

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Adam

Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Quantifizierung des Leberfettgehalts: Vergleich zwischen ^1H -MR Spektroskopie, Chemical Shift Relaxometrie und Leberbiopsie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jochen Benjamin Veigel
aus Heidenheim a.d. Brenz

Hamburg 2013

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

27.01.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD. Dr. J. Yamamura

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

PD. Dr. D. Benten

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

PD. Dr. P. Nielsen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Definition	6
1.2 Epidemiologie.....	6
1.3 Pathogenese	8
1.4 Diagnostik	10
1.5 NAFLD Histologie.....	13
1.6 NASH Histologie	13
1.7 NAFLD Aktivitäts-Score (NAS).....	14
1.8 Alternativen zur Biopsie	15
1.9 Ziel der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Studiendesign	19
2.2 Patienten und Histopathologie der Leber (HIS-V)	19
2.3 Phantom.....	22
2.4 ¹ H-magnetic resonance spectroscopy (¹ H-MRS) am 3T MRT	24
2.4.1 ¹ H-MRS Auswertung	26
2.4.2 T2 Korrektur der MRS.....	27
2.5 Chemical shift Relaxometrie (CSR) am 1,5T MRT.....	29
2.5.1 T1 Korrektur und Modellauswertung der CSR	32

2.6 Statistische Auswertung	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Analyse der ¹ H-Leberspektren mit der IDL- und ACDlabs-Software	34
3.2 Mayonnaise-Phantom-Studie	35
3.3 Vergleich der ¹ H-MRS mit der Leber-Histopathologie	38
3.4 CSR und ¹ H-MRS	41
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	42
4. Diskussion	43
4.1 Histopathologische Leberfett-Bestimmung	43
4.2 Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie (¹ H-MRS)	45
4.2.1 T2-Korrektur	45
4.2.2 T1-Korrektur	48
4.2.3 Allgemeine Störfaktoren:	49
4.3 Chemical Shift Relaxometrie (CSR)	50
4.3.1 T2* Bestimmung	51
4.3.2 Fett-Wasser-Dominanz	51
4.4 Vergleich der ¹ H-MRS- mit der CSR-Methode	52
5. Zusammenfassung	54
6. Abkürzungsverzeichnis	56
7. Literaturverzeichnis	57
8. Danksagung	68

9. Lebenslauf.....	69
10. Eidesstattliche Versicherung	71

1.Einleitung

1.1 Definition

Die nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD) wurde erstmals 1980 von Ludwig et al beschrieben.

Definitionsgemäß handelt es sich um eine Verfettung des Lebergewebes von > 5 %, bei der kein erhöhter Alkoholkonsum (> 10 g/Tag bei Frauen und > 20 g/Tag bei Männern) oder andere Gründe, wie zum Beispiel eine chronische Hepatitis, dafür verantwortlich gemacht werden können (Younossi, 2008, Wanless and Lentz, 1990).

Die nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) sind unterteilt in nicht alkoholische Fettlebern (NAFL) und nicht alkoholische Fettleberhepatitiden (NASH). Bei der NAFL finden sich keinerlei entzündliche Komponenten in der Leber. Im Gegensatz dazu findet man bei einer NASH eine Entzündungsreaktion, die histologisch sehr schwierig von einer alkoholinduzierten Fettleberhepatitis (ASH) zu unterscheiden ist (Sheth et al., 1997, Ludwig et al., 1980).

Eine Progression von der NAFL zur NASH und schließlich zur Zirrhose ist möglich.

Es wird angenommen, dass etwa 4 - 5 % der NAFLD das Endstadium einer Leberzirrhose erreichen (Ekstedt et al., 2006, Gramlich et al., 2004, Angulo, 2002, Matteoni et al., 1999).

1.2 Epidemiologie

Die NAFLD ist in den westlichen Ländern die am häufigsten vorkommende Leberveränderung. Dies ist vor allem auf die dort gehäuft auftretenden Risikofaktoren wie Übergewicht, Diabetes mellitus Typ II, Veränderungen im Lipidstoffwechsel sowie dem metabolischen Syndrom zurückzuführen (Younossi et al., 2011).

Es wird vermutet, dass die Prävalenz der NAFLD in den USA zwischen 10 und 46 % sowie die der NASH bei 3 bis 5 % liegt (Younossi et al., 2011).

Weltweit wird eine Prävalenz der NAFLD von 6 bis 35 % angenommen (Vernon et al., 2011, Williams et al., 2011).

Die meisten Patienten bei denen eine NAFLD diagnostiziert wird sind zwischen 40 und 50 Jahre alt (Falck-Ytter et al., 2001). Über die geschlechtsspezifische Prävalenz kann keine Eindeutige Aussage getroffen werden (Williams et al., 2011, Browning et al., 2004, Angulo et al., 1999).

Bei der NAFLD werden auch populationsbezogene Unterschiede in der Prävalenz gefunden. So waren fast doppelt so viele Angehörige der hispanischen Bevölkerung (45 %) wie Schwarze (24 %) von einer NAFLD betroffen.

Die höhere Prävalenz unter der hispanischen Bevölkerung wurde mit der höheren Rate an Fettleibigkeit unter der untersuchten hispanischen Population erklärt (Browning et al., 2004).

Das Vorkommen der NAFLD ist mit anderen Erkrankungen vergesellschaftet. Die meisten Patienten die an einer NAFLD leiden erfüllen mindestens ein diagnostisches Kriterium des metabolischen Syndroms. Kriterien hierfür sind Übergewicht, Hypertonus, Dyslipidämie sowie Insulinresistenz oder Diabetes Mellitus Typ II. Gezeigt wurde dies in einer Studie mit 304 Patienten mit NAFLD. 74 % der Patienten wurden positiv auf NASH diagnostiziert. Gleichzeitig erfüllten 88 % der NASH Patienten die diagnostischen Kriterien für das metabolische Syndrom. Das Auftreten eines metabolischen Syndroms im Zusammenhang mit einer NAFLD war direkt assoziiert mit einem höheren Risiko eine Leberfibrose zu entwickeln (OR 3,5, 95 % Konfidenzintervall 1,1-11,2) (Marchesini et al., 2003).

Während das metabolische Syndrom ein Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt, konnte gezeigt werden, dass das alleinige Vorhandensein einer NAFLD/ NASH ein eigenständiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulären Erkrankungen darstellt (Sung et al., 2009). Eine durch NASH entwickelte Leberzirrhose stellt ebenfalls ein Risikofaktor für

die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) dar (Guzman et al., 2008, Rubinstein et al., 2008, Sanyal et al., 2006).

1.3 Pathogenese

Die genaue Pathogenese der NAFLD ist nach wie vor ungeklärt.

Zu einer Leberverfettung kommt es, wenn die Aufnahme der Fettsäuren die Abgabe übersteigt und es zu einer Anreicherung von Triglyceriden in der Leber kommt. Es ist jedoch ungeklärt warum bei einigen Betroffenen die NAFLD zu einer NASH mit Fibrose und sogar bis zur Zirrhose fortschreitet. Die primäre Ursache für das Ungleichgewicht im Fettstoffwechsel ist ebenfalls nicht ausreichend untersucht. Eine zentrale Rolle spielt wahrscheinlich die obligat vorhandene Insulinresistenz und die damit verbundenen Veränderungen in der Signaltransduktion im Lipidstoffwechsel (Marchesini et al., 1999).

Die Ursache der Insulinresistenz selbst gilt als multifaktoriell und ist bislang auch unzureichend untersucht. Bis jetzt konnten einige molekulare Strukturen, die an der Insulinresistenz beteiligt sind, wie zum Beispiel das RAD (RAS associated with diabetes), das PC-1 Membranglykoprotein, Leptin, TNF-Alpha identifiziert werden (Hotamisligil et al., 1996, Cohen et al., 1996, Maddux et al., 1995, Reynet and Kahn, 1993).

Wie das eigentliche Ungleichgewicht im Insulinstoffwechsel und der beteiligten Proteine entsteht, ist weiterhin Gegenstand der heutigen Forschung.

Eine Insulinresistenz führt jedoch über eine gesteigerte Lipolyse und eine Hyperinsulinämie zum Akkumulieren von Fettsäuren in der Leber.

Für das Voranschreiten der NAFL zu einer NASH ist hauptsächlich der oxidative Stress in den Zellen verantwortlich.

Die größte Quelle für oxidative Radikale sind die Mitochondrien. Die Entstehung einer Steatohepatitis wird hier durch die Lipidperoxidation, die Zytokininduktion und die Induktion des Fas-Liganden getriggert. Bei der Lipidperoxidation kommt es zum Zelltod und zur Freisetzung von MDA (Malondialdehyd) und HNE (4-Hydroxynonenal) (Esterbauer et al., 1991). MDA und HNE sind für die Bildung

von Mallory Bodies und für die Bildung von Kollagen durch die hepatischen Sternzellen verantwortlich (Leonarduzzi et al., 1997, Zatloukal et al., 1991). HNE wirkt außerdem chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, welche eine Entzündung induzieren (Curzio et al., 1985).

Sauerstoffradikale verursachen zusätzlich die Bildung von TNF- α , TGF- β und dem proinflammatorischen Interleukin 8. TNF- α und TGF- β induzieren in den Hepatozyten die Apoptose (Higuchi et al., 1997, Inayat-Hussain et al., 1997).

Durch die Induktion des Fas-Liganden durch die oxidativen Radikale in den Mitochondrien kommt es schließlich zu einer Apoptose in den Hepatozyten. (Hug et al., 1997).

Nach diesem Schema kann eine NAFLD von der einfachen Steatosis über die NASH bis hin zur Fibrose und Leberzirrhose führen (Abbildung. 1).

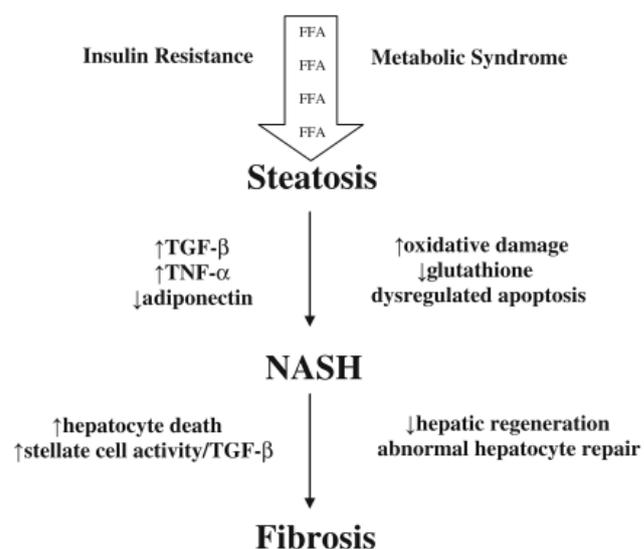


Abbildung 1: Entstehung und Verlauf der Fettlebererkrankung von der einfachen Verfettung (Steatosis) über die Entzündung (NASH) bis hin zur Fibrose (Fibrosis) (Lewis and Mohanty, 2010).

1.4 Diagnostik

Ein großes Problem ist, dass die meisten Patienten mit NAFLD keine klinischen Symptome zeigen. Einige NASH Patienten entwickeln unspezifische Lebersymptome wie Müdigkeit und rechtsseitige Oberbauchschmerzen (Bacon et al., 1994).

Diagnostisch spielen Laborwerte wie die Transaminasen eine eher untergeordnete Rolle. Es wurde gezeigt, dass in einigen Patienten mit NAFLD eine Erhöhung der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) gefunden wurde, jedoch konnten normale Transaminasen keinesfalls eine NAFLD ausschließen. Im Falle einer Transaminasenerhöhung können diese jedoch nicht zur Abschätzung des Schweregrades der hepatischen Entzündung hinzugezogen werden (Charatcharoenwitthaya et al., 2012, Fracanzani et al., 2008, Mofrad et al., 2003, Noguchi et al., 1995, Bacon et al., 1994).

Das Ferritin sowie die Transferrinsättigung kann in Patienten mit NAFLD ebenfalls erhöht sein (Angulo et al., 1999, Bacon et al., 1994). Es wird angenommen, dass eine Erhöhung des Ferritins über das 1,5-fache des Referenzbereichs in NAFLD Patienten häufiger zu einer NASH und einer Fibrose der Leber führt (Kowdley et al., 2012). In einer Untersuchung von 628 Patienten mit NAFLD konnte 2012 von Valenti et al. gezeigt werden, dass der erhöhte Eisengehalt ein unabhängiger Parameter zum Abschätzen des Schweregrads eines durch die NAFLD entstandenen Leberschadens ist. Eine Bestimmung des Ferritins wird als sinnvoll empfohlen um die Patienten, welche wahrscheinlich eine Fibrose entwickeln herauszufinden (Valenti et al., 2012).

Bis heute ist die Leberbiopsie (Abbildung 2a) der Goldstandard in der Diagnose der NAFLD und NASH und zum Abschätzen des Schweregrades der Entzündung unverzichtbar (Reeder and Sirlin, 2011).

Der limitierende Faktor der Leberbiopsie ist die Invasivität des Eingriffes, die damit verbundenen Schmerzen und die, wenn auch sehr geringe, Mortalitätsrate (Castéra et al., 1999, Gilmore et al., 1995). Eine Fehlerquelle der

1. Einleitung

Biopsie ist die Ungenauigkeit bei der Probengewinnung, welcher zur falschen Diagnose oder zum falschen Einschätzen des Schweregrads der Erkrankung führen kann (Ratziu et al., 2005).

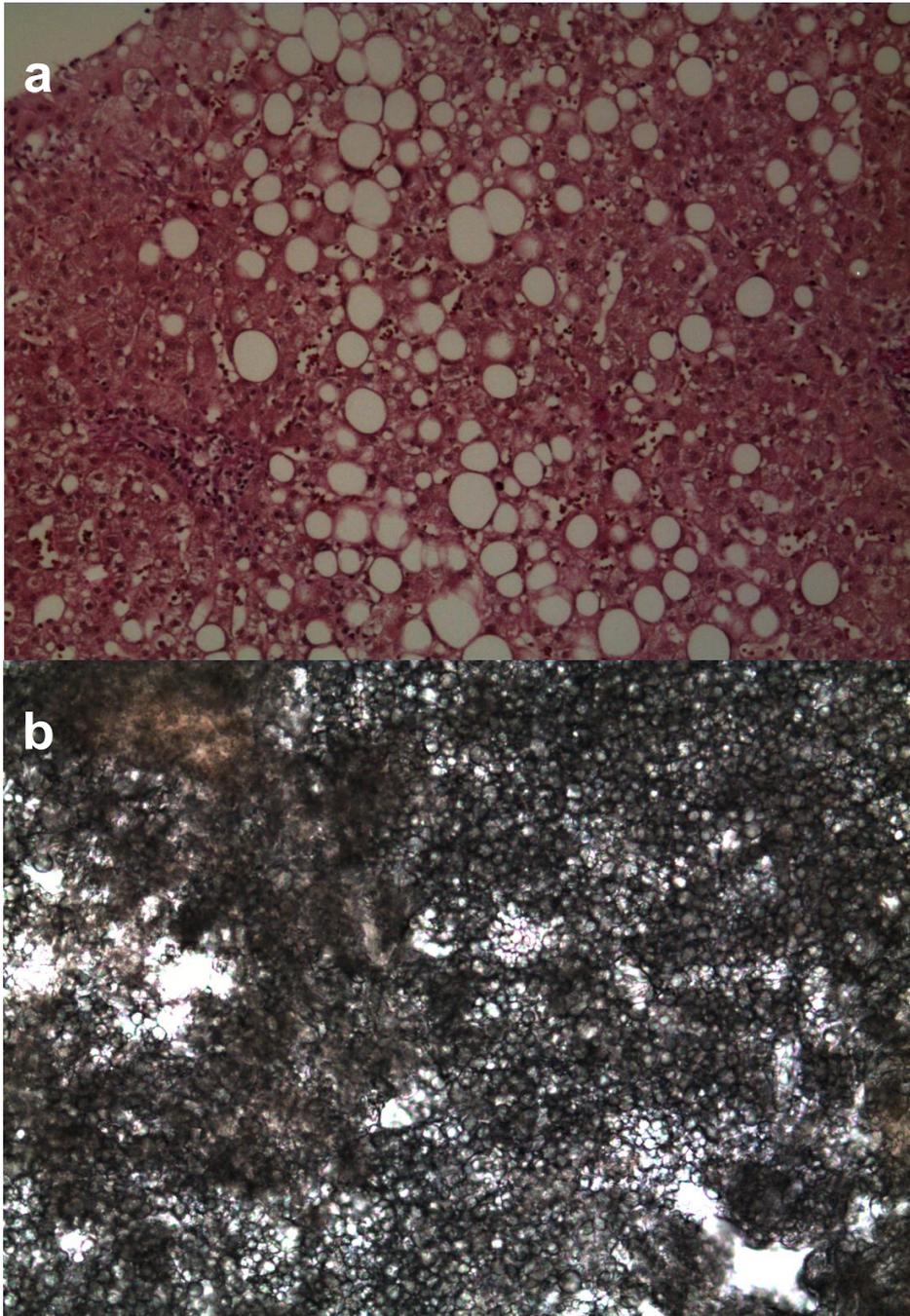


Abbildung 2:

(a) Leberbiopsie einer Probandin mit 60 % histopathologischem Fettgehalt (Hämatoxylin-Eosin Anfärbung, x100): Durchmesser der Fettvakuolen 5 - 50 μm .

