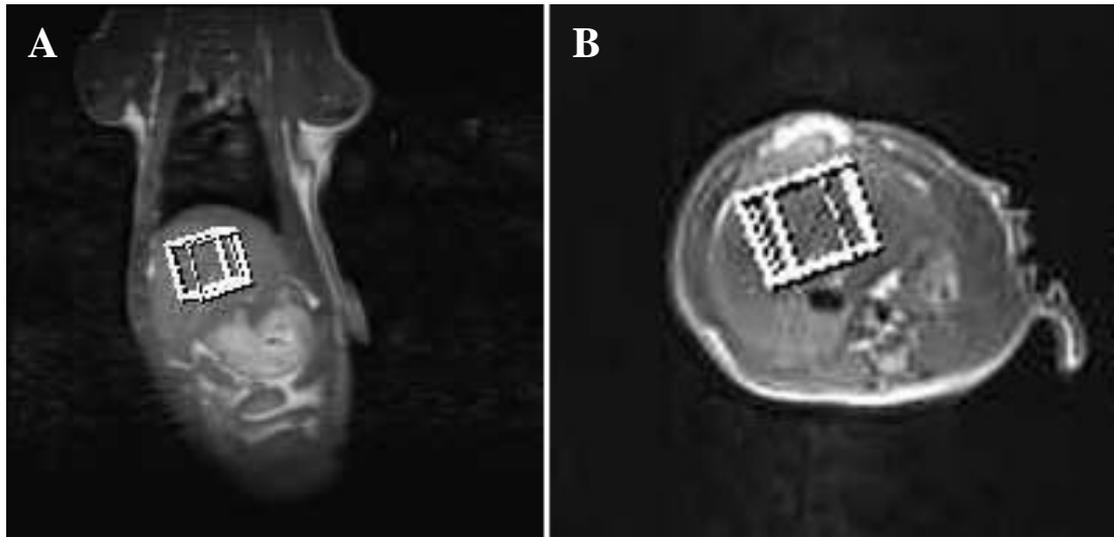


Abbildung 10: A: T1-gewichtetes MRT-Bild in koronarer, B: in transversaler Ebene jeweils mit Position des Voxels von $10 \times 10 \times 10$ mm in der Leber eines Versuchstieres in-vivo

Das ^1H -Spektrum wurde mit einer Single-Voxel-Spin-Echo-Sequenz (PRESS) mit folgenden Parametern aufgezeichnet: TR/TE: 1500/30 ms, 256 Mittelungen, 1024 Datenpunkte, 1000-Hz Bandbreite. Auf eine T1-Korrektur wurde bei der Datenerhebung verzichtet (siehe Kapitel 5). Im direkten Anschluss erfolgte zur T2-Korrektur die Ermittlung der T2-Relaxationszeiten für Wasser und Fett in einer Serie von sechs Spektren mit TE-Zeiten von 30, 40, 60, 80, 100 und 120 ms. Die Gesamtdauer der MR-Bildgebung pro Ratte einschließlich der nachfolgenden Spektroskopie blieb dabei unter 30 Minuten. Zur Nachbearbeitung und Analyse der Rohdaten wurde die Software *Spectroscopy* (Siemens, Erlangen) verwendet. Die Nachbearbeitung beinhaltete die Interpolation (*zero-filling*) – um die scheinbare Auflösung der Endbilder zu verbessern – einer Filterung mit einem Hanning-Filter und die anschließende Fourier-Transformation. Im Anschluss erfolgte an dem erhaltenen Absorptionsspektrum eine Phasen- und Basislinienkorrektur. Die Phasenkorrektur wurde mittels Verschiebung der konstanten sowie der linearen frequenzabhängigen Phase durchgeführt. Hierzu dienten die Signale von Fett (CH_2)_n und Wasser (H_2O) als Referenzpeaks. Die Basislinienkorrektur wurde in einem Berechnungsbereich von 0.0 bis 6.0 ppm angewendet.

Die T2-Korrektur mit Erhalt der T2-Konstanten für Fett und Wasser erfolgte aus der Signalintensität der gemessenen Echozeiten und wurde durch eine korrespondierende Exponentialgleichung festgelegt für Fett aus:

$$S(t) = S_0 \times \exp(-t/T2_{\text{fat}})$$

sowie für Wasser aus:

$$S(t) = S_0 \times \exp(-t/T2_{\text{water}})$$

S beschreibt dabei die Signalintensität zum Zeitpunkt t und S_0 die Signalintensität zum Zeitpunkt $t = 0$ [113]. In dem ermittelten Spektrum konnten Wasser- und Fettmetaboliten anhand ihrer spezifischen Position auf der Abszisse identifiziert werden. Bei den Lipiden, die im Lebergewebe als frei bewegliche Triglyceride vorkommen, dominierte insbesondere der Peak der Methylengruppen $(\text{CH}_2)_n$ zwischen 1.1 und 1.5 ppm [102]; Die Wasserresonanz war bei 4.7 ppm abgrenzbar (siehe Abbildungen 11–13).

Im Folgendem wurde gemäß Guiu et al. [114] der Leberfettgehalt (*hepatic fat fraction*, HFF) in Prozent (%) bestimmt:

$$\text{HFF} = \text{fat peak area} / (\text{fat peak area} + \text{water peak area}) \times 100$$

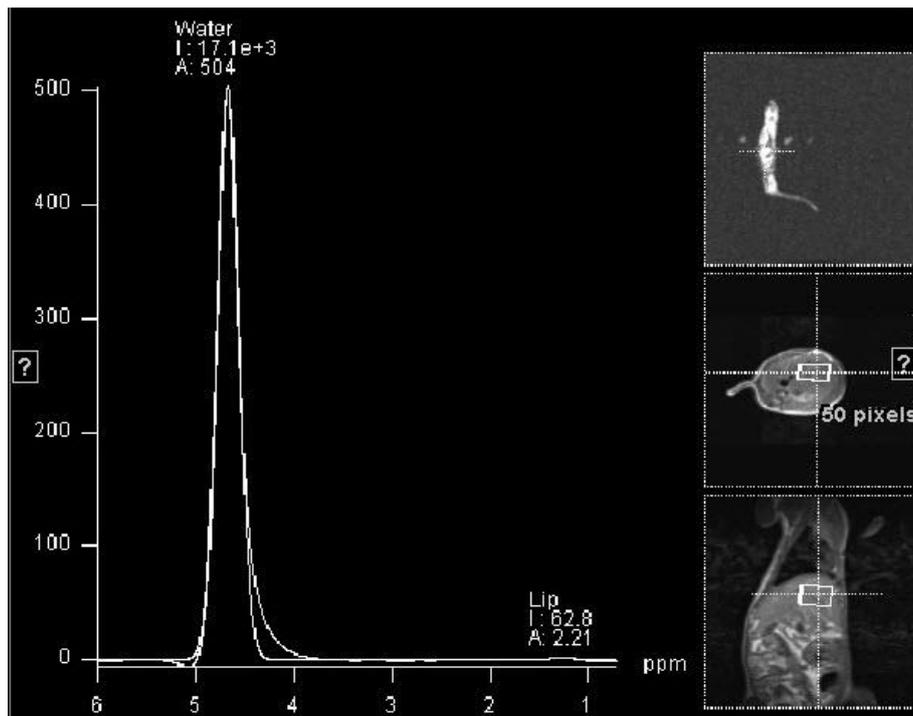


Abbildung 11: ^1H -MRS-Lebermetaboliten-Spektrum einer Ratte der Versuchsgruppe vor Ethanolgabe *in-vivo* mit einem intrahepatisch gemessenen Lipidgehalt von 0.5 % Das Spektrum zeigt den dominierenden Wasser-Peak bei 4.7 ppm mit einer sehr schwach ausgeprägten Lipidresonanz ($[\text{CH}_2]_n$) bei 1.1–1.3 ppm; rechtsseitig werden die Schnittebene sowie die Positionierung des Voxels in der Lokalizier-Sequenz sowie in koronarer und transversaler Ebene gezeigt

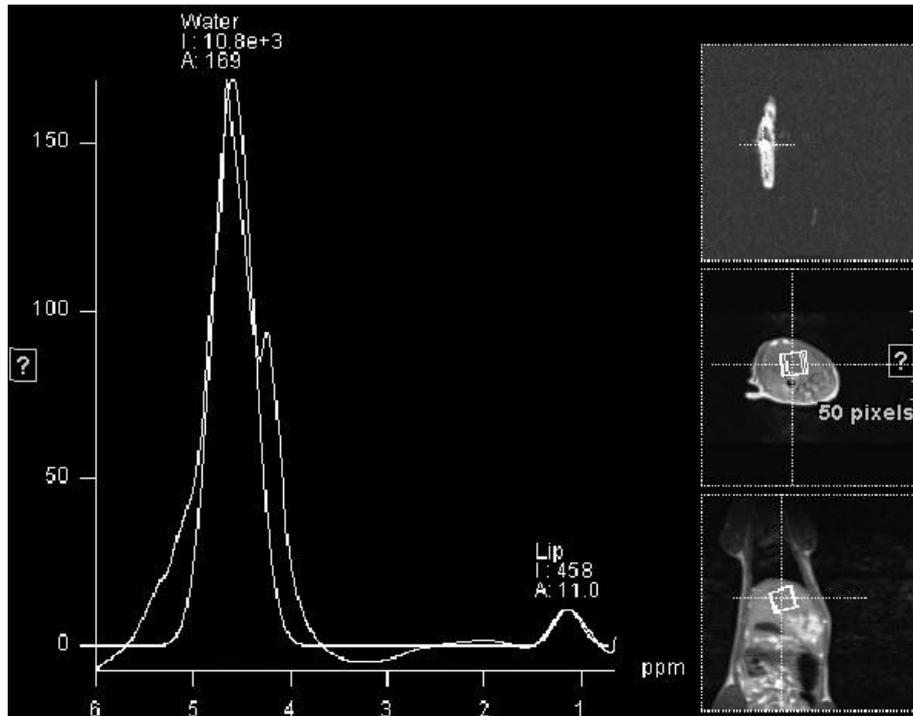


Abbildung 12: ¹H-MRS-Lebermetaboliten-Spektrum von Ratte Nr. 14 der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe in-vivo mit einem intrahepatisch gemessenen Lipidgehalt von 4.1 %
Das Spektrum zeigt den dominierenden Wasser-Peak sowie einen nun auffallenden Lipidpeak ([CH₂)n bei 1.1–1.3 ppm

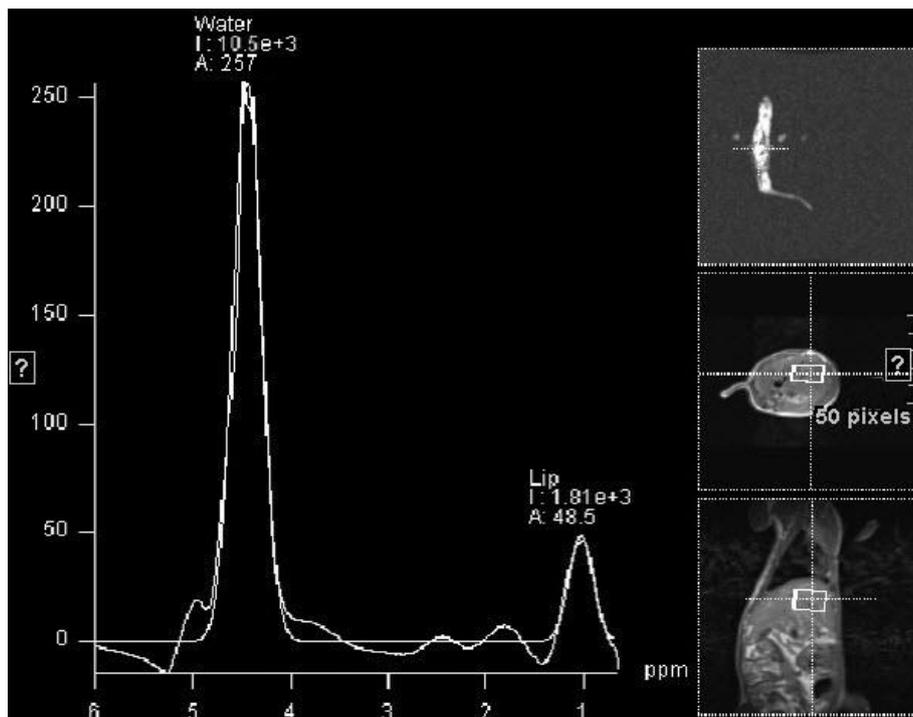


Abbildung 13: ¹H-MRS-Lebermetaboliten-Spektrum von Ratte Nr. 13 der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe in-vivo mit einem intrahepatisch gemessenen Lipidgehalt von 14.7 %
Das Spektrum zeigt den dominierenden Wasser-Peak sowie die stark ausgeprägte Lipidresonanz ([CH₂)n bei 1.1–1.3 ppm

3.2.4 Entnahme der Leber

Nach Beendigung der ¹H-MRS-Messungen sowie der Blutentnahme wurde die Leber der jeweiligen Tiere entnommen. Zunächst erfolgte eine Überdosierung mit Isofluran im Glaszylinder. Zur Leberentnahme wurden die verstorbenen Tiere in Rückenlage median laparotomiert (siehe Abbildung 14).



Abbildung 14: Mediane Laparotomie eines Versuchstiers mit Darstellung der Leber: Mit den beiden Wattestäbchen werden der mittlere und linke Leberlappen fixiert; nach unten reichend und durch den Pfeil markiert befindet sich der vordere rechte Leberlappen

Für die Präparationsschritte wurden neben einer Präparationsschere (Aesculap BC631, B. Braun Melsungen AG, Deutschland, Art-Nr.: 0023584) Wattetupfer (NOBA GmbH, Deutschland, PZN: 7101419) genutzt, um die Gewebeschichten durch scherende Bewegung voneinander zu trennen. Mittels an den Wundrändern eingesetztem Wundspreizer (B. Braun Melsungen AG, Deutschland, Art-Nr.: 605090) konnte das Abdomen offengehalten werden. Es folgte obligat eine Exploration, bevor die Leber in toto extrahiert wurde.

3.2.5 Biochemische Analyse der Triglyceride nach FOLCH

Neben dem Goldstandard der histopathologischen Fettbestimmung wurde zur weiteren Validierung der Ergebnisse die biochemische intrahepatische Triglyceridbestimmung (TG-Bestimmung) nach FOLCH durchgeführt [86]. Dazu wurde der TG-Gehalt an 10 Tieren der Kontrollgruppe sowie an 20 Tieren der Versuchsgruppe nach Alkoholintoxikation ermittelt, wobei 100 mg aus insgesamt fünf Regionen der extrahierten Rattenleber in 2 ml Chloroform-Methanol-Lösung (2:1) dispergiert (T 25 digital Ultra-Turrax,

Wenk LabTec, Nettetal, Deutschland) und durch anschließendes Zentrifugieren (Zentrifuge 5451R Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) bei $16000 \times g$ für eine Minute homogenisiert wurden. Das Lösungsmittel wurde im SpeedVac-Konzentrator (SpeedVac-Konzentrator SVC 100H, Savant, Hicksville, USA) eingedampft und der Rückstand der Lipide in 100 μ l Isopropanol resuspendiert. Anschließend wurde der TG-Gehalt spektrophotometrisch mittels des Modular-P-Analysators (Roch Diagnostic, Penzberg, Deutschland) unter Verwendung eines kommerziellen Analysekits von Roche Diagnostic bestimmt.