(b) Mayonnaise mit 50 % Fettgehalt (nativ, x100): Durchmesser der Fetttropfen 2 - 20 μm .

1.5 NAFLD Histologie

Definitionsgemäß wird ein histologischer Lebefettgehalt von > 5 % als Fettleber bezeichnet (Brunt, 2009, Neuschwander-Tetri and Caldwell, 2003, Wanless and Lentz, 1990). Histopathologisch wird zwischen 5 – 33 % von milder Verfettung, von 34 – 66 % von moderater Verfettung und bei > 66 % von starker Verfettung gesprochen. Typischerweise findet sich bei NAFLD Patienten eine makrovesikuläre Verfettung beginnend in der Leberazinuszone 3 (Brunt and Tiniakos, 2010).

1.6 NASH Histologie

NASH Patienten haben in der Leberbiopsie von der alkoholischen Fettleber nicht zu unterscheidende Befunde (siehe Tabelle 1). Es zeigt sich ein hoher Anteil an perisinusoidaler Fibrose, entzündeten Leberläppchen, sowie ballonierten Leberzellen (Abbildung 2a).

Wichtig in der Diagnose der NASH ist der Ausschluss eines signifikantem Alkoholkonsum von > 10 g/Tag bei Frauen und > 20 g/Tag bei Männern.

Tabelle 1: Berichtete histologische Merkmale der Nichtalkoholischen Fettleberhepatitis (NASH) aus (Brunt, 2001).

Author, Year	No Bx	Steatosis (%)	Lobular Inflammation, PMNs (%)	Ballooning of Liver Cells (%)	Perisinusoidal Fibrosis (%)	Cirrhosis (%)	Mallory's Hyaline (%)	Glycogen Nuclei (%)	Portal CI (%)	Lipogranulomas (%)	Focal Necrosis (%)	Iron (%)
Adler, 1979	29	100	85	n/a	41	24	24	41	83	n/a	57	n/a
Ludwig, 1980	20	100	100	+	70	15	70	n/a	+	n/a	25	15
Itoh, 1987	17	100	+	+	100	0.9	59	76	n/a	n/a	+	n/a
Nagore, 1988	9	100	56	100	100	0	56	100	n/a	78	n/a	n/a
Diehl, 1988	39	100	97	+	+	26	90	n/a	90	n/a	n/a	n/a
Lee, 1989	49	100	100	+	+	16	49	35	n/a	n/a	+	n/a
Wanless, 1989	22	100	86	100	n/a	+	78	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Powell, 1990	42	100	100	n/a	n/a	7	10	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Bacon, 1994	33	100	100	+	n/a	15	70	97	64	6	n/a	55
Baldrige,* 1995	15	100	+	n/a	+	0	7	100	100	3	+	n/a
Pinto, 1996	32	100	91	100	81	9	63	75	n/a	n/a	n/a	n/a
Brunt, 1999	51	100	100	100	80	6	41	86	+	82	+	18
Rashid,* 2000	24	100	n/a	n/a	+	4	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

*Pediatric patients; Pmn's: polymorphonuclear leukocytes (neutrophils) specifically noted by authors; CI: chronic inflammation

+: commented upon but not quantitated; n/a: not addressed.

1.7 NAFLD Aktivitäts-Score (NAS)

Der NAFLD Aktivitäts-Score (siehe Tabelle 2) gibt den Schweregrad der Krankheitsaktivität einer NAFLD gemessen an histologischen Veränderungen an. Einfluss auf den Score haben der Grad der Leberverfettung, das Ausmaß der Entzündung, das Leberzell-ballooning sowie der Fibrosegrad der Leber.

Ein Score von 1-2 entspricht einer NAFLD während ein Score von 3-4 einer borderline NASH und ein Score von > 4 einer NASH entspricht (Tabelle 2).

Der Fibrosegrad wird in der Regel gesondert angegeben.

Tabelle 2: Nicht alkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD) Aktivitäts-Score mit Berücksichtigung des Fettgehalts (Steatosis), der Entzündung (Lobular inflammation, dem Leberzellballooning (Hepatocellular ballooning) und dem Fibrosegrad (Fibrosis)(Kleiner et al., 2005).

Steatosis (%)	≤5	0
	5-33	1
	33-66	2
	≥66	3
Lobular inflammation (per 200x field)	none	0
	≤2 foci	1
	2-4 foci	2
	≥4 foci	3
Hepatocellular ballooning	none	0
	few, mild ballooning	1
	prominent ballooning	2
Fibrosis	no fibrosis	0
	zone 3 perisinusoidal fibrosis (special fibrosis staining required to identify)	1a
	zone 3 perisinusoidal fibrosis (easily seen on H&E)	1b
	periportal/portal fibrosis only	1c
	zone 3 with periportal/portal fibrosis	2
	as previous with bridging fibrosis	3
	cirrhosis	4

1.8 Alternativen zur Biopsie

Als nichtinvasive Alternative kann die Sonographie gesehen werden. Das Leberecho einer verfetteten Leber zeigt im Vergleich zum Kortex der Niere ein helleres Echo als das einer normalen Leber (Joseph et al., 1979). Jedoch hat auch die Sonographie ihre Nachteile. Bei einem Fettgehalt von unter 30 % ist die Sonographie zu ungenau (Saadeh et al., 2002). Erst ab einem Fettgehalt von über 30 % kommt die Sonographie auf eine diagnostische Spezifität von 93-100 % und eine Sensitivität von 91-100 % (Palmentieri et al., 2006, Mottin et al., 2004). Eine Metaanalyse von 2011, welche 49 Studien mit 4720 Patienten beinhaltete beziffert die Spezifität und Sensitivität der Sonographie in Bezug auf Leberbiopsien mit 84 und 94 % (Hernaiz et al., 2011).

Die Computertomographie (CT) kann ebenfalls zur Diagnostik der NAFLD verwendet werden. Bei einer Leberverfettung sind die gemessenen Dichtewerte der Leber im Vergleich deutlich niedriger als die der Milz oder der normalen Leber. Die normalen Dichtewerte der Leber sind 50 bis 70 Hounsfield Einheiten (HU). In leichten Fettlebern ist die mittlere Dichte 52 HU, in mittelschweren Verfettungen 27 HU und in schweren Fettlebern sogar nur 10 HU. Insgesamt zeigen die Dichtewerte eine hohe Korrelation zum Leberfettgehalt (Longo et al., 1993, Pamilo et al., 1983, Bydder et al., 1980, Piekarski et al., 1980). Das größte Problem an der CT-Diagnostik ist die Röntgenstrahlung aufgrund derer eine Verwendung z.B. für ein Screening oder zur Routinediagnostik der NAFLD ausgeschlossen ist.

Ein weiteres Problem der CT- und auch der Sonographiediagnostik ist, dass keine der beiden Methoden zwischen einer Verfettung mit und ohne Fibrose unterscheiden kann. Beide Methoden können den Grad der Leberverfettung nicht sehr genau abschätzen (Ricci et al., 1997, Needleman et al., 1986).

Mit Einführung der Magnetresonanztomographie (MRT) in den 80er Jahren wurde eine Technik verfügbar, die neben der Fettdetektion in der Leber auch eine nichtinvasive Quantifizierung des Fettgehalts erlaubt.

Bereits 1984 wurde die sogenannte Dixon Methode zur Leberfettquantifizierung entwickelt (Levenson et al., 1991, Dixon, 1984).

Diese basiert auf der Tatsache, dass das Fett- und Wassersignal sich in der sogenannten "in phase" addiert und in der "opposed-phase" subtrahiert (Chang et al., 2006). Mit dieser Technik ist es also möglich den Fettgehalt zu bestimmen indem man die Bilder des „in-phase“ Signals mit denen des „opposed-phase“ Signals vergleicht (Cassidy et al., 2009).

Basierend auf dieser Entwicklung wurde die sogenannte chemical shift Relaxometrie (CSR) zur besseren Quantifizierung des Fettgehalts in menschlichen Organen entwickelt (O'Regan et al., 2008). Die sogenannte „magnitude-based“ Technik nutzt für die Bestimmung des Fettgehaltes mindestens 2 oder mehr Echozeiten (TE) und die dazugehörigen Signalintensitäten (SI). Mit dieser Methode kann anschließend relativ genau in einem Bereich von 0-50 % der Fettgehalt bestimmt werden. Ein Problem dieser Methode ist jedoch, dass Werte über 50 % als identisch mit den korrelierenden Werten unterhalb von 50 % angesehen werden. Konkret bedeutet dies, man kann nicht zwischen 40 und 60 % Fettgehalt unterscheiden (Reeder and Sirlin, 2011, Guiu et al., 2009). Ein weiterer Vorteil ist, dass diese Methode es erlaubt über die Bestimmung von $R2^*$ und entsprechenden Literaturwerten den Lebereisengehalt zu berechnen (Wood et al., 2005).

Ebenfalls eine Technik der MRT ist die ^1H -Magnetresonanzspektroskopie (^1H MRS), welche die Resonanzfrequenzverschiebung einzelner Moleküle in Abhängigkeit von ihrem chemischen Aufbau misst und so eine genaue Bestimmung einzelner chemischer Verbindungen erlaubt. Ursprünglich wurde die ^1H -MRS hauptsächlich von Chemikern und Physikern verwendet. Erst 1993 verwendeten Longo et al die ^1H -MRS zum ersten Mal im klinischen Rahmen, um den Fettgehalt der menschlichen Leber in vivo zu bestimmen (Longo et al., 1995, Longo et al., 1993). Ein großer Vorteil der ^1H -MRS ist es, neben dem Gesamtfettgehalt der Leber, auch die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren quantifizieren zu können (siehe Tabelle 4) (Bacon et al., 1994).

Jede der unterschiedlichen funktionellen Gruppen in Fettsäuren hat hier eine eigene spezifische Resonanzfrequenz (siehe Tabelle 4), welche mittels der Spektroskopiemessung gemessen, grafisch dargestellt und Anhand der Fläche quantifiziert werden kann.

2005 wurde die ^1H -MRS von Szczepaniak et al. benutzt um am 1,5 Tesla MRT den Leberfettgehalt für eine Prävalenzstudie in 2349 Probanden zu bestimmen. In dieser Studie wurde die Prävalenz mit 33,6 % bei einem selbstbestimmten Cut-off-Wert von 5,56 % ermittelt. In mehreren anderen Studien wurde anschließend die ^1H -MRS benutzt um den Leberfettgehalt mit anderen klinischen und metabolischen Parametern zu vergleichen (van Werven et al., 2010, Szczepaniak et al., 2005, Thomas et al., 2005, Longo et al., 1995, Thomsen et al., 1994, Longo et al., 1993).

Aufgrund von Spin-Spin Interaktionen kommt es bei der ^1H -MRS zu einem schnelleren Signalabfall so dass eine T2 Korrektur notwendig wird. Diese kann aufgrund von Literaturangaben (Szczepaniak et al., 2005) oder durch die Bestimmung mehrerer Echozeiten erfolgen (Guiu et al., 2009, Thomsen et al., 1994).

Neuere Studien zeigen, dass der Eisengehalt des Organs nicht unerheblichen Einfluss auf die ^1H -MRS Methode hat (Guiu et al., 2009).

Der Einfluss von einem erhöhten Lebereisen ist, wie die Arbeit von Guiu et al. (2009) zeigt, nicht unerheblich und führt zu deutlich höheren T2-Abfällen als bisher berücksichtigt.

Bei der sogenannten Dixon-Methode mit 2 oder 3 Echozeiten ist außerdem eine T2* Korrektur durchzuführen, um vor allem den durch Eisen verursachten schnelleren Signalabfall zu berücksichtigen (Westphalen et al., 2007). Bei der CSR mit mehreren Echozeiten entfällt eine T2* Korrektur, da sie die Grundlage der Modell-Funktion darstellt und die Lebereisenkonzentration bestimmt. Die momentane Entwicklung zeigt, dass vermutlich die Rolle des Eisens bei der Entstehung und im Verlauf der NAFLD unterschätzt wurde. Valenti et al. berichteten 2012 von einer starken positiven Assoziation zwischen dem Schweregrad einer Leberschädigung bei der NAFLD und dem Eisengehalt der Leber (Valenti et al., 2012). Umso wichtiger erscheint es auch bei der Quantifizierung diese Tatsache zu berücksichtigen.

1.9 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es

1. die wichtigsten nichtinvasiven Methoden (^1H MR-Spektroskopie, chemical shift Relaxometrie) zur quantitativen Fettbestimmung in der Leber von NAFLD Patienten und an einem auf die Leber übertragbares Phantom mit dem semi-quantitativen histopathologischen Scoring in Leberbiopsie-Proben zu vergleichen, sowie
2. den Einfluss von Lebereisen auf die nicht-invasiven Methoden zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die Studie ist eine retrospektive Pilotstudie, in der Patienten, die an einer histopathologisch gesicherten nicht alkoholischen Fettleber (NAFLD) leiden, mittels ¹H-Magnetresonanzspektroskopie (¹H-MRS) am 3 Tesla (3T) MRT untersucht wurden. Unter Berücksichtigung des teilweise hohen Lebereisengehaltes in NAFLD Patienten wurde die chemical shift Relaxometrie (CSR) am 1,5 T MRT als Vergleichsmethode gewählt. Um beide Methoden miteinander zu vergleichen wurde vorab schon eine Phantomstudie mit einem Mayonnaisephantom durchgeführt.

Für die Durchführung der Studie wurden ein Votum der zuständigen Ethikkommission, sowie das schriftliche Einverständnis aller teilnehmenden Probanden eingeholt.

2.2 Patienten und Histopathologie der Leber (HIS-V)

Insgesamt nahmen 15 Patienten im Alter von 26 bis 67 Jahren (Median 49 Jahre), die sich vorher einer diagnostischen Leberbiopsie des rechten Leberlappens unterzogen hatten, an der Studie teil (Tabelle 3 Gruppe A). Für jede Biopsie gab es unabhängig von dieser Studie medizinische Gründe diese durchzuführen. Als Beispiel kann hier die diagnostische Abklärung chronisch erhöhter Transaminasen (ALT, AST) mit einer sonographisch diagnostizierten Leberverfettung dienen.

Der Leberfettgehalt wurde in 10 % Abstufungen visuell durch einen erfahrenen Pathologen bestimmt. Bei Patienten mit NASH wurde zusätzlich noch der NASH-Score bestimmt (Tabelle 2 u. 3).

Voraussetzungen zur Teilnahme an der Studie waren eine mittels Biopsie diagnostizierte NASH oder NAFLD mit mindestens 10 oder mehr Prozent Leberfettgehalt. Patienten mit viralen Infektionen der Leber wie z.B. Hepatitis B oder C oder einer anderen infektiösen Lebererkrankung wurden

2. Material und Methoden

ausgeschlossen. Ebenfalls ein Ausschlusskriterium war das Vorhandensein einer alkoholinduzierten Lebererkrankung. Von insgesamt 2 Patienten waren keine Biopsiedaten vorhanden (Tabelle 3 Gruppe A).

Um die ¹H-MRS mit der CSR vergleichen zu können wurden 4 Patienten aus Gruppe A, 4 Probanden bei denen eine Fettleber wahrscheinlich war und 5 gesunde Kontrollen mit der CSR untersucht (Gruppe B). In Gruppe B betrug die Altersspanne 23 - 68 Jahre.

Zusätzlich wurden alle Teilnehmer noch mittels eines standardisierten Fragebogens bezüglich ihrer Lebensgewohnheiten, Ernährung und dem Gebrauch von Medikamenten befragt. Zusätzlich wurden, falls vorhanden die aktuellen Laborwerte erfragt (Tabelle 3).

2. Material und Methoden

Tabelle 3: Patientengruppen und charakteristische Daten: Body mass index (BMI), Lebereisenkonzentration (LIC, in mg/g Trockengewicht (TG)), Triglyceride (TAG), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT).

Nr.	Gruppe	Diagnose	Alter	BMI	Biopsie	LIC	Glukose	Cholesterin	TAG	AST	ALT
			(J)	kg/m ²	(0-100%)	(mg/gTG)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(U/L)	(U/L)
8	A	NAFLD	50	27,1	30	ND	94			25	49
9	A	NAFLD	67	22,9	10	ND	86	277	179	38	46
10	A	NASH 6/8	41	30,5	50	ND	72	212	193	178	341
11	A	NAFLD	41	29,1	ND	ND	102	665	596	218	97
12	A	NASH 8/8	32	29,0	70	ND	136	208	592	61	138
13	A	NASH 3/8	55	23,8	10	ND		253	239	25	30
16	A	NAFLD	54	28,4	10	ND	98	185	148	110	85
17	A	NAFLD	42	25,6	ND	ND		237	227	49	51
18	A	NASH 8/8	30	15,8	80	ND				27	17
19	A	NAFLD	66	30,8	60	ND	121	330	206	41	63
20	A	NASH 5/8	26	23,2	20	ND	87	233	298	35	88
23	A, B	NAFLD	61	37,1	60	2,42	164	224	261	20	34
24	A, B	NAFLD	63	33,2	80 ^{a)}	1,83	135	182	240	39	71
25	A, B	NASH 6/8	37	25,7	60	2,28	108	162	214	112	92
26	A, B	NASH 6/8	54	27,1	70	2,65	96	239	185	36	70
30	B	NAFLD	36	27,1	ND	1,79	87	143	83	57	191
22	B	NAFLD	68	24,1	ND	1,41	77	158	192	16	27
27	B	NAFLD	57	27,8	ND	1,67	108	230		38	84
29	B	Hämochromatose.	63	28,7	ND	3,91	89	220	148	30	31
21	B	control	30	27,2	ND	1,35					
28	B	control	48	25,3	ND	1,27					
31	B	control	31	23,8	ND	1,30					
32	B	control	45	23,9	ND	1,33					
33	B	control	52	21,5	ND	1,16					
		normal (m)		18,5-25	< 5%	0,7-1,73 ^{b)}	60-110	< 200	< 200	10-50	10-50
		normal (f)		18,5-25	< 5%	0,7-1,73 ^{b)}	60-110	< 200	< 200	10-35	10-35
					^{a)} Biopsie vor 6 Jahren			^{b)} Quelle Wood et al., 2005			

2.3 Phantom

Das Phantom bestand aus insgesamt 10 Probengefäßen mit jeweils 50 ml Volumen. Diese wurden in eine mit Wasser gefüllte Polypropylenbox mit 2,4 Liter Inhalt gegeben. Jedes der Probengefäße enthielt einen definierten Fettgehalt von 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 und 80 %. Zusätzlich wurde noch eine Probe mit 20 % Fett und einem erhöhten Eisengehalt (4,9 mg/ml) gemessen. Ausgewählt wurde diese Abstufung um einen möglichst breiten Bereich der histopathologisch möglichen Bestimmung abzudecken.

Die einzelnen Proben wurden auf der Grundlage von handelsüblicher Mayonnaise (Knorr Salat Mayonnaise, Unilever, Germany) mit 10, 50 und 80 % Fettgehalt zusammengemischt.

Um eine möglichst große Homogenität zu erreichen wurden alle Proben nach dem Zusammenmischen manuell zentrifugiert.

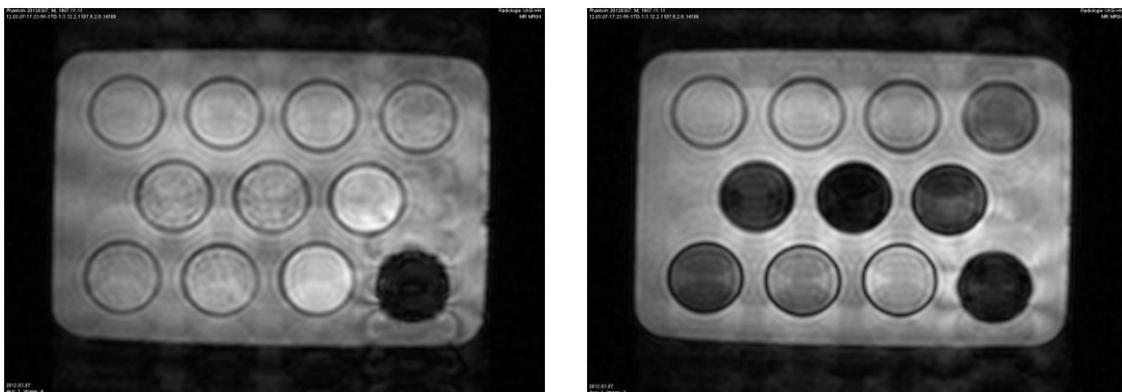


Abbildung 3: MR-Signalintensitäten von ansteigenden Mayonnaise Konzentrationen (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 % und 20 % + Fe^{3+}) im wassergefüllten 2,4 L Becken – Phantom mittels koronarer Gradienten-Echo Sequenz bei $\text{TE} = 2,46 \text{ ms}$ (links: hohes Signal - in phase) und bei $\text{TE} = 4,78 \text{ ms}$ (rechts: niedriges Signal - out of phase) bei 1,5 T.

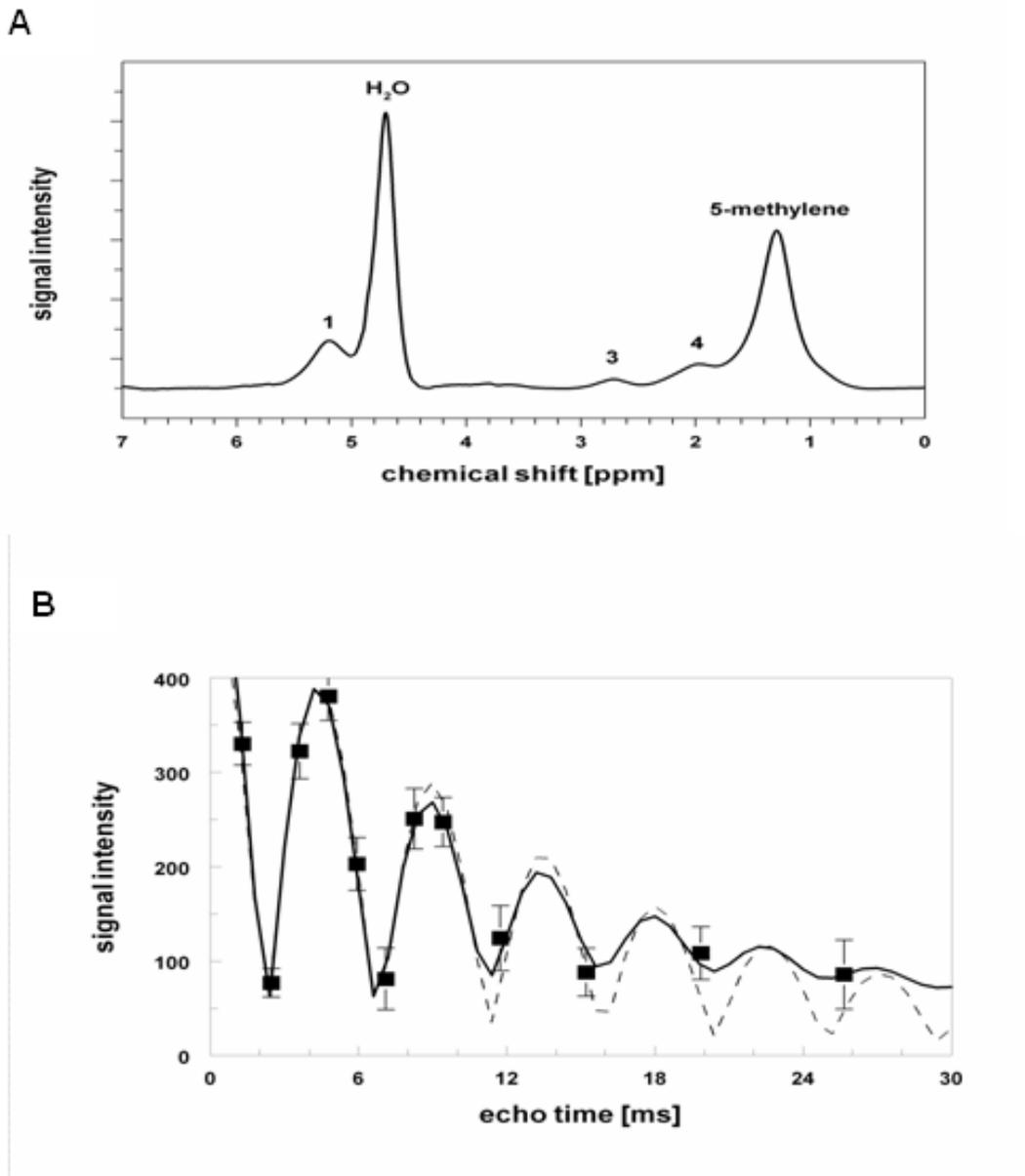


Abbildung 4:

A: ¹H-MRS Mayonnaise-Spektrum mit 50 % Fettanteil: analysiert mittels ACDlabs mit den Peakpositionen wie in Tabelle 4.

B: GRE-Signalintensitäten der 50 % Mayonnaise: analysiert mittels effektivem chemical shift Relaxometrie-Modell ergibt mit $\nu = 220 \pm 2$ Hz und $R_{2w}^* = R_{2f}^*$ einen Fettgehalt von 56 ± 3 % (unterbrochene Linie: $r^2 = 0,95$) und mit $\nu = 221 \pm 1$ Hz und $R_{2w}^* \neq R_{2f}^*$ ergibt einen Fettgehalt von 60 ± 2 % (durchgezogene Linie: $r^2 = 0,99$).

2.4 ¹H-Magnet-Resonanz Spektroskopie (¹H-MRS) am 3T MRT

Die Messungen der Patienten erfolgten am 3 Tesla MRT Scanner (Philips Intera© Netherlands) in Rückenlage. Als Spule wurde eine sechs Kanal „cardiac“ Spule verwendet. Nach der „localizer“ Sequenz (TR/TE: 8/2,3 ms, FOV: 450x450 mm², Schichtdicke 15mm) und einem „reference scan“ (TR/TE: 4/80 ms) wurde die eigentliche Bildgebung mittels einer coronal und einer sagittal angefertigten T2 „half fourier-acquired single shot turbo spin echo“ (HASTE) Sequenz (TR/TE: 1348/80 ms, Flipwinkel 90°) angefertigt. Die Bildgebung dient hierbei dem Zweck, ein genaues Bild der Leber zu erhalten, um eine möglichst exakte Voxelpositionierung vornehmen zu können (siehe Abb. 5a).

Anschließend wurde ein 20x20x20 mm³ großer Voxel in der Leber platziert. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass dieser sich weder zu nahe am Diaphragma noch in einem großen Lebergefäß befinden darf (siehe Abbildung 5a).

Die ¹H-MRS wurde standardisiert ohne Atemanhalten sowie ohne Wasserunterdrückung mit einer „point resolved spectroscopy“ (PRESS) Sequenz (TR/TE: 2000/39 ms, Flipwinkel 90°, samples 1024) durchgeführt. Die theoretische Gesamtdauer betrug 3,3 Minuten.

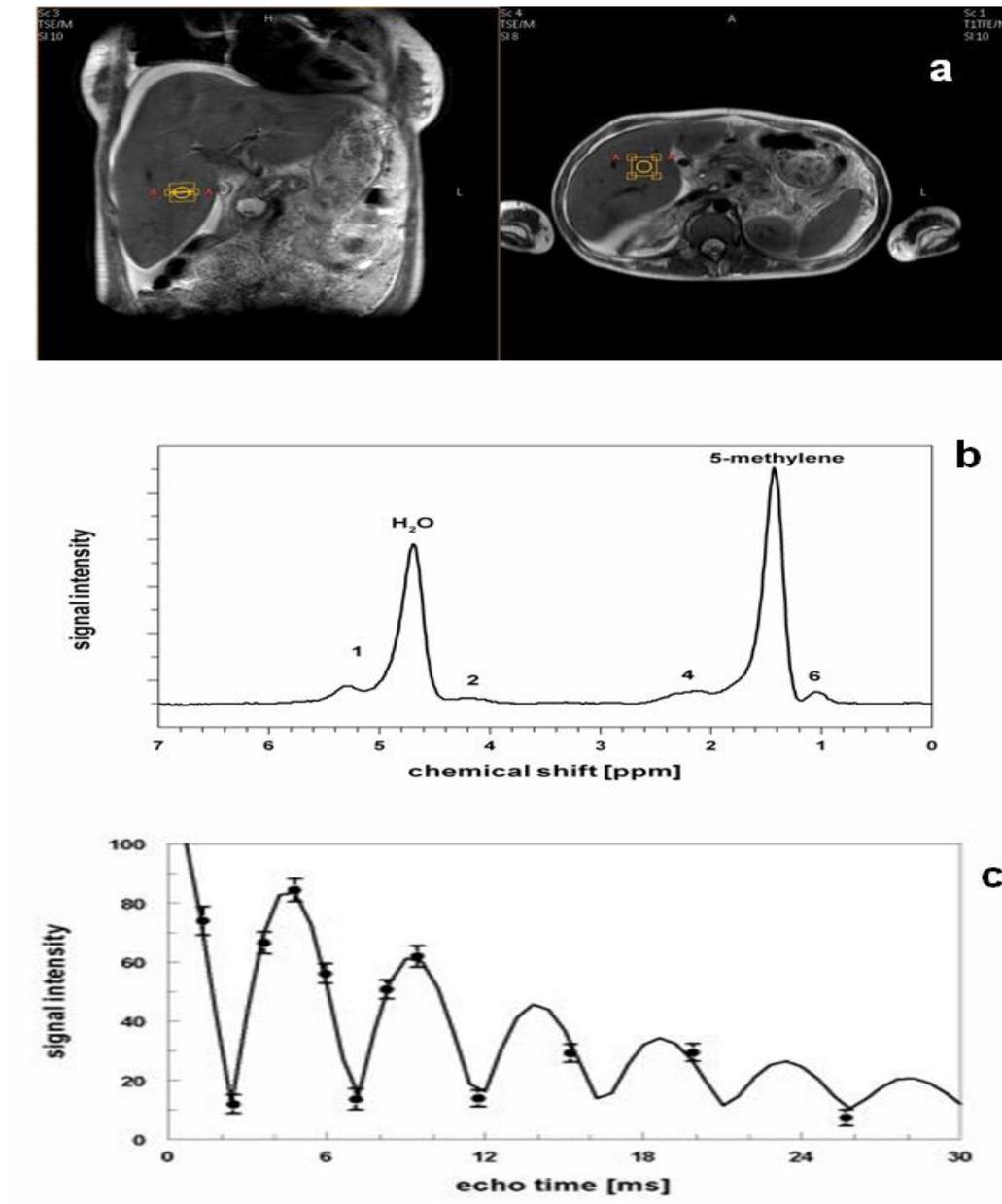


Abbildung 5: ^1H -MR coronar und transversal localizer Bild (a) mit dazugehörigem Spektrum (b) gemessen am 3T MRT mit einem Voxel ($2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$) im rechten Leberlappen eines Patienten mit histopathologisch bestimmten Fettgehalt von 60 %. Spektroskopisch wurde ein Fettgehalt von 62,9 % bestimmt (b). Die chemical shift Relaxometrie ergab einen Fettgehalt von 55,9 % (c).

2.4.1 ¹H-MRS Auswertung

Für die Auswertung der Spektren wurde ein von Z.J. Wang (2011) programmiertes IDL 7.0 Programm verwendet (IDL virtual machine tool, personal communication).

Zusätzlich wurde für die Auswertung das ACDLabs 12.0 (Advanced Chemical Development Inc., Toronto, Canada: www.acdlabs.com) Programm, welches eine komplexere Analyse aller Fettpeaks erlaubt, verwendet (siehe Tabelle 4). Die Spektren wurden phasenkorrigiert und an die X-Achse angepasst (Abbildung 5b, Abbildung 6).

Nach diesen Korrekturen, wurde die Fläche des Hauptfettpeaks bei 1,3 ppm, welcher den Methylenprotonen der Fettsäuren entspricht und die des Wasserpeaks bei 4,7 ppm, welcher den Wasserprotonen entspricht, zur Quantifizierung mit Hilfe des IDL Programms benutzt (Abbildung 5b u. 6). Da der Fettpeak bei 1,3 ppm nur etwa 70 % des gesamten Fettspektrums ausmacht, (Tabelle 4) wurde anschließend der ermittelte Fettgehalt auf 100 % hochgerechnet. Die so errechneten Fettgehalte wurden anschließend mit denen des ACD/Labs berechneten verglichen (Abbildung 6).