3.2.6 Histopathologie

Nach der Leberextraktion und Entnahme von Lebergewebe für die biochemische Untersuchung wurde diese in 4 %-igem Formalin fixiert. Anschließend erfolgte die histopathologische Aufarbeitung im Senckenberg Institut für Pathologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt durch den zuständigen Pathologen Dr. med. Reinhold Bug. 2 mm dicke Schnitte wurden angefertigt und eine anschließende Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe von Ethanol bis zum absoluten Alkohol durchgeführt. Durch Xylol wurde der Alkohol wieder entzogen und die Schnitte in verflüssigtem Paraffin getränkt. Zwecks Eingießen in Paraffinblöcke wurden die Schnitte zusammen mit flüssigem Paraffin in eine Gießform gebracht. Nach Erkalten und damit verbundenem Erhärten lieferte ein Schlittenmikrotom 2 μ m dicke Gewebsschnitte, die in einem warmen Wasserbad auf Objektträger aufgetragen wurden. Die histomorphologische Beurteilung des Lebergewebes erfolgte durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Im weiteren Verfahren wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe bis zum destillierten Wasser rehydriert. Darauf folgten die Färbung mit Hämatoxylin-Lösung für 3 Minuten, die zweisekündige Entfärbung mit Salzsäure und die Differenzierung unter Leitungswasser für 3 bis 5 Minuten. Die Anfärbung mit Eosin (0.1 %-ig, wässrig) dauerte 4 Minuten; entfärbt wurde durch Leitungswasser. Abschließend wurden die Schnitte mit einem Kunstharz als Eindeckmittel versehen und mit einem Deckglas verschlossen.

Durch die HE-Färbung ist es möglich, das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung zu quantifizieren. Darüber hinaus kann mit dieser Übersichtsfärbung sowohl die Anzahl der Hepatozyten ausgezählt als auch die Intensität eines inflammatorischen Infiltrats ermittelt werden. Das Prinzip der HE-Färbung basiert auf der Oxidation des Hämatoxylin zu dem Farbstoff Hämatin, der im sauren Milieu mit Aluminiumionen einen positiv

geladenen Komplex bildet. Die Metall-Hämatein-Komplexe binden an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren des Zellkerns, der dadurch im Präparat blau erscheint. Die Zytoplasmafärbung erfolgt mit dem sauren Farbstoff Eosin, der überwiegend an Proteine gebunden wird und das Zytoplasma rosa färbt.

Die Leberverfettung wurde semiquantitativ als Prozentsatz verfetteter Hepatozyten (0–100 %) angegeben. Dabei wurden sowohl makrovesikuläre als auch mikrovesikuläre Verfettungen in die Auswertung einbezogen (siehe Abbildung 15).

Für ein semiquantitatives Grading der Infiltration wurden die folgenden Werte verwendet: Grad 0 (S0): kein sichtbares Fett; Grad 1 (S1): < 5 % Fett; Grad 2 (S2): 5–25 % Fettinfiltration; Grad 3 (S3): 25–50 % Fett; Grad 4 (S4): > 50 % Fett [115-118].

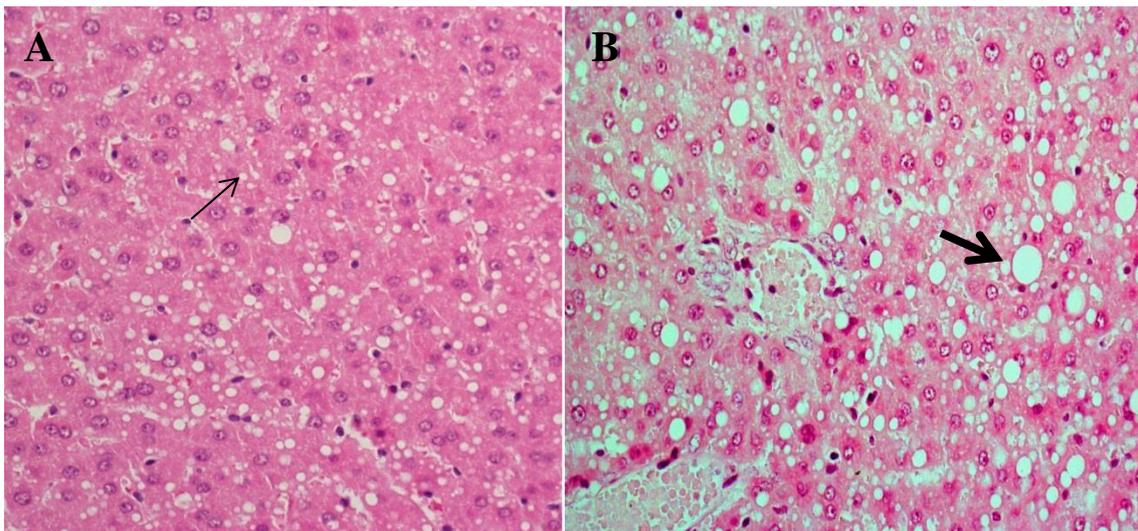


Abbildung 15: Histologischer Schnitt der Leber und HE-Färbung, gemessen 24 Stunden nach zweiter Ethanolintoxikation

A: Das Präparat zeigt eine ca. 30 %-ige mit mikrovesikulären (kleiner Pfeil) und makrovesikulären Fetttropfen – B: ca. 50 %-ige vorwiegend makrovesikuläre Verfettung der Hepatozyten (großer Pfeil) mit leukozytär demarkierten Einzelzellnekrosen (Bildmitte) (Originalvergrößerung 200-fach).

3.3 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm BiAS Version 8.4 (epsilon, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Zusätzlich wurden die Variablen in Boxplots dargestellt. Für die Korrelationen zwischen den biochemischen, histologischen, spektroskopischen sowie serologischen Messwerten wurde ein Streudiagramm mit linearer Regression erstellt und die Berechnung mittels Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei allen Untersuchungen bei einem p -Wert < 0.05 akzeptiert.

4 ERGEBNISSE

Insgesamt überlebten alle 20 Tiere der Versuchsgruppe die dreitägige Versuchsreihe mit allen beinhaltenden Untersuchungen bis zur Leberentnahme. In dieser Studie galt der histologisch evaluierte Fettgehalt als Goldstandard. Bei 16 von 20 Tieren der Versuchsgruppe ließ sich histologisch gemäß der Leitlinie der AWMF eine Leberverfettung bzw. Fettleber nachweisen; die Erfolgsrate des Tiermodells betrug somit 80 %.

4.1 Histopathologische Auswertung

Um einen direkten Vergleich (1:1) zwischen den Tieren der Versuchsgruppe vor und nach Ethanolintoxikation mittels 1H-MRS und laborchemischer Untersuchung zu erhalten, wurde auf eine histopathologische Untersuchung der 20 Tiere der Versuchsgruppe vor Ethanolgabe verzichtet. Es erfolgte ein allgemeiner Vergleich bezüglich der Alkoholauswirkung auf den histologischen Verfettungsgrad zwischen 10 gesunden Tieren (Kontrollgruppe) und den 20 Tieren der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe und Beendigung der spektroskopischen Untersuchungen. In der Kontrollgruppe ergab sich ein durchschnittlicher Verfettungsgrad von 1.5 %. Eine Leberverfettung unterschiedlicher Ausprägung in der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe war bei 16 von 20 Tieren erkennbar (siehe Tabelle 4). Der histopathologisch gemessene Mittelwert der Verfettung betrug 12.75 %, die Standardabweichung (SD) \pm 11.64 %. Der Median lag bei 10 % (siehe Abbildung 16).

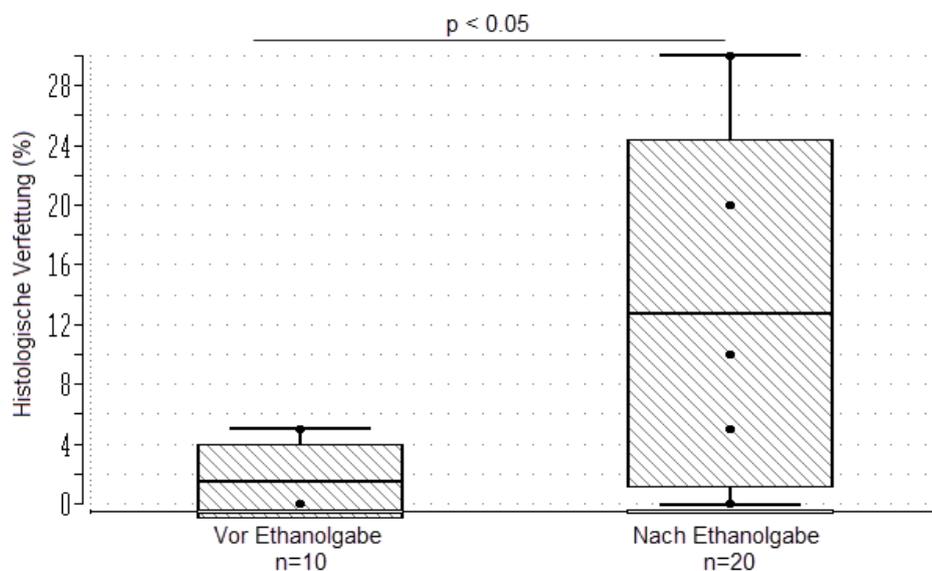


Abbildung 15: Boxplots zur Darstellung der histologisch gemessenen Verfettung vor Ethanolgabe (Anzahl der Tiere $n = 10$; Mittelwert: 1.5 %; SD: 1.42 %) sowie nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere $n = 20$; Mittelwert: 12.75 %; SD: 11.64 %); $p < 0.05$

Tabelle 4: Anzahl und Ausprägung der Versuchsgruppentiere mit jeweils durchschnittlicher histologisch gemessener Leberverfettung in Anlehnung an oben beschriebenes Grading
 Grad S0 = keine Verfettung; Grad S1 = 1–5 % Fett; Grad S2 = > 5–25 % Fettinfiltration; Grad S3 = > 25–50 % Fett; Grad S4 = > 50 % Fett)

Grad der Leberverfettung	Anzahl Tiere	Ø Verfettung (%) nach Ethanolgabe
S0	4	0
S1	5	5
S2	6	13.3
S3	5	30
S4	0	-

4.2 Auswertungen der serologischen Parameter

Bei Ratten gelten Werte von 20 bis 30 U/l für ALT und 30 bis 70 U/l für AST als physiologisch [119, 120].

4.2.1 Aspartat-Aminotransferase

Die ALT-Aktivität wurde bei allen 20 Tieren der Versuchsgruppe vor und nach Ethanolgabe bestimmt. Der Mittelwert betrug vor Ethanolgabe $164.7 \text{ U/l} \pm 64.75 \text{ U/l}$. Die Range reichte von 66 bis 288 U/l. Der Median befand sich bei 155 U/l. Nach Ethanolgabe ergab sich ein signifikanter Anstieg des Mittelwerts auf $571.56 \pm 285.34 \text{ U/l}$ mit einer Range von 240 bis 1116 U/l. Der Median betrug 505.5 U/l, $p < 0.05$ (siehe Abbildung 17).

4.2.2 Alanin-Aminotransferase

Die AST-Aktivität wurde bei allen 20 Tieren der Versuchsgruppe vor und nach Ethanolgabe bestimmt. Der Mittelwert betrug vor Ethanolgabe $47.15 \pm 14.15 \text{ U/l}$. Die Range reichte von 28 bis 71 U/l. Der Median befand sich bei 46.5 U/l. Nach Ethanolgabe ergab sich ein signifikanter Anstieg des Mittelwerts auf $114.9 \pm 28.78 \text{ U/l}$ mit einer Range von 67 bis 154 U/l. Der Median befand sich bei 120 U/l, $p < 0.05$ (siehe Abbildung 18).

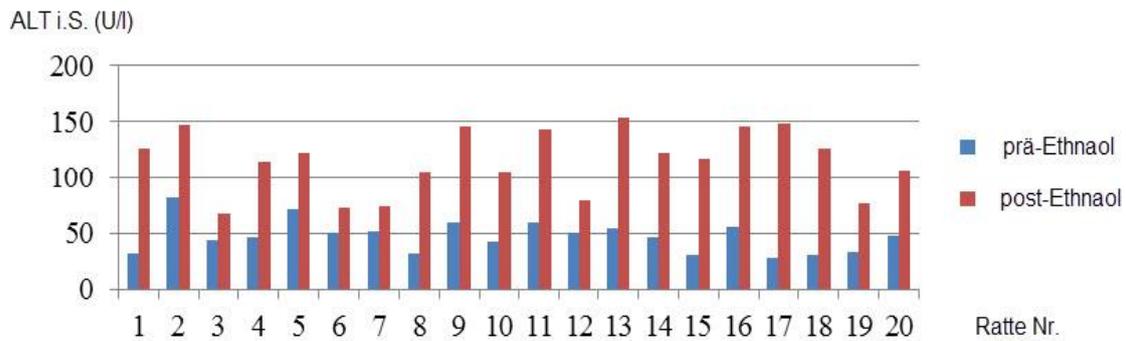


Abbildung 16: 1:1-Vergleich der Serum-ALT-Spiegel vor und 24 Stunden nach zweiter Ethanolgabe

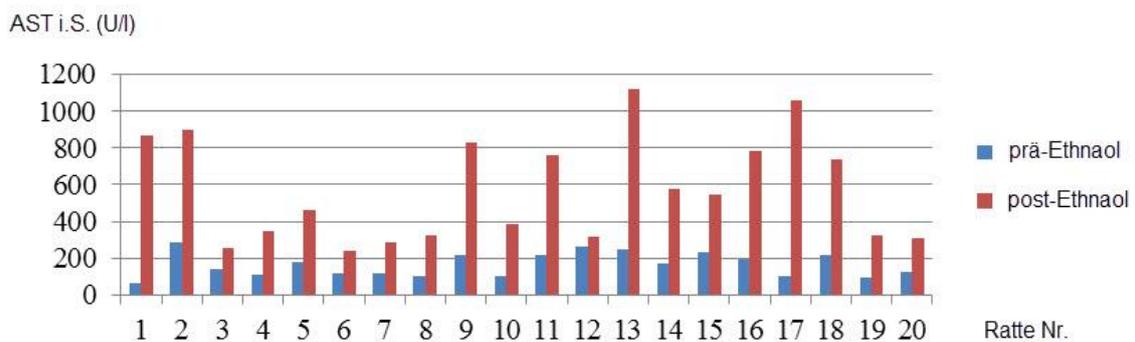


Abbildung 17: 1:1-Vergleich der Serum-AST-Spiegel vor und 24 Stunden nach zweiter Ethanolgabe

4.2.3 De-Ritis-Quotient

Der Quotient aus AST und ALT (De-Ritis-Quotient) wurde bei allen 20 Tieren bestimmt. In allen Messungen der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe errechnete sich ein Wert von > 2 (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Verteilung des De-Ritis-Quotienten (Versuchsgruppe)

De-Ritis-Quotient	Anzahl Tiere
< 0.5	0
$0.5 < x \leq 1.0$	0
$1.0 < x \leq 2$	0
> 2	20

4.2.4 Gamma-Glutamyl-Transferase

Die gemessene GGT-Aktivität lag sowohl vor als auch nach Ethanolintoxikation durchschnittlich unter der messbaren Nachweisgrenze von 3 U/l, weshalb auf die Darstellung von Boxplots für die Messungen verzichtet wurde.