Der Leberfettgehalt und dessen Standardfehler (ΔFC) wurde mit Hilfe der Gesamtfläche der Fettpeaks (A_f) und der Fläche des Wasserpeaks (A_w) nach folgender Gleichung bestimmt:

$FC = A_f / (A_f + A_w)$, mit einem Standardfehler $\Delta FC = \sqrt{((A_w \cdot \Delta A_f)^2 + (A_f \cdot \Delta A_w)^2) / (A_w + A_f)^2}$ aus 3 Wiederholungsbestimmungen der Flächen und deren Standardabweichungen ΔA_w and ΔA_f .

2.4.2 T2 Korrektur der MRS

Da das Messsignal erst nach einer relativ langen Echozeit detektiert wird, haben sich die Messsignale von Fett und Wasser aufgrund ihrer unterschiedlichen Relaxationszeiten schon stark verändert (Standardwerte für Wasser $T_{2w} = 25,8$ ms und für Fett $T_{2f} = 55,4$ ms (Gambarota et al., 2011)). Da der Unterschied in den Zeiten zu einer relativen Überschätzung des Fettgehaltes führen würde, ist eine T2-Korrektur nach folgender Formel nötig:

$$A_{f,w}(0) = A_{f,w} \exp(TE/T_{2f,w}); TE = 39 \text{ ms.}$$

Auf eine T1-Korrektur konnte wegen der relativ langen TR-Zeit verzichtet werden (siehe die Diskussion hierzu).

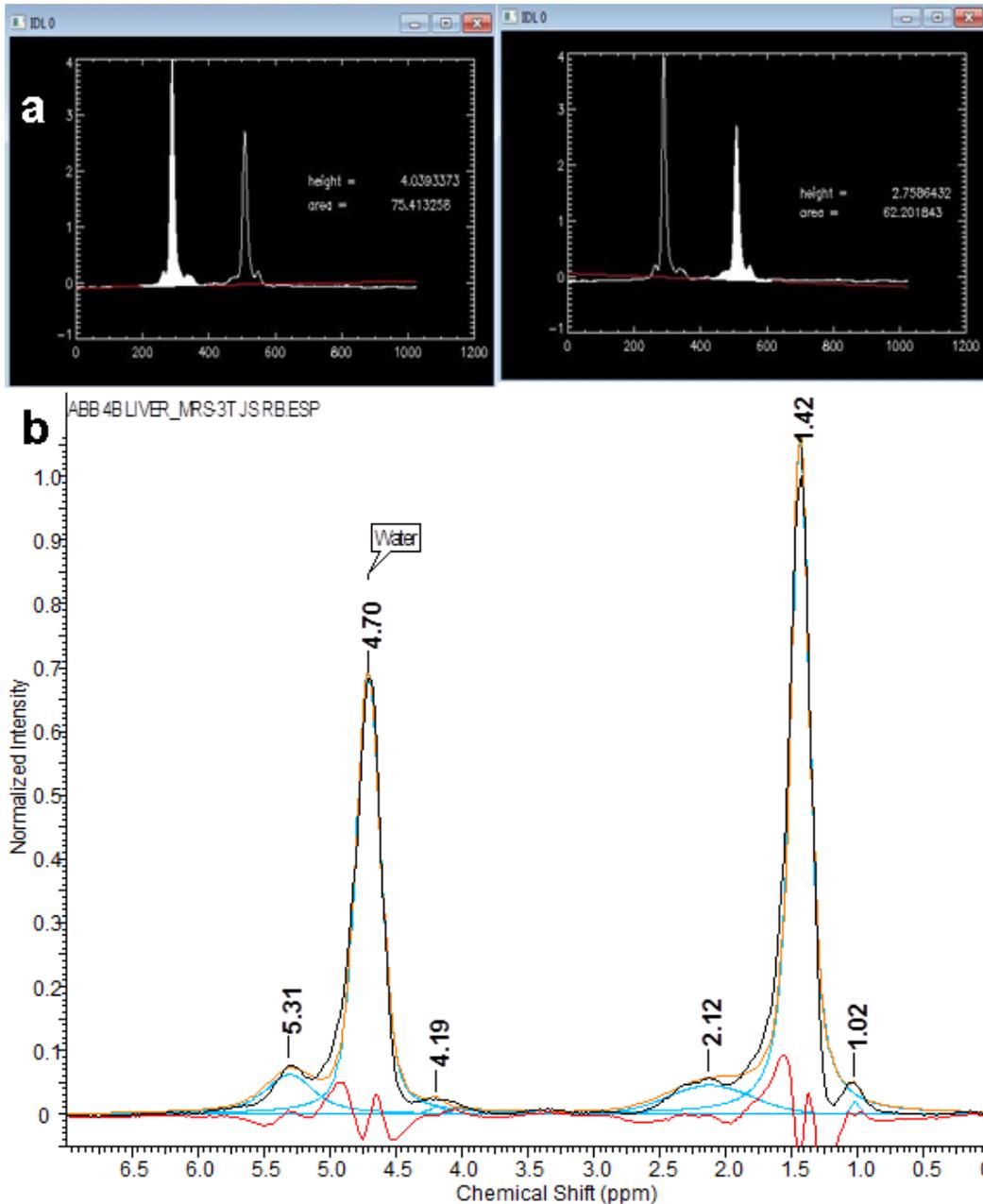


Abbildung 6: a Auswertung des ^1H -Spektrums mit dem IDL-Programm als Flächenberechnung unter dem Wasserpeak (rechts) und Fettpeak (links) nach Abzug des Untergrundes (rote Linie) mit einem Leber-Fettgehalt von 54,8 % für den Patienten aus Abbildung 5.

b Auswertung des ^1H -Spektrums (schwarze Kurve) mit ACD/Lab mit Peakfit als Summe von Gauss- und Lorentz-Funktionen (blaue Kurven, Residuen = rote Kurven) für den Patienten aus Abbildung 5.

2.5 Chemical shift Relaxometrie (CSR) am 1,5T MRT

Für die Fettquantifizierung mittels CSR wurden die transversalen Relaxationsraten am 1,5 T MRT (Symphony®, Siemens AG, Erlangen) bestimmt. Hierfür wurde eine Schicht (Dicke = 10 mm, Pixel Auflösung 1,25 x 1,25 mm²), die einen Großteil der Leber abdeckt ausgewählt.

Für die Messung wurden 12 bipolare Echozeiten (TE = 1,3 bis 25,7 ms) verwendet ($\Delta t = n \cdot 1,16$ ms, TR = 244 ms oder RR-Intervall bei EKG-Triggerung, Flipwinkel = 20°, Bandbreite 1955 Hz/Pixel).

Um den Einfluss von Phaseneffekten entgegengesetzter Gradienten zu berücksichtigen wurde in einigen Patienten die Relaxometrie mittels monopolarer und bipolarer Echos verglichen (TE = 1,3 bis 25,7 ms, $\Delta t = n \cdot 2,1$ ms). Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Die Signalintensitäten wurden auf der Grundlage einer von Wehrli et al 1991 entwickelten Methode als Funktion der GRE (Gradient Recalled Echo) Zeiten analysiert.

In einem 2-Kompartiment Modell können die Signalintensitäten $S(t)$ der Wasserprotonen (ω), welche keine Veränderung der Resonanzfrequenz von 63,9 MHz bei 1,5 T ($\omega = 0!$) erfahren und die der Fettprotonen (f) mit einer Resonanzveränderung ($\omega = 2\pi\nu$, $\nu = 217$ Hz oder 3,4 ppm) mit der Gleichung 1 beschrieben werden.

$$(1) S_w(t) = S_w(0) \cdot \exp(-R_{2w}^*t) \quad \text{und} \quad S_f(t) = S_f(0) \cdot \exp(-R_{2f}^*t) \cdot [\cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)]$$

Hierbei ist $S(0)$ die Signalamplitude und R_2^* die transversal Relaxationsrate.

Die absolute Signalintensität $|S(t)| = |S_w(t) + S_f(t)| = \sqrt{\{\text{Re}(t)^2 + \text{Im}(t)^2\}}$ der MR Bilder berechnet sich mit dem oben genannten Term aus der „Fourier transformierten“ realen ($\text{Re}(t)$) und imaginären ($\text{Im}(t)$).

2. Material und Methoden

Die Berücksichtigung nur einer effektiven chemischen Verschiebung von ungefähr 217 Hz repräsentiert ca. 91 % des gesamten Fettspektrums (siehe Tabelle 4).

Unter der Annahme eines konstanten Signaluntergrundes (S_{LO} , noise) führt dieser Ansatz zu verschiedenen Relaxationsraten R_{2w}^* und R_{2f}^* für Wasser und Fett, wie in Gleichung 2 dargestellt.

$$(2) |S(t)| = \exp(-R_{2w}^*t) \cdot \sqrt{\{ S_w(0)^2 + S_f(0)^2 \cdot \exp[2(R_{2w}^* - R_{2f}^*)t] + 2(S_f(0) \cdot S_w(0)) \cdot \exp[(R_{2w}^* - R_{2f}^*)t] \cdot \cos(\omega t)\}} + S_{LO}$$

Unter der Annahme, $R_{2w}^* \approx R_{2f}^*$, ergibt sich eine weitere Vereinfachung der Gleichung 2 mit nur einem Relaxationsterm vor der quadratischen Wurzel.

Weiterhin gibt es ein von Hamilton et al beschriebenes spektrales Lipid-Modell, das die Fettfraktionen f_n [%] = 4,7; 3,9; 12; 70; 8,8 mit ω [2π Hz] = -241, 201, 1043, 1364, 1525 berücksichtigt (Tabelle 4). Einzig der mit 0,6 % anteilige Peak Nummer 3 bei 2,75 ppm (Tabelle 4) wird in diesem Modell nicht berücksichtigt (Hamilton et al., 2011).

2. Material und Methoden

Tabelle 4: Lipid-Spektrum mit den von Hamilton et al (2011) ermittelten Leberfett-Metaboliten und -Fraktionen sowie deren "chemical shifts" relativ zu Wasser bei 1,5 und 3,0 Tesla sowie die in dieser Arbeit mittels ACDlabs bestimmten Fettfraktionen für Mayonnaise.

Nr.	peak	beobachtet (ppm) (ppm)		Bo (MHz) 1,5 T 63,9		Bo (MHz) 3,0 T 127,7		T2 (ms)	Leber Fett-	Mayonnaise Fett-
				v (Hz)	ω (2πHz)	v (Hz)	ω (2πHz)		Anteil f _n (%)	Anteil f _n (%)
1	Olefine	5,3	-0,6	-38	-241	-77	-482	-	4,7	22,5
0	Wasser	4,7	0	0	0	0	0	23		
2	Glycerin	4,2	0,5	32	201	64	401	-	3,9	
3	Diacylgruppen	2,75	1,95	125	783	249	1565	51	0,6	1,3
4	α-Olefine	2,1	2,6	166	1043	332	2087	52	12	9,6
5	Methylengruppen	1,3	3,4	217	1364	434	2729	62	70	66,7
6	Methylgruppen	0,9	3,8	243	1525	485	3050	83	8,8	
Summe (Fett peak 1-6):									100,0	100,0
Summe (Fett peak 4-6):									90,8	76,25

Dieses spektrale Lipid-Modell führt unter Berücksichtigung der f_n (siehe Tabelle 4) und deren „chemical shifts“ ω_n zu folgender Gleichung ($\sqrt{\{\text{Re}(t)^2 + \text{Im}(t)^2\}}$):

$$(3) S(t) = \sqrt{\{[S_w(0) \cdot \exp(-R_{2w}^*t) + S_f(0) \cdot \exp(-R_{2f}^*t) \cdot \sum f_n \cos(\omega_n t)]^2 + [S_f(0) \cdot \exp(-R_{2f}^*t) \cdot \sum f_n \sin(\omega_n t)]^2\}}$$

Die unbekannt Parameter aus dieser Gleichung (S_w(0), S_f(0), R_{2w}^{*}, R_{2f}^{*}) entsprechen denen aus Gleichung 2.

2.5.1 T1 Korrektur und Modellauswertung der CSR

Der scheinbare Fettgehalt (aFC) kann anschließend aus den Signalamplituden $S_w(0)$ und $S_f(0)$ ähnlich wie in der ^1H -MRS berechnet werden:

$$\text{aFC} = S_f(0) / [S_f(0) + S_w(0)].$$

Der wahre Fettgehalt (FC), basierend auf den Protonenspindichten $C_w(0)$ und $C_f(0)$, kann aus den Signalamplituden $S_{f,w}(0)$ durch eine T1-Korrektur mit den folgenden Gleichungen 4 und 5 bestimmt werden (Wismer et al., 1988):

$$(4) C_{f,w}(0) = S_{f,w}(0) \cdot [1 - \cos\alpha \cdot \exp(-TR/T_{1f,w})] / \{\sin\alpha [1 - \exp(-TR/T_{1f,w})]\} \text{ und}$$

$$(5) \text{FC} = C_f(0) / [C_f(0) + C_w(0)]$$

Abhängig von der Repetitionszeit ($TR \geq 244$ ms) in Bezug auf die T1-Relaxationszeit (663 und 236 ms für Wasser und Fett) (Thomsen et al., 1994) unterscheidet sich der wahre FC vom aFC um weniger als 10 %. Dies gilt insbesondere für lange TR-Zeiten und/oder wenn Eisen die T1-Zeit verkürzt.

Um die Gleichung 2 als eine Funktion mit 5 unbekanntem Parametern an die Signalintensitäten bei 12 Echozeiten anzupassen, wurde ein Levenberg-Marquardt Algorithmus benutzt (Slide Write V7, Advanced Graphics Software Inc., Encinitas CA, USA; siehe Abbildungen 4b, 5c). Dabei wurden die Signalintensitäten innerhalb eines Voxels (ROI) mit ihren Standardabweichungen gewichtet. Für $R_2^* < 100 \text{ s}^{-1}$ muss typischerweise der Signaluntergrund S_{LO} aus dem atmungs-artefaktfreien Luftraum bestimmt werden. Ferner ist bei geringem Fettgehalt ($\text{aFC} < 10 \%$) und in Gegenwart von Lebereisen anzunehmen, dass die Relaxationsraten für Wasser und Fett ähnlich beeinflusst werden ($R_{2w}^* = R_{2f}^*$). Die Wasser/Fett Verschiebung ω muss dann ebenfalls als konstant ($2\pi \cdot 217$ Hz) angenommen werden. Ferner ist die in dieser Arbeit benutzte chemical shift Relaxometrie zur Wasser-Fett-Trennung wegen der fehlenden Unterscheidbarkeit der Wasser- oder Fettdominanz auf einen Fettgehalt $< 50 \%$ begrenzt (Reeder and Sirlin, 2011).

2.6 Statistische Auswertung

Die verschiedenen spektralen Auswertemethoden (IDL- vs. ACDIabs-Software), Relaxometrie-Fitmethoden (effektives vs. spektrales Lipid-Modell) und MR-Fettbestimmungsmethoden (CSR vs. MRS) wurden mit Hilfe linearer Regressionen am Mayonnaise-Phantom verglichen, wobei das Bestimmtheitsmass (r^2) die Güte der linearen Anpassung und der Regressionskoeffizient (Steigung \pm Standardfehler) eventuelle Abweichungen wiedergeben. Die Signifikanz der Korrelation von Spektroskopie ($^1\text{H-MRS}$) und histopathologischer Fettbestimmung in der Leberbiopsie (HIS-V) wurde mit der Spearman-Rank-Korrelation getestet. Der Grad der Übereinstimmung bzw. ein systematischer Unterschied zwischen $^1\text{H-MRS}$ und CSR wurde in einer Altman-Bland-Darstellung geprüft. Die nichtparametrischen statistischen Tests (Spearman-Rank-Korrelation, Altman-Bland-Darstellung) wurden mit der EXCEL-Zusatz-Software „Analyze-it“ durchgeführt (Analyze-it Software Inc., Leeds, UK).

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der ¹H-Leberspektren mit der IDL- und ACDlabs-Software

Die Auswertung mit dem Flächenberechnungs-Programm (IDL) erfordert den geringsten Zeitaufwand, während die Auswertung mit der ACDlabs-Software durch das Fitten der Multipieaks eine vollständige Bestimmung der Lipid-Metaboliten erlaubt, aber einen höheren Aufwand erfordert. Ein Vergleich der beiden Methoden ist in Abbildung 7 als lineare Regression mit einem Regressionskoeffizienten von $1,01 \pm 0,02$ bei einem zu vernachlässigenden Achsenschnittpunkt von $1,1 \pm 0,8$.