4.3 Auswertung der biochemischen Messungen

Wie bei der histopathologischen Untersuchung wurde auch bei der biochemischen Messung nach FOLCH auf eine direkte Kontrollgruppe verzichtet, um einen 1:1-Vergleich innerhalb der 1H-MRS-Versuchsgruppe zu gewährleisten. Dennoch wurden 10 gesunde Tiere für einen prä-post-Vergleich einer biochemischen Analyse unterzogen, um eine indirekte Ableitung einer Verfettung nach Ethanolgabe zu erhalten. In der Literatur wird bei normal ernährten Ratten ein Triglyceridgehalt der Leber von ca. 4–7 mg/g Leber angenommen [121, 122], der unter Ethanoleinwirkung innerhalb von zwölf Stunden auf das Vierfache des Ausgangswerts ansteigen kann [123]. Der Triglyceridgehalt lag vor Ethanolgabe bei einem Mittelwert von $6.78 \text{ mg/g} \pm 2.19 \text{ mg/g}$ und zeigte 24 Stunden nach der zweiten Ethanolgabe einen Mittelwert von $18.45 \pm 11.51 \text{ mg/g}$ Leber. Der Median betrug 16.51 mg/g . Im Durchschnitt zeigte sich somit ein TG-Gehalt, der einer akuten Leberverfettung entspricht (siehe Abbildung 19).

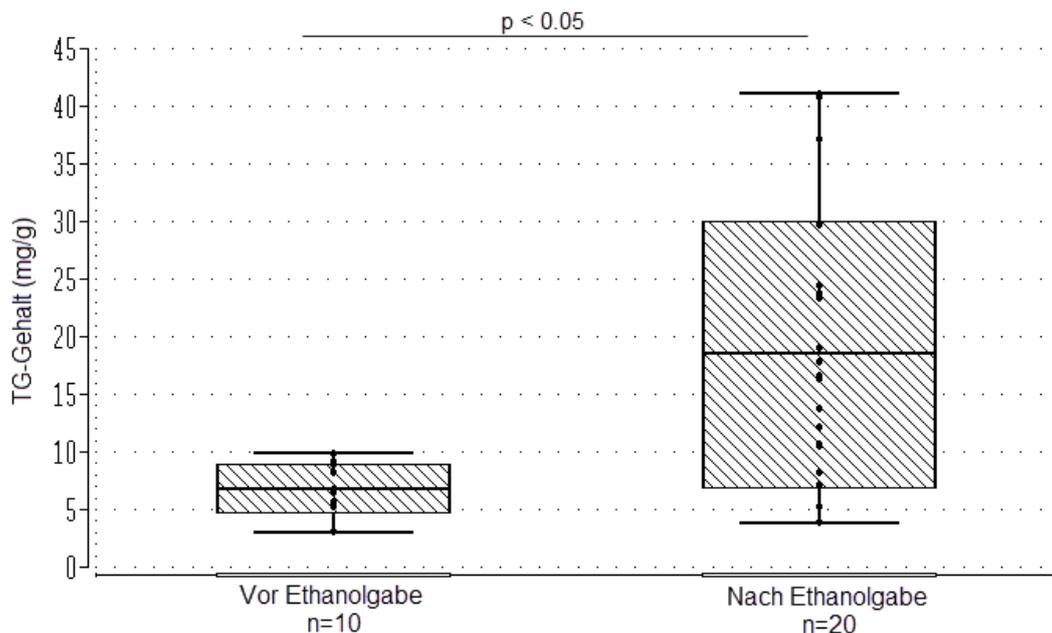


Abbildung 18: Boxplots zur Darstellung der biochemisch gemessenen Verfettung bzw. des Triglyceridgehalts (mg/g Leber) vor Ethanolgabe (Anzahl der Tiere $n = 10$; Mittelwert: 6.78 mg/g ; SD: 2.19 mg/g) sowie nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere $n = 20$; Mittelwert: 18.75 mg/g ; SD: 11.51 mg/d); $p < 0.05$

4.4 Auswertungen der 1H-MRS-Messungen

Bei allen 20 Ratten wurden vor der ersten und 24 Stunden nach der zweiten gastraln Ethanolapplikation 1H-MRS-Messungen wie oben beschrieben durchgeführt. Ein Nachweis intrahepatischen Fetts gelang bei allen 20 Tieren der Versuchsgruppe vor

sowie nach Ethanolgabe. Der Mittelwert des gemessenen intrahepatischen Fettgehalts in der prä-Ethanol-Gruppe ergab einen Wert von 0.69 % ± 0.33 %. Die Range reichte von 0.39 bis 1.3 %. Der Median befand sich bei 0.67 %. In der post-Ethanol-Gruppe betrug der Mittelwert 5.80 % ± 3.94 % mit einer Range von 2.03 bis 14.69 %. Der Median lag bei 4.06 %. (siehe Abbildung 20).

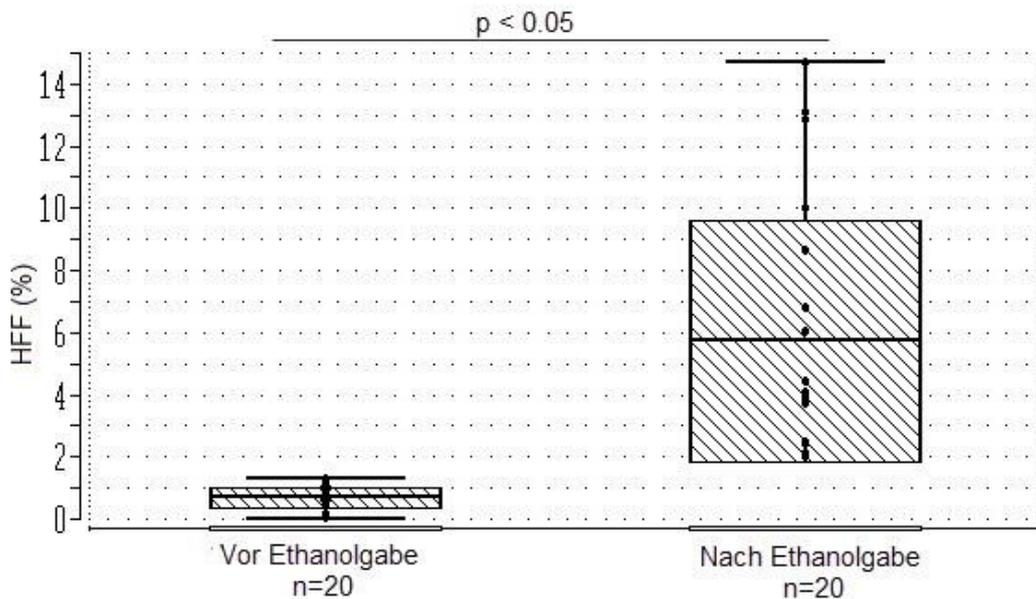


Abbildung 19: Boxplots zur Darstellung des spektroskopisch gemessenen intrahepatischen Fettgehalts (HFF) (%) vor Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20; Mittelwert: 0.69 %; SD: 0.33 %) sowie nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20; Mittelwert: 5.8 %; SD: 3.94 %); $p < 0.05$

Das bereits oben beschriebene Grading zur histopathologischen Einteilung der Verfettungsgrade zeigt im Folgenden die Einarbeitung des MR-spektroskopisch gemessenen Fettgehalts (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Anzahl und Ausprägung der Versuchsgruppentiere mit jeweils durchschnittlicher MR-spektroskopisch gemessener Leberverfettung (HFF) in Anlehnung an oben beschriebenes Grading
 Grad S0 = keine Verfettung; Grad S1 = 1–5 % Fett; Grad S2 = > 5–25 % Fettinfiltration; Grad S3 = > 25–50 % Fett; Grad S4 = > 50 % Fett

Grad der Leberverfettung	Anzahl Tiere	Ø HFF (%) nach Ethanolgabe
S0	0	–
S1	13	3.37
S2	7	10.32
S3	0	–
S4	0	–

Bei allen 16 Tieren mit histologisch nachgewiesener Leberverfettung zeigte die ^1H -Spektroskopie ebenfalls einen intrahepatischen Fettnachweis über 3.7 %. Die Sensitivität lag damit bei 100 %, sofern 3.7 % der spektroskopisch gemessenen Nachweisgrenze einer histopathologischen Fettleber entsprechen (siehe hierzu auch Kapitel 5).

Folgende T2-Konstanten konnten für die 20 Tiere der post-Ethanol-Gruppe bestimmt werden: Die T2-Konstante der Protonen von Wasser lag im Mittel bei 34.1 ms mit einer Range von 23.8 bis 47.57 ms. Die T2-Konstante der Protonen von Fett zeigte einen Mittelwert von 53 ms. Die Range reichte von 38.2 bis 86.2 ms.

4.5 Korrelative Zusammenhänge der ^1H -Spektroskopie mit histopathologischer Auswertung, biochemischer Triglyceridbestimmung sowie serologischer Messung

4.5.1 Korrelative Zusammenhänge zwischen ^1H -MRS-Messungen und Serologie

In der vorliegenden Arbeit wurden die spektroskopisch gemessenen Konzentrationen des intrahepatischen Fettgehalts mit den laborchemischen Leberparametern AST und ALT der Versuchstiere verglichen, um die Aussagekraft des spektroskopisch gemessenen Fettgehalts über die Leberfunktion der verfetteten Lebern zu prüfen. Der spektroskopisch gemessene Fettgehalt korrelierte nach dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson signifikant positiv mit der Aktivität von AST ($r = 0.91$, $p < 0.05$) sowie ALT ($r = 0.84$, $p < 0.05$) (siehe Abbildungen 21 und 22).

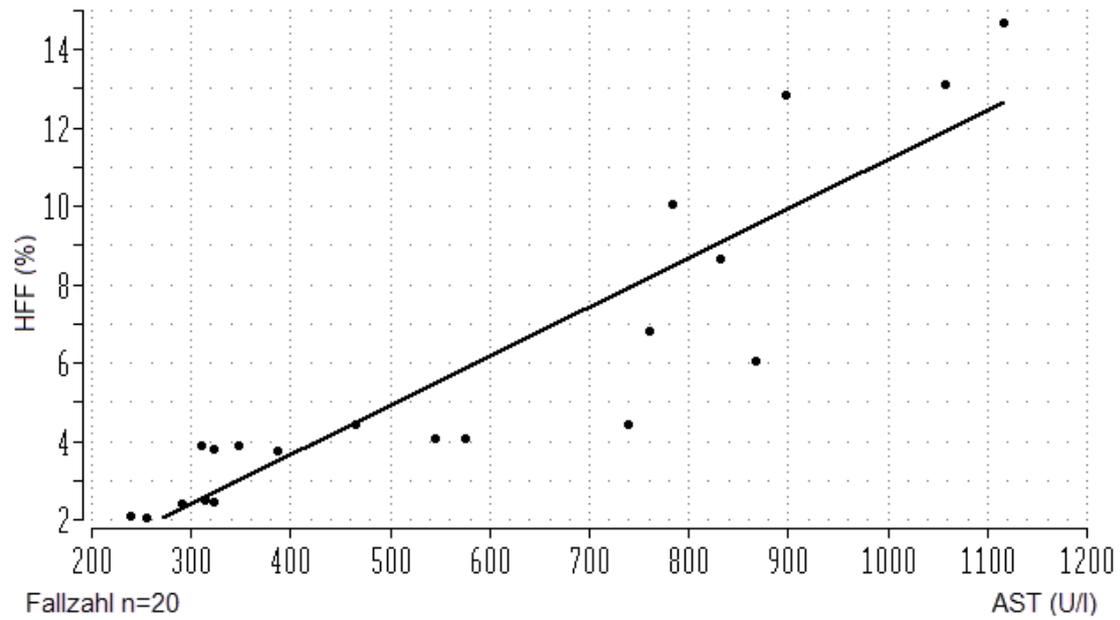


Abbildung 20: Streudiagramm mit Trendlinie: Korrelation des spektroskopisch bestimmten intrahepatischen Fettgehalts (HFF in %) mit der Serumkonzentration von AST (U/l) (Anzahl der Tiere n = 20, $r = 0.90$; $p < 0.05$)

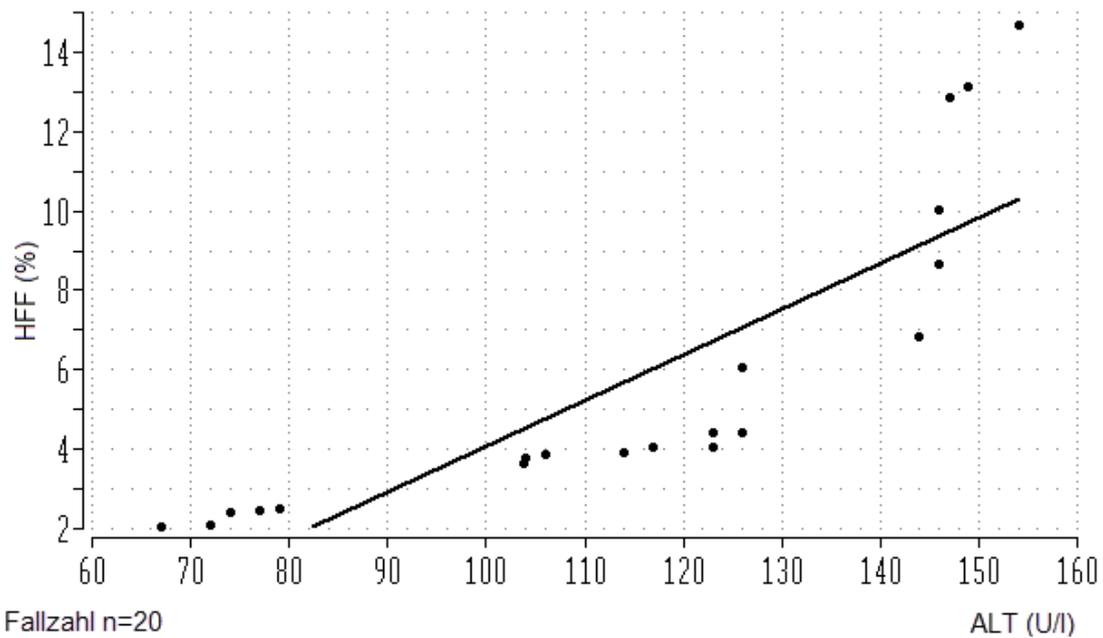


Abbildung 21: Streudiagramm mit Trendlinie: Korrelation des spektroskopisch bestimmten intrahepatischen Fettgehalts (HFF in %) mit der Serumkonzentration von ALT (U/l) (Anzahl der Tiere n = 20, $r = 0.84$, $p < 0.05$)

4.5.2 Korrelation des spektroskopisch gemessenen Fettgehalts mit der biochemischen Triglyceridbestimmung nach FOLCH

Die spektroskopisch gemessene Konzentration der Lipide korrelierte nach dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson im Kollektiv der alkoholischen Leberverfettung positiv mit dem biochemisch gemessenen Triglyceridgehalt nach FOLCH ($r = 0.97$, $p < 0.01$) (siehe Abbildung 23).

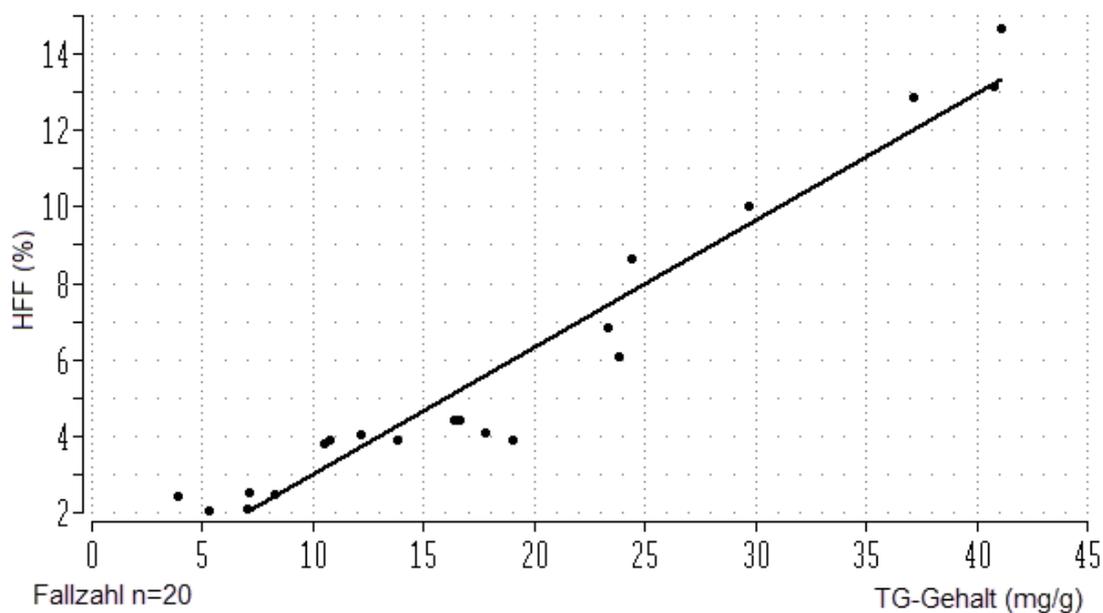


Abbildung 22: Korrelation des spektroskopisch bestimmten intrahepatischen Fettgehalts (HFF in %) mit dem gemessenen Triglyceridgehalt nach FOLCH (mg/g Leber) nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere $n = 20$, $r = 0.97$, $p < 0.01$)

4.5.3 Korrelation des spektroskopisch gemessenen Fettgehalts mit der histologisch gemessenen Verfettung

Des Weiteren wurden die histologischen Ergebnisse (Fett als Prozentsatz der infiltrierten Hepatozyten) mit dem spektroskopisch gemessenen prozentualen Lipidgehalt verglichen. Obwohl im direkten Vergleich der spektroskopisch ermittelte Fettgehalt im Durchschnitt geringer ausfiel, konnte zwischen beiden Methoden eine signifikant positive Korrelation ermittelt werden ($r = 0.90$, $p < 0.01$) (siehe Abbildung 24).

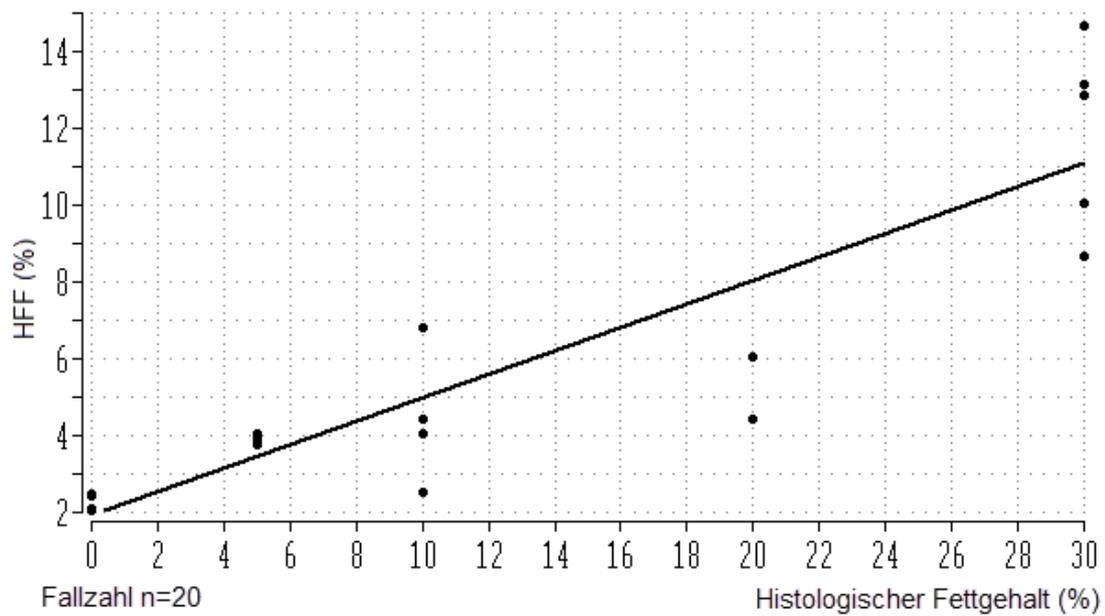


Abbildung 23: Korrelation des spektroskopisch bestimmten Fettgehalts (HFF in %) mit der histologisch gemessenen Verfettung (in %) nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20, $r = 0.90$, $p < 0.01$)

Tabelle 7: Vergleich der Korrelation des MR-spektroskopisch gemessenen Fettgehalts mit histologischer, biochemischer und serologischer Diagnostik

	1H-MRS vs. Histologie	1H-MRS vs. FOLCH	1H-MRS vs. AST	1H-MRS vs. ALT
Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r)	r = 0.90	r = 0.97	r = 0.91	r = 0.84

Tabelle 8: Zusammenfassung der Messwerte nach Ethanolgabe: Vergleich aus spektroskopischer, histologischer, biochemischer und serologischer Diagnostik

Ratte Nr.	1H-MRS (HFF %)	Histologie (%)	Biochemie (TG mg/g)	ALT (U/l)	AST (U/l)
1	6.06	20	23.81	126	868
2	12.86	30	37.18	147	897
3	2.03	0	5.27	67	255
4	3.9	5	13.85	114	348
5	4.42	10	16.38	123	465
6	2.11	0	7.04	72	240
7	2.41	0	3.85	74	290
8	3.8	5	10.53	104	323
9	8.66	30	24.4	146	832
10	3.74	5	10.7	104	387
11	6.82	10	23.34	144	761
12	2.51	10	7.14	79	314
13	14.70	30	41.1	154	1116
14	4.07	10	17.81	123	576
15	4.05	5	12.2	117	546
16	10.04	30	29.7	146	784
17	13.13	30	40.81	149	1058
18	4.44	20	16.62	126	739
19	2.47	0	8.25	77	323
20	3.89	5	19.02	106	311

5 DISKUSSION

Die Biopsie von Leberparenchym mit anschließender histologischer Aufarbeitung gilt nach wie vor als Goldstandard in der Detektion und Quantifizierung einer Fettleber. Zum einen ermöglicht dieses Vorgehen neben der semiquantitativen Einstufung der Schwere der Steatose auch die Differenzierung zwischen Fettleber und Steatohepatitis. Zum anderen kann auf diese Weise eine Bestätigung bzw. ein Ausschluss einer von der Fettlebererkrankung unabhängigen Lebererkrankung erfolgen. Zusätzlich lässt sich das Ausmaß der entzündlichen Aktivität erfassen [30]. Trotz dieser Vorteile hat die Leberbiopsie als invasive Methode ein Morbiditäts- und Komplikationspotenzial. In großen retrospektiven Erhebungen mit 68276 bzw. 80000 Patienten liegt die Gesamtkomplikationsrate der perkutanen Leberbiopsie zwischen 0.22 und 0.29 %; letale Komplikationen bei Leberbiopsien treten im Allgemeinen bei 0.01% der Patienten auf [124], leichtere Komplikationen, wie passagere Schmerzen können bei 20-30% beobachtet werden [125]. Darüber hinaus ist sie für die Überwachung der Progression oder Regression einer Leberverfettung – als dynamischer Prozess – im Laufe des Krankheitsverlaufs mit häufigen Biopsien nicht praktikabel [126].

Generell bieten bildgebende Verfahren mehrere Vorteile gegenüber der Biopsie für die Diagnose von Fettlebererkrankung: Neben der nicht invasiven Technik ist auch das gleichzeitige Screening anderer Leberanomalien möglich. So können beispielsweise Informationen über den Fettstoffwechsel vor allem bei Risikopatienten mit Insulinresistenz oder Adipositas gewonnen werden [127]. Vor allem eine genaue wiederholbare quantitative Bewertung bei medikamenteninduzierter Fettleber durch Chemotherapeutika (wie Methotrexat und Irinotecan) kann die Risiken von Morbidität und Sterblichkeit signifikant positiv beeinflussen. Eine Verlaufskontrolle des intrahepatischen Fettgehalts führt zudem zu einer besseren Kontrolle in der Therapie bei primären oder metastatischen Lebertumoren [128, 129].

Des Weiteren steht vor Lebertransplantationen eine genaue und möglichst schnelle Diagnostik im Vordergrund. So ist die Transplantation einer Leber mit Zirrhose oder schwerer Steatose (> 60 %) mit einem hohen Risiko einer primären *non-function* des Organs verbunden [130, 131]. Desgleichen ist eine akute Fettleber ein bedeutender Risikofaktor für ein postoperatives Leberversagen nach einer Transplantation [132, 133]. Für Spender nach Teilhepatektomie zeigte sich eine bessere Regeneration des verbleibenden Organs bei einem intrahepatischen Fettgehalt von weniger als 5 % gegenüber solchen Lebern mit einem Fettgehalt von 5 bis 30 % [68].

Die Auswahl einer geeigneten bildgebenden Technik ist vor diesem Hintergrund wichtig für die genaue Erfassung und Quantifizierung des Leberfettgehalts bei verschiedenen Lebererkrankungen. Die Bestimmung des intrahepatischen Fettgehalts mittels Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie ist zwar möglich, liefert zum Teil aber nur semiquantitative Aussagen über den Leberfettgehalt und ist wenig sensitiv im Bereich geringgradiger Verfettung. Die entscheidende Bedeutung in der Diagnostik einer Fettleber liegt jedoch gerade im frühzeitigen Erkennen und der exakten Beurteilung des Fettgehalts. Mit der ¹H-MRS wurde eine nicht invasive Untersuchungsmethode entwickelt, die wegen der genauen Quantifizierung der Lebermetaboliten vor allem im akuten Stadium einer Leberverfettung eine entscheidende Rolle spielen kann.

1993 veröffentlichten Longo et al. [134] ihre ersten Ergebnisse zu MR-spektroskopisch gemessenem Leberparenchym an 29 Patienten mit Verdacht auf NAFLD. Die Daten wurden mit CT-Messungen und histomorphometrischen Analysen aus Leberbiopsien verglichen, wobei eine signifikante Korrelation herausgearbeitet werden konnte. Seitdem haben mehrere Studien diese Ergebnisse durch Vergleich verschiedener bildgebender Verfahren wie US, CT und MRT bestätigt [41, 135-138]. Die bisher größte Meta-Analyse von Bothe et al. [139] zeigte, dass die MR-Protonenresonanz-Spektroskopie die bisher sensitivste Methode zur nicht invasiven Quantifizierung des Leberfettgehalts darstellt. Im Vergleich der verschiedenen Arbeiten konnte jedoch nur eine Studie gefunden werden, die MR-spektroskopisch die Lebern von sechs Probanden mit alkoholischer Leberschädigung (ALD) untersuchte [140]. Alle weiteren bezogen sich in ihrem Vergleich der diagnostischen Verfahren auf nicht alkoholische Lebererkrankungen [141-144]. Eine große Anzahl an Studien wurde zudem ausgeschlossen [85, 114, 135, 145-148], da die Autoren in diesen Arbeiten ¹H-MRS als neuen Referenzstandard festlegten, zu diesem Thema aber nach wie vor kein klarer Konsens existiert [139]. Auch in diesen Studien lag der Schwerpunkt auf dem Nachweis nicht-alkoholischer Lebererkrankungen mittels MRT/¹H-MRS; nur wenige zeigten einen zusätzlichen Vergleich zwischen ¹H-MRS und dem Goldstandard der histologischen Untersuchung.

Zum größten Teil wurden MRS-gestützte Studien zur Bestimmung des intrahepatischen Fettgehalts an MRT-Systemen mit einer Feldstärke von 1.5 T durchgeführt. Das räumliche Auflösungsvermögen ist dabei auf ca. 3 × 3 bis 4 × 4 mm beschränkt, sodass es zu Bildartefakten (z. B. Partialvolumen-Effekte) und ungleichmäßiger Kontrastverstärkung beiträgt. Außerdem bestehen Hinweise auf ein vermehrtes Auftreten von Signalauslö-

schungen – sogenannte *dark rim*-Bildartefakte – bei niedrigen Bildauflösungen, sodass Gesamtbildqualität und diagnostische Auswertbarkeit beeinträchtigt sind. Mit Erhöhung der magnetischen Feldstärke steigt ungefähr linear auch das Signal-Rausch-Verhältnis (*Signal-to-Noise-Ratio*, SNR). Dieser SNR-Gewinn führt zu einer Verbesserung des räumlichen Auflösungsvermögens und einer verkürzten Aquisitionszeit [149]. Letztere führt zu einem geringeren Zeitaufwand pro Untersuchung. Zwar wirken sich bei höheren Magnetfeldstärken auch die sogenannten Suszeptibilitätseffekte stärker aus, welche die Homogenität des Magnetfelds beeinträchtigen, dieses Problem lässt sich jedoch durch sorgfältiges Shimmen eingrenzen.

Der spektroskopische Nachweis eines Lipidsignals gelang in vorliegender Arbeit bei allen 20 Versuchstieren; auch bei solchen, bei denen histologisch keine Verfettung der Hepatozyten zu beobachten war. Eine histologisch nachweisbare Verfettung (> S0) fand sich in nur 80 % der Biopsien der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe. Zudem zeigte sich eine teilweise deutliche Diskrepanz zwischen dem spektroskopisch gemessenen Lipidanteil und der histologisch bestimmten Verfettung. So entsprach in Ratte Nr. 9 eine histologisch gemessene Verfettung von ca. 30 % einem Wert von ca. 9 % durch Nachweis mittels ¹H-MRS (siehe Tabelle 8). Dieses Ergebnis hätte zur Folge, dass Patienten mit Steatose-Grad S1 oder S2 auf Grundlage spektroskopischer Messungen niedriger eingestuft werden als nach histologischer Analyse. Eine Erklärung für die vorliegende Diskrepanz liegt in der nur semiquantitativen histologischen Einstufung der Verfettung durch Erfassung des Prozentsatzes von Hepatozyten mit sichtbarer Steatose in mikroskopischer Ansicht. Folglich kann die visuelle Schätzung und Beurteilung eines nur kleinen Leberzylinders in den jeweiligen Biopsien zu Stichprobenfehlern und zu ungenauen Messergebnissen führen. Ratziu et al. [150] zeigten in ihrer Arbeit, dass die Übereinstimmung hinsichtlich des Steatosegrads von zwei Leberbiopsien des gleichen Patienten bei nur ca. 60 % liegt. Selbst innerhalb einer Biopsieprobe konnte im Rahmen der histologischen Untersuchungen eine Variabilität des Schweregrads der Steatose nachgewiesen werden [151]. Überdies spielt die Heterogenität in Verteilung und Menge der verfetteten Hepatozyten in einer Leberbiopsie eine entscheidende Rolle; resultierend ergeben sich Verzerrungen und falsch negative Ergebnisse der Biopsien vor allem im Bereich geringgradiger Verfettungen [152].