Basierend auf dieser Übereinstimmung der beiden spektralen Analysemethoden wurde im weiteren Verlauf im Wesentlichen die IDL Software zur Auswertung der ¹H-MRS Daten verwendet.

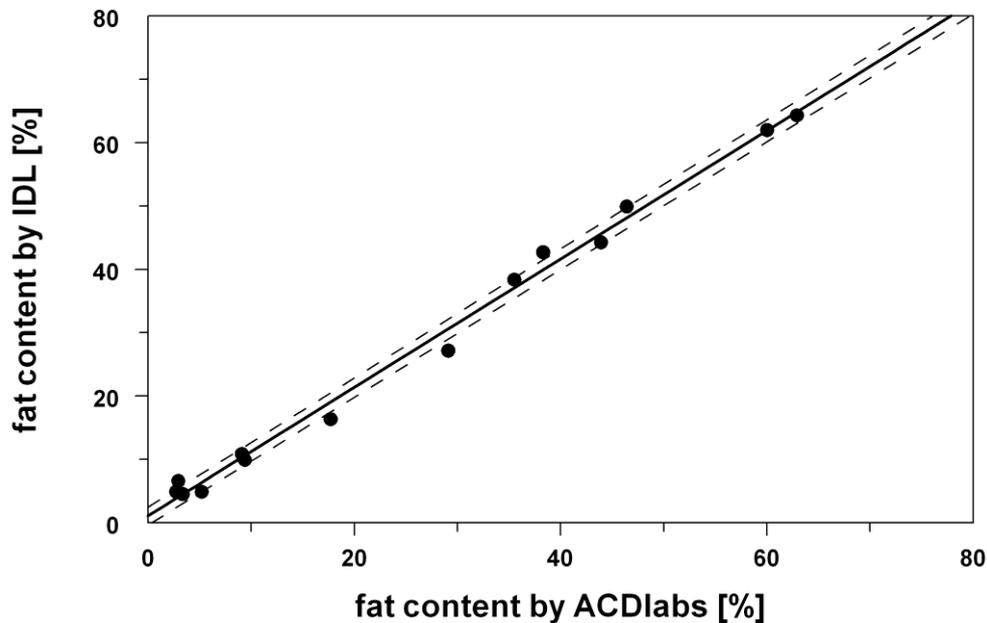


Abbildung 7: Lineare Regression ($r^2 = 0,99$ durchgezogene Linie) mit 95 % Konfidenzintervall (gestrichelte Linie) der mittels IDL und ACDlabs berechneten Fettgehalte.

3.2 Mayonnaise-Phantom-Studie

Unter Berücksichtigung von Tabelle 4 sowie Abbildung 4 und 5 zeigt das Mayonnaise-Phantom (Abbildungen 2, 3) sowohl in der ^1H -MRS als auch in der CSR ein sehr ähnliches Verhalten wie das Lebergewebe.

Das Mayonnaisephantom scheint daher für die folgenden methodischen Vergleiche ein geeignetes Modell.

3. Ergebnisse

Für den Methodenvergleich von ^1H -Magnetresonanz-Spektroskopie (^1H -MRS) mit der chemical shift Relaxometrie (CSR) wurde das Mayonnaise-Phantom benutzt. Hierzu wurden Proben mit einem Fettgehalt von 5 bis 80 % angemischt. Jede Probe wurde am 1,5 T MRT mittels chemical shift Relaxometrie (CSR) und am 3,0 T MRT mittels ^1H -MRS gemessen. Anschließend erfolgte die relaxometrische bzw. spektrale Auswertung der Daten zur Bestimmung des gemessenen Fettgehaltes FC (siehe Abbildung 6).

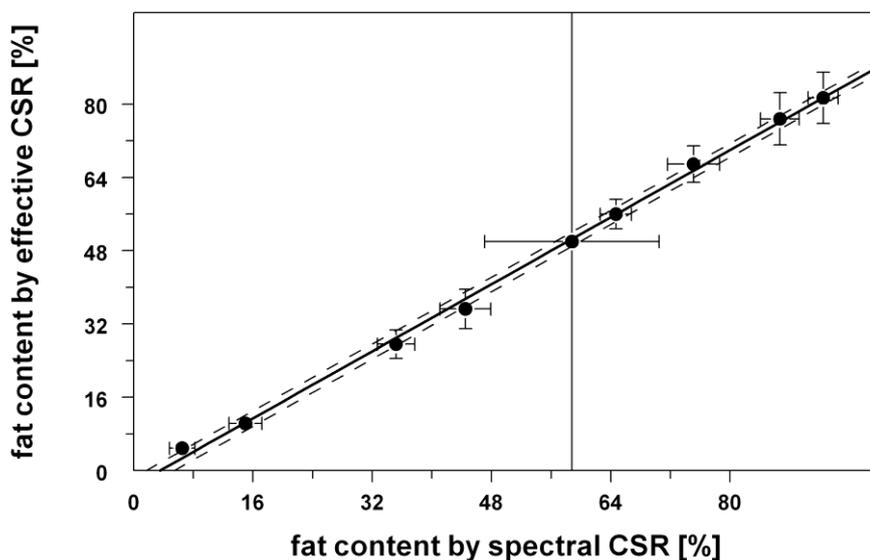


Abbildung 8: Lineare Regression ($r^2 = 0,997$, durchgezogene Linie) mit 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelte Linie) der Relaxometrie-Methoden zur Bestimmung der scheinbaren Fettkonzentration im Mayonnaise-Phantom mittels effektiver (effective CSR: Gleichung 2) und spektraler (spectral CSR: Gleichung 3, Tabelle 4) chemischer Verschiebung.

3. Ergebnisse

Zunächst wurden die beiden Relaxometrie-Methoden zur Bestimmung des scheinbaren Fettgehalts (aFC) miteinander verglichen (Abbildung 8). Hierbei wurden die Relaxationsraten $R2^*$ von Wasser und Fett gleichgesetzt, um einen robusten Fit zu gewährleisten. Es wurde eine lineare Beziehung mittels Regression zwischen der CSR mit einer effektiven chemischen Verschiebung, die hauptsächlich durch den Methylen-Peak bestimmt wird ($aFC_{\text{effective}}$: 223 ± 10 Hz), und der CSR, die auf dem Mayonnaise-Spektrum basiert (aFC_{spectral} : Tabelle 4), erhalten: $aFC_{\text{effective}} = (0,92 \pm 0,02) \cdot aFC_{\text{spectral}} - (3,2 \pm 1,0)$.

Aufgrund der guten Übereinstimmung der beiden chemical shift Relaxometrie-Methoden wurde im Folgenden nur noch die CSR-Methode mit einer effektiven chemischen Verschiebung benutzt. Die effektiven CSR- und $^1\text{H-MRS}$ - Messergebnisse des Mayonnaise-Phantoms wurden in Abbildung 9 mit dem nominalen Fettgehalt der Proben verglichen. Auf eine T2-Korrektur der MRS-Daten für Mayonnaise wurde verzichtet. Die Auswertung der Daten mittels linearer Regression zeigt, dass beide Methoden mit dem nominalen Fettgehalt übereinstimmende Ergebnisse liefern, wobei es keinen signifikanten offset (Schnittpunkt mit der y-Achse) a_0 gab ($a_{0\text{CSR}} = (3,1 \pm 2,2)\%$, $a_{0\text{MRS}} = (-0,9 \pm 1,4)\%$) (Abbildung 9).

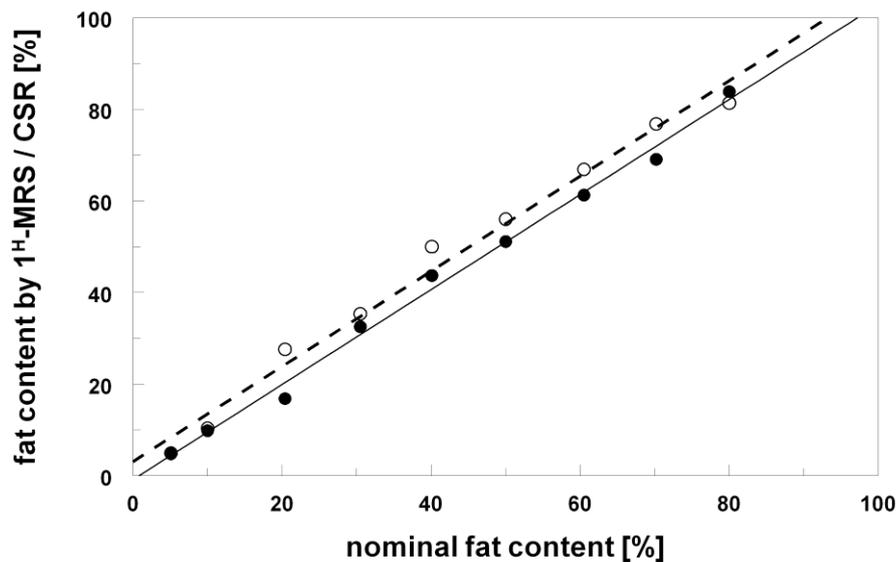


Abbildung 9: Übereinstimmung zwischen dem nominalen Fettgehalt im Mayonnaise-Phantom und den mit $^1\text{H-MRS}$ (geschlossene Kreise) bzw. mit CSR (offene Kreise) bestimmten Fettgehalten: linearer Regressionsfit an die MRS-Daten (durchgezogene Linie: $r^2 = 0,993$, Regressionskoeffizient = $1,04 \pm 0,03$) und GRE (gestrichelte Linie: $r^2 = 0,984$, Regressionskoeffizient = $1,04 \pm 0,05$).

3.3 Vergleich der $^1\text{H-MRS}$ mit der Leber-Histopathologie

Um zu testen, wie sich die $^1\text{H-MRS}$ Methode im Vergleich zu den Leberbiopsieergebnissen verhält, wurde in einer weiteren Messung der Leberfettgehalt mit der $^1\text{H-MRS}$ bei 3,0 Tesla in 22 Patienten gemessen. Von diesen Patienten hatten 13/22 Patienten sich vorher einer Leberbiopsie unterzogen. Der histopathologisch bestimmte Fettgehalt reichte von 10 bis 80 %. Sieben der Patienten hatten eine diagnostizierte NASH mit einem Score von 3/8 bis 8/8 reichend. Zusätzlich wurden noch 4 Personen bei denen eine

3. Ergebnisse

Fettleber wahrscheinlich erscheinen, die jedoch keine Biopsieergebnisse hatten, sowie 5 gesunde Kontrollprobanden gemessen. Die teilnehmenden Personen entsprechen Gruppe A in Tabelle 3. Das Alter der untersuchten Personen reichte von 26 – 67 Jahre. Der Body Mass Index (BMI) reichte von 22,9 – 30,5 kg/m².

Der Standardfehler der Einzelmessungen ¹H-MRS wurde mittels einer dreifachen Auswertung geschätzt und betrug zwischen 0,4 und 4,2 %. Der mittlere Variationskoeffizient (COV) der bestimmten Fettflächen betrug 5,7 % mit einer Variationsbreite von 0,1 bis 25,4 %. Es wurden größere COV bei kleineren Fettflächen und damit niedrigerem Fettgehalt bestimmt. Der mittlere Variationskoeffizient (COV) bei der Bestimmung der Wasserflächen betrug 2 % mit einem Minimum von 0,2 und einem Maximum von 6,3 %. Dies resultiert wahrscheinlich daraus, dass die Fläche unter dem Wasserpeak im Durchschnitt größer war als die unter dem Fettpeak.

Zusätzlich wurde in 10 Patienten mit Leberbiopsien der Fettgehalt der rechten Leberhälfte mit dem der linken Leberhälfte verglichen. Im Vergleich der beiden Leberlappen wurde kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Fettgehalt gefunden (Regressionskoeffizient $0,97 \pm 0,06$, $r^2 = 0,97$).

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der 13 gemessenen Patienten, welche sich vorher einer Leberbiopsie unterzogen hatten und die der 5 gesunden Kontrollprobanden. Als Referenzmethode wurde hier die Leberfettbestimmung mit Hilfe der Biopsie gewertet. Ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Fettgehalt der Leberbiopsie und dem mittels ¹H-MRS bestimmten Fettgehalts wurde gefunden (Spearman rank correlation coefficient $r_s = 0,76$, $p < 0,0025$). Vor der T2-Korrektur besitzt die Trendlinie eine Steigung von $0,8 \pm 0,1$, während die T2-korrigierte Trendlinie eine Steigung von $0,5 \pm 0,1$ besitzt. Das bedeutet, dass die Fettgehalte, die mittels ¹H-MRS ermittelt wurden, ca. die Hälfte des Fettgehaltes der Biopsie wiedergeben.

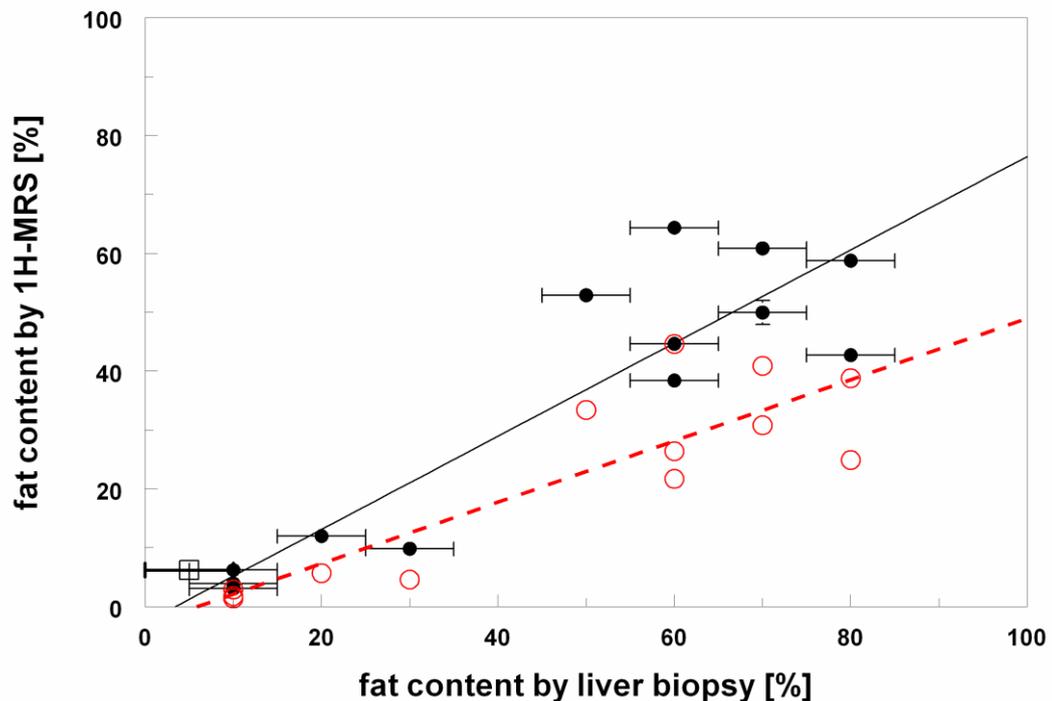


Abbildung 10: Die Spearman'sche Rangkorrelation zwischen den histologischen (biopsy) und spektroskopischen ($^1\text{H-MRS}$) Bestimmungen des Leberfettgehalts (FC) zeigt eine signifikante Korrelation für den unkorrigierten FC (schwarze Kreise und Trendlinie: $r_s = 0,76$; $p = 0,0025$), ebenso für den um die T2-Relaxationszeit (Gambarotta et al, 2011) korrigierten FC (rote Kreise und Trendlinie: $r_s = 0,76$; $p = 0,0025$), der im Mittel um 50 % kleinere Fettgehalte anzeigt.

Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe (schwarzes Quadrat) mit einem bioptischen FC von 5 % (Referenz) symbolisch dargestellt.

3.4 CSR und ¹H-MRS

In der Probandengruppe B der Tabelle 3 wurde die CSR mit der besser evaluierten ¹H-MRS als Referenzmethode verglichen. Hierfür wurden 4 Patienten mit Biopsie, 4 Personen mit vermuteter Leberverfettung ohne Biopsie sowie 5 Kontrollpersonen mittels ¹H-MRS bei 3,0 T und CSR bei 1,5 T gemessen. In einem weiteren Schritt wurden die Ergebnisse der ¹H-MRS einer T2 Korrektur unterzogen, um die unterschiedlichen Relaxationsraten für Fett und Wasser zu berücksichtigen.

Die Altman-Bland Darstellung in Abbildung 11 zeigt eine hohe Übereinstimmung ($p = 0,008$) zwischen den beiden Methoden mit einer relativen Differenz zwischen -21 % und 55 %. Die CSR ergibt einen um 17 % systematisch höheren Fettgehalt in einem 95 %-Konfidenzintervall von 5 % bis 29 %.