Im Gegensatz zur histologischen Untersuchung gelang der spektroskopische Nachweis intrahepatischen Fetts schon durch die Detektion kleinster Lipidsignale. Folglich zeigte

sich bereits ein messbarer Fettnachweis von 0.39 % in der Kontrollgruppe ohne Ethanolgabe. Mit Hilfe eines angepassten VOI ließ sich zudem eine Region der Leber mit größtmöglichem homogenem Parenchym untersuchen. Wie genau die Anpassung des VOI sein sollte, zeigen diverse Studien, in denen zum Teil deutliche regionale Unterschiede spektroskopisch gemessenen Fettgehalts vorlagen. Hájek et al. [153] zeigten in einer Gruppe von Leber-Transplantatempfängern ($n = 77$), dass der Fettgehalt in drei verschiedenen Positionen der Leber um 20 % variierte. Van Werven et al. [154] berichteten in einer Studie mit 12 Probanden über regionale Unterschiede des Leberfettgehalts von bis zu 14 %. Cowin et al. [155] fanden innerhalb unterschiedlicher Volumenpositionen in der Leber Variationen von 3 % im posterioren Anteil des rechten Leberlappens, 7 % Variation im rechten vorderen Leberlappen, 6 % im zentralen Teil des rechten Lappens und 13 % Unterschied im linken Leberlappen. In der vorliegenden Studie wurde auf mehrere Messungen an unterschiedlichen Stellen verzichtet; umso mehr wurde darauf geachtet, ein VOI zu wählen, das eine größtmögliche homogene Fläche an Leberparenchym erfasst.

Die bestehende Diskrepanz zwischen den Messergebnissen der Histologie und der MR-Spektroskopie unterstützt neben einer linearen Abhängigkeit (siehe Abbildung 18) die Anwendung eines Kalibrierungsgraphen. In diesem Fall wird die nichtlineare Regression basierend auf den erhobenen Daten und dem erhobenen Vier-Stufen-Grading aus histologischer und spektroskopischer Messung durchgeführt unter der Annahme, dass die Kurve bei einem histologischen Fettgehalt von 0 % beginnt (siehe Abbildung 25). Nach dem Pearson-Korrelationskoeffizienten ergibt sich folglich ein noch höherer r -Wert ($r = 0.9515$) als bei der linearen Korrelation.

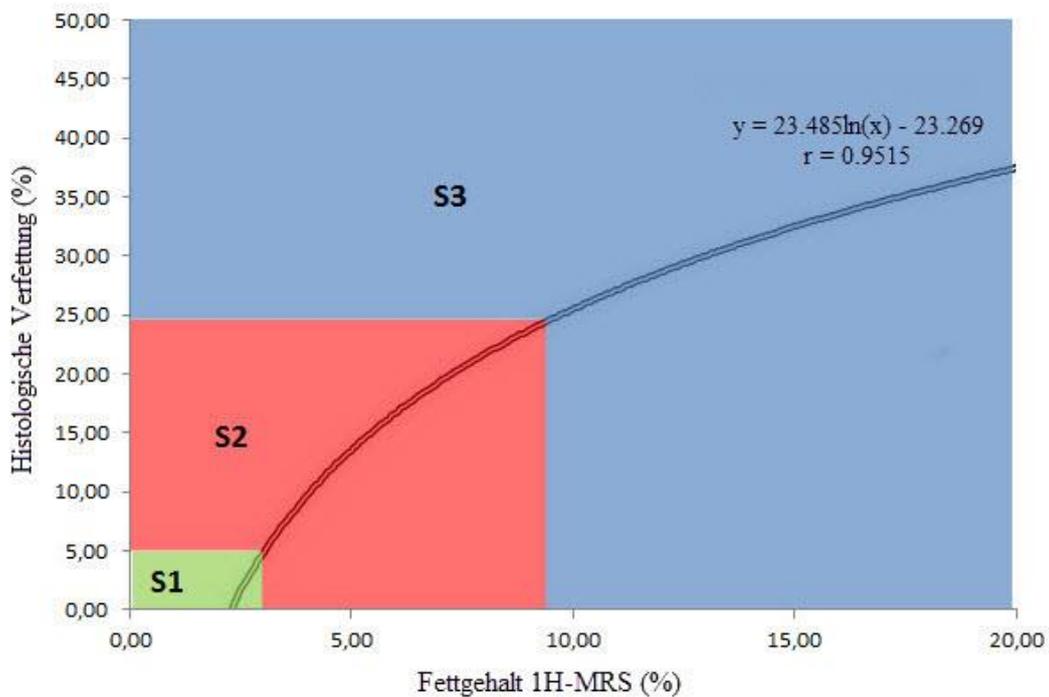


Abbildung 24: Kalibrierungsgraph zur Klassifizierung der Steatose nach dem Vier-Stufen-Grading zwischen histologisch (y) und spektroskopisch (x) gemessener Verfettung $y = 23.85 \ln(x) - 23.269$; $r = 0.9515$; nach Farben zugeordnete Klassifizierung in Anlehnung an oben beschriebenes Grading (S0 = x = y = 0 %): grün: S1, rot: S2, blau: S3.

Unterschiedliche histologisch und spektroskopisch gemessene intrahepatische Fettgehalte zeigten auch d'Assignies et al. [156]. Der durchschnittlich gemessene histologische Fettgehalt in 20 Patienten mit einer Fettleber betrug $47.5 \pm 19.6\%$, mittels 1H-MRS $18.1 \pm 9\%$. Der errechnete Korrekturkoeffizient für die Anpassung der 1H-MRS-Messung an den histologischen Fettgehalt ergab den Faktor 2.6. Ebenso verwendeten Hájek et al. [153] lineare und nicht lineare Modelle, um die Beziehung zwischen 1H-MRS und Histologie besser zu beschreiben. Die Korrekturkoeffizienten der linearen Korrelationsmodelle zwischen Histologie und Spektroskopie von intrahepatischem Fett für drei Gruppen von insgesamt 77 Lebertransplantatempfängern betragen 3.3, 4.2 und 6.1. In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich der histologischen und spektroskopischen Messungen ein Korrekturkoeffizient von 2.2 errechnet werden. Die klinische Relevanz der unterschiedlichen histologischen und spektroskopischen Messergebnisse wird aktuell noch diskutiert [157]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es zudem noch keinen Konsens über einen standardisierten Normalwert für spektroskopisch gemessene intrahepatische Verfettung. Ein erster Vorschlag als Referenzschwelle für die Diagnose einer Fettleber zielte auf einen Wert von 20 % [158]. In einer weiteren Studie an Kanin-

chen wurde ein Wert von $> 3.6\%$ intrahepatisch gemessenen Fetts mittels $^1\text{H-MRS}$ einer Fettleber gleichgesetzt [159]. In der vorliegenden Arbeit entsprach spektroskopisch ein Wert von 3.7% einer histologisch gemessenen Leberverfettung (Beteiligung von $> 5\%$ der Hepatozyten mittels histologischer Analyse) (siehe Tabelle 8).

Zur exakten Bestimmung des intrahepatischen Fettgehalts über die spektroskopischen Peakflächen sollte wie oben beschrieben die Relaxationszeit für T2 korrigiert werden. In einer Reihe von Studien wurden die folgenden durchschnittlichen T2-Werte mittels 3.0 T-Technik berechnet: T2 Wasser = 27 ms (Bereich 12.4 – 54.3 ms) und T2 Fett = 61 ms (Bereich 28 – 82.2 ms) [160]; T2 Wasserbereich: 12.4 – 54.3 ms und T2 Fettbereich 49–60 ms [153]; T2 Wasser = 28 ms (Bereich 22 – 42 ms) und T2 Fett = 64 ms (Bereich 36 – 99 ms) [161]. Diese Werte für 3.0 T stehen im Einklang mit den in der vorliegenden Studie erarbeiteten T2-Konstanten.

Theoretisch müssten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten auch einer T1-Korrektur unterzogen werden. Bei langen TR-Zeiten (> 1500 ms) hat Lebergewebe seine ursprüngliche Magnetisierung weitestgehend zurückerlangt und die T1-Zeitkonstante kaum noch Einfluss auf den Bildkontrast. Obwohl eine noch längere TR-Zeit weitere T1-Effekte minimieren würde, war die gewählte TR-Zeit von 1500 ms ein akzeptabler Kompromiss zwischen den T1-Effekten und der Untersuchungszeit [141]; auf eine T1-Korrektur wurde dementsprechend verzichtet.

Einen Vorteil dieser Arbeit stellt der zusätzliche Vergleich der $^1\text{H-MRS}$ -Daten – neben der histologischen Analyse – mit der biochemischen Analyse extrahierter Gewebeproben und dem folglich ermittelten Triglyceridgehalt der einzelnen Tiere dar. Die hier ermittelte hohe Korrelation zwischen HFF mittels $^1\text{H-MRS}$ und TG-Gehalt von $r = 0.97$ lässt die Reproduzierbarkeit der spektroskopischen Fettmessung auch auf andere Fett-Quantifizierungsmethoden vermuten und bestätigt das Ergebnis der Korrelation zwischen Histologie und $^1\text{H-MRS}$. Auch wenn die Menge an Triglyceriden zu klein war, um makroskopische Vesikel zu bilden und diese anschließend histologisch nachzuweisen, konnten sie mit der Methode nach FOLCH gemessen werden. Im Zusammenspiel mit der ausreichenden Empfindlichkeit der $^1\text{H-MRS}$ für die Quantifizierung intrahepatischen Fettgehalts korrelierten die Ergebnisse der biochemischen Analyse daher besser mit den Spektroskopiedaten als zwischen histologischer Fettbestimmung und $^1\text{H-MRS}$.

Die Korrelationen der spektroskopisch gemessenen Lipidkonzentrationen mit den laborchemisch bestimmten Leberwerten der Tiere bestätigen die Hypothese, dass die Spektroskopie Aussagen über Funktion und Zustand erkrankter Lebern ermöglicht. Es sollte jedoch beachtet werden, dass der separat betrachtete Wert der Lebersyntheseparameter nur als allgemeiner Indikator der Leberfunktion anzusehen ist und erst im Zusammenhang mit anderen laborchemischen Ergebnissen bzw. über den De-Ritis-Quotienten genauere Anhaltspunkte hinsichtlich des Stadiums einer alkoholbedingten Leberdekompensation liefern kann. In der isolierten Betrachtung der Leber-Transaminasen AST und ALT nach Alkoholkonsum findet sich charakteristisch eine stärkere Erhöhung der Aktivität der AST im Vergleich zu Werten der ALT, was die leicht bessere Korrelation zwischen 1H-MRS und AST ($r = 0.90$) im Gegensatz zu ALT ($r = 0.84$) erklären würde.

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine kaum messbare GGT-Aktivität; vereinzelt wurden Werte von 4, 5 und 6 U/l gemessen. Über 90 % der Messungen lagen unter der Nachweisgrenze von 3 U/l. Da Ratten keine Gallenblase zur Speicherung der Gallenflüssigkeit haben, scheint die GGT-Aktivität bei den Tieren geringer als beim Menschen und nur in sehr marginalen Mengen im Plasma nachweisbar.

Es sollte angemerkt werden, dass die 1H-MRS-Messungen vorliegend unter stark standardisiert experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden. Die 1H-MR-Spektren wurden an narkotisierten Tieren dargestellt und zeigten nur minimale Bewegungsartefakte. Trotzdem konnten Atembewegung der Tiere nicht ganz vermieden werden; zudem zeigten Inhomogenitäten des Magnetfeldes auf Grund des kleinen Voxel-Volumen, sowie der Messungen eines kleinen Objekts im Ganzkörperscanner trotz sorgfältiger Nachbearbeitung gelegentlich Verzerrungen der Spektrallinien (siehe Abbildung 12). In der klinischen MR-Diagnostik können zudem unterschiedliche technische Untersuchungsgegebenheiten wie Magnetfeldstärke, Lokalisierungsverfahren oder Repetitionszeiten die spektroskopischen Daten beeinflussen.

Eine weitere Limitation dieser Studie ergibt sich aus der geringen Anzahl der untersuchten Tiere. Um die Ergebnisse zu fundieren, sollten sie durch weitere Untersuchungen mit einem größeren Untersuchungskollektiv statistisch bestätigt und validiert werden; eine begründete statistische Aussage in Bezug auf Spezifität und Sensitivität der 1H-MRS konnte vorliegend mit der geringen Anzahl der Tiere somit nicht sinnvoll ermittelt werden. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass mithilfe der 1H-

Magnetresonanzspektroskopie quantitative Aussagen über schon kleinste Mengen intrahepatischen Fetts möglich werden, um im Rahmen individueller Krankheitsbilder und Therapieverläufe präziser reagieren zu können.

6 SCHLUSSFOLGERUNG

Im Ergebnis existieren verschiedene Methoden zur nicht invasiven Bestimmung von Leberfett mit individuellen Vor- und Nachteilen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bereits geringgradige Verfettungen im Rahmen einer akuten alkoholinduzierten Fettleber nach 48 Stunden mittels klinischen 3.0 T-MR-Tomographen spektroskopisch präzise detektiert und quantifiziert werden können. Ein Anstieg der Lipidkonzentration wird folglich schon vor dem Stadium der Steatosis hepatis erkannt. Somit ist mittels ¹H-MRS eine exakte Differenzierung gesunder und pathologischer Lebern mit direkter Betrachtung des geschädigten Organs ohne invasive Untersuchungsmethoden möglich.

Der hohe personelle, technische und zeitliche Aufwand für die Spektroskopie verhindert bisher den klinischen Routineeinsatz dieses Verfahrens. Zukünftige, kürzere Untersuchungszeiten und eine automatisierte und standardisierte Auswertung könnten einen häufigeren Einsatz mit besserer Übertragbarkeit der Studienergebnisse ermöglichen. Verbesserungen der Aufnahmetechnik und Auswertungsverfahren werden zukünftig eine stärker differenzierte Aussagekraft sowie Beurteilung der Spektren ermöglichen. Vor allem die Diskordanz zwischen MR-spektroskopischen Ergebnissen und histologischen Befunden geben Anlass, in weiteren Studien die klinische Relevanz zu beurteilen und die ¹H-MR-Spektroskopie als neuen Standard in der Diagnostik einer Fettleber zu etablieren.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Studie

Die akute alkoholinduzierte Fettleber stellt das erste Stadium alkoholischer Lebererkrankungen dar. Bereits eine akute Alkoholintoxikation führt zu einer signifikanten Akkumulation von Fett in den Hepatozyten. Trotz verbesserter serologischer und bildgebender Diagnoseverfahren ist die Leberbiopsie nach wie vor der Goldstandard zur Diagnose einer Fettleber. Mögliche Komplikationen als invasives Verfahren, Stichprobenfehler sowie eine geringe Sensitivität im Bereich geringgradiger Verfettung sind die größten Nachteile der Leberbiopsie. Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe der ¹H-Magnetresonanzspektroskopie eine akute alkoholinduzierte Fettleber zu diagnostizieren und quantitativ zu beurteilen. Um die Korrelation zwischen spektroskopisch gemessenem Leberfettgehalt und histologischer, biochemischer sowie laborchemischer Analyse zu bestimmen, wurde eine alkoholinduzierte Fettleber im Tiermodell verwendet.

Methodik

In 20 Lewis-Ratten wurde eine alkoholische Fettleber mittels gastraler Ethanol-Applikation induziert; 10 Ratten dienten als Kontrolle. Der intrahepatische Fettgehalt wurde mittels ¹H-MRS (3.0 T) als prozentuales Verhältnis zwischen Lipid- und Wasser-Peak berechnet. Fettgehalt sowie Triglyceride wurden nach Entnahme der Leber histologisch und biochemisch (nach FOLCH) bestimmt. Um spezifische Leberenzyme zu untersuchen, wurde Blut aus dem orbitalen Venenplexus entnommen.

Ergebnisse

In allen 20 Tieren konnte nach Ethanolapplikation eine Leberverfettung mittels ¹H-MRS nachgewiesen werden. Histologisch zeigten 16 Tiere eine Fettleber. Ebenso zeigte sich nach Ethanolgabe und folgender biochemischer Analyse im Durchschnitt eine Erhöhung des Triglyceridgehalts, welcher einer Leberverfettung entsprach. Es fanden sich statistisch signifikante Korrelationen zwischen der histologisch bestimmten intrahepatischen Verfettung und dem spektroskopisch gemessenen Fettgehalt (Pearson-Korrelationskoeffizient $r = 0.90$, $p < 0.01$) sowie zwischen der biochemischen Analyse nach FOLCH und ¹H-MRS ($r = 0.97$, $p < 0.01$). Ebenso zeigte sich eine positive signifikante Korrelation zwischen spektroskopisch gemessener Leberverfettung und den Leberparametern AST ($r = 0.91$, $p < 0.05$) und ALT ($r = 0.84$, $p < 0.05$).

Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass bereits geringgradige intrahepatische Verfettungen präzise quantitativ mittels 3.0 T-Protonen-MR-Spektroskopie darstellbar sind. Somit kann die Methode – bei Beachtung geeigneter Grenzwerte histologischer Messungen – als verlässliche diagnostische Alternative in Betracht gezogen werden. Bereits 48 Stunden nach Alkoholintoxikation ist mittels 1H-MRS eine exakte Differenzierung gesunder und pathologischer Lebern möglich – entscheidend vor allem im Rahmen einer Prätransplantationsdiagnostik bei Verdacht auf eine akute Fettleber. Darüber hinaus ist die 1H-MRS anderen bildgebenden Verfahren wie Ultraschall, CT und MRT in der genauen Quantifizierung intrahepatischen Fettgehalts überlegen. Der Einsatz erscheint auch in der Diagnostik und Verlaufskontrolle alkoholischer Lebererkrankungen in Zukunft sinnvoll. Kommende Untersuchungen sollten an einem größeren Probandenkollektiv durchgeführt werden, um den Stellenwert der 1H-MRS zu unterstreichen.

8 SUMMARY

Aim of the study

The acute alcohol-induced fatty liver represents the first stage of alcoholic liver diseases. Already acute alcohol intoxication leads to a significant accumulation of fat in hepatocytes. Despite improved serological and imaging techniques, liver biopsy still remains the gold-standard in diagnosing a fatty liver. Complications as an invasive procedure, sampling errors and low sensitivity in case of low-grade fatty degeneration are the major drawbacks of liver biopsy. The aim of this study was to diagnose and to assess quantitatively an acute alcohol-induced fatty liver by using ¹H-magnetic resonance spectroscopy. To determine the correlation between fat content measured by ¹H-MRS and histological, biochemical and laboratory-chemical analyses an in-vivo animal model of alcohol-induced fatty liver disease was used.

Methods

In 20 Lewis rats an alcoholic fatty liver was induced, 10 rats served as control. Intrahepatic fat content was expressed as a percentage of the ratio of the lipid and the water peak by using ¹H-MRS (3.0 T). Fat content as well as triglycerides were also determined histologically respectively biochemically. To define specific liver enzymes blood was taken from the orbital venous plexus.

Results

In all 20 animals increased liver fat could be detected by ¹H-MRS after ethanol application. Histologically 16 animals showed a fatty liver. Likewise, there was an increase in the triglyceride level at average after ethanol administration measured biochemically, which corresponded to a fatty liver. Statistically significant correlation was detected between histological fatty infiltration and liver fat content measured spectroscopically (Pearson correlation coefficient $r = 0.90$, $p < 0.01$) as well as between biochemical analysis (FOLCH) and ¹H-MRS ($r = 0.97$, $p < 0.01$). Similarly, a positive significant correlation was found between liver fat content measured spectroscopically and liver enzymes AST ($r = 0.91$, $p < 0.05$) and ALT ($r = 0.84$, $p < 0.05$).

Conclusion

The study has shown that already mild intrahepatic fatty degeneration could be detected precisely quantitatively by ¹H-MR spectroscopy. Thus, the method – obeying appropriate limits of histological measurements – is considered as a reliable diagnostic alternative. Already 48 hours after alcohol intoxication an exact differentiation of healthy and pathological livers is possible – a crucial aspect in the context of pre-transplant diagnostics on suspicion of acute fatty liver. Furthermore ¹H-MRS is superior to other imaging techniques such as ultrasound, CT and MRI in the accurate quantification of intrahepatic fat content. The use of ¹H-MRS in the diagnosis and monitoring of alcoholic liver disease would be helpful in the future. Upcoming studies should be conducted on a larger group of subjects in order to underline the priority of ¹H-MRS.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Neuschwander-Tetri, B.A. and S.H. Caldwell, *Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1202-19.
2. Reddy, J.K. and M.S. Rao, *Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(5): p. G852-8.
3. Lindenmeyer, J., *Alkoholabhängigkeit - Fortschritte der Psychotherapie (Manuale für die Praxis)* Vol. 6. 2005.
4. Singer, M., Teyssen, Stephan, *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten - Grundlagen - Diagnostik - Therapie* 2005. 640.
5. Manfred v. Singer, S.T. *Alkohol Und Alkoholfolgekrankheiten*. 2005 [cited 2; 614].
6. Riemann, J.F., *Gastroenterologie: das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Band 1* 2008. 2039.
7. Nicola Stefano, M.M., *Protonen-Magnetresonanztomographie bei Stoffwechselstörungen des zentralen Nervensystems*. Clinical Neuroradiology, 2007. **4**: p. 223-229
8. Corbin, I.R., et al., *Hepatic 31P MRS in rat models of chronic liver disease: assessing the extent and progression of disease*. Gut, 2003. **52**(7): p. 1046-53.
9. Sumida, Y., A. Nakajima, and Y. Itoh, *Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(2): p. 475-85.
10. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology*. Gastroenterology, 2012. **142**(7): p. 1592-609.
11. Li Vecchi, V., et al., *Non-invasive assessment of liver steatosis and fibrosis in HIV/HCV- and HCV- infected patients*. Ann Hepatol, 2013. **12**(5): p. 740-8.
12. Grant, B.F., M.C. Dufour, and T.C. Harford, *Epidemiology of alcoholic liver disease*. Semin Liver Dis, 1988. **8**(1): p. 12-25.
13. Mueller, S.S., H. K., *Alkohol und Lebererkrankungen*. Med Welt, 2008. **6**: p. 210-216.
14. Messmann, H., *Klinische Gastroenterologie: Das Buch für Fort- und Weiterbildung* 2011. 840.
15. Setshedi, M., J.R. Wands, and S.M. Monte, *Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease*. Oxid Med Cell Longev, 2010. **3**(3): p. 178-85.
16. Lieber, C.S., *Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001*. Pathol Biol (Paris), 2001. **49**(9): p. 738-52.
17. Gordon, T. and J.T. Doyle, *Drinking and mortality. The Albany Study*. Am J Epidemiol, 1987. **125**(2): p. 263-70.
18. Gordon, T. and W.B. Kannel, *Drinking and mortality. The Framingham Study*. Am J Epidemiol, 1984. **120**(1): p. 97-107.
19. Lucey, M.R., P. Mathurin, and T.R. Morgan, *Alcoholic hepatitis*. N Engl J Med, 2009. **360**(26): p. 2758-69.
20. Lelbach, W.K., *Epidemiology of alcoholic liver disease*. Prog Liver Dis, 1976. **5**: p. 494-515.
21. Lelbach, W.K., *[The liver and environmental poisons]*. Klin Wochenschr, 1985. **63**(22): p. 1139-51.

22. Dufour, M.C., F.S. Stinson, and M.F. Caces, *Trends in cirrhosis morbidity and mortality: United States, 1979-1988*. Semin Liver Dis, 1993. **13**(2): p. 109-25.
23. John, U., et al., *Excess mortality of alcohol-dependent individuals after 14 years and mortality predictors based on treatment participation and severity of alcohol dependence*. Alcohol Clin Exp Res, 2013. **37**(1): p. 156-63.
24. *Der Alkoholkonsum Jugendlicher und junger Erwachsener in Deutschland 2012 - Ergebnisse einer aktuellen Repräsentativbefragung und Trends*, 2014, Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung.
25. Deutschland, S.B., *Diagnosis: alcohol abuse - number of young hospital patients on the rise*. Press release No.486 / 2009-12-15, 2009.
26. Kraus, L., et al., *Association of average daily alcohol consumption, binge drinking and alcohol-related social problems: results from the German Epidemiological Surveys of Substance Abuse*. Alcohol Alcohol, 2009. **44**(3): p. 314-20.
27. Wechsler, H., et al., *A gender-specific measure of binge drinking among college students*. Am J Public Health, 1995. **85**(7): p. 982-5.
28. Farke, W. and P. Anderson, *Binge drinking in Europe*. Adicciones, 2007. **19**(4): p. 333-9.
29. Backens, D.M., *Grundlagen der MR-Spektroskopie*, in *Der Radiologe* 2010. p. 767-774.
30. Hubscher, S.G., *Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease*. Histopathology, 2006. **49**(5): p. 450-65.
31. Friedman, S.L., *Stellate cell activation in alcoholic fibrosis--an overview*. Alcohol Clin Exp Res, 1999. **23**(5): p. 904-10.
32. JC, B., *Alkoholismusdiagnostik aus internistischer Sicht*. Biologische Alkoholismusmarker, ed. S.M. (Hrsg)1995, Weinheim: Chapman and Hall.
33. JC, B., *Klinik und Therapie alkoholischer Leberschäden*. In: Seitz HK, Lieber CS, Simanowski UA (Hrsg) Handbuch Alkohol, Alkoholismus, alkoholbedingte Organschäden. 2. Aufl. Barth, Leipzig, Heidelberg, S 275 - 298, 2000.
34. Hall, P.D., *Pathological spectrum of alcoholic liver disease*. Alcohol Alcohol Suppl, 1994. **2**: p. 303-13.
35. *Alcoholic liver disease: morphological manifestations. Review by an international group*. Lancet, 1981. **1**(8222): p. 707-11.
36. Elphick, D.A., et al., *Spectrum of liver histology in presumed decompensated alcoholic liver disease*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(4): p. 780-8.
37. Eng, S.C., et al., *Hepatic iron overload in alcoholic end-stage liver disease is associated with iron deposition in other organs in the absence of HFE-1 hemochromatosis*. Liver Int, 2005. **25**(3): p. 513-7.
38. Manfred v. Singer, S.T., *Alkohol Und Alkoholfolgekrankheiten: Grundlagen – Diagnostik – Therapie*. Vol. 2. 2005: Springer Medizin Verlag Heidelberg. 629.
39. Obika, M. and H. Noguchi, *Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 145754.
40. Adams, L.A. and P. Angulo, *Role of liver biopsy and serum markers of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Liver Dis, 2007. **11**(1): p. 25-35, viii.
41. Schwenzer, N.F., et al., *Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance*. J Hepatol, 2009. **51**(3): p. 433-45.
42. Conigrave, K.M., et al., *Traditional markers of excessive alcohol use*. Addiction, 2003. **98 Suppl 2**: p. 31-43.

43. Sharpe, P.C., *Biochemical detection and monitoring of alcohol abuse and abstinence*. Ann Clin Biochem, 2001. **38**(Pt 6): p. 652-64.
44. Sorbi, D., J. Boynton, and K.D. Lindor, *The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(4): p. 1018-22.
45. Elomaa, V.V., et al., *Biological markers of alcohol consumption and effect of calcitonin in nonalcoholic men: a prospective, double-blind study*. Alcohol Clin Exp Res, 1996. **20**(5): p. 830-5.
46. Anton, R.F., et al., *The effect of drinking intensity and frequency on serum carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyl transferase levels in outpatient alcoholics*. Alcohol Clin Exp Res, 1998. **22**(7): p. 1456-62.
47. Helander, A., A.V. Carlsson, and S. Borg, *Longitudinal comparison of carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyl transferase: complementary markers of excessive alcohol consumption*. Alcohol Alcohol, 1996. **31**(1): p. 101-7.
48. Mihas, A.A. and M. Tavassoli, *Laboratory markers of ethanol intake and abuse: a critical appraisal*. Am J Med Sci, 1992. **303**(6): p. 415-28.
49. Sillanaukee, P., *Laboratory markers of alcohol abuse*. Alcohol Alcohol, 1996. **31**(6): p. 613-6.
50. Johnston, D.E., *Special considerations in interpreting liver function tests*. Am Fam Physician, 1999. **59**(8): p. 2223-30.
51. Golka, K. and A. Wiese, *Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)--a biomarker for long-term alcohol consumption*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2004. **7**(4): p. 319-37.
52. Ricci, C., et al., *Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver*. J Hepatol, 1997. **27**(1): p. 108-13.
53. Saadeh, S., et al., *The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 745-50.
54. Karcaaltincaba, M. and O. Akhan, *Imaging of hepatic steatosis and fatty sparing*. Eur J Radiol, 2007. **61**(1): p. 33-43.
55. Graif, M., et al., *Quantitative estimation of attenuation in ultrasound video images: correlation with histology in diffuse liver disease*. Invest Radiol, 2000. **35**(5): p. 319-24.
56. Yajima, Y., et al., *Ultrasonographical diagnosis of fatty liver: significance of the liver-kidney contrast*. Tohoku J Exp Med, 1983. **139**(1): p. 43-50.
57. Saverymuttu, S.H., A.E. Joseph, and J.D. Maxwell, *Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1986. **292**(6512): p. 13-5.
58. Debongnie, J.C., et al., *Prospective evaluation of the diagnostic accuracy of liver ultrasonography*. Gut, 1981. **22**(2): p. 130-5.
59. Foster, K.J., et al., *The accuracy of ultrasound in the detection of fatty infiltration of the liver*. Br J Radiol, 1980. **53**(629): p. 440-2.
60. Steinmaurer, H.J., et al., *[Accuracy of sonography in the diagnosis of diffuse liver parenchymal diseases--comparison of sonography and liver histology]*. Ultraschall Med, 1984. **5**(3): p. 98-103.
61. Leen, E., et al., *Detection of colorectal liver metastases: comparison of laparotomy, CT, US, and Doppler perfusion index and evaluation of postoperative follow-up results*. Radiology, 1995. **195**(1): p. 113-6.
62. Hagspiel, K.D., et al., *Detection of liver metastases: comparison of superparamagnetic iron oxide-enhanced and unenhanced MR imaging at 1.5 T*