Das Ergebnis des Vergleichs beider Methoden zeigt, dass bei der in vivo Leberfettquantifizierung beide Methoden mit einer ähnlich guten Genauigkeit zu verwenden sind.

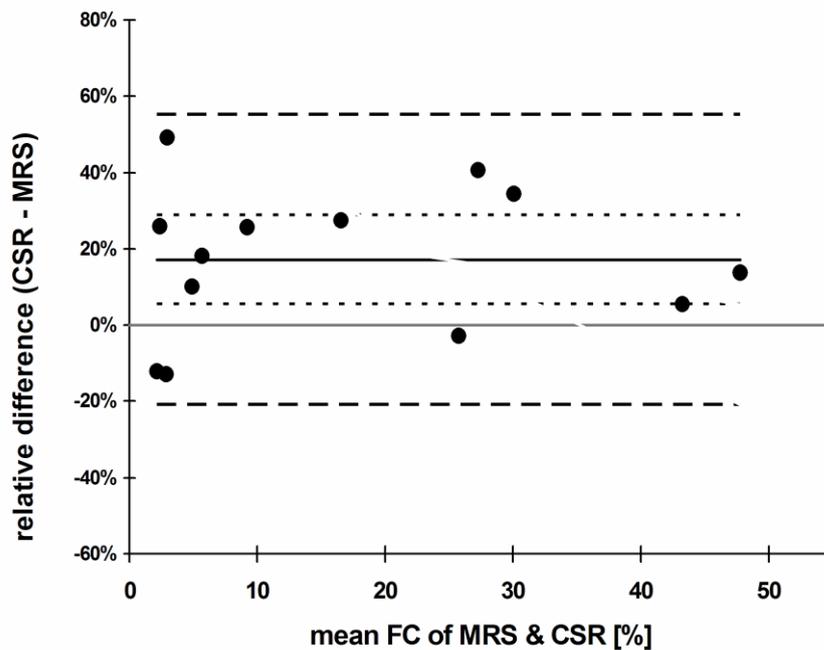


Abbildung 11: *Altman-Bland Darstellung der relativen Differenzen des Fettgehalts (FC) mittels CSR und ^1H -MRS zeigt einen um 17 % systematisch höheren Fettgehalt (bias: durchgezogene Linie, 95 % Vertrauensbereich: gepunktete Linie) für die CSR-Methode (95 % Übereinstimmungs-Grenzen: gestrichelte Linie).*

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die ^1H -MRS wie auch die CSR sind beides Methoden, die in vitro sowie in vivo geeignet sind, den Leberfettgehalt zu bestimmen. Generell fällt der mit ^1H -MRS bestimmte Fettgehalt um 50 % geringer aus als die Biopsieergebnisse, während die CSR einen um 17 % höheren Fettgehalt bestimmt als die ^1H -MRS.

4. Diskussion

Die Bestimmung des Leberfettgehalts erfolgte mittels drei verschiedener Methoden, die im Folgenden einzeln und vergleichend diskutiert werden. Insbesondere wird der Einfluss von Eisen auf die Methoden untersucht werden.

1. Visuelle histopathologische Einteilung der Leberbiopsien (HIS-V)
2. Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie (^1H -MRS)
3. chemical shift Relaxometrie (CSR)

4.1 Histopathologische Leberfett-Bestimmung

Bis dato ist die Leberbiopsie noch immer der Goldstandard in der Diagnose der NAFLD und für die Quantifizierung des Leberfettgehalts (Joy et al., 2003).

Die Biopsie hat jedoch einige entscheidende Nachteile. Sie ist eine invasive, schmerzhaft und mit einer kleinen aber nicht vernachlässigbaren Mortalität verbundene Methode (Castéra et al., 1999, Gilmore et al., 1995). Ein Problem der Biopsie ist die geringe Menge Lebergewebe (ca. 10 mg), die mittels Biopsienadel gewonnen werden kann. Dies bedeutet, dass eine eventuell vorhandene ungleiche Verteilung des Leberfettes nicht erfasst werden kann. In der Folge kann dies zu einer falschen Diagnose oder zu einer falschen Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung führen. So zeigte Ratziu et al. (2005), dass in 24 % der Patienten mit Leberbiopsie das hepatozelluläre „ballooning“, welches das Anschwellen und Absterben von Leberzellen beschreibt, nicht gesehen wurde. In dieser Arbeit wurden die Leberbiopsien von unterschiedlichen Pathologen im Rahmen der Routinediagnostik beurteilt. Der Leberfettgehalt wurde in 10 % Schritten festgelegt. Dies hat zur Folge, dass es bei der Bestimmung womöglich eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen

4. Diskussion

Untersuchern, sowie aufgrund der 10 % Abstufung eine hohe Ungenauigkeit der Biopsieergebnisse gegeben hat. Ein weiteres Problem ist es, dass einige Pathologen, wie auch in dieser Arbeit, den Fettgehalt anhand des Fettanteils pro Gesichtsfeld abschätzen (Marsman et al., 2004), wohingegen andere nur den Prozentsatz der makrovesikulären Verfettung in den Hepatozyten beurteilen (Brunt et al., 1999).

Insgesamt ist der oben genannte Einfluss jedoch schwer abzuschätzen. Im klinischen Alltag reicht diese Genauigkeit der Bestimmung des Leberfettgehalts jedoch aus.

4.2 Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie (¹H-MRS)

Die Fettbestimmungen mittels ¹H-MRS am Mayonnaise-Phantom zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den Fettkonzentrationen der angemischten Proben ($r^2 = 0,993$; Regressionskoeffizient = 1,04, Abbildung 9). Auf eine T2-Korrektur der MRS-Daten konnte verzichtet werden, da in der Mayonnaise die T2-Relaxationszeiten für Fett und Wasser wegen des fehlenden Eisens eher länger sein dürften als in der Leber.

Die anschließend durchgeführte ¹H-MRS in der Patientengruppe A (Tabelle 3) zeigte eine gute Korrelation zwischen den spektroskopisch und bioptisch bestimmten Fettgehalten ($p = 0,0025$).

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die ¹H-MRS eine genaue Methode ist um den Leberfettgehalt zu bestimmen (d'Assignies et al., 2009, Guiu et al., 2009, McPherson et al., 2009, Szczepaniak et al., 2005, Szczepaniak et al., 1999, Longo et al., 1995, Thomsen et al., 1994, Longo et al., 1993).

In der Arbeit von d'Assignies et al (2009) wurde an 20 Patienten mit histologisch gesicherter NAFLD (Fettgehalt von 12,5 -72,5 %) bei 1,5 T eine Korrelation von $r = 0,773$ ($p < 0,001$) gefunden. Dort wurden jedoch nur die Lipidpeaks bei 0,9, 1,3 und 2,0 ppm analysiert. Dies bedeutet, dass der wahre Fettgehalt ca. 10 % höher einzuschätzen ist (Tabelle 4). Im Vergleich hierzu analysiert diese Arbeit das gesamte Spektrum der Lipidpeaks (siehe Abbildungen 5b, 6b). Außerdem wurde nur eine standardisierte T2-Korrektur mit Literaturwerten von 60 ms für Fett und 50 ms für Wasser vorgenommen (d'Assignies et al., 2009).

4.2.1 T2-Korrektur

Wie die Arbeit von Guiu et al (2009) zeigt, variieren die T2-Werte für Fett und Wasser in jedem Patienten sehr beträchtlich. In deren Arbeit wurden Spektren mit 7 verschiedenen Echozeiten gemessen, um die T2-Zeiten von Wasser und Fett bei 3 T für jeden Patienten individuell zu bestimmen. Die T2-Zeiten von Wasser reichten von 12,4 ms bis 41,2 ms und für Fett von 33 ms bis 77 ms.

4. Diskussion

Guiu et al (2009) machen für einen dort gemessenen Patienten eine T2-Zeit für Fett von 33 ms einen Fettgehalt von 42 % aus. Für T2 = 77 ms wird durch die exponentielle Korrektur des Fettanteils jedoch nur 30,1 % erhalten.

Die hohe Variabilität der T2-Zeiten ist vor allem dem unterschiedlich hohen Eisengehalt der Leber geschuldet. Guiu et al (2009) messen jedoch nur den Methylenpeak bei 1,3 ppm und vergleichen diesen mit Wasser bei 4,7 ppm.

Van Werven et al (2010) verwenden für die Messung des Fettgehalts inklusive der ungesättigten Fettsäuren bei 5,4 und 4,65 ppm am 3 T MRT mittels ^1H -MRS Korrekturwerte von 34 ms und 68 ms für T2 Wasser und Fett. Die Arbeit von McPherson et al (2009) vergleicht die ^1H -MRS 1,5 T mit Leberbiopsien und kommt zu einer hoch-signifikanten Korrelation ($p < 0,001$). McPherson et al (2009) zeigen, dass der Fibrosegrad einen Einfluss auf die ^1H -MRS Messung hat und diese deshalb abhängig vom Fibrosegrad korrigiert werden muss. Über die Art der Korrektur wird jedoch keine Angabe gemacht. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass Patienten mit einer Leberfibrose einen erhöhten Eisengehalt in der Leber hatten. Dies wurde jedoch in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass der Eisengehalt keineswegs bei der Bestimmung des Fettgehalts zu vernachlässigen ist (Abbildung 12).

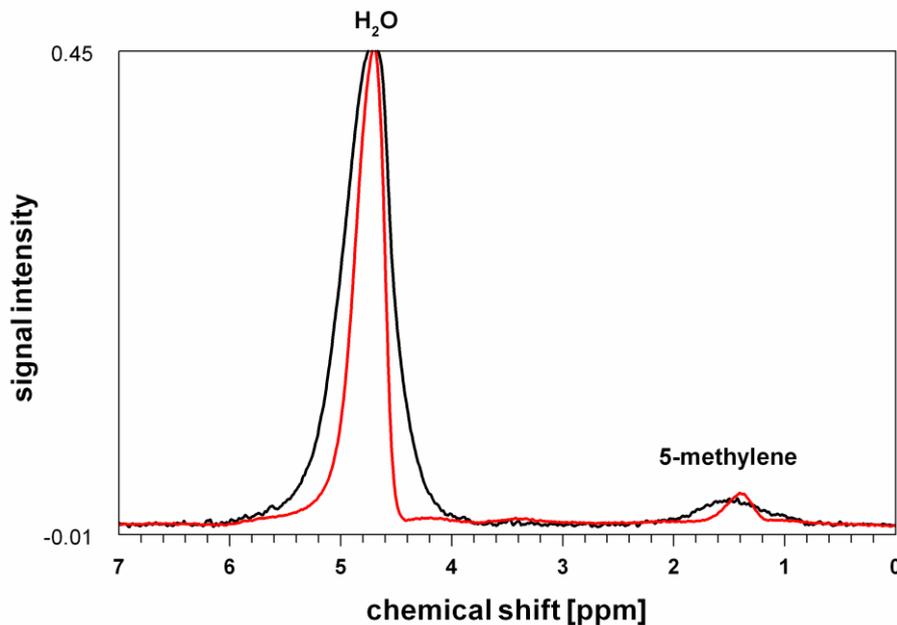


Abbildung 12: ^1H -Spektren eines Patienten mit einer Lebereisen-Konzentration $\text{LIC} = 4,2 \text{ mg-Fe/g-TG}$ (schwarz) und einer Kontrollperson mit $\text{LIC} = 1,1 \text{ mg-Fe/g-TG}$ (rot) bei etwa gleichem Fettgehalt von 10 %.

Es zeigt sich, dass eine erhöhte Eisenkonzentration wie bei Patient 29 (Tabelle 3) zu einer nahezu 2-fachen Verbreiterung sowohl des Wasser- als auch des Fett-Peaks führt. Gleichzeitig werden die Relaxationszeiten von Fett und Wasser unterschiedlich stark beeinflusst, was zu einer individuellen T2-Korrektur für Patienten mit höherem Eisengehalt in der Leber führen müsste. Ein Vergleich der unkorrigierten Werte mit den korrigierten Werten zeigt, dass ohne die Korrektur der Leberfettgehalt durch die ^1H -MRS deutlich höher ausfällt (Abbildung 10).

Unter Berücksichtigung der aktuellen Arbeiten von Guiu et al (2009), Valenti et al (2012) und dieser Arbeit sind die Ergebnisse von McPherson et al (2009) neu zu beurteilen. Der Verzicht auf eine T2 Korrektur ist danach nicht haltbar.

Ein Problem der aktuellen Arbeit stellt die Verwendung der von Gambarota et al

(2011) an 5 gesunden Probanden bestimmten T2-Relaxationszeiten für Wasser und Fett dar. Grund dafür ist, dass in dieser Arbeit die ^1H -MRS nur bei einer Echozeit von 39 ms durchgeführt wurde. Insbesondere bei 3 T ist nicht bekannt wie sich die T2-Relaxationszeiten für Wasser und Fett bei steigendem Eisengehalt zueinander verhalten. Es ist anzunehmen, dass die T2 Korrektur mit steigendem Eisengehalt deutlich weniger stark ausfallen wird, da sich die Relaxationszeiten von Fett und Wasser a) stark verkürzen und b) einander angleichen würden.

Für weitere Untersuchungen empfiehlt es sich deshalb immer, die individuellen T2-Zeiten für jeden Probanden zu bestimmen. Insbesondere vor dem Hintergrund der Arbeit von Valenti et al (2012), die eine positive Korrelation zwischen Lebereisengehalt und Schweregrad der NAFLD feststellte sollte eine T2 Korrektur nach Literaturwerten nur unter Vorbehalt angewendet werden (Valenti et al., 2012).

4.2.2 T1-Korrektur

Theoretisch müssten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten auch einer T1 Korrektur unterzogen werden. Basierend auf einer Arbeit von Thomsen (1990) sollten zur Vermeidung einer signifikanten T1 Beeinflussung lange Repetitionszeiten von $TR = 4000$ ms gewählt werden. In dieser Arbeit wurde, basierend auf den Messungen von van Werven et al bei 3 T, eine TR von 2000 ms gewählt (van Werven et al., 2009). Mit den (normalen) T1-Relaxationszeiten von 663 bzw. 236 ms für Wasser bzw. Fett von Thomsen et al (1994) erhält man für $TR = 2000$ ms nach T1-Korrektur ein um 0,047-fach kleineres Ergebnis für normale Fettgehalte ($< 5\%$), das für einen Fettgehalt von 50 % wegen des relativ kleineren Wasseranteils auf 0,024-fach schrumpft. Aus diesem Grund wurde anschließend in dieser Arbeit auf eine T1-Korrektur verzichtet.

Um jedoch ein höheres Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erhalten, empfiehlt sich eine kürzere TR (Gambarota et al., 2011). Dies würde insbesondere für geringe Fettgehalte, bei denen die Peaks sehr klein sind, einen Vorteil bewirken. Auf

eine T1 Korrektur kann allerdings unter diesen Umständen nicht verzichtet werden.

4.2.3 Allgemeine Störfaktoren:

Zusätzlich müssen bei der ^1H -MRS noch einige weitere mögliche Störfaktoren berücksichtigt werden. So wurde die ^1H -MRS Messung in dieser Arbeit immer ohne Atemtriggerung durchgeführt. Da die Leber aber ein atemverschiebliches Organ ist, welches sich um 2 - 3 cm pro Atemzug verschiebt, ist eine perfekte Homogenisierung des Magnetfeldes (shimming) über dem zu messenden Bereich kaum möglich. Um eine möglichst hohe Genauigkeit zu erzielen wurde in dieser Arbeit der Voxel möglichst weit weg vom Diaphragma platziert. Eine generelle Verbesserung könnte jedoch eine Atemtriggerung (Navigator-Methode) oder eine kürzere Messzeit (< 20 s) bewirken.

Vorstellbar wäre auch ein Einfluss der aktuellen Nahrungsaufnahme auf den aktuellen Leberfettgehalt. Studien von Szczepaniak et al (2005) und von van Werven et al (2009) haben jedoch gezeigt, dass die ^1H -MRS Messung nicht von der aktuellen Nahrungsaufnahme oder der Tageszeit beeinflusst wird.

Generell ist auch eine unterschiedliche Verteilung des Fettes in der Leber denkbar.

Nach einer Studie von van Werven et al (2009), beträgt die Variabilität des spektroskopisch bestimmten Leberfettgehalts 14,5 %. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Fettgehalt im rechten und im linken Leberlappen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit muss aber kritisch gesehen werden, da van Werven et al (2009) sowie diese Arbeit jeweils die „single voxel“ Spektroskopie benutzen. Das bedeutet, in keiner der beiden Arbeiten wurde der gesamte Leberfettgehalt bestimmt.