- with dynamic CT, intraoperative US, and percutaneous US. *Radiology*, 1995. **196**(2): p. 471-8.
63. Rettenmaier, G., *Chronische Leberkrankheiten In: Rettenmaier G, Seitz K (Hrsg) Sonographische Differentialdiagnostik, Band 1. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, S 19-78*1990.
 64. Ryan, C.K., et al., *One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation*. *Liver Transpl*, 2002. **8**(12): p. 1114-22.
 65. Tchelepi, H., et al., *Sonography of diffuse liver disease*. *J Ultrasound Med*, 2002. **21**(9): p. 1023-32; quiz 1033-4.
 66. Annemarie Grillenberger, E.F., 978-3-7089-0819-9 2007. 261.
 67. Alpern, M.B., et al., *Focal hepatic masses and fatty infiltration detected by enhanced dynamic CT*. *Radiology*, 1986. **158**(1): p. 45-9.
 68. Ma, X., et al., *Imaging-based quantification of hepatic fat: methods and clinical applications*. *Radiographics*, 2009. **29**(5): p. 1253-77.
 69. Kawata, R., et al., *Quantitative evaluation of fatty liver by computed tomography in rabbits*. *AJR Am J Roentgenol*, 1984. **142**(4): p. 741-6.
 70. Limanond, P., et al., *Macrovesicular hepatic steatosis in living related liver donors: correlation between CT and histologic findings*. *Radiology*, 2004. **230**(1): p. 276-80.
 71. Park, S.H., et al., *Macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: use of CT for quantitative and qualitative assessment*. *Radiology*, 2006. **239**(1): p. 105-12.
 72. Lee, S.W., et al., *Unenhanced CT for assessment of macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: comparison of visual grading with liver attenuation index*. *Radiology*, 2007. **244**(2): p. 479-85.
 73. Cho, C.S., et al., *Preoperative radiographic assessment of hepatic steatosis with histologic correlation*. *J Am Coll Surg*, 2008. **206**(3): p. 480-8.
 74. Panicek, D.M., C.S. Giess, and L.H. Schwartz, *Qualitative assessment of liver for fatty infiltration on contrast-enhanced CT: is muscle a better standard of reference than spleen?* *J Comput Assist Tomogr*, 1997. **21**(5): p. 699-705.
 75. Mendler, M.H., et al., *Dual-energy CT in the diagnosis and quantification of fatty liver: limited clinical value in comparison to ultrasound scan and single-energy CT, with special reference to iron overload*. *J Hepatol*, 1998. **28**(5): p. 785-94.
 76. Charatcharoenwittaya, P. and K.D. Lindor, *Role of radiologic modalities in the management of non-alcoholic steatohepatitis*. *Clin Liver Dis*, 2007. **11**(1): p. 37-54, viii.
 77. Qayyum, A., et al., *Accuracy of liver fat quantification at MR imaging: comparison of out-of-phase gradient-echo and fat-saturated fast spin-echo techniques--initial experience*. *Radiology*, 2005. **237**(2): p. 507-11.
 78. Frank Schneider, G.R.F., *Funktionelle MRT in Psychiatrie und Neurologie*2007. 689.
 79. Schick, F., *Grundlagen der Magnetresonanztomographie (MRT)*. *Der Radiologe*, 2005. **45**: p. 69–88.
 80. Pabst, C. *Grundlagen der Magnetresonanztomographie*. 2013; Available from: http://www.ukgm.de/ugm_2/deu/umr_rdi/Teaser/Grundlagen_der_Magnetresonanztomographie_MRT_2013.pdf.
 81. Pilleul, F., et al., *Fatty infiltration of the liver. Detection and grading using dual T1 gradient echo sequences on clinical MR system*. *Gastroenterol Clin Biol*, 2005. **29**(11): p. 1143-7.

82. Rofsky, N.M. and H. Fleishaker, *CT and MRI of diffuse liver disease*. Semin Ultrasound CT MR, 1995. **16**(1): p. 16-33.
83. Laniado, M. and A.F. Kopp, *Liver-specific contrast media: a magic bullet or a weapon for dedicated targets?* Radiology, 1997. **205**(2): p. 319-22.
84. C. Müller , F.H., S. Bisdas , C. Herzog , R. M. Hammerstingl , H. Ackermann , M. Vorbuchner , T. J. Vogl, *In-vivo-Protonenspektroskopie des Leberparenchyms: Technik und Ergebnisse*. Fortschr Röntgenst, 2006. **178**(11): p. 1128-1136.
85. Szczepaniak, L.S., et al., *Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(2): p. E462-8.
86. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
87. Hermann Fießl, M.M., *Duale Reihe Anamnese und Klinische Untersuchung*. Vol. 5. 2014. 536.
88. FT., F., *Über den Diabetes*. Hirschwald 1884, Berlin.
89. E., B., *Aspiration for removal of biopsy material from the liver*. Arch Intern Med, 1939. **63**:: p. 276-89.
90. Huard P, M.J., Joyeux B., *La ponction biopsie du foie et son utilité dans le diagnostic des affections hépatiques*. Ann Anat Path Anat Norm Méd-chir, 1935. **12**:: p. 1118-24.
91. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.
92. Bacon, B.R., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1103-9.
93. Uchida, T., et al., *Alcoholic foamy degeneration--a pattern of acute alcoholic injury of the liver*. Gastroenterology, 1983. **84**(4): p. 683-92.
94. Yeh, M.M. and E.M. Brunt, *Pathology of nonalcoholic fatty liver disease*. Am J Clin Pathol, 2007. **128**(5): p. 837-47.
95. Brunt, E.M., *Pathology of fatty liver disease*. Mod Pathol, 2007. **20 Suppl 1**: p. S40-8.
96. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
97. Reid, A.E., *Nonalcoholic steatohepatitis*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 710-23.
98. Brunt, E.M., *Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis*. Clin Liver Dis, 2002. **6**(2): p. 399-420, vii.
99. Piccinino, F., et al., *Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies*. J Hepatol, 1986. **2**(2): p. 165-73.
100. H., L., *Das Risiko der perkutanen Leberbiopsie*. Med Klin 1971. **66**: p. 924-9.
101. Cadranet, J.F., P. Rufat, and F. Degos, *Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL)*. Hepatology, 2000. **32**(3): p. 477-81.
102. Bachert P, S.L., *Magnetresonanzspektroskopie, Teil 1: Grundlagen*. Radiologe 2003.
103. Ernst, T. and J. Hennig, *Coupling effects in volume selective 1H spectroscopy of major brain metabolites*. Magn Reson Med, 1991. **21**(1): p. 82-96.

104. Kantarci, K., *1H magnetic resonance spectroscopy in dementia*. Br J Radiol, 2007. **80 Spec No 2**: p. S146-52.
105. Papanagiotou al. *MR-Spektroskopie bei Hirntumoren*. Der Radiologe, 2007. **47(6)**: p. 520-529.
106. Bottomley, P.A., *Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo*. Ann N Y Acad Sci, 1987. **508**: p. 333-48.
107. Yablonskiy, D.A., et al., *Homonuclear J coupling effects in volume localized NMR spectroscopy: pitfalls and solutions*. Magn Reson Med, 1998. **39(2)**: p. 169-78.
108. Brown, T.R., B.M. Kincaid, and K. Ugurbil, *NMR chemical shift imaging in three dimensions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79(11)**: p. 3523-6.
109. Shungu, D.C. and J.D. Glickson, *Sensitivity and localization enhancement in multinuclear in vivo NMR spectroscopy by outer volume presaturation*. Magn Reson Med, 1993. **30(6)**: p. 661-71.
110. Adalsteinsson, E., et al., *Volumetric spectroscopic imaging with spiral-based k-space trajectories*. Magn Reson Med, 1998. **39(6)**: p. 889-98.
111. Posse, S., et al., *High speed 1H spectroscopic imaging in human brain by echo planar spatial-spectral encoding*. Magn Reson Med, 1995. **33(1)**: p. 34-40.
112. Reboucas, G. and K.J. Isselbacher, *Studies on the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. I. Synthesis and oxidation of fatty acids by the liver*. Journal of Clinical Investigation, 1961. **40**: p. 1355-62.
113. Smith, H.E., et al., *Spatial variation in cartilage T2 of the knee*. J Magn Reson Imaging, 2001. **14(1)**: p. 50-5.
114. Guiu, B., et al., *Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and in vivo proton MR spectroscopy*. Radiology, 2009. **250(1)**: p. 95-102.
115. Brunt, E.M., *Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology*. Semin Liver Dis, 2001. **21(1)**: p. 3-16.
116. Crowley, H., et al., *Steatosis in donor and transplant liver biopsies*. Hum Pathol, 2000. **31(10)**: p. 1209-13.
117. Perez-Daga, J.A., et al., *Influence of degree of hepatic steatosis on graft function and postoperative complications of liver transplantation*. Transplant Proc, 2006. **38(8)**: p. 2468-70.
118. Gilat, T., et al., *Prevention of diet-induced fatty liver in experimental animals by the oral administration of a fatty acid bile acid conjugate (FABAC)*. Hepatology, 2003. **38(2)**: p. 436-42.
119. Antai, A.B., et al., *Serum protein and enzyme levels in rats following administration of ethanolic leaf extract of Ageratum conyzoides (goat weed)*. Niger J Physiol Sci, 2009. **24(2)**: p. 117-20.
120. Ekam, V.S. and P.E. Ebong, *Serum protein and enzyme levels in rats following administration of antioxidant vitamins during caffeinated and non-caffeinated paracetamol induced hepatotoxicity*. Niger J Physiol Sci, 2007. **22(1-2)**: p. 65-8.
121. Theuer, R.C., et al., *Regression of alcoholic fatty liver in the rat by medium-chain triglycerides*. Am J Clin Nutr, 1972. **25(2)**: p. 175-81.
122. Tsukamoto, H., et al., *Hepatic origin of triglycerides in fatty livers produced by the continuous intragastric infusion of an ethanol diet*. Lipids, 1984. **19(6)**: p. 419-22.
123. Ch. Bode, H.K., H. Goebell, Christiane Bode, G. A. Martini, *Zur Pathogenese der Fetteinlagerung in die Leber durch Alkohol*. Klinische Wochenschrift, 1970. **19**: p. 1180 - 1188.

124. Piccinino, F., et al., *Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies.* Journal of Hepatology, 1986. **2**(2): p. 165-73.
125. Strassburg, C.P. and M.P. Manns, *Approaches to liver biopsy techniques--revisited.* Seminars in Liver Disease, 2006. **26**(4): p. 318-27.
126. Smith, E.H., *Complications of percutaneous abdominal fine-needle biopsy. Review.* Radiology, 1991. **178**(1): p. 253-8.
127. Thomas, E.L., et al., *Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study.* Gut, 2005. **54**(1): p. 122-7.
128. Peppercorn, P.D., et al., *Demonstration of hepatic steatosis by computerized tomography in patients receiving 5-fluorouracil-based therapy for advanced colorectal cancer.* Br J Cancer, 1998. **77**(11): p. 2008-11.
129. McCormack, L., et al., *Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy - A matched case-control study.* Annals of Surgery, 2007. **245**(6): p. 923-930.
130. Selzner, M. and P.A. Clavien, *Fatty liver in liver transplantation and surgery.* Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 105-13.
131. Todo, S., et al., *Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration.* Transplantation, 1989. **47**(5): p. 903-5.
132. Ploeg, R.J., et al., *Malfunction of the liver after transplantation: an analysis of potential risk factors.* Transplant Proc, 1993. **25**(1 Pt 2): p. 1659-61.
133. Chan, C., et al., *Hepatic tissue engineering for adjunct and temporary liver support: critical technologies.* Liver Transpl, 2004. **10**(11): p. 1331-42.
134. Longo, R., et al., *Fatty infiltration of the liver. Quantification by 1H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography.* Invest Radiol, 1993. **28**(4): p. 297-302.
135. Guiu, B., et al., *Magnetic resonance imaging and spectroscopy for quantification of hepatic steatosis: urgent need for standardization!* J Hepatol, 2009. **51**(6): p. 1082-3; author reply 1083-4.
136. House, M.J., et al., *Diagnostic performance of a rapid magnetic resonance imaging method of measuring hepatic steatosis.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59287.
137. Permutt, Z., et al., *Correlation between liver histology and novel magnetic resonance imaging in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease - MRI accurately quantifies hepatic steatosis in NAFLD.* Aliment Pharmacol Ther, 2012. **36**(1): p. 22-9.
138. Siegelman, E.S. and M.A. Rosen, *Imaging of hepatic steatosis.* Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 71-80.
139. Bohte, A.E., et al., *The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis.* Eur Radiol, 2011. **21**(1): p. 87-97.
140. Gaspard d'Assignies, M.R., Abdesslem Khiat, Luigi Lepanto, Miguel Chagnon, Claude Kauffmann, An Tang, Louis Gaboury, Yvan Boulanger, *Noninvasive quantitation of human liver steatosis using magnetic resonance and bioassay methods.* European Radiology, 2009. **19**(8): p. 2033-2040.
141. Orlacchio, A., et al., *Evaluation of the severity of chronic hepatitis C with 3-T1H-MR spectroscopy.* AJR Am J Roentgenol, 2008. **190**(5): p. 1331-9.
142. McPherson, S., et al., *Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered.* J Hepatol, 2009. **51**(2): p. 389-97.

143. Krssak, M., et al., *Non-invasive assessment of hepatic fat accumulation in chronic hepatitis C by 1H magnetic resonance spectroscopy*. Eur J Radiol, 2010. **74**(3): p. e60-6.
144. Friedrich-Rust, M., et al., *Assessment of liver fibrosis and steatosis in PBC with FibroScan, MRI, MR-spectroscopy, and serum markers*. J Clin Gastroenterol, 2010. **44**(1): p. 58-65.
145. Borra, R.J., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: rapid evaluation of liver fat content with in-phase and out-of-phase MR imaging*. Radiology, 2009. **250**(1): p. 130-6.
146. Guiu, B., et al., *Mapping of liver fat with triple-echo gradient echo imaging: validation against 3.0-T proton MR spectroscopy*. Eur Radiol, 2009. **19**(7): p. 1786-93.
147. Reeder, S.B., et al., *Quantification of hepatic steatosis with MRI: the effects of accurate fat spectral modeling*. J Magn Reson Imaging, 2009. **29**(6): p. 1332-9.
148. Yokoo, T., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and fat-grading accuracy of low-flip-angle multiecho gradient-recalled-echo MR imaging at 1.5 T*. Radiology, 2009. **251**(1): p. 67-76.
149. Takahashi, M., H. Uematsu, and H. Hatabu, *MR imaging at high magnetic fields*. Eur J Radiol, 2003. **46**(1): p. 45-52.
150. Ratziu, V., et al., *Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(7): p. 1898-906.
151. Turlin, B., et al., *Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies*. Liver Int, 2009. **29**(4): p. 530-5.
152. Mennesson, N., et al., *Liver steatosis quantification using magnetic resonance imaging: a prospective comparative study with liver biopsy*. J Comput Assist Tomogr, 2009. **33**(5): p. 672-7.
153. Hajek, M., et al., *MR spectroscopy as a tool for in vivo determination of steatosis in liver transplant recipients*. Magnetic Resonance Materials in Physics Biology and Medicine, 2011. **24**(5): p. 297-304.
154. van Werven, J.R., et al., *Reproducibility of 3.0 Tesla magnetic resonance spectroscopy for measuring hepatic fat content*. J Magn Reson Imaging, 2009. **30**(2): p. 444-8.
155. Cowin, G.J., et al., *Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis*. J Magn Reson Imaging, 2008. **28**(4): p. 937-45.
156. d'Assignies, G., et al., *Noninvasive quantitation of human liver steatosis using magnetic resonance and bioassay methods*. Eur Radiol, 2009. **19**(8): p. 2033-40.
157. Noworolski, S.M., et al., *Liver steatosis: concordance of MR imaging and MR spectroscopic data with histologic grade*. Radiology, 2012. **264**(1): p. 88-96.
158. Zhong, L., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: quantitative assessment of liver fat content by computed tomography, magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy*. J Dig Dis, 2009. **10**(4): p. 315-20.
159. Choji, T., [Evaluation of fatty liver changes and fatty degeneration in liver tumors by 1H-MRS]. Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi, 1993. **53**(12): p. 1408-14.
160. Hamilton, G., et al., *Effect of PRESS and STEAM sequences on magnetic resonance spectroscopic liver fat quantification*. J Magn Reson Imaging, 2009. **30**(1): p. 145-52.
161. Chabanova, E., et al., *MR spectroscopy of liver in overweight children and adolescents: Investigation of H-1 T-2 relaxation times at 3 T*. Eur J Radiol, 2012. **81**(5): p. 811-814.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AFL	alcoholic fatty liver/alkoholische Fettleber
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
AST	Aspartat-Aminotransferase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
13C	Kohlenstoff
CDT	Carbohydrat-defizientes Transferrin
CT	Computertomographie
19F	Fluor
FLD	fatty liver disease
FOV	field of view
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GRE	Gradientenecho
1H	Wasserstoff
HF	Hochfrequenz
HFF	hepatic fat fraction
HU	Houndsfieldunits
Hz	Hertz
IL-1	Interleukin-1
IP	in-phase
i.S.	im Serum
kVp	kilovoltage
MCV	Mittleres korpuskuläre Volumen
MHz	Megahertz
23Na	Natrium
NADH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrid
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease

NIAAA	Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism
MEOS	Mikrosomales Ethanol-oxidierendes System
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomographie
OP	out-phase
³¹ P	Phosphor
ppm	Parts per million
PRESS	Point-RESolved Spectroscopy
SD	Standardabweichung
SE	Spinecho
STEAM	Stimulated Echo Acquisition
SVS	single voxel spectroscopy
T	Tesla
TE	Echozeit
TG	Triglyceride
TSE	Turbo Spinecho
TR	Repetitionzeit
TNF	Tumornekrosefaktor
U/l	Unites per liter
US	Ultraschall
ZNS	Zentrales Nervensystem
VIBE	Volume Interpolated Breathhold Examination
VOI	volume of interest

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Diagrammschema über den Metabolismus von Ethanol ADH – Alkoholdehydrogenase, MEOS – mikrosomales, Ethanol- oxidierendes System, ALDH – Aldehyddehydrogenase (modifiziert nach Setshedi [15])	9
Abbildung 2: Stadien und klinischer Verlauf alkoholbedingter Lebererkrankungen ...	13
Abbildung 3: Nach Einstrahlen eines HF-Pulses präzedieren die Protonen in Phase und die Magnetisierung wird um 90° in die Transversalebene gebracht (aus Schneider [78]).....	19
Abbildung 4: T1-Relaxation: Übergang der Längsmagnetisierung (longitudinale Magnetisierung) in ihren Gleichgewichtszustand (modifiziert nach Pabst [80]).....	20
Abbildung 5: T2-Relaxation: Übergang der Quermagnetisierung (transversale Magnetisierung) in ihren Gleichgewichtszustand. Verlust der Gleichphasigkeit der Spins (Dephasierung) und damit Verschwinden des Summenvektors (grau) in der xy-Ebene (modifiziert nach Pabst [80]).....	20
Abbildung 6: Typisches MR-Spektrum mit Vergrößerung des Lipid-Peaks einer Ratte mit leichter Leberverfettung; Ordinatenachse mit Amplitude; Abszisse mit der Frequenz der entsprechenden Metaboliten.....	29
Abbildung 7: Gastrale Ethanolapplikation über eine Knopfkanüle	33
Abbildung 8: Versuchstier in <i>head-first-supine-position</i> im 3.0 T-MRT vor Messbeginn. Pfeil in A zeigt den schräg abgeschnittenen Perfusorspritzenkolben mit Schlauchsystem, Kreuz in B markiert die Clothespin-Spule.....	35
Abbildung 9: A: T1-gewichtetes MRT-Bild eines Versuchstiers in koronarer Ebene (TR = 745 ms, TE = 20 ms); B: T1-gewichtetes MRT-Bild der Leber in transversaler Ebene (TR = 648 ms, TE = 20 ms). C: T2-gewichtetes MRT-Bild der Leber in transversaler Ebene (TR = 4820 ms, TE = 79 ms).....	36
Abbildung 10: A: T1-gewichtetes MRT-Bild in koronarer, B: in transversaler Ebene mit Position des Voxels von 10 × 10 × 10 mm in der Leber eines Versuchstieres in-vivo	37
Abbildung 11: 1H-MRS-Lebermetaboliten-Spektrum einer Ratte der Versuchsgruppe vor Ethanolgabe in-vivo mit einem intrahepatisch gemessenen Lipidgehalt von 0.5 %. Das Spektrum zeigt den dominierenden Wasser-Peak bei 4.7 ppm mit einer sehr schwach ausgeprägten Lipidresonanz ([CH ₂] _n) bei 1.1–1.3 ppm; rechtsseitig werden die Schnittebene sowie die Positionierung des Voxels in der Lokalizier- Sequenz sowie in koronarer und transversaler Ebene gezeigt	38
Abbildung 12: 1H-MRS-Lebermetaboliten-Spektrum von Ratte Nr. 14 der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe in-vivo mit einem intrahepatisch gemessenen Lipidgehalt von 4.1 %. Das Spektrum zeigt den dominierenden Wasser-Peak sowie einen nun auffallenden Lipidpeak ([CH ₂] _n) bei 1.1–1.3 ppm.....	39

Abbildung 13: 1H-MRS-Lebermetaboliten-Spektrum von Ratte Nr. 13 der Versuchsgruppe nach Ethanolgabe in-vivo mit einem intrahepatisch gemessenen Lipidgehalt von 14.7 %.....	39
Abbildung 14: Mediane Laparotomie eines Versuchstiers mit Darstellung der Leber: Mit den beiden Wattestäbchen werden der mittlere und linke Leberlappen fixiert; nach unten reichend und durch den Pfeil markiert befindet sich der vordere rechte Leberlappen	40
Abbildung 15: Histologischer Schnitt der Leber und HE-Färbung, gemessen 24 Stunden nach zweiter Ethanolintoxikation.....	42
Abbildung 16: Boxplots zur Darstellung der histologisch gemessenen Verfettung vor Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 10; Mittelwert: 1.5 %; SD: 1.42 %) sowie nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20; Mittelwert: 12.75 %; SD: 11.64 %); p < 0.05	43
Abbildung 17: 1:1-Vergleich der Serum-ALT-Spiegel vor und 24 Stunden nach zweiter Ethanolgabe.....	45
Abbildung 18: 1:1-Vergleich der Serum-AST-Spiegel vor und 24 Stunden nach zweiter Ethanolgabe.....	45
Abbildung 19: Boxplots zur Darstellung der biochemisch gemessenen Verfettung bzw. des Triglyceridgehalts (mg/g Leber) vor Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 10; Mittelwert: 6.78 mg/g; SD: 2.19 mg/g) sowie nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20; Mittelwert: 18.75 mg/g; SD: 11.51 mg/d); p < 0.05	46
Abbildung 20: Boxplots zur Darstellung des spektroskopisch gemessenen intrahepatischen Fettgehalts (HFF) (%) vor Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20; Mittelwert: 0.69 %; SD: 0.33 %) sowie nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20; Mittelwert: 5.8 %; SD: 3.94 %); p < 0.05	47
Abbildung 21: Streudiagramm mit Trendlinie: Korrelation des spektroskopisch bestimmten intrahepatischen Fettgehalts (HFF in %) mit der Serumkonzentration von AST (U/l) (Anzahl der Tiere n = 20, r = 0.90; p < 0.05)	49
Abbildung 22: Streudiagramm mit Trendlinie: Korrelation des spektroskopisch bestimmten intrahepatischen Fettgehalts (HFF in %) mit der Serumkonzentration von ALT (U/l) (Anzahl der Tiere n = 20, r = 0.84, p < 0.05)	49
Abbildung 23: Korrelation des spektroskopisch bestimmten intrahepatischen Fettgehalts (HFF in %) mit dem gemessenen Triglyceridgehalt nach FOLCH (mg/g Leber) nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20, r = 0.97, p < 0.01)	50
Abbildung 24: Korrelation des spektroskopisch bestimmten Fettgehalts (HFF in %) mit der histologisch gemessenen Verfettung (in %) nach Ethanolgabe (Anzahl der Tiere n = 20, r = 0.90, p < 0.01).....	51
Abbildung 25: Kalibrierungsgraph zur Klassifizierung der Steatose nach dem Vier-Stufen-Grading zwischen histologisch (y) und spektroskopisch (x) gemessener Verfettung $y = 23.85 \ln(x) - 23.269$; $r = 0.9515$; nach Farben zugeordnete Klassifizierung in Anlehnung an oben beschriebenes Grading (S0 = x = y = 0 %): grün: S1, rot: S2, blau: S3...	57

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Referenzbereiche der Leberenzyme AST und ALT in IFCC-Einheiten pro Liter	15
Tabelle 2:	Histologische Merkmale zur Differenzialdiagnostik der alkoholischen (AFLD) und nicht alkoholischen Steatohepatitis (NAFLD).....	24
Tabelle 3:	Zuordnung der spektroskopischen Peaks zu ihren hepatischen Metaboliten mit den verwandten Abkürzungen.....	30
Tabelle 4:	Anzahl und Ausprägung der Versuchsgruppentiere mit jeweils durchschnittlicher histologisch gemessener Leberverfettung in Anlehnung an oben beschriebenes Grading. Grad S0 = keine Verfettung; Grad S1 = 1–5 % Fett; Grad S2 = > 5–25 % Fettinfiltration; Grad S3 = > 25–50 % Fett; Grad S4 = > 50 % Fett).....	44
Tabelle 5:	Verteilung des De-Ritis-Quotienten (Versuchsgruppe)	45
Tabelle 6:	Anzahl und Ausprägung der Versuchsgruppentiere mit jeweils durchschnittlicher MR-spektroskopisch gemessener Leberverfettung (HFF) in Anlehnung an oben beschriebenes Grading. Grad S0 = keine Verfettung; Grad S1 = 1–5 % Fett; Grad S2 = > 5–25 % Fettinfiltration; Grad S3 = > 25–50 % Fett; Grad S4 = > 50 % Fett.....	47
Tabelle 7:	Vergleich der Korrelation des MR-spektroskopisch gemessenen Fettgehalts mit histologischer, biochemischer und serologischer Diagnostik	51
Tabelle 8:	Zusammenfassung der Messwerte nach Ethanolgabe: Vergleich aus spektroskopischer, histologischer, biochemischer und serologischer Diagnostik	52

CURRICULUM VITAE

Angaben zur Person

Name: Daniel Keese
Geburtsdatum: 13.09.1982
Geburtsort: Hildesheim

Schulbildung

1989–1993 Grundschule Hildesheim/Achtum
1993–2002 Bischöfliches Gymnasium Josephinum Hildesheim

Zivildienst

07/2002–04/2003 Medizintechnik St. Bernward Krankenhaus Hildesheim

Studium

04/2003–10/2005 Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Hannover
10/2005–11/2011 Studium der Humanmedizin an der Universität Frankfurt a. M.
1. Ärztliche Prüfung 09/2007
Praktisches Jahr:
Innere Medizin: Klinikum Offenbach
Chirurgie: Spital Surselva/Ilanz (Schweiz)
Wahlfach Pädiatrie: Universitätsklinikum Frankfurt a. M.
2. Ärztliche Prüfung 11/2011

Studentische Tätigkeiten

2007–2010 Tutor an der Universität Frankfurt in den vorklinischen Fächern
Biologie, Physiologie und Biochemie
2009–2010 OP-Assistenz in der Orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim – Frankfurt am Main

2010–2012 Pflegekraft/Nachtwache in der Kopfklinik Sachsenhausen –
Frankfurt am Main

Beruflicher Werdegang

04/2012–11/2013 Assistenzarzt für Kinder-und Jugendmedizin am Klinikum Frank-
furt-Höchst

seit 11/2013 Assistenzarzt für Kinderchirurgie und Kinderurologie am Univer-
sitätsklinikum Frankfurt a. M.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas J. Vogl für die Möglichkeit danken an seinem Institut zu promovieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. habil. Hüdayi Korkusuz für die Überlassung und Betreuung der vorliegenden Arbeit und sein ständiges Interesse am Fortschritt und Motivierung zur Durchführung. Ich danke Dir für die zahlreiche Diskussionen und Anregungen, sowie für die Möglichkeit meine Ergebnisse zu publizieren.

Danken möchte ich Herrn Dr. Frank Hübner für die Unterstützung bei Berechnung und Auswertung der Spektroskopiedaten.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Reinhold Bug für die Anfertigung, sowie Auswertung der histologischen Präparate am Senckenbergischen Institut für Pathologie.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Dmitry Nahmgalaze für die Einarbeitung in die biochemischen Methoden, sowie für die Betreuung und Unterstützung im Anfertigen der photometrischen Messungen.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Eltern und meinem Bruder. Ohne Euch wäre mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen. Danke dass Ihr immer hinter mir steht, mich bestärkt, wenn ich zweifle, auf mich achtet, wenn ich meine Grenze überschreite und mir das Gefühl gebt alles schaffen zu können.

SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„3.0 Tesla Protonen-Magnetresonanztomographie (1H-MRS) der akuten alkohol-induzierten Fettleber – Korrelation mit Histologie, biochemischer Untersuchung und laborchemischen Parametern“

im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie unter Betreuung und Anleitung von Herrn Dr. med. habil. Hüdayi Korkusuz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in Teilen in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht und submittet:

1. **Daniel Keese**, Hüdayi Korkusuz, Frank Huebner, Dmitry Namgaladze, Bahram Raschidi, Gudrun Hintereder, Thomas J. Vogl –
In-vivo and ex-vivo measurements: non-invasive assessment of alcoholic fatty liver using 1H-MR spectroscopy.
Diagnostic and Interventional Radiology – Manuscript ID: DIR.0331-14.
2. Hüdayi Korkusuz, **Daniel Keese**, Bahram Raschidi, Frank Huebner, Dmitry Namgaladze, Gudrun Hintereder, Renate Hammerstingl, Thomas J. Vogl –
Detection of a fatty liver after binge drinking: correlation of MR-spectroscopy, DECT, biochemistry and histology in a rat model.
Academic Radiology. 2011 Nov;18(11):1349–57.

3. Huedayi Korkusuz, Bahram Raschidi, **Daniel Keese**, Frank Huebner, Dmitry Namgaladze, Ralf Bauer, Thomas J. Vogl –
Diagnosing and quantification of acute alcohol intoxication--comparison of dual-energy CT with biochemical analysis: initial experience.
Röfo. 2012 Dec;184(12):1126–30.

Frankfurt, 29.10.2015

(Ort, Datum)



(Unterschrift)