Unter Berücksichtigung aller oben genannten Faktoren ist die ^1H -MRS dennoch eine sehr genaue nicht-invasive Methode, um den Leberfettgehalt zu bestimmen.

4.3 Chemical Shift Relaxometrie (CSR)

Die Auswertung des Mayonnaise-Phantom zeigte ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung mit den Fettkonzentrationen der angemischten Proben ($r^2 = 0,984$; Regressionskoeffizient = 1,04, siehe Abbildung 9).

Der Vergleich der ^1H -MRS mit der CSR ergab eine sehr gute Übereinstimmung. Durchschnittlich bewertet die CSR den Fettgehalt um 17 % höher als die ^1H -MRS (Abbildung 11).

Frühere Arbeiten zeigten ebenfalls, dass eine Quantifizierung des Leberfettgehalts mit der CSR möglich ist (Leporq et al., 2013, Kühn et al., 2012, Yokoo et al., 2011, Reeder and Sirlin, 2011, d'Assignies et al., 2009, Guiu et al., 2009).

Von diesen Arbeiten benutzten nur Leporq et al (2013) eine CSR mit 13 Echozeiten.

Kühn et al (2012) und Guiu et al (2009) benutzen die in der Literatur am häufigsten Verwendete 3-Punkt Dixon Methode mit 3 Echozeiten. Der Vorteil mehrerer Echozeiten ist eine deutlich genauere Bestimmung des Fettgehalts sowie auch der $T2^*$ Zeiten.

d'Assignies et al (2009) verwenden für die CSR nur eine Methode mit 2 Echozeiten. Dies scheint zur Fettbestimmung nur bedingt geeignet, da eine Berücksichtigung von $T2^*$ mit nur 2 Echozeiten nicht möglich ist.

4.3.1 T2* Bestimmung

Die Berücksichtigung der T2*-Zeiten, die vor allem dem Einfluss des Eisens geschuldet sind, wurde bei Guiu et al (2009) auf der Grundlage von Hussain et al (2005) durchgeführt. Dort zeigte sich eine sehr große Variabilität der T2* Zeiten. Diese reichten je nach Patient von 5,4 ms bis zu 25,4 ms.

Am deutlichsten zeigte sich der T2* Abfall bei Patienten mit Hämochromatose (Leporq et al., 2013, Guiu et al., 2009). Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Bezug auf den Patienten mit einer LIC von 3,9 [mg-Fe/g-TG] (T2* = 5,8 ms; Normalwerte: 17 – 50 ms, Wood et al, 2005).

Da bei chronischen Lebererkrankungen häufig eine Eisenüberladung der Leber beobachtet wird, ist eine Berücksichtigung der näherungsweise bestimmten T2* Zeiten bei der von Guiu (2009) verwendeten 3-Punkt Dixon Methode immer notwendig (Valenti et al., 2012, Westphalen et al., 2007).

Eine R2* (= 1/T2*) Bestimmung auf der Grundlage des bioptisch ermittelten Lebereisengehaltes wurde bei Kühn et al (2012) durchgeführt.

Die hier angewandte chemical shift Relaxometrie (CSR) mit 12 Echozeiten (auch multi-Echo Dixon-Methode genannt) bezieht die T2* Werte in die Fettbestimmung mit ein. Zusätzlich erlaubt diese Methode eine T2* (= 1/R2*) Bestimmung von Wasser und Fett und damit eine Berechnung der Lebereisenkonzentration (LIC). Dazu wurde die von Wood et al (2005) gefundene LIC-R2* Beziehung benutzt: $LIC = 0,0254 R_{2w}^* + 0,202$ [mg-Fe/g-TG] (siehe Tabelle 3). Die in dieser Arbeit ermittelten LIC reichen von 1,16 - 3,91 [mg-Fe/g-TG].

4.3.2 Fett-Wasser-Dominanz

Die hier verwendeten CSR, basierend auf der Signalstärke erlaubt keine Bestimmung, ob der Wasser- oder der Fettgehalt den größten Anteil in der Leber ausmacht.

Es kann also aufgrund des Signalabfalls nicht differenziert werden ob man eine

Leber mit z.B. 40 % oder 60 % Fettgehalt untersucht hat. Um dieses Problem zu umgehen wurden in dieser Arbeit die ^1H -MRS Ergebnisse als Entscheidungshilfe benutzt. Andere Arbeiten wie z.B. Guiu et al (2009) beziehen sich bei dieser Entscheidung auf die Arbeit von Thomas et al (2005) in welcher der höchste Fettgehalt bei 2349 Patienten 47.5 % betrug. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein Fettgehalt von über 50 % durchaus möglich ist. Eine Möglichkeit zur Umgehung des 50 % Unsicherheitsproblems kann die Einbeziehung der Phasen-Information in der sogenannten „complex-based-Technik“, wie auch von Kühn et al (2012) verwendet, sein. Weitere Möglichkeiten den dominanten Metaboliten zu bestimmen sind die von Reeder et al. 2011 vorgestellte IDEAL-Methode oder das Verwenden von 2 Flip-Winkeln (20° , 70°).

Die hier verwendete CSR ist eine schnelle und zuverlässige Methode den Leberfettgehalt, auch über die ganze Leber verteilt, sowie den Lebereisengehalt zu bestimmen.

4.4 Vergleich der ^1H -MRS- mit der CSR-Methode

Beide Methoden können mittlerweile in der klinischen Routine verwendet werden.

Generell hat die CSR jedoch einige Vorteile gegenüber der ^1H -MRS.

Die Dauer der Messungen ist bei der CSR deutlich kürzer als die der ^1H -MRS. So kann eine Messung problemlos unter Vermeidung von Atemartefakten, wie sie bei der ^1H -MRS auftreten, durchgeführt werden. Ein zweiter Vorteil ist, dass mit der CSR eine viel größere Schicht des Gewebes, anstatt nur eines kleinen Voxels, erfasst werden kann. Dies scheint vor allem in Bezug auf eine möglicherweise ungleichmäßig vorhandene Fettverteilung relevant zu sein. Ein letzter Punkt ist, dass die Nachbearbeitung der CSR Daten deutlich einfacher und schneller ist (Guiu et al., 2009).

Die Spektroskopie erlaubt im Kontrast zur CSR eine einfachere selektive Bestimmung einzelner Fettmetaboliten (Tabelle 4).

Die von uns ermittelte Unterschätzung des Leberfettgehaltes im Vergleich zur

4. Diskussion

Biopsie (Abbildung 10 u. 11) findet sich ebenfalls auch in den Arbeiten von LePorq et al (2013), d'Assignies et al (2009) und bei Kühn et al (2012). Möglicherweise liegen die Unterschiede darin begründet, dass die nicht-invasiven Methoden im Vergleich zur der histologischen Bestimmung die Protonendichte von Fett mit der von Wasser vergleicht. Im Gegensatz hierzu bestimmen die Pathologen nur den sichtbaren Anteil an verfetteten Hepatozyten und beziehen diesen nicht auf das im Gewebe vorhandene Wasser. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Thomson et al (1994), die den Fettgehalt der Leber durch eine biochemische Analyse aller Fette in der Biopsie mittels Auflösung des Gewebes bestimmten, unterstützt. Die dort ermittelte Korrelation zeigt deutlich weniger von der bioptischen Quantifizierung abweichende Spektroskopieergebnisse. Beide Methoden (CSR und ^1H -MRS) sind im klinischen Alltag gut geeignet, den Leberfettgehalt zu quantifizieren.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit vergleicht die drei unterschiedlichen Methoden Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie ($^1\text{H-MRS}$), chemical shift Relaxometrie (CSR) und visuelle histopathologische Einteilung der Leberbiopsien (HIS-V) zur Quantifizierung des Leberfettgehaltes. Alle drei Methoden sind in der Lage den Fettgehalt zu quantifizieren

Aktuell gibt es keine Veröffentlichung, die alle drei Methoden miteinander vergleicht und speziell dazu noch den Einfluss des Lebereisengehalt berücksichtigt.

Dies ist meinem Wissen nach die erste Arbeit die signifikante Korrelationen zwischen allen drei Methoden zeigt.

Die CSR liefert systematisch einen im Vergleich zur $^1\text{H-MRS}$ um 17 % höheren Fettgehalt. Generell weist die $^1\text{H-MRS}$ wie auch die CSR im Vergleich zur Biopsie einen halb so hohen Fettgehalt auf.

Für die klinische Anwendung erscheint die CSR von Vorteil, da sie im Vergleich zur $^1\text{H-MRS}$ die deutlich schnellere Methode ist. Die Datenverarbeitung gestaltet sich bei der CSR ebenfalls einfacher.

Generelle Probleme dieser Arbeit sind ein zu kleines Probandenkollektiv von insgesamt nur 24 Personen. Nicht jeder Proband hatte ein Leberbiopsieergebnis, so dass alle drei Methoden nicht optimal miteinander verglichen werden konnten. Eine Biopsie für alle Probanden wäre jedoch ethisch nicht vertretbar, da hierfür immer noch die medizinische Indikation im Vordergrund steht.

Eine immer wichtigere Rolle bei chronisch entzündlichen Lebererkrankungen spielt der Eisengehalt. Dieser kann mit der CSR bestimmt werden, während die $^1\text{H-MRS}$ mittels T2-Korrektur auf erhöhtes Lebereisen korrigiert werden muss. Hierfür fehlen aktuell noch eisenabhängige T2-Relaxationszeiten von Fett und Wasser insbesondere bei 3,0 Tesla.

Möglicherweise ist eine Bestimmung des Lebereisengehalts mittels der CSR bei NAFLD Erkrankungen ein sinnvoller Prädiktor für den Verlauf der Erkrankung und könnte in Zukunft helfen, Patienten, welche wahrscheinlich eine

5. Zusammenfassung

Leberfibrose entwickeln werden, früher zu erkennen und auch zu behandeln.

Ein weiterer Nutzen der beiden Methoden könnte klinisch in der Frühdiagnose des metabolischen Syndroms sowie der Therapieüberwachung von Lebererkrankungen liegen.

Aufgrund ihres diagnostischen Mehrwertes bezüglich des Entzündungsgeschehens kann jedoch nicht in jedem Fall auf eine Biopsie verzichtet werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

ASH	Alkoholische Fettleberhepatitis
BMI	body mass index (kg/m ²)
COV	Variationskoeffizient
CSR	Chemical Shift Relaxometrie
CT	Computertomographie
FC	Fettgehalt
FOV	field of view
GRE	gradient recalled echo
HASTE	half fourier-acquired single shot turbo spin echo
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HNE	4-Hydroxynonenal
ID	Erkennungsnummer
LIC	Lebereisenkonzentration
MDA	Malondialdehyde
MRT	Magnetresonanztomographie
NAFL	Nicht alkoholische Fettleber
NAFLD	Nicht alkoholische Fettlebererkrankungen
NASH	Nicht alkoholische Fettleberhepatitis
Peak	Signalerhebung in einer Grafik
RAD	RAS associated with diabetes
ROI	region of interest
SI	Signalintensität
TAG	Triacylglyceride
TE	Echozeit
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF- α ,	Tumornekrosefaktor α
TR	Repetitionszeit
¹ H-MRS	Protonenmagnetresonanzspektroskopie
3,0 T; 1,5 T	Feldstärke des MRT-Magneten in Tesla

7. Literaturverzeichnis

ANGULO, P. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease.[see comment]. *New England Journal of Medicine*, 346, 1221-31.

ANGULO, P., KEACH, J. C., BATTS, K. P. & LINDOR, K. D. 1999. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 30, 1356-62.

BACON, B. R., FARAHVASH, M. J., JANNEY, C. G. & NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. 1994. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*, 107, 1103-9.

BROWNING, J. D., SZCZEPANIAK, L. S., DOBBINS, R., NUREMBERG, P., HORTON, J. D., COHEN, J. C., GRUNDY, S. M. & HOBBS, H. H. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, 40, 1387-95.

BRUNT, E. M. 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Seminars in Liver Disease*, 21, 3-16.

BRUNT, E. M. 2009. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 13, 533-44.

BRUNT, E. M., JANNEY, C. G., DI BISCEGLIE, A. M., NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. & BACON, B. R. 1999. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *American Journal of Gastroenterology*, 94, 2467-2474.

BRUNT, E. M. & TINIAKOS, D. G. 2010. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 5286-96.

BYDDER, G. M., KREEL, L., CHAPMAN, R. W., HARRY, D., SHERLOCK, S. & BASSAN, L. 1980. Accuracy of computed tomography in diagnosis of fatty liver. *British Medical Journal*, 281, 1042.

CASSIDY, F. H., YOKOO, T., AGANOVIC, L., HANNA, R. F., BYDDER, M., MIDDLETON, M. S., HAMILTON, G., CHAVEZ, A. D., SCHWIMMER, J. B. & SIRLIN, B.

7. Literaturverzeichnis

- C. B. 2009. Fatty Liver Disease: MR Imaging Techniques for the Detection and Quantification of Liver Steatosis¹. *Radiographics*, 29, 231-260.
- CASTÉRA, L., NÈGRE, I., SAMII, K. & BUFFET, C. 1999. Pain experienced during percutaneous liver biopsy. *Hepatology*, 30, 1529-1530.
- CHANG, J. S., TAOULI, B., SALIBI, N., HECHT, E. M., CHIN, D. G. & LEE, V. S. 2006. Opposed-Phase MRI for Fat Quantification in Fat-Water Phantoms with ¹H MR Spectroscopy to Resolve Ambiguity of Fat or Water Dominance. *Am. J. Roentgenol.*, 187, W103-106.
- CHARATCHAROENWITTHAYA, P., LINDOR, K. D. & ANGULO, P. 2012. The spontaneous course of liver enzymes and its correlation in nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases & Sciences*, 57, 1925-31.
- COHEN, B., NOVICK, D. & RUBINSTEIN, M. 1996. Modulation of insulin activities by leptin. *Science*, 274, 1185-8.
- CURZIO, M., ESTERBAUER, H. & DIANZANI, M. U. 1985. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *International Journal of Tissue Reactions*, 7, 137-42.
- D'ASSIGNIES, G., RUEL, M., KHIAT, A., LEPANTO, L., CHAGNON, M., KAUFFMANN, C., TANG, A., GABOURY, L. & BOULANGER, Y. 2009. Noninvasive quantitation of human liver steatosis using magnetic resonance and bioassay methods. *European Radiology*, 19, 2033-40.
- DIXON, W. T. 1984. Simple proton spectroscopic imaging. *Radiology*, 153, 189-94.
- EKSTEDT, M., FRANZEN, L. E., MATHIESEN, U. L., THORELIUS, L., HOLMQVIST, M., BODEMAR, G. & KECHAGIAS, S. 2006. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*, 44, 865-73.
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J. & ZOLLNER, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11, 81-128.

7. Literaturverzeichnis

- FALCK-YTTER, Y., YOUNOSSI, Z. M., MARCHESINI, G. & MCCULLOUGH, A. J. 2001. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Seminars in Liver Disease*, 21, 17-26.
- FRACANZANI, A. L., VALENTI, L., BUGIANESI, E., ANDREOLETTI, M., COLLI, A., VANNI, E., BERTELLI, C., FATTA, E., BIGNAMINI, D., MARCHESINI, G. & FARGION, S. 2008. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*, 48, 792-8.
- GAMBAROTA, G., TANNER, M., VAN DER GRAAF, M., MULKERN, R. V. & NEWBOULD, R. D. 2011. 1H-MRS of hepatic fat using short TR at 3T: SNR optimization and fast T2 relaxometry. *MAGMA*, 24, 339-45.
- GILMORE, I. T., BURROUGHS, A., MURRAY-LYON, I. M., WILLIAMS, R., JENKINS, D. & HOPKINS, A. 1995. Indications, methods, and outcomes of percutaneous liver biopsy in England and Wales: an audit by the British Society of Gastroenterology and the Royal College of Physicians of London. *Gut*, 36, 437-41.
- GRAMLICH, T., KLEINER, D. E., MCCULLOUGH, A. J., MATTEONI, C. A., BOPARAI, N. & YOUNOSSI, Z. M. 2004. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Human Pathology*, 35, 196-9.
- GUIU, B., LOFFROY, R., HILLON, P. & PETIT, J. M. 2009. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for quantification of hepatic steatosis: urgent need for standardization! *Journal of Hepatology*, 51, 1082-3; author reply 1083-4.
- GUZMAN, G., BRUNT, E. M., PETROVIC, L. M., CHEJFEC, G., LAYDEN, T. J. & COTLER, S. J. 2008. Does nonalcoholic fatty liver disease predispose patients to hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 132, 1761-6.
- HAMILTON, G., YOKOO, T., BYDDER, M., CRUITE, I., SCHROEDER, M. E., SIRLIN, C. B. & MIDDLETON, M. S. 2011. In vivo characterization of the liver fat (1)H MR spectrum. *NMR Biomed*, 24, 784-90.

7. Literaturverzeichnis

- HERNAEZ, R., LAZO, M., BONEKAMP, S., KAMEL, I., BRANCATI, F. L., GUALLAR, E. & CLARK, J. M. 2011. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology*, 54, 1082-90.
- HIGUCHI, M., AGGARWAL, B. B. & YEH, E. T. 1997. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 1751-8.
- HOTAMISLIGIL, G. S., PERALDI, P., BUDAVARI, A., ELLIS, R., WHITE, M. F. & SPIEGELMAN, B. M. 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 271, 665-8.
- HUG, H., STRAND, S., GRAMBIHLER, A., GALLE, J., HACK, V., STREMMEL, W., KRAMMER, P. H. & GALLE, P. R. 1997. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28191-3.
- HUSSAIN, H. K., CONJEEVARAM, H. S., CHENEVERT, T. & LONDY, F. 2005. Hepatic fat fraction: MR imaging for quantitative measurement and display--early experience.
- INAYAT-HUSSAIN, S. H., COUET, C., COHEN, G. M. & CAIN, K. 1997. Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 25, 1516-26.
- JOSEPH, A. E., DEWBURY, K. C. & MCGUIRE, P. G. 1979. Ultrasound in the detection of chronic liver disease (the "bright liver"). *British Journal of Radiology*, 52, 184-8.
- JOY, D., THAVA, V. R. & SCOTT, B. B. 2003. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 15, 539-43.
- KLEINER, D. E., BRUNT, E. M., VAN NATTA, M., BEHLING, C., CONTOS, M. J., CUMMINGS, O. W., FERRELL, L. D., LIU, Y.-C., TORBENSON, M. S., UNALP-ARIDA, A., YEH, M., MCCULLOUGH, A. J. & SANYAL, A. J. 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41, 1313-1321.

7. Literaturverzeichnis

- KOWDLEY, K. V., BELT, P., WILSON, L. A., YEH, M. M., NEUSCHWANDER-TETRI, B. A., CHALASANI, N., SANYAL, A. J., NELSON, J. E. & NETWORK, N. C. R. 2012. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 55, 77-85.
- KÜHN, J. P., HERNANDO, D., MUNOZ DEL RIO, A., EVERT, M., KANNENGIESSER, S., VOLZKE, H., MENSEL, B., PULS, R., HOSTEN, N. & REEDER, S. B. 2012. Effect of multiplex spectral modeling of fat for liver iron and fat quantification: correlation of biopsy with MR imaging results. *Radiology*, 265, 133-42.
- LEONARDUZZI, G., SCAVAZZA, A., BIASI, F., CHIARPOTTO, E., CAMANDOLA, S., VOGEL, S., DARGEL, R. & POLI, G. 1997. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB Journal*, 11, 851-7.
- LEPORQ, B., RATINEY, H., PILLEUL, F. & BEUF, O. 2013. Liver fat volume fraction quantification with fat and water T1 and T2* estimation and accounting for NMR multiple components in patients with chronic liver disease at 1.5 and 3.0 T. *Eur Radiol*, 23, 2175-86.
- LEVENSON, H., GREENSITE, F., HOEFS, J., FRILLOUX, L., APPLGATE, G., SILVA, E., KANEL, G. & BUXTON, R. 1991. Fatty infiltration of the liver: quantification with phase-contrast MR imaging at 1.5 T vs biopsy. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 156, 307-12.
- LEWIS, J. R. & MOHANTY, S. R. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Digestive Diseases & Sciences*, 55, 560-78.
- LONGO, R., POLLESELLO, P., RICCI, C., MASUTTI, F., KVAM, B. J., BERCICH, L., CROCE, L. S., GRIGOLATO, P., PAOLETTI, S. & DE BERNARD, B. 1995. Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 5, 281-5.
- LONGO, R., RICCI, C., MASUTTI, F., VIDIMARI, R., CROCE, L. S., BERCICH, L., TIRIBELLI, C. & DALLA PALMA, L. 1993. Fatty infiltration of the liver. Quantification by ¹H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. *Investigative Radiology*, 28, 297-302.

7. Literaturverzeichnis

- LUDWIG, J., VIGGIANO, T. R., MCGILL, D. B. & OH, B. J. 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 55, 434-8.
- MADDUX, B. A., SBRACCIA, P., KUMAKURA, S., SASSON, S., YOUNGREN, J., FISHER, A., SPENCER, S., GRUPE, A., HENZEL, W., STEWART, T. A. & ET AL. 1995. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 373, 448-51.
- MARCHESINI, G., BRIZI, M., MORSELLI-LABATE, A. M., BIANCHI, G., BUGIANESI, E., MCCULLOUGH, A. J., FORLANI, G. & MELCHIONDA, N. 1999. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *The American Journal of Medicine*, 107, 450-455.
- MARCHESINI, G., E, B. & G, F. 2003. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37.
- MARSMAN, H., MATSUSHITA, T., DIERKHISING, R., KREMERS, W., ROSEN, C., BURGART, L. & NYBERG, S. L. 2004. Assessment of donor liver steatosis: pathologist or automated software? *Human Pathology*, 35, 430-5.
- MATTEONI, C. A., YOUNOSSI, Z. M., GRAMLICH, T., BOPARAI, N., LIU, Y. C. & MCCULLOUGH, A. J. 1999. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116, 1413-9.
- MCPHERSON, S., JONSSON, J. R., COWIN, G. J., O'ROURKE, P., CLOUSTON, A. D., VOLP, A., HORSFALL, L., JOTHIMANI, D., FAWCETT, J., GALLOWAY, G. J., BENSON, M. & POWELL, E. E. 2009. Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered. *Journal of Hepatology*, 51, 389-97.
- MOFRAD, P., CONTOS, M. J., HAQUE, M., SARGEANT, C., FISHER, R. A., LUKETIC, V. A., STERLING, R. K., SHIFFMAN, M. L., STRAVITZ, R. T. & SANYAL, A. J. 2003. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*, 37, 1286-92.

7. Literaturverzeichnis

- MOTTIN, C. C., MORETTO, M., PADOIN, A. V., SWAROWSKY, A. M., TONETO, M. G., GLOCK, L. & REPETTO, G. 2004. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obesity Surgery*, 14, 635-7.
- NEEDLEMAN, L., KURTZ, A. B., RIFKIN, M. D., COOPER, H. S., PASTO, M. E. & GOLDBERG, B. B. 1986. Sonography of diffuse benign liver disease: accuracy of pattern recognition and grading. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 146, 1011-5.
- NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. & CALDWELL, S. 2003. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*, 37.
- NOGUCHI, H., TAZAWA, Y., NISHINOMIYA, F. & TAKADA, G. 1995. The relationship between serum transaminase activities and fatty liver in children with simple obesity. *Acta Paediatrica Japonica*, 37, 621-5.
- O'REGAN, D. P., CALLAGHAN, M. F., WYLEZINSKA-ARRIDGE, M., FITZPATRICK, J., NAOUMOVA, R. P., HAJNAL, J. V. & SCHMITZ, S. A. 2008. Liver fat content and T2*: simultaneous measurement by using breath-hold multiecho MR imaging at 3.0 T-- feasibility. *Radiology*, 247, 550-7.
- PALMENTIERI, B., DE SIO, I., LA MURA, V., MASARONE, M., VECCHIONE, R., BRUNO, S., TORELLA, R. & PERSICO, M. 2006. The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Digestive and Liver Disease*, 38, 485-489.
- PAMILO, M., SOTANIEMI, E. A., SURAMO, I., LAHDE, S. & ARRANTO, A. J. 1983. Evaluation of liver steatotic and fibrous content by computerized tomography and ultrasound. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 18, 743-7.
- PIEKARSKI, J., GOLDBERG, H. I., ROYAL, S. A., AXEL, L. & MOSS, A. A. 1980. Difference between liver and spleen CT numbers in the normal adult: its usefulness in predicting the presence of diffuse liver disease. *Radiology*, 137, 727-9.
- RATZIU, V., CHARLOTTE, F., HEURTIER, A., GOMBERT, S., GIRAL, P., BRUCKERT, E., GRIMALDI, A., CAPRON, F. & POYNARD, T. 2005. Sampling Variability of Liver Biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 128, 1898-1906.

7. Literaturverzeichnis

- REEDER, S. B. & SIRLIN, C. B. 2011. Quantification of liver fat with magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, 18, 337-57.
- REYNET, C. & KAHN, C. R. 1993. Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science*, 262, 1441-4.
- RICCI, C., LONGO, R., GIOULIS, E., BOSCO, M., POLLESELLO, P., MASUTTI, F., CROCE, L. S., PAOLETTI, S., DE BERNARD, B., TIRIBELLI, C. & DALLA PALMA, L. 1997. Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver. *Journal of Hepatology*, 27, 108-13.
- RUBINSTEIN, E., LAVINE, J. E. & SCHWIMMER, J. B. 2008. Hepatic, cardiovascular, and endocrine outcomes of the histological subphenotypes of nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*, 28, 380-5.
- SAADEH, S., YOUNOSSI, Z. M., REMER, E. M., GRAMLICH, T., ONG, J. P., HURLEY, M., MULLEN, K. D., COOPER, J. N. & SHERIDAN, M. J. 2002. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 123, 745-750.
- SANYAL, A. J., BANAS, C., SARGEANT, C., LUKETIC, V. A., STERLING, R. K., STRAVITZ, R. T., SHIFFMAN, M. L., HEUMAN, D., COTERRELL, A., FISHER, R. A., CONTOS, M. J. & MILLS, A. S. 2006. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology*, 43, 682-9.
- SHETH, S. G., GORDON, F. D. & CHOPRA, S. 1997. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med*, 126, 137-45.
- SUNG, K. C., RYAN, M. C. & WILSON, A. M. 2009. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with increased cardiovascular risk in a large cohort of non-obese Asian subjects. *Atherosclerosis*, 203, 581-586.
- SZCZEPANIAK, L. S., BABCOCK, E. E., SCHICK, F., DOBBINS, R. L., GARG, A., BURNS, D. K., MCGARRY, J. D. & STEIN, D. T. 1999. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *American Journal of Physiology*, 276, E977-89.

7. Literaturverzeichnis

- SZCZEPANIAK, L. S., NURENBERG, P., LEONARD, D., BROWNING, J. D., REINGOLD, J. S., GRUNDY, S., HOBBS, H. H. & DOBBINS, R. L. 2005. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism*, 288, E462-8.
- THOMAS, E. L., HAMILTON, G., PATEL, N., O'DWYER, R., DORE, C. J., GOLDIN, R. D., BELL, J. D. & TAYLOR-ROBINSON, S. D. 2005. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut*, 54, 122-7.
- THOMSEN, C., BECKER, U., WINKLER, K., CHRISTOFFERSEN, P., JENSEN, M. & HENRIKSEN, O. 1994. Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance Imaging*, 12, 487-95.
- THOMSEN, C., CHRISTOFFERSEN, P., HENRIKSEN, O. & JUHL, E. 1990. Prolonged T1 in patients with liver cirrhosis: an in vivo MRI study. *Magnetic Resonance Imaging*, 8, 599-604.
- VALENTI, L., DONGIOVANNI, P. & FARGION, S. 2012. Diagnostic and therapeutic implications of the association between ferritin level and severity of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 18, 3782-6.
- VAN WERVEN, J. R., HOOGDUIN, J. M., NEDERVEEN, A. J., VAN VLIET, A. A., WAJS, E., VANDENBERK, P., STROES, E. S. & STOKER, J. 2009. Reproducibility of 3.0 Tesla magnetic resonance spectroscopy for measuring hepatic fat content. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 30, 444-8.
- VAN WERVEN, J. R., SCHREUDER, T. C. M. A., NEDERVEEN, A. J., LAVINI, C., JANSEN, P. L. M. & STOKER, J. 2010. Hepatic unsaturated fatty acids in patients with non-alcoholic fatty liver disease assessed by 3.0 T MR spectroscopy. *European Journal of Radiology*, 75, e102-e107.
- VERNON, G., BARANOVA, A. & YOUNOSSI, Z. M. 2011. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 34, 274-285.

7. Literaturverzeichnis

- WANLESS, I. R. & LENTZ, J. S. 1990. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: An autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*, 12, 1106-1110.
- WEHRLI, F. W., FORD, J. C., ATTIE, M., KRESSEL, H. Y. & KAPLAN, F. S. 1991. Trabecular structure: preliminary application of MR interferometry. *Radiology*, 179, 615-21.
- WESTPHALEN, A. C., QAYYUM, A., YEH, B. M., MERRIMAN, R. B., LEE, J. A., LAMBA, A., LU, Y. & COAKLEY, F. V. 2007. Liver fat: effect of hepatic iron deposition on evaluation with opposed-phase MR imaging. *Radiology*, 242, 450-5.
- WILLIAMS, C. D., STENGEL, J., ASIKE, M. I., TORRES, D. M., SHAW, J., CONTRERAS, M., LANDT, C. L. & HARRISON, S. A. 2011. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 140, 124-31.
- WISMER, G., BUXTON, R., ROSEN, B., FISEL, C., OOT, R., BRADY, T. & DAVIS, K. 1988. Susceptibility induced MR line broadening: applications to brain iron mapping. *J Comp Ass Tomography* 12, 259-265.
- WOOD, J. C., ENRIQUEZ, C., GHUGRE, N., TYZKA, J. M., CARSON, S., NELSON, M. D. & COATES, T. D. 2005. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*, 106, 1460-5.
- YOKOO, T., SHIEHMORTEZA, M., HAMILTON, G., WOLFSON, T., SCHROEDER, M. E., MIDDLETON, M. S., BYDDER, M., GAMST, A. C., KONO, Y., KUO, A., PATTON, H. M., HORGAN, S., LAVINE, J. E., SCHWIMMER, J. B. & SIRLIN, C. B. 2011. Estimation of hepatic proton-density fat fraction by using MR imaging at 3.0 T. *Radiology*, 258, 749-59.
- YOUNOSSI, Z. M. 2008. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 28, 2-12.

7. Literaturverzeichnis

YOUNOSSI, Z. M., STEPANOVA, M., AFENDY, M., FANG, Y., YOUNOSSI, Y., MIR, H. & SRISHORD, M. 2011. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology & Hepatology*, 9, 524-530 e1; quiz e60.

ZATLOUKAL, K., BOCK, G., RAINER, I., DENK, H. & WEBER, K. 1991. High molecular weight components are main constituents of Mallory bodies isolated with a fluorescence activated cell sorter. *Laboratory Investigation*, 64, 200-6.

8. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. A. Laatsch und Herrn PD. Dr. med J. Yamamura sowie Herrn PD. Dr. rer. nat. Dr. med. P. Nielsen, die für die Initiierung und Durchführung der Arbeit zuständig waren.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. Z.J. Wang für die methodische Beratung sowie die Entwicklung der Analysetools; außerdem Herrn Dr. rer. nat. K. Tödter für die Idee zum Mayonnaise-Phantom.

Bei Herrn Prof. Dr. med. G. Adam, ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Diagnostische Radiologie, Universität Hamburg möchte ich mich für die zur Verfügungstellung der radiologischen Geräte bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. R. Fischer, der entscheidende Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit insbesondere im Bereich Statistik leistete und ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für Ideen, Hinweise, Korrekturen und ihre liebevolle Unterstützung danke ich meiner Freundin Melanie Mey-Lan Liem.

9. Lebenslauf

Name:	Jochen Benjamin Veigel
Geburtsdatum:	27.01.1986
Geburtsort:	Heidenheim a.d. Brenz
Familienstand:	Ledig
Eltern:	Norbert Veigel 04.01.1951 Gisela Veigel geborene Kupke 23.10.1954
Geschwister:	Julia Veigel 25.03.1989
Hochschulausbildung:	
Seit 01/2013	Assistenzarzt am Institut für Klinische Chemie UKE Hamburg
11/ 2012	2. Staatsexamen Medizin
09/ 2008	1. Staatsexamen Medizin
2006 - 2012	Studium der Humanmedizin in Hamburg

Sonstiges:

01/ 2011 12/2012

Dozent für Anatomie und Physiologie an der
MTLA Schule St. Georg und der KPS der
Asklepios Kliniken Hamburg

Zivildienst (FSJ):

2005-2006

Rettungssanitäter beim ASB-Ludwigsburg im
Bereich Rettungsdienst und Krankentransport

Schulbildung:

1996-2005

Oscar-Partet-Schule Freiberg am Neckar,
Gymnasium

1992-1996

Schillerschule Ingersheim, Grundschule

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: