

Aus der Chirurgischen Klinik  
Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung molekularer und strukturell-mechanischer  
Lebergewebeeigenschaften zur Verbesserung der diagnostischen  
Wertigkeit eines  $^{13}\text{C}$ -Leberfunktionstests

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Niklas Heucke

aus Beckendorf – Neindorf

Datum der Promotion: 18.09.2020



## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in modifizierter Form und in englischer Sprache bereits veröffentlicht in:

Wuensch, T.\* , Heucke, N.\* , Wizenty, J., Quint, J., Sinn, B., Arsenic, R., Jara, M., Kaffarnik, M., Pratschke, J., und Stockmann, M., *Hepatic CYP1A2 activity in liver tumors and the implications for preoperative volume-function analysis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019. **316**(5): S. G608-G614.

[\* geteilte Erstautorschaft]

Heucke, N.\* , Wuensch, T.\* , Mohr, J., Kaffarnik, M., Arsenic, R., Sinn, B., Müller, T., Pratschke, J., Stockmann, M., Sack, I., und Tzschätzsch, H., *Non-invasive structure-function assessment of the liver by 2D time-harmonic elastography and the dynamic Liver MAXimum capacity (LiMAx) test*. J Gastroenterol Hepatol, 2019. **34**(9): S. 1611-1619.

[\* geteilte Erstautorschaft]

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b> .....	<b>III</b>
<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1    Chronische Lebererkrankungen und Tumoren der Leber .....	1
1.2    Methoden zur quantitativen Einschätzung der Leberfunktion .....	3
1.2.1    Liver M <sup>A</sup> ximum capacity (LiM <sup>A</sup> x)-Test .....	5
1.2.2    Einsatz des LiM <sup>A</sup> x in der Leberchirurgie .....	6
1.2.3    Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) .....	9
1.2.4    Veränderung der CYP1A2-Aktivität bei Lebererkrankungen.....	11
1.3    Erfassung strukturell-mechanischer Lebergewebeeigenschaften .....	12
1.3.1    Nicht-invasive Diagnostik der Leberfibrose.....	14
1.3.2    Zeitharmonische Elastographie (THE).....	16
1.4    Fragestellung .....	18
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1    Studiendesign .....	20
2.1.1    Ein- und Ausschlusskriterien .....	22
2.2    Material .....	22
2.2.1    Antikörper .....	22
2.2.2    Assays .....	22
2.2.3    Chemikalien.....	23
2.2.4    Verbrauchsmaterialien.....	23
2.2.5    Geräte.....	24
2.3    LiM <sup>A</sup> x-Test.....	24
2.4    Zeitharmonische Elastographie (THE) .....	25
2.5    Laborparameter und serologische Scores .....	27
2.5.1    APRI und FIB-4 .....	27
2.6    Fibrosegrade.....	27
2.7    Zellkultur .....	28
2.8    CYP1A2-Aktivitätsbestimmung .....	28
2.9    Gewebefärbung .....	31
2.9.1    Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	32
2.9.2    Immunfluoreszenzfärbung .....	32
2.10    Volumen-Funktionsplanung .....	33

2.11	Statistische Methoden und graphische Aufbereitung .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Etablierung des CYP1A2-Aktivitätsassays .....	35
3.2	CYP1A2-Aktivität in hepatischen Tumoren .....	36
3.3	Veränderung der CYP1A2-Aktivität mit zunehmender Leberfibrose .....	41
3.4	Bedeutung der CYP1A2-Aktivität in hepatischen Tumoren für die präoperative Volumen-Funktionsplanung .....	44
3.5	Charakteristika der Studienpopulation zur Analyse des Zusammenhangs strukturell-mechanischer und funktioneller Lebergewebeeigenschaften ...	46
3.6	Zusammenhang zwischen Lebersteifigkeit, serologischen Scores und Leberfunktion .....	51
3.7	Einfluss fortschreitender Leberfibrose auf Lebersteifigkeit, serologische Scores und Leberfunktion .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1	Ergebnisbewertung .....	58
4.1.1	Einfluss von Fibrosierung und Tumorgenese auf CYP1A2 .....	58
4.1.2	Verbesserung der präoperativen Volumen-Funktionsplanung .....	62
4.1.3	Struktur-Funktionsbeziehung im Progress chronischer Lebererkrankungen .....	63
4.1.4	THE und LiMAx als diagnostische Werkzeuge der Fibrosedetektion .....	66
4.2	Limitationen .....	70
4.2.1	Charakterisierung von CYP1A2 in der Leber .....	70
4.2.2	Erfassung strukturell-mechanischer Lebergewebeeigenschaften .....	72
4.3	Ausblick und weitere Forschung .....	76
4.4	Schlussfolgerungen .....	78
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>95</b>
	<b>Anteilerklärung an erfolgten Publikationen .....</b>	<b>96</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>98</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>99</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>100</b>

## Kurzzusammenfassung

**Hintergrund:** Der atembasierte Liver MAXimum capacity (LiMAX)-Test erlaubt die nicht-invasive Messung der Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Gesamtleberfunktion. In Kombination mit Schnittbildverfahren wird der LiMAX-Test zur Einschätzung der Operabilität vor leberchirurgischen Eingriffen eingesetzt (Volumen-Funktionsplanung). Unklar ist bislang der Einfluss der CYP1A2-Aktivität hepatischer Tumoren auf die Genauigkeit der Volumen-Funktionsplanung, was im ersten Teil untersucht werden sollte. Darüber hinaus könnte der LiMAX-Test künftig allein oder in Kombination mit einem elastographischen Verfahren als diagnostisches Werkzeug, z. B. zur Fibrosedetektion, eingesetzt werden. Grundlegend ist dafür, den Zusammenhang zwischen strukturell-mechanischen Lebergewebeeigenschaften und dem LiMAX-Test zu untersuchen (Struktur-Funktionsanalyse), was Gegenstand des zweiten Teils der Arbeit sein sollte.

**Methoden:** Die CYP1A2-Aktivität wurde experimentell in 38 Gewebeproben aus hepatozellulärem Adenom (HCA), Karzinom (HCC), kolorektalen Lebermetastasen (CRLM) sowie den korrespondierenden nicht-tumorösen Geweben bestimmt. Zur Struktur-Funktionsanalyse wurden bei 66 Patienten mit chronischen Lebererkrankungen sowie 20 lebergesunden Probanden simultan Lebersteifigkeit (zeitharmonische Elastographie, THE) und Leberfunktion (LiMAX-Test) erfasst. Zudem wurden die serologischen Fibrose-Scores *Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index* (APRI) und *Fibrosis-4 Index* (FIB 4) berechnet und bei 47 Patienten der Fibrosegrad bestimmt.

**Ergebnisse:** HCC und CRLM wiesen nahezu keine CYP1A2-Aktivität im Vergleich zum nicht-tumorösen Gewebe auf ( $< 1\%$ ). HCA-Gewebe hingegen besaß eine Restaktivität (20,7%), die sich auf die exemplarisch erstellte Volumen-Funktionsplanung auswirkte. Die Struktur-Funktionsanalyse zeigte eine stark negative Korrelation zwischen Lebersteifigkeit und LiMAX-Werten ( $r = -0,701$ ). Eine fortschreitende Fibrosierung ging mit einer höheren Lebersteifigkeit und Fibrose-Scores sowie niedrigeren LiMAX-Werten einher. Nur schwere Leberfibrose war zuverlässig mit THE und LiMAX detektierbar.

**Schlussfolgerung:** Zur exakten Volumen-Funktionsplanung sollte die CYP1A2-Aktivität in HCA Berücksichtigung finden. Zudem besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen strukturell-mechanischen und funktionellen Lebergewebeeigenschaften, der sich klinisch zur nicht-invasiven Diagnostik nutzen lässt.

## Abstract

**Background:** The Liver MAXimum capacity (LiMAX) test allows the non-invasive measurement of the overall hepatic cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity. It is used, in combination with imaging techniques, for preoperative risk assessment in liver surgery (volume-function analysis). Yet, it remains unknown, to which extent the residual CYP1A2 activity of hepatic tumors influences the accuracy of the volume-function analysis, which was addressed in the first part. Moreover, the LiMAX test, alone or in combination with elastographic techniques, could be used as a diagnostic tool, e.g. for fibrosis detection. The relationship between structural characteristics of the hepatic tissue and the LiMAX test must be studied beforehand (structure-function relationship), which was the aim of the second part.

**Methods:** CYP1A2 activity was measured *in vitro* in 38 paired samples of tumorous and adjacent nontumorous tissue of patients suffering from hepatocellular adenoma (HCA), carcinoma (HCC) or colorectal liver metastases (CRLM). To analyze the hepatic structure-function relationship, LiMAX test and liver stiffness measurements based on time-harmonic elastography (THE) were applied and the serological fibrosis scores Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI) and Fibrosis-4 Index (FIB 4) were calculated in patients with chronic liver diseases ( $n = 66$ ) and healthy control subjects ( $n = 20$ ). Moreover, fibrosis was graded by histological examination.

**Results:** CYP1A2 activity was found to be significantly decreased in HCC and CRLM tissues, compared to the adjacent nontumorous tissue ( $< 1\%$ ). HCA tissue contained residual activity (20.7 %) which altered the results of the volume-function analysis in its currently used way. Concerning the structure-function relationship, there was a significant negative correlation between liver stiffness and LiMAX values ( $r = -0.701$ ). Liver stiffness and serological fibrosis scores (APRI, FIB-4) increased progressively with the stage of fibrosis whereas LiMAX values decreased with fibrosis progression. THE and LiMAX were able to discriminate well between non-severe and severe fibrosis.

**Conclusion:** The residual CYP1A2 activity should be considered especially in HCA cases for an improved volume-function analysis. Moreover, the strong relationship between structural and functional tissue characteristics should be further evaluated for non-invasive diagnostic applications.

## Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
APRI	<i>Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index</i>
ARFI	<i>Acoustic radiation force impulse</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUROC	<i>Area under the receiver operating characteristic cuve</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body-Mass-Index
B-Mode	<i>Brightness mode</i>
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom ( <i>cholangiocarcinoma</i> )
CRLM	Kolorektale Lebermetastase ( <i>colorectal liver metastases</i> )
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom P450
CYP1A2	Cytochrom P450 1A2
EZM	Extrazellulärmatix
FIB-4	<i>Fibrosis-4 Index</i>
FLRF-LiMAx	Postoperativ erwartete Leberfunktion ( <i>future liver remnant function-LiMAx</i> )
FLRV	Postoperativ erwartetes Lebervolumen ( <i>future liver remnant volume</i> )
HCA	Hepatozelluläres Adenom ( <i>hepatocellular adenoma</i> )
HCC	Hepatozelluläres Karzinom ( <i>hepatocellular carcinoma</i> )
ICG	Indocyaningrün
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IQR	Interquartilsabstand ( <i>interquartile range</i> )
LiMAx	Liver MAximum capacity
MRT	Magnetresonanztomographie
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung ( <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> )
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis ( <i>non-alcoholic steatohepatitis</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
pSWE	<i>Point shear wave elastography</i>
PVE	Portalvenöse Embolisation
ROI	<i>Region of Interest</i>
SWEI	<i>Shear wave elastography imaging</i>
TE	Transiente Elastographie
THE	Zeitharmonische Elastographie ( <i>time-harmonic elastography</i> )
U	Einheit ( <i>unit</i> )
γ-GT	γ-Glutamyltransferase

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische Lebererkrankungen und Tumoren der Leber

Chronische Lebererkrankungen und deren Folgen stellen weltweit ein großes Gesundheitsproblem dar und gehören zu den häufigsten Todesursachen [1]. Laut der jüngsten *Global Burden of Disease Study* starben im Jahr 2017 etwa 1,3 Millionen Menschen weltweit an chronischen Lebererkrankungen, was 2,5 % aller Todesfälle oder jedem 40. Tod entspricht [2]. Leberzirrhose, als gemeinsame Spätfolge verschiedener chronischer Lebererkrankungen, ist ein histopathologisch definiertes Krankheitsbild, bei dem es zum fibrösen Umbau und letztlich zur Zerstörung des Lebergewebes kommt. Die Hauptfolgen sind neben einem veränderten hepatischen Blutfluss vor allem ein progredienter Funktionsverlust des Leberparenchyms. In den Industrieländern wird die Erkrankung insbesondere durch Alkoholabusus, Virushepatitiden (B, C, D) und die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) verursacht. Klinisch bleibt die Leberzirrhose oft über Jahre asymptomatisch und manifestiert sich erst durch schwerwiegende Komplikationen wie Ösophagusvarizenblutung, Aszites, spontan bakterielle Peritonitis oder hepatische Enzephalopathie. Darüber hinaus ist sie ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) [3, 4].

HCC machen etwa 75 - 85 % aller primären Lebertumoren aus, zu denen darüber hinaus hauptsächlich noch das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) gehört und die weltweit die sechshäufigste Tumorentität und die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache darstellen [5]. Typischerweise entstehen HCC im Kontext einer Leberzirrhose, welche bei ca. 80 % der HCC-Patienten\* zu finden ist [6]. Dennoch können sich HCC auch in nicht-zirrhotischer Leber entwickeln. So ist beispielsweise das Vorhandensein einer chronischen Hepatitis-B-Virusinfektion oder eine NAFLD auch unabhängig vom Vorliegen einer Leberzirrhose mit erhöhtem Risiko für das Auftreten von HCC verbunden [7]. Potenziell kurative Therapieverfahren des HCC umfassen neben der Lebertransplantation und lokalen Verfahren wie Radiofrequenzablation oder transarterieller Chemoembolisation (TACE) vor allem die chirurgische Resektion.

---

\* Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichwohl für beiderlei Geschlecht.

Während bei Patienten mit HCC in nicht-zirrhotoscher Leber die Leberteilresektion die Standardtherapie darstellt, gestaltet sich beim Vorhandensein einer Leberzirrhose mit konsekutiver Leberfunktionseinschränkung eine operative Resektion durch die Gefahr einer postoperativen Leberinsuffizienz schwieriger. Dennoch haben Verbesserungen der chirurgischen Verfahren, des perioperativen Managements und der Patientenselektion dazu geführt, dass selbst fortgeschrittene Erkrankungen mit geringer Leberfunktion mittels Hepatektomie therapiert werden können [8]. Grundvoraussetzung für eine korrekte Therapieplanung ist dabei die Einschätzung der Operabilität eines Patienten, die insbesondere durch das individuelle Risiko für das Auftreten des postoperativen Leberversagens bestimmt wird. Dafür sollten im Rahmen einer multiparametrischen Risikoabschätzung vor allem drei Komponenten berücksichtigt werden: Ausmaß der Leberresektion, Vorhandensein portaler Hypertension und Einschätzung der Leberfunktion [9]. Volumetrische Analysen basierend auf Schnittbildgebungsverfahren wie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) werden routinemäßig zur Resektionsplanung vor dem Eingriff durchgeführt und können darüber hinaus zur Vorhersage postoperativer Leberdysfunktion herangezogen werden [10]. Dennoch erlauben rein bildgebungsbasierte Methoden keine Aussage über die Funktionskapazität des Leberparenchyms und sind so insbesondere bei Patienten mit Funktionseinschränkungen nach Chemotherapie, durch Steatose, Cholestase oder Fibrose hinsichtlich ihrer Aussagekraft limitiert [11]. Daher ist oft für die richtige Therapieentscheidung eine gezielte Quantifizierung der Leberfunktion mit einem spezifischen Testverfahren geboten.

Diagnostische Verfahren bei den genannten fokalen und diffusen Lebererkrankungen machen sich nun vor allem den charakteristischen fortschreitenden Leberfunktionsverlust als auch die Veränderung strukturell-mechanischer Lebergewebeeigenschaften als Messgröße zu Nutze, um frühzeitig pathologische Veränderungen zu detektieren, Therapieentscheidungen zu treffen sowie den Krankheitsverlauf und Therapieerfolg zu beurteilen. Zahlreiche Techniken zur Einschätzung der Funktion und Struktur der Leber wurden entwickelt, die sich hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit und Kosten, Reproduzierbarkeit sowie Leberspezifität zum Teil erheblich unterscheiden.

## 1.2 Methoden zur quantitativen Einschätzung der Leberfunktion

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan erfüllt eine Vielzahl lebenswichtiger Funktionen im menschlichen Körper. Neben der Synthese und Speicherung zahlreicher Stoffe kommt der Leber unter anderem eine Schlüsselrolle bei der Entgiftung und Ausscheidung körpereigener und körperfremder Stoffe zu und ist darüber hinaus auch Teil des Immunsystems [12]. Eine Erfassung aller Komponenten der Leberfunktion mit einem diagnostischen Test ist vor dem Hintergrund der vielen Partialfunktionen schwierig. Daher kann sie nur indirekt durch spezifische Messung einer oder mehrerer für die Gesamtleber möglichst repräsentativer Partialfunktionen eingeschätzt werden. Verschiedene Ansätze zur Messung der Leberfunktion sind entwickelt wurden.

Konventionelle Blutwerte wie Bilirubin, Albumin oder die *International Normalized Ratio* (INR) finden breite Verwendung zur schnellen Einschätzung der hepatischen Funktion. Darüber hinaus sind klinische Scores entwickelt wurden, die Blutwerte und klinische Befunde eingeschränkter Leberfunktion miteinander kombinieren, um eine detaillierte Erfassung funktioneller Lebereigenschaften zu ermöglichen (z. B. Child-Pugh-Klassifikation [13] oder *Model for End-stage Liver Disease Score* (MELD) [14]). Dennoch ist keiner der verwendeten Parameter leberspezifisch, sodass Veränderungen auch durch nicht-hepatische Prozesse hervorgerufen werden können. Außerdem können sie in frühen Krankheitsstadien und selbst bei fortgeschrittener Leberschädigung im physiologischen Normbereich bleiben [15].

Eine Weiterentwicklung stellen die sogenannten dynamischen, quantitativen Leberfunktionstests dar, die den leberspezifischen Metabolismus oder die Ausscheidung einer applizierten Substanz über die Zeit messen [16]. Ein vor allem im asiatischen Raum verbreitetes Verfahren ist dabei beispielsweise der Indocyaningrün (ICG)-Test, bei dem die Ausscheidungsfunktion der Leber erfasst wird. ICG ist ein Farbstoff, der unkonjugiert fast ausschließlich biliär eliminiert wird. Über die meist transkutane Erfassung der ICG-Konzentrationskinetik nach intravenöser Applikation kann nun auf die hepatobiliäre Ausscheidungsfunktion rückgeschlossen werden [17]. In Studien konnte gezeigt werden, dass der ICG-Test bei leberchirurgischen Patienten mit der Prognose und dem postoperativen Überleben nach Lebertransplantation oder -teilresektion korreliert [18, 19]. Nichtsdestotrotz kann der Test unter anderem durch Veränderungen des hepatischen Blutflusses, bei Cholestase oder Hyperbilirubinämie verfälscht werden, was in jedem Fall

eine Testinterpretation im individuellen klinischen Kontext des Patienten erfordert [20, 21].

Zur gezielten Messung des hepatischen Metabolismus hingegen gibt es verschiedene Ansätze. Beim MEGX-Test wird die hepatische Stoffwechsellage von intravenös appliziertem Lidocain zu Monoethylglycinxylylid (MEGX) gemessen [22], dessen Anwendung sich jedoch aufgrund von schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Herzrhythmusstörungen oder Krampfanfälle bei intravenöser Applikation als nachteilig erweist. In der Kategorie der metabolischen Tests gibt es des Weiteren die große Gruppe der Atemtests, die alle nach einem identischen Grundprinzip funktionieren. Hier finden mit den Kohlenstoffisotopen  $^{13}\text{C}$  oder  $^{14}\text{C}$  markierte Testsubstanzen Verwendung, die hauptsächlich hepatisch verstoffwechselt werden. In der Natur kommt Kohlenstoff hingegen fast ausschließlich in Form des  $^{12}\text{C}$ -Isotops vor. Nach oraler oder intravenöser Verabreichung und entsprechender Metabolisierung der Testsubstanz wird nun parallel zum natürlichen  $^{12}\text{CO}_2$  auch  $^{13}\text{CO}_2$  bzw.  $^{14}\text{CO}_2$  produziert und nach Passage im Blutstrom in der Ausatemluft detektierbar. Eine Erhöhung des  $^{13}\text{CO}_2$  bzw.  $^{14}\text{CO}_2$  in der Atemluft muss also direkt mit der Stoffwechsellage der verabreichten Testsubstanz verbunden sein und erlaubt so einen direkten Rückschluss auf den Substratumsatz im adressierten Stoffwechselprozess [23]. Eine Vielzahl verschiedener vor allem  $^{13}\text{C}$ -markierter Testsubstanzen wurde vorgeschlagen und in verschiedensten klinischen Situationen getestet, darunter Aminopyrin, Galaktose, Methionin, Methacetin und Phenylalanin. Nichtsdestotrotz sind die meisten Verfahren aufgrund unterschiedlicher Limitationen über einen rein experimentellen Einsatz nicht hinausgekommen [24].

Darüber hinaus existieren auch radiologische Verfahren zur spezifischen Erfassung der Leberfunktion, die im Gegensatz zu den bisher genannten Tests insbesondere die räumliche Verteilung der Leberfunktion abbilden können [25]. Einerseits stehen nuklearmedizinische Methoden zur Verfügung, wobei gegenwärtig zwei leberspezifische Tracer verfügbar sind:  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Galactosyl (GSA) [26] und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Mebrofenin [27]. Dabei erfolgt die Aufzeichnung der freiwerdenden  $\gamma$ -Strahlung mittels planarer Szintigraphie oder dreidimensional mittels *single photon emission computed tomography* (SPECT).  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Galactosyl bindet spezifisch an Oberflächenrezeptoren von Hepatozyten und wird nach Internalisierung metabolisiert, wobei  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Mebrofenin ähnlich dem ICG ohne vorherige Biotransformation biliär ausgeschieden wird. Beide Techniken besitzen einen

hohen prädiktiven Wert für das postoperative Outcome nach leberchirurgischen Eingriffen, sind aber in der Testdurchführung aufwändig und mit Strahlenbelastung für den Patienten verbunden [28]. Andererseits kann auch die MRT mit Gadolinium-basierten Kontrastmitteln als bildgestützter Leberfunktionstest Verwendung finden und ist dabei nicht nur frei von ionisierender Strahlung, sondern lässt sich auch noch leicht als einfache Erweiterung in die ohnehin durchzuführende Routinediagnostik bei Patienten mit Lebererkrankungen integrieren [25, 29, 30].

### 1.2.1 Liver MAXimum capacity (LiMAX)-Test

Der an der Charité – Universitätsmedizin Berlin entwickelte  $^{13}\text{C}$ -Atemtest ist der Liver MAXimum capacity (LiMAX)-Test, bei dem intravenös verabreichtes  $^{13}\text{C}$ -Methacetin als Testsubstanz verwendet wird.  $^{13}\text{C}$ -Methacetin wird dabei leberspezifisch durch Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) verstoffwechselt [31-33]. Der LiMAX-Test gibt somit die maximal mögliche Umsatzrate des CYP1A2-Enzyms wieder, welche repräsentativ für die aktuelle Gesamtleberfunktion gelten kann. Bei der Messung der Leberfunktion mittels LiMAX-Tests während der Lebertransplantation von fünf Patienten konnte keine Verstoffwechslung des applizierten  $^{13}\text{C}$ -Methacetin in der anhepatischen Phase gemessen werden, wohingegen nach Reperfusion der transplantierten Leber ein Anstieg des Methacetin-Metabolismus messbar war. Dies spricht für die leberspezifische Verstoffwechslung der verwendeten LiMAX-Testsubstanz  $^{13}\text{C}$ -Methacetin [34]. Dabei entsteht Paracetamol und  $^{13}\text{CO}_2$ , welches kontinuierlich in der Ausatemluft mittels nichtdispersiver isotopenselektiver Infrarotspektroskopie (NDIRS) detektiert werden kann. Zur Bestimmung des LiMAX-Wertes wird die maximale Veränderung des  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Verhältnisses im Vergleich zur Ausgangslage vor Substratinjektion (maximaler *delta over baseline* Wert), normiert auf das *Pee Dee belemnite limestone* (PDB) Standardverhältnis von  $^{13}\text{C}$  zu  $^{12}\text{C}$ , ermittelt. Durch Multiplikation mit der approximierten  $\text{CO}_2$ -Produktionsrate kann das zusätzlich gebildete  $^{13}\text{CO}_2$  in mmol berechnet und unter Verwendung der molaren Masse der Testsubstanz  $^{13}\text{C}$ -Methacetin auf die Umsatzrate pro Zeit am Enzym in  $\mu\text{g}$  geschlossen werden. Der LiMAX-Wert wird auf das Körpergewicht in kg der Testperson normiert (Formel zur Berechnung des LiMAX-Wertes siehe Abschnitt 2.3). In einer Kohorte von 86 lebergesunden Probanden wurde ein LiMAX-Wert  $> 315 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  als unterer Normwert der Leberfunktion ermittelt [35].

Der LiMAx-Test besitzt gegenüber den oben beschriebenen Verfahren zur Leberfunktionsanalyse eine Reihe von Vorteilen, die seine Überführung in die klinische Anwendung begünstigen. Zunächst ist der Test nicht-invasiv, standardisiert und einfach in der Durchführung, der ohne wesentliche Risiken oder Nebenwirkungen für den Patienten erfolgen kann. Zudem konnte durch die gezielte Verwendung von intravenös applizierbarem  $^{13}\text{C}$ -Methacetin anstelle oraler Testsubstanzen der Einfluss der gastrointestinalen Passagezeit und Resorption auf das Testergebnis beseitigt werden [36]. Darüber hinaus erfolgt die hepatische Metabolisierung von  $^{13}\text{C}$ -Methacetin im Gegensatz zu anderen Substanzen nur in einem enzymatischen Schritt. So wird das Substrat schnell umgesetzt und es kann verlässlich auf die adressierte Enzymreaktion rückgeschlossen werden [37]. Letztlich erlaubt der LiMAx-Test eine dynamische Messung der Leberfunktion in Echtzeit und ist als Gerät dank seiner Kompaktheit mobil am Patientenbett einsetzbar.

### 1.2.2 Einsatz des LiMAx in der Leberchirurgie

Das Hauptanwendungsgebiet des LiMAx-Tests stellt aktuell die Leberchirurgie dar, wo er präoperativ zur Einschätzung der Operabilität Verwendung findet. Daneben existieren mit der Transplantations- [38-40] und Intensivmedizin [41-43] sowie der Hepatologie [44-46] weitere wichtige klinische Anwendungsmöglichkeiten.

Entsprechend einem von Stockmann *et al.* erarbeiteten Algorithmus wird der LiMAx-Test präoperativ bei Verdacht auf vorbestehender Leberfunktionsstörung des Patienten oder bei chirurgischer Resektion von mehr als zwei Lebersegmenten empfohlen [47]. Bei eingeschränkter Leberfunktion (LiMAx 140 - 315  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) oder ausgedehnter Resektion von mehr als vier Lebersegmenten sollte ergänzend eine sogenannte Volumen-Funktionsplanung durch Kombination des LiMAx-Tests mit einem schnittbildbasierten radiologischen Verfahren (CT, MRT) erfolgen. Dabei wird im Rahmen der volumetrischen Analyse der Schnittbilder das Lebergesamtvolumen ( $V_{\text{Ges}}$ ), das Tumolvolumen ( $V_{\text{Tumor}}$ ) wie auch das zu erwartende Restlebervolumen (*future liver remnant volume*, FLRV) entsprechend der geplanten chirurgischen Resektion bestimmt. In Kombination mit dem LiMAx-Wert kann dann letztlich auf die theoretisch postoperativ zu erwartende, residuale Leberfunktion (*future liver remnant function-LiMAx*, FLRF-LiMAx) geschlossen werden. Im Rahmen der aktuellen Standardmethode zur Berechnung der FLRF-LiMAx wird zunächst das sogenannte funktionelle Lebervolumen durch Subtraktion des

Tumorvolumens vom Lebergesamtvolumen berechnet. Anschließend wird die prozentuale Volumenreduktion durch die Operation ermittelt, indem das FLRV mit dem funktionellen Lebervolumen, nicht mit dem Lebergesamtvolumen in Beziehung gesetzt wird. Letztlich wird dann durch Übertragung der ermittelten prozentualen Volumenreduktion auf den präoperativen LiMAx-Wert die FLRF-LiMAx bestimmt (LiMAx-Volumetrieformel siehe Abschnitt 2.10).

Bei einer errechneten FLRF-LiMAx von  $> 100 \mu\text{g/kg/h}$  kann die Operation als sicher durchführbar eingestuft werden. Eingriffe mit einer erwarteten FLRF-LiMAx von  $80 - 100 \mu\text{g/kg/h}$  sind als kritisch einzustufen, zusätzliche präoperative Verfahren wie eine portalvenöse Embolisation (PVE) oder alternative Therapien sollten erwogen werden. Bei einer FLRF-LiMAx  $< 80 \mu\text{g/kg/h}$  sollte von einer operativen Therapie gänzlich abgesehen werden (38,1 % postoperative Mortalität) [47].

Vergleichende Messungen der Leberfunktion prä- und postoperativ erbrachten den Nachweis, dass die vorgeschlagene Formel zuverlässig die FLRF-LiMAx vorhersagen kann. Stockmann *et al.* konnten in einer 2009 veröffentlichten Arbeit zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen der präoperativ, mittels Volumen-Funktionsplanung vorhergesagten FLRF-LiMAx und der tatsächlichen innerhalb von 24 h postoperativ gemessenen Leberfunktion besteht ( $r = 0,85$ ,  $p < 0,001$ ) [34]. Im Mittel lag in der Studie eine Differenz ( $\pm$  Standardabweichung) von  $-36 (\pm 43) \mu\text{g/kg/h}$  zwischen präoperativ vorhergesagtem und postoperativ gemessenem LiMAx-Wert. Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch eine Studie von Malinowski *et al.*, in der intra- und postoperative Lebergewebeschäden durch Ischämie oder Hypoperfusion als mögliche Ursachen der beobachteten Differenz diskutiert wurden [48].

Hinsichtlich des klinischen Nutzens zeigte eine retrospektive Auswertung von Patientendaten, dass die mittels LiMAx-Test und Bildgebung ermittelte residuale postoperative Leberfunktion prädiktiven Wert sowohl für unmittelbar postoperativ auftretende Komplikationen als auch für das Posthepatektomie-Leberversagen besitzt [49]. Neben diesem rein deskriptiven Zusammenhang konnte darüber hinaus der Nachweis erbracht werden, dass der Einsatz des LiMAx-Tests tatsächlich zur Verbesserung der Patientenversorgung in der Leberchirurgie beiträgt. In einer retrospektiven Analyse von 1170 Patienten, die sich zwischen 2006 und 2011 einer elektiven Hepatektomie unterzogen, konnte gezeigt werden, dass nach Implementation

des LiMAx-Algorithmus die Rate an postoperativem Leberversagen sowie der damit verbundenen Mortalität gesenkt werden konnte [50]. In einer kürzlich veröffentlichten prospektiven randomisierten kontrollierten Studie wurden die Auswirkungen einer perioperativen Verwendung des LiMAx-Tests auf das postoperative Outcome bei Patienten mit hepatischen Tumoren untersucht [51]. Dazu wurde die Interventionsgruppe prä- und postoperativ mit dem LiMAx-Test untersucht und mit einer Kontrollgruppe ohne LiMAx verglichen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden in der Interventionsgruppe signifikant mehr Patienten direkt postoperativ auf eine Normalstation verlegt, traten postoperativ weniger schwere Komplikationen auf und war insgesamt die Krankenhausverweildauer kürzer, was auf einen positiven Effekt des LiMAx-Einsatzes in der Leberchirurgie hindeutet.

Bei der aktuellen Berechnungsmethode der FLRF-LiMAx wird nun angenommen, dass der LiMAx-Test ausschließlich die Funktion des nicht-tumorösen Leberparenchyms erfasst. Die potenzielle CYP1A2-Aktivität hepatischer Läsionen wird bei der Berechnung nicht berücksichtigt [47], da die prozentuale Volumenreduktion allein anhand des tumorfreien Leberparenchyms bestimmt wird. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei Tumorgewebe um dedifferenziertes Gewebe handelt, das die genuinen Funktionen des Ausgangsgewebes verloren hat, ist das aktuelle Vorgehen zumindest teilweise nachvollziehbar. Nichtsdestotrotz ist das Vorhandensein von Restaktivität im Tumorgewebe nicht ausgeschlossen und könnte eine weitere mögliche Ursache für die beobachtete Differenz zwischen präoperativ berechneter und postoperativ gemessener Leberfunktion sein. Im Rahmen der oben beschriebenen Standardberechnung würde vorhandene Restaktivität im Tumor zur systematischen Überschätzung der individuellen Leberfunktion führen, da der Anteil des tumorösen Gewebes am Methacetin-Gesamtmetabolismus nicht berücksichtigt und der LiMAx-Wert fälschlicherweise ausschließlich als Ausdruck der metabolischen Aktivität des nicht-tumorösen Parenchyms angesehen wird. Letztlich könnte so auf Basis der fehlerhaften Volumen-Funktionsplanung die Indikation zur Leberteilresektion bei einem Patienten mit eigentlich zu geringer Leberfunktion gestellt werden, was unweigerlich mit einem erhöhten Risiko für ein postoperatives Leberversagen verbunden wäre. Eine systematische Untersuchung der CYP1A2-Aktivität in Lebertumoren ist also notwendig, um die Vorhersagegenauigkeit der präoperativen Volumen-Funktionsplanung zu steigern und

damit die für eine chirurgische Resektion in Frage kommenden Patienten zuverlässiger zu selektieren.

### 1.2.3 Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)

CYP1A2 nimmt bei der Klärung des aufgeworfenen Problems eine Schlüsselrolle ein, da es durch die Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -Methacetin als Testsubstanz spezifisch durch den LiMAX-Test adressiert wird. Daher sollen nachfolgend kurz wichtige Charakteristika des Enzyms skizziert werden.

Die Cytochrom P450 (CYP) Enzymfamilie ist neben anderen Funktionen an den Phase-I-Reaktionen der Biotransformation beteiligt, die aufgenommene Stoffe durch chemischen Umbau hauptsächlich in der Leber für die Exkretion aus dem Körper vorbereiten. Im humanen Genom wurden bis heute 57 Gene identifiziert, die für CYP-Enzyme codieren [52]. Dabei sind vor allem fünf CYP-Enzyme (CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 und CYP1A2) von herausragender Bedeutung, da sie für etwa 90 % der Biotransformation von Pharmaka verantwortlich sind [53].

Während viele CYP-Enzyme in mehreren Organen gleichzeitig exprimiert werden, wird CYP1A2 organspezifisch nur in der Leber exprimiert [54]. CYP1A2 macht etwa 13 % der in der Leber exprimierten CYP-Enzyme aus und ist dabei an der Metabolisierung von etwa 8 - 10 % aller in der Leber umgesetzten Pharmaka (z. B. Clozapin, Theophyllin) beteiligt, wobei der Anteil von CYP1A2 am Gesamtumsatz eines Medikaments jeweils unterschiedlich ausgeprägt ist [53, 55]. Die Enzymaktivität von CYP1A2 weist große interindividuelle Variationen auf [54, 56]. Dafür werden sowohl genetische als auch biologische Faktoren sowie Umwelteinflüsse verantwortlich gemacht.

Mehr als 30 verschiedene Allele des CYP1A2-Gens wurden bis heute identifiziert. Dabei unterscheiden sich die Allele hauptsächlich durch Veränderung der Nukleotidsequenz in der 5'-flankierenden Region und im Intron 1 [57]. Daneben existieren nicht-synonyme, mit einer Veränderung der Aminosäuresequenz des CYP1A2-Proteins verbundene Polymorphismen, die in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von < 1 % vorkommen [55]. Eine Metaanalyse von 2017 untersuchte den Effekt von 6 verschiedenen genetischen Polymorphismen auf die CYP1A2-Aktivität, erfasst durch Messung von Koffein-Abbauprodukten im Urin oder Speichel nach dessen oraler Applikation. Signifikant höhere Enzymaktivitäten im Vergleich zu den Studienteilnehmern mit dem Wildtyp-Gen

zeigten sich dabei nur bei Teilnehmern, die homozygot oder heterozygot für den synonymen, im Intron 1 lokalisierten -163C>A-Polymorphismus (*Reference SNP Cluster ID: rs762551*) waren [57]. Dieselbe Arbeitsgruppe veröffentlichte 2019 eine Metaanalyse mit Fokus auf Studien, die pharmakokinetische Parameter nach Verabreichung von CYP1A2-Substraten, in dem Fall Antipsychotika, untersuchten. Bei keinem der betrachteten genetischen Polymorphismen konnte eine signifikant veränderte CYP1A2-Aktivität festgestellt werden [58]. Zudem gelang es bisher noch nicht, anhand eines bekannten Polymorphismus oder Haplotyps des CYP1A2-Gens unzweifelhaft auf den daraus resultierenden Phänotyp (hohe vs. niedrige Aktivität) zu schließen, wie dies z. B. für CYP2D6 möglich ist [59]. Die bisher bekannten genetischen Variationen im CYP1A2-Gen können daher nur eingeschränkt die großen interindividuellen Aktivitätsunterschiede erklären und die funktionelle Bedeutung vieler genetischer Polymorphismen im CYP1A2-Gen bleibt deshalb vorerst ungeklärt [55].

Hinsichtlich des Einflusses von Geschlechtsunterschieden auf die CYP1A2-Aktivität gibt es widersprüchlich Angaben. Während manche Autoren eine geringere Aktivität in Frauen berichten [60-62], können andere Studien keinen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen feststellen [63-65]. Daneben scheint die CYP1A2-Aktivität eine gewisse ethnische Variabilität aufzuweisen, so konnte beispielsweise gezeigt werden, dass gesunde schwedische Probanden eine höhere CYP1A2-Aktivität haben als koreanische Studienteilnehmer mit identischem CYP1A2-Genotyp und vergleichbaren Umwelteinflüssen [66].

Umweltfaktoren wie das Rauchen sind als potente Induktoren des CYP1A2-Enzyms beschrieben worden [67, 68]. Des Weiteren wurden Nahrungsmittel wie Pflanzen aus der Familie der Kreuzblütler (Brokkoli, Rosenkohl) und über Kohle gegrilltes Fleisch als CYP1A2-Induktoren identifiziert [69, 70]. Zudem interagiert eine Reihe von Medikamenten mit der Aktivität von CYP1A2, wobei sowohl Induktoren (z. B. Omeprazol, Insulin) als auch Inhibitoren (z. B. Ciprofloxacin, Fluvoxamin) bekannt sind. Eine umfassende Übersicht bekannter Substrate, Induktoren und Inhibitoren bieten unter anderem die *Drug Interactions Flockhart Table* der Universität Indiana, USA [71] sowie zahlreiche Übersichtsarbeiten zum Thema [52, 72].

#### 1.2.4 Veränderung der CYP1A2-Aktivität bei Lebererkrankungen

In der Literatur existieren bereits einige Studien, die die Veränderung der CYP1A2-Expression und Aktivität bei Lebererkrankungen untersucht haben und so zur Klärung des oben aufgeworfenen Problems beitragen können. Bekannt ist, dass pathologische Prozesse wie Tumorgenese oder auch Fibrosierung CYP1A2 beeinflussen. So konnte bereits *in vitro* mittels Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) gezeigt werden, dass HCC-Gewebe im Vergleich zu nicht-tumorösem Lebergewebe deutlich niedrigere Mengen an CYP1A2-mRNA enthält, wenngleich auch im HCC-Gewebe mRNA detektierbar bleibt [73, 74]. Auch ist bekannt, dass in Patienten mit chronischer Hepatitis C die Menge an CYP1A2-mRNA negativ mit dem Grad der Fibrosierung korreliert. In Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose wird also signifikant weniger CYP1A2-mRNA in der Leber synthetisiert im Vergleich zu Patienten mit gesundem Leberparenchym bzw. milder Fibrose [75, 76].

Hinsichtlich der tatsächlich gebildeten Proteinmenge im Lebergewebe konnte durch Massenspektroskopie-basierte quantitative Proteomanalyse gezeigt werden, dass CYP1A2 signifikant niedriger im HCC-Gewebe synthetisiert wird. Naboulsi *et al.* analysierten 19 gepaarte (nicht-tumorös vs. HCC) Gewebeproben von Patienten mit verschiedenen HCC-Ätiologien (NAFLD, Hepatitis B und C, unbekannt) und fanden eine 3fach höhere CYP1A2-Proteinmenge im nicht-tumorösen Gewebe [77]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Gao *et al.* konnte eine 10fach höhere Menge von CYP1A2 im nicht-tumorösen Gewebe von 14 HCC-Patienten gemessen werden, deren Tumoren mit Hepatitis B assoziiert waren. Diese differenzielle Proteinexpression von CYP1A2 konnte zudem experimentell mittels Western Blot bestätigt werden [78]. Yan *et al.* untersuchten parallel sowohl die Proteinmenge als auch die CYP1A2-Aktivität und konnten bestätigen, dass HCC-Gewebe sowohl eine deutlich reduzierte Proteinmenge als auch CYP1A2-Aktivität im Vergleich zum peritumoralen Gewebe aufweist [79]. Dabei wurden chirurgisch resezierte nicht-tumoröse und tumoröse Gewebe von 26 chinesischen HCC-Patienten untersucht, deren Tumoren ebenfalls mit Hepatitis B assoziiert waren. Proteomanalysen von Gewebe aus zirrhotischer Leber im Vergleich zu gesundem Lebergewebe konnten die Ergebnisse der Studien zur Menge an CYP1A2-mRNA bestätigen mit signifikant niedrigerer Proteinmenge in Gewebeproben aus Patienten mit Leberzirrhose [80]. Beim Vergleich der CYP1A2-Aktivität von 105 Lebergewebeproben ohne jegliche hepatische Fibrosierung mit 102 nicht-tumorösen fibrotischen und zirrhotischen Gewebeproben von

Patienten mit Hepatitis B bzw. C konnten Zhou *et al.* zwar keinen Unterschied im Aktivitätslevel zwischen Fibrose und Zirrhose feststellen, dennoch fand sich in der Studie eine signifikante Abnahme der CYP1A2-Aktivität sowohl der fibrotischen als auch der zirrhotischen Gewebe im Vergleich zu den gesunden Proben [81]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass wie im HCC-Gewebe eine fortschreitende hepatische Fibrosierung sowohl mit einer Abnahme der CYP1A2-Proteinexpression als auch der Aktivität einhergeht. Auch *in vivo* konnte bei Patienten mit Leberzirrhose nach Applikation von spezifisch durch CYP1A2 verstoffwechseltem Koffein eine geringere Konzentration von dessen Abbauprodukten gemessen werden. Dies deutet übereinstimmend mit den oben beschriebenen Daten auf eine geringere CYP1A2-Aktivität in Leberzirrhose hin [82, 83]. Experimentelle Daten zu CYP1A2 in hepatozellulären Adenomen (HCA) [84] und kolorektalen Lebermetastasen (CRLM) [85] stehen bisher nur sporadisch zur Verfügung.

Zusammenfassend deuten die bisher verfügbaren Daten darauf hin, dass Lebertumoren eine reduzierte, aber doch vorhandene CYP1A2-Expression und Aktivität aufweisen. Die aktuelle Berechnungsmethode der FRLF-LiMAX wäre damit potenziell fehlerbehaftet. Eine systematische Untersuchung der Expressions- und Aktivitätslevel von CYP1A2 im tumorösen und nicht-tumorösen Lebergewebe mit spezifischem Fokus auf deren Einfluss auf das LiMAX-Testergebnis sowie die präoperative Volumen-Funktionsplanung als gegenwärtiges Haupteinsatzgebiet des Tests ist bis heute nicht erfolgt. Diese wichtige Fragestellung sollte daher im ersten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dabei sollte sich die Untersuchung beschränken auf das HCC als häufigsten malignen Primärtumor der Leber [5], auf CRLM als insgesamt sehr häufige maligne Lebertumoren in der klinischen Routine [86] und auf das HCA als relevante gutartige Lebererkrankung.

### **1.3 Erfassung strukturell-mechanischer Lebergewebeeigenschaften**

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen strukturell-mechanischen Lebergewebeeigenschaften und dem LiMAX-Test genauer untersucht werden. Hierfür sollte ein neues elastographisches Verfahren Verwendung finden, weshalb im Folgenden zunächst Techniken zur Erfassung strukturell-mechanischer Gewebeeigenschaften vorgestellt werden.

Gemeinsames Merkmal chronischer Lebererkrankungen unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache ist eine chronische Inflammation, die letztlich zu einer

qualitativen und quantitativen Veränderung der Extrazellulärmatrix (EZM) in der Leber, der sogenannten Fibrosierung, mit dem oben beschriebenen Funktionsverlust führt [87]. Einerseits ändert sich qualitativ die Zusammensetzung der EZM durch abweichende Expressionsmuster spezifischer EZM-Komponenten im Vergleich zur gesunden Leber [88]. Andererseits ist rein quantitativ eine Zunahme der EZM charakteristisch. Die damit einhergehenden Veränderungen strukturell-mechanischer Gewebeeigenschaften sind messbar, was deren Einschätzung neben der Beurteilung der Leberfunktionskapazität zu einem Grundpfeiler der Diagnosefindung, Verlaufsbeurteilung und Prognoseabschätzung bei chronischen Lebererkrankungen macht.

Traditionell wurde die Leberbiopsie als Referenzmethode zur Beurteilung der Leberfibrose angesehen. Vorteilhaft ist dabei, dass über eine Einschätzung der Fibrosierung hinaus Informationen über das Ausmaß hepatischer Inflammation, Verfettung sowie zur möglichen Ursache der zugrundeliegenden Lebererkrankung gewonnen werden können. Wenn auch in bestimmten klinischen Situationen unentbehrlich, geht die Leberbiopsie mit einer Reihe beträchtlicher Limitationen und potenzieller Risiken für den Patienten einher [89]. Bei einer Biopsie wird nur ein kleiner Anteil (etwa 1/50 000) der Gesamtleber untersucht, was gerade im Rahmen diffuser Lebererkrankungen unter Umständen nicht repräsentativ für die Erkrankung ist und als Stichprobenfehler bezeichnet wird (engl. *sampling error*). In einer Studie an 124 Patienten mit chronischer Hepatitis C, bei denen simultan eine laparoskopische Biopsie aus beiden Leberlappen entnommen wurde, ergab sich bei 41 Patienten (33 %) ein Unterschied von mindestens einem Fibrosegrad zwischen den beiden Biopsien und bei 18 Patienten (14,5 %) wäre bei alleiniger Beurteilung einer der beiden Biopsien eine Leberzirrhose übersehen worden [90]. Darüber hinaus kann die pathologische Befundung der Biopsie von subjektiven Faktoren beeinflusst werden, was zu einer möglichen Diskordanz zwischen verschiedenen Untersuchern, der sogenannten Interobserver-Variabilität, führen kann. Zudem erlaubt die Leberbiopsie aufgrund ihrer Invasivität immer nur einen schnappschussartigen Einblick und keine dynamische Verlaufsbeurteilung der fortschreitenden Fibrosierung [91]. Letztlich stellt die Biopsie für den Patienten eine invasive Prozedur mit potenziell lebensbedrohlichen Komplikationen dar [92].

### 1.3.1 Nicht-invasive Diagnostik der Leberfibrose

Vor dem Hintergrund dieser Limitationen wurden zahlreiche nicht-invasive Methoden zur Einschätzung der Leberfibrose entwickelt, die sich grundsätzlich in zwei Gruppen einteilen lassen: serologische Fibrosemarker und radiologische Verfahren.

Es gibt viele Laborparameter, die als Einzelwert oder in Kombination mit dem Grad der hepatischen Fibrose korrelieren. Als indirekt werden Marker bezeichnet, die die Abnahme der hepatischen Funktion widerspiegeln, ohne wie direkte Marker den Metabolismus der EZM zu erfassen. Dazu gehören unter anderem Albumin, Bilirubin, INR aber auch Thrombozyten, Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) oder  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT). Eine vor allem bei Patienten mit chronischer Hepatitis C intensiv untersuchte Kombination zweier indirekter Parameter ist der *Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index* (APRI) bei dem der AST-Wert und die Thrombozytenzahl berücksichtigt werden (Berechnung siehe Abschnitt 2.5.1) [93]. Der *Fibrosis-4 Index* (FIB-4), der neben der AST und den Thrombozyten noch die ALT und das Alter des Patienten berücksichtigt, stellt einen weiteren nicht-kommerziellen serologischen Score dar [94]. Ein nur kommerziell erhältlicher Test zur Erfassung des Fibrosegrades ist z. B. der FibroTest, der alters- und geschlechtsgewichtet fünf Laborparameter miteinander kombiniert ( $\alpha$ -2-Makroglobulin, Apolipoprotein A1, Bilirubin,  $\gamma$ -GT, Haptoglobin) [95]. Direkte Fibrosemarker sind im Blut messbare Stoffwechselprodukte aus der Synthese oder dem Abbau der EZM bzw. damit verbundener Zytokine, wobei auch diese zu klinischen Scores kombiniert wurden (z. B. FibroSpect II, *European Liver Fibrosis panel*) [96]. Nichtsdestotrotz ist keiner der verwendeten Laborwerte leberspezifisch und kann so auch potenziell durch extrahepatische Prozesse verfälscht werden. Zudem gehören gerade die direkten Fibrosemarker nicht zu den Standardlaboruntersuchungen und sind somit besonders bei nur kommerziell erhältlichen Tests mit zusätzlichen Kosten verbunden [91].

Radiologische Techniken zur Fibrosedetektion sind neben den konventionellen Bildgebungsmodalitäten (Ultraschall, CT, MRT) vor allem elastographische Verfahren, die strukturell-mechanische Gewebeeigenschaften erfassen können. Die Elastographie beruht im Allgemeinen auf einer Gewebedeformation durch mechanische Kraftausübung und der bildgestützten Detektion der Gewebeantwort mit Ultraschall oder MRT, woraus sich strukturell-mechanische Gewebeeigenschaften ableiten lassen, die mit rein

konventioneller Bildgebung nicht zu erfassen sind. Diese Eigenschaften werden direkt beeinflusst vom Anteil der EZM im untersuchten Gewebe und unter dem Begriff der Lebersteifigkeit subsumiert. Nichtsdestotrotz beeinflusst auch noch eine Reihe anderer Faktoren wie Inflammation, Steatose, Cholestase oder Leberperfusion die Lebersteifigkeit, was bei dessen Erfassung berücksichtigt werden sollte [97].

Es existiert eine ganze Reihe von ultraschallbasierten Elastographieverfahren, die sich grundsätzlich durch die Art und Weise der Gewebestimulation sowie der erfassten viskoelastischen Parameter unterscheiden. Aufgrund der Vielfalt sind über die letzten Jahre umfassende Reviews und Lehrbuchartikel zum Thema erschienen [97-99]. Im Wesentlichen lassen sich zwei große Gruppen unterscheiden: *strain imaging* und Scherwellenelastographie (*shear wave elastography*). Beim *strain imaging* wird die kompressionsbedingte axiale Verformung des Gewebes erfasst und farbkodiert in Form einer Karte der Gewebedeformation, dem sogenannten Elastogramm, dargestellt. Durch fehlende Information über das Ausmaß der initialen Gewebeverformung kann nur eine qualitative Einschätzung der Gewebesteifigkeit mit Unterscheidung von harten und weichen Geweberegionen erfolgen, eine Quantifizierung viskoelastischer Eigenschaften ist nicht möglich. Die Gewebestimulation erfolgt beim *strain imaging* direkt durch den Schallkopf, intrinsisch durch zyklische kardiovaskuläre oder respiratorische Bewegungen oder mittels eines fokussierten Ultraschallpulses, der sogenannten *acoustic radiation force impulse* (ARFI)-Anregung [100, 101].

Bei der Scherwellenelastographie hingegen handelt es sich um ein quantitatives Verfahren. Grundlage dieser Technik ist die Erzeugung mechanischer Schwingungen in Form von Scherwellen mit einer Geschwindigkeit von wenigen m/s. Die Messung der Ausbreitungsgeschwindigkeit dieser Scherwellen im Gewebe erfolgt durch Ultraschallwellen mit ihrerseits einer Geschwindigkeit von ca. 1500 m/s. Die Impulse zur Gewebestimulation können dabei auf vielfältige Weise erzeugt werden und nur kurzzeitig (transient) oder kontinuierlich (harmonisch) auf das Gewebe einwirken. Die Scherwellengeschwindigkeit ist dabei vor allem proportional zum Anteil der EZM im untersuchten Organ und kann so als Surrogatparameter für die Lebersteifigkeit gelten. Eine Fibrosierung des Leberparenchyms geht somit mit hohen Scherwellengeschwindigkeiten einher [99].

Die transiente Elastographie (TE, FibroScan) war das erste kommerzielle Verfahren, das zur quantitativen Messung der Lebersteifigkeit zur Verfügung stand und ist heute die am meisten untersuchte elastographische Technik [102]. Dabei wird das Lebergewebe transient von außen durch einen an den Schallkopf montierten Impulsgeber ausgelenkt und die Laufzeit der Scherwellen eindimensional durch Ultraschallwellen erfasst. Die Eindringtiefe des erzeugten Impulses und somit die Messtiefe der TE ist dabei auf ca. 8 cm begrenzt [99].

Sowohl die *point shear wave elastography* (pSWE) [103] als auch die *shear wave elastography imaging* Technik (SWEI) [104] basieren ebenfalls auf einer transienten Gewebestimulation, die jedoch bei beiden Verfahren durch die ARFI-Anregungstechnik über den Ultraschallkopf erfolgt. So sind sie im Gegensatz zur TE in ein konventionelles Ultraschallgerät integrierbar und erlauben durch simultane Darstellung des *brightness mode* (*B-Mode*) eine gezieltere Messung der Lebersteifigkeit. Bei der pSWE wird die Scherwellengeschwindigkeit punktförmig innerhalb einer gewählten *Region of Interest* (ROI) erfasst und rein als Zahlenwert ohne Elastogramm ausgegeben. Die SWEI ermöglicht hingegen neben der quantitativen Messung auch eine zweidimensionale farbkodierte Darstellung viskoelastischer Gewebeeigenschaften als Elastogramm innerhalb eines abgegrenzten Bereiches des *B-Mode*-Bildes (3 x 4 cm<sup>2</sup>). Beide Techniken sind durch die Eindringtiefe des Ultraschallpulses auf Messungen bis in eine Tiefe von ca. 8 cm begrenzt [105].

### 1.3.2 Zeitharmonische Elastographie (THE)

Die zeitharmonische Elastographie (*time-harmonic elastography*, THE) ist ein weiteres Verfahren der ultraschallbasierten Scherwellenelastographie, das an der Charité – Universitätsmedizin Berlin entwickelt wurde [106]. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Techniken wird die Leber harmonisch, also kontinuierlich über einen externen in die Untersuchungsliege integrierten Lautsprecher stimuliert. Das gesamte Gewebe kann somit zuverlässig mechanisch in Schwingung versetzt werden und die Tiefenauflösung ist allein von der Eindringtiefe der Ultraschallwellen abhängig. So sind bei der THE Scherwellenmessungen bis in eine Tiefe von 13 cm möglich, was im Vergleich zu den anderen Verfahren der Scherwellenelastographie eine bedeutende Steigerung darstellt. Insbesondere tief liegende Strukturen und Organe in Patienten mit

Adipositas oder Aszites sind so erstmalig mit einer elastographischen Messung erreichbar [99].

Darüber hinaus erfolgt bei der THE die Gewebestimulation multifrequent, d. h. zeitgleich mit mehreren Vibrationsfrequenzen im Bereich von 27 bis 56 Hz. Die Detektion der Scherwellen erfolgt wie bei den anderen Verfahren auch mit der Ultraschallsonde. Jede Anregungsfrequenz wird zunächst separat ausgewertet, um dann gewichtet in das finale Messergebnis integriert zu werden. Da das Ausbreitungsmuster und die Dämpfung der Scherwellen frequenzabhängig sind, erlaubt die parallele Erfassung mehrerer Frequenzen eine optimale Anpassung der Messung an die aktuellen Gewebeeigenschaften. Wie bei der SWEI-Technik wird schließlich ein Elastogramm erzeugt, das jetzt aber über das gesamte *B-Mode*-Bild dargestellt werden kann. Dies ist insbesondere bei diffusen Lebererkrankungen ein Vorteil sowohl gegenüber den punktuellen, eindimensionalen Messverfahren (TE, pSWE) als auch über dem bei der SWEI generierten kastenförmigen Elastogramm [107].

Nach erfolgreicher Testetablierung an gesunden Probanden konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass mittels THE Patienten mit Leberzirrhose durch erhöhte Scherwellengeschwindigkeit von gesunden Probanden abgegrenzt werden können [108]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Hudert *et al.* wurden 67 zum Teil stark übergewichtige Jugendliche mit NAFLD, bei denen eine Leberbiopsie indiziert war, gleichzeitig mittels THE untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Scherwellengeschwindigkeit stark signifikant mit dem erfassten Fibrosegrad korreliert und die THE selbst bei Adipositas zuverlässig zwischen gesundem Leberparenchym und moderater bzw. fortgeschrittener Fibrose unterscheiden kann [109]. Über die Messung der Lebersteifigkeit hinaus wurde die diagnostische Wertigkeit der THE zur Erfassung viskoelastischer Eigenschaften weiterer Organe untersucht, darunter Herz [110], abdominelle Aorta [111], Milz [107], Niere [112] und Gehirn [113].

Mit der THE steht somit ein elastographisches Verfahren zur Verfügung, das zuverlässig auch in tief liegenden Leberanteilen die Gewebesteifigkeit als wichtigen strukturell-mechanischen Gewebeparameter erfassen kann. Insbesondere im Hinblick auf eine Weiterentwicklung des LiMAx-Tests als diagnostisches Verfahren bei chronischen Lebererkrankungen ist die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen strukturell-mechanischen Veränderungen des Leberparenchyms, wie Steifigkeit und Fibrosegrad,

und den LiMAx-Werten von großer Bedeutung. Im Vordergrund steht dabei die Frage, wie sich die mit dem LiMAx-Test erfasste Leberfunktion mit zunehmender Lebersteifigkeit und Fibrosierung verändert. Letztlich kann daraus abgeleitet werden, ob der LiMAx-Test allein oder in Kombination mit der THE als diagnostisches Verfahren zur Fibrosedetektion geeignet ist.

Der Zusammenhang von Leberfibrose und LiMAx-Werten wurde kürzlich in einer retrospektiven Auswertung von 102 Patientenfällen mit chronischen Lebererkrankungen verschiedenster Ätiologie erstmals untersucht [46]. Dabei zeigte sich, dass die LiMAx-Werte stark negativ mit dem Grad der Fibrosierung des Lebergewebes korrelieren. Zudem war der LiMAx-Test in der Lage zwischen verschiedenen Fibrosegraden zu unterscheiden und ist somit potenziell als diagnostisches Werkzeug zur Fibrosedetektion geeignet. Eine direkte Untersuchung des Zusammenhangs von Lebersteifigkeit und LiMAx-Werten ist bisher noch nicht erfolgt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher, aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen, der LiMAx-Test erstmals gemeinsam mit der THE in einer Kohorte von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen Anwendung finden. Darüber hinaus sollten komplementär APRI und FIB-4 als etablierte, auf der Grundlage von Routinelaboruntersuchungen zu bestimmende serologische Fibrose-Scores miterfasst und histologisch der Fibrosegrad bestimmt werden, sodass eine umfassende Einschätzung sowohl funktioneller als auch strukturell-mechanischer Parameter erfolgen kann. Schließlich sollte so die Eignung des LiMAx-Tests allein oder in Kombination mit der THE für die Fibrosedetektion als ein mögliches klinisches Einsatzgebiet beider Verfahren untersucht werden.

### **1.4 Fragestellung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die CYP1A2-Aktivität im Lebergewebe und der Zusammenhang zwischen strukturell-mechanischen und funktionellen Lebergewebeeigenschaften im Progress chronischer Lebererkrankungen untersucht werden. Dadurch sollte einerseits die präoperative Volumen-Funktionsplanung als die aktuelle Hauptanwendung des LiMAx-Tests weiter verbessert sowie das Potential des LiMAx-Tests als diagnostisches Verfahren zur Fibrosedetektion eingeschätzt werden. Übergeordnetes Ziel beider Teiluntersuchungen war dabei jeweils die Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit des LiMAx-Tests.

Folgende Hypothesen wurden aufgestellt und sollten im Weiteren geprüft werden:

- 1) Die experimentell ermittelte CYP1A2-Aktivität im nicht-tumorösen Lebergewebe spiegelt sich in der klinisch erfassten Gesamtleberfunktion gemessen mit dem LiMAx-Test wider.
- 2) Hepatozelluläre Adenome und Karzinome sowie kolorektale Lebermetastasen besitzen eine veränderte CYP1A2-Aktivität im Vergleich zum umliegenden nicht-tumorösen Gewebe.
- 3) Durch Berücksichtigung der CYP1A2-Aktivität in tumorösen Lebergeweben ist eine präzisere Volumen-Funktionsplanung möglich.
- 4) Im Progress chronischer Lebererkrankungen besteht ein Zusammenhang zwischen strukturell-mechanischen und funktionellen Lebergewebeeigenschaften.
- 5) Der Zusammenhang zwischen Leberfibrose, Lebersteifigkeit und Leberfunktion lässt sich diagnostisch für die nicht-invasive Fibrosedetektion nutzen.

## 2 Material und Methoden

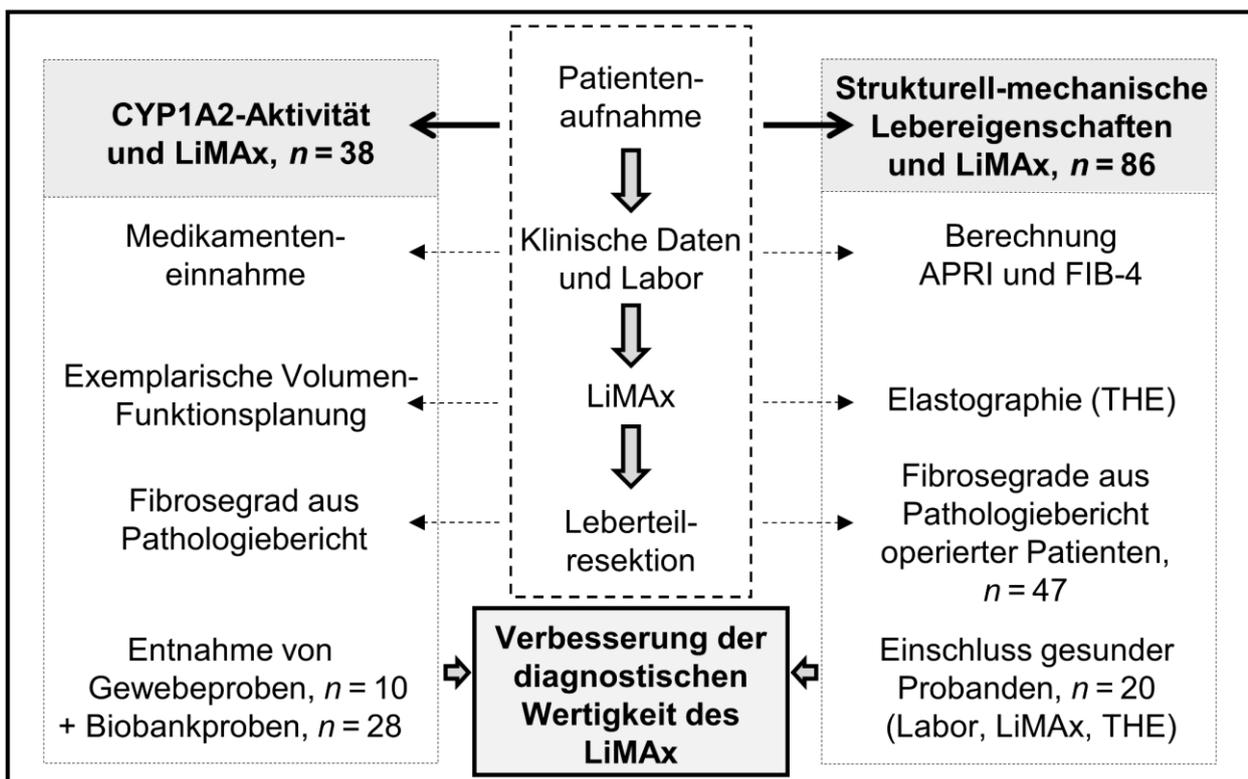
### 2.1 Studiendesign

Zur Beantwortung der Forschungsfragen wurde ein klinisch-zentriertes Forschungsdesign mit laborexperimentellen Anteilen gewählt. Es wurden Patienten mit Lebererkrankung rekrutiert, die sich für einen LiMAx-Test im Rahmen der Vorbereitung eines leberchirurgischen Eingriffs oder einer Evaluation zur Lebertransplantation an der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum und an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie Campus Virchow-Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin vorstellten. Probanden ohne anamnestische und laborchemische Hinweise auf eine bestehende Lebererkrankung wurden durch Aushänge und persönlichen Kontakt am Campus Virchow-Klinikum rekrutiert. Jeder Studienteilnehmer erteilte nach ausführlicher Aufklärung über Studienziele und Ablauf der Studie inklusive potenzieller Risiken sein schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme. Die Teilnehmerrekrutierung fand zwischen Januar 2017 und April 2018 statt. Die Untersuchung erfolgte im Rahmen des durch die zuständige Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bewilligten Ethikantrags EA1/140/15. Die Studie war Teil des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Liver Systems Medicine (LiSyM)-Projektes (Förderkennzeichen 031L0057) und wurde im Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS, ID: DRKS00016362) registriert. Eine Übersicht über die erhobenen Daten und Teilnehmerrekrutierung der vorliegenden Arbeit ist in Abbildung 1 dargestellt.

Zur Untersuchung des Einflusses der CYP1A2-Aktivität in Lebertumoren auf den LiMAx wurden 38 Patienten eingeschlossen, die präoperativ mittels LiMAx-Test untersucht worden sind und bei denen anschließend eine Leberteilresektion erfolgte. Voraussetzung war, dass operativ entnommenes, nicht-tumoröses Gewebe als auch Tumorgewebe für die Messung der Enzymaktivität zur Verfügung stand. Zusätzlich wurden Laborparameter und klinische Daten wie die Einnahme potenziell mit CYP1A2 interagierender Medikamente auf Basis der *Drug Interactions Flockhart Table* [71] erfasst. Zehn Patienten wurden prospektiv eingeschlossen und postoperativ jeweils Tumorgewebe als auch Gewebe aus einer makroskopisch nicht-tumorösen Region vom Resektat durch den diensthabenden Pathologen im Schnellschnittlabor abgetrennt. Dabei wurden die gewonnenen Proben für die Aktivitätsanalysen unverzüglich kryokonserviert (Lagerung

bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C) sowie für Gewebefärbungen in Formalin fixiert. Daneben wurden 28 gepaarte, kryokonservierte Gewebeproben (Tumor und nicht-tumoröses Gewebe) aus der Biobank für onkologische Fragestellungen an der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum für die Untersuchung der CYP1A2-Aktivität genutzt. Die Verwendung der Proben als auch klinischer Daten (Diagnosen, Laborparameter, LiMAx-Wert, Pathologiebefund) für onkologische Fragestellungen erfolgte im Rahmen des Ethikantrags EA1/292/16 der Charité – Universitätsmedizin Berlin und mit schriftlichem Einverständnis der Patienten.

Zur Analyse des Zusammenhangs zwischen strukturell-mechanischen Veränderungen des Leberparenchyms und den LiMAx-Werten wurden sowohl 66 Patienten als auch eine Vergleichsgruppe von 20 gesunden Probanden prospektiv rekrutiert und mittels LiMAx-Test und THE untersucht. Zudem wurden klinische Daten, Laborparameter und der Fibrosegrad bei Patienten, bei denen eine Leberteilresektion erfolgte, erfasst.



**Abbildung 1: Übersicht der Teilnehmerrekrutierung und erhobenen Daten der vorliegenden Untersuchung.** Zur Bearbeitung der beiden Themenschwerpunkte der vorliegenden Untersuchung (Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) und Liver M<sub>A</sub>ximum capacity (LiMAx)-Test; Struktur und LiMAx) wurden ausgehend vom Routineablauf eines leberchirurgisch vorgestellten Patienten (Mitte) klinische und histopathologische Daten erhoben und durch Zusatzuntersuchungen ergänzt. Eine Kontrollgruppe wurde zusätzlich rekrutiert. Übergeordnetes Ziel war dabei die Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit des LiMAx-Tests. APRI, *Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index*; FIB-4, *Fibrosis-4 Index*; n, Anzahl der untersuchten Teilnehmer; THE, zeitharmonische Elastographie.

### 2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Studienteilnehmer mussten bei Studieneinschluss volljährig sein, eine obere Altersgrenze gab es nicht. Beim Vorliegen mindestens eines der folgenden Kriterien konnte kein Studieneinschluss stattfinden:

- Patienten mit koronarer Herzkrankheit
- Patienten mit Fieber > 38,5 °C
- Leberchirurgischer Eingriff (ausgenommen Cholecystektomie) oder Lebertransplantation in der Patientenvorgeschichte
- Patienten mit porto-systemischem Shunt
- Bekannte Paracetamol-Unverträglichkeit

## 2.2 Material

Sämtliche im laborexperimentellen Teil dieser Arbeit verwendeten Antikörper, Assays, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Folgenden aufgelistet.

### 2.2.1 Antikörper

Bezeichnung [Artikelnummer]	Verdünnung	Wirtstier	Hersteller
Monoklonaler Anti-human-CYP1A2-Antikörper [NBP2-02563 8F1]	1:100	Maus	Bio-Techne
Polyklonaler Anti-Glutamin-Synthetase-Antikörper [NB110-41404]	1:200	Kaninchen	Bio-Techne
Anti-mouse Sekundärantikörper, Cy5-konjugiert [AB6563]	1:250	Ziege	Abcam
Anti-rabbit Sekundärantikörper, Alexa Fluor594-konjugiert [AB150080]	1:250	Ziege	Abcam

### 2.2.2 Assays

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
CYP1A2 Activity Assay Kit (Fluorometric)	K893-100	Biovision
Pierce bicinchoninic acid protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific

## 2.2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	D9542-5MG	Sigma-Aldrich Chemie
Acetonitril ROTISOLV	HN44.2	Roth
Dimethylsulphoxide (DMSO) ROTIPURAN	4720.4	Roth
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	10-013-CVR	Corning
Entellan Neu Schnelleindeckmittel	1079610100	Merck
Eosin 1 %, alkoholisch	11503.01000	Morphisto
Ethanol, vergällt 70, 80, 90, 96, 100 %	T913, 9474, T171, K928	Roth
Fetales Kälberserum	TMS-013-B	Merck Millipore
Formaldehydlösung 4 % (Roti-Histofix)	P087.3	Roth
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	1051740500	Merck
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	1027900250	Merck
Magermilchpulver	A0830,1000	AppliChem
PBS 10x Roti-CELL	9150.1	Roth
Penicillin-Streptomycin 10 000 U/ml	15140122	Gibco
Protein Standard, 200 mg/ml (BSA)	P5369-10ML	Sigma-Aldrich Chemie
tri-Natriumcitrat-dihydrat	A3901,1000	AppliChem
Trypan Blau	T8154-100ML	Sigma
Trypsin-EDTA 0,25 %	SM-2003-C	Merck Millipore
Tween 20	A4974,0500	AppliChem
Vectashield Eindeckmittel	H-1000	Vector Laboratories
Xylol	9713.3	Roth
Zitronensäure Monohydrat	C1909-1KG	Sigma-Aldrich Chemie

## 2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
96-Well-Platte; schwarz, Boden transparent, flach	165305	Thermo Fisher Scientific
Falcon 96-Well-Platte; transparent, Boden flach	353072	Corning
Falcon-Tube; konisches Reaktionsgefäße 15, 50 ml	352096, 352070	Corning
Flacon Zellkulturflasche 25, 75 cm <sup>2</sup>	353108, 353136	Corning
Kryoröhrchen CryoPure 1,8 ml	72.379	Sarstedt
PCR-Gefäß 0,2 ml	82-0620-A	Peqlab
Reagiergefäß 1,5 ml, 2 ml	72.706, 72.691	Sarstedt
Schraubbecher 100 ml	75.562.105	Sarstedt
Steriles Einmal-Sicherheitsskalpell	BA820SU	Aesculap
SuperFrost Plus Objektträger	03-0040	R.Langensbrinck
Wägebepapier	516-0318	VWR

### 2.2.5 Geräte

---

<b>Bezeichnung [Artikelnummer]</b>	<b>Hersteller</b>
Ausgießstation HistoStar	Thermo Fisher Scientific
Axio Observer Z1 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy
CO <sub>2</sub> -Inkubator CB-150	Binder
Einbettautomat Excelsior ES	Thermo Fisher Scientific
Feinwaage AC121S	Sartorius
FLUOstar OPTIMA Mikroplatten-Lesegerät	BMG LABTECH
Inverses Mikroskop, VisiScope IT415 PH	VWR
Mikro-Gewebe-Handhomogenisator mit Glas Stößel, 5ml [358111]	Wheaton
Multiparameter-Labormessgerät inoLab Multi 9310 IDS (pH-Messung)	Xylem Analytics
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld
Plattenschüttler IKA MTS electronic	IKA
Rotationsmikrotom RM2255	Leica Biosystems
Schwingmühle MM400	Retsch
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific
Wärmeschrank FD-53	Binder
Wärmeschrank UM300	Memmert
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf

---

### 2.3 LiMAx-Test

Die Leberfunktion wurde mit dem LiMAx-Test unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Fast Liver Investigation Packet (FLIP) 2.0 Infrarotspektrometers (Humedics GmbH, Berlin, Deutschland), wie in der Literatur beschrieben, ermittelt (Abbildung 2A) [34]. Patienten erhielten die Messung als Bestandteil der präoperativen Routinediagnostik während ihres stationären Aufenthaltes oder im Rahmen einer Evaluation zur Lebertransplantation. Bei allen gesunden Probanden wurde der LiMAx-Test nur für Studienzwecke durchgeführt. Nach einer Nahrungskarenz von mindestens drei Stunden wurde an der liegenden Testperson ein peripherer Gefäßzugang etabliert und die Atemmaske möglichst dicht über Mund und Nase platziert. Über einen Zeitraum von mindestens 10 min wurde nun der Basalwert des individuellen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-Verhältnisses vor Applikation der Testsubstanz bestimmt. Über den peripheren Gefäßzugang erfolgte dann die Injektion der <sup>13</sup>C-Methacetin-Lösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml gewichtsadaptiert (2 mg/kg Körpergewicht) im Bolus über maximal 1 min unmittelbar gefolgt von 20 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9 % zur Spülung des Venenverweilkatheters. Die Messung erfolgte nun kontinuierlich über maximal 60 min. Nach Festlegung der maximalen Veränderung des <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-Verhältnisses im Vergleich zum Basalwert am Ende der Messung wurde der LiMAx-Wert, wie in Abschnitt

1.2.1 beschrieben, automatisch berechnet und ausgegeben. Alle Teilnehmer wurden gebeten, vor dem LiMax-Test für mindestens 24 h nicht zu rauchen. Die Formel zur Berechnung des LiMax-Werts setzte sich wie folgt zusammen:

$$\text{LiMax} [\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}] = \frac{\text{DOB}_{\text{max}} \times R_{\text{PDB}} \times P \times M}{\text{KG}}$$

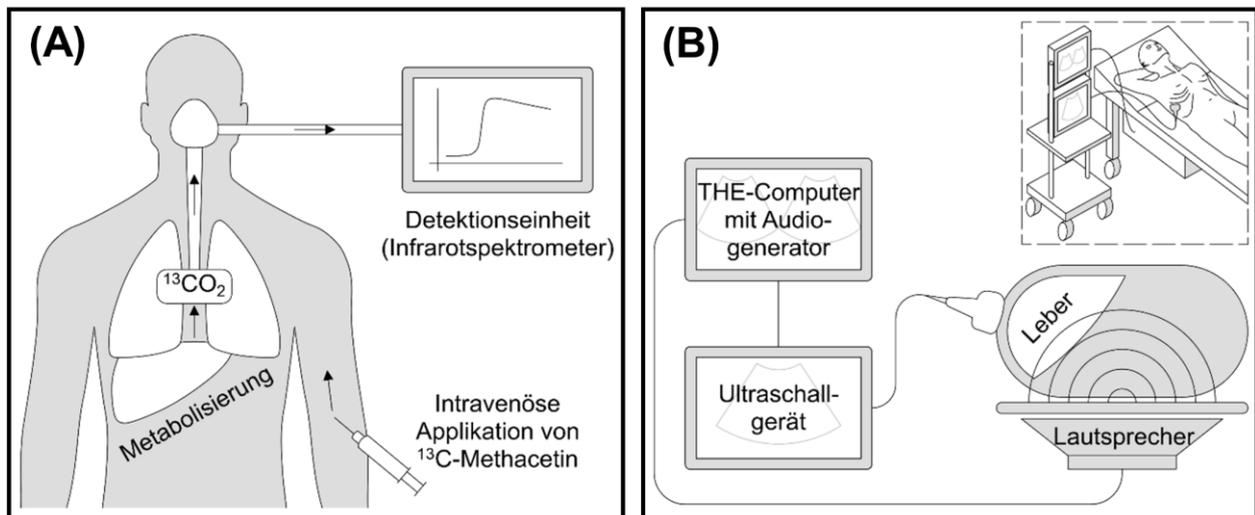
$\text{DOB}_{\text{max}}$  = Maximaler *delta over baseline* Wert

$R_{\text{PDB}}$  = *Pee Dee belemnite limestone* (PDB)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Ratio ( $R_{\text{PDB}} = 0,011237$ )

$P$  = Approximierte  $\text{CO}_2$ -Produktionsrate (mmol/h),  
( $300 \text{ mmol}/\text{h}/\text{m}^2 \times \text{Körperoberfläche } \text{m}^2$ )

$M$  = Molare Masse von  $^{13}\text{C}$ -Methacetin (g/mol)

$\text{KG}$  = Körpergewicht (kg)



**Abbildung 2: Darstellung der Grundprinzipien des Liver MAXimum capacity (LiMax)-Tests (A) und der zeitharmonischen Ultraschallelastographie (THE) (B).** LiMax-Test: Die  $^{13}\text{C}$ -Methacetin-Lösung wird intravenös appliziert und leberspezifisch von Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) zu Paracetamol und  $^{13}\text{CO}_2$  verstoffwechselt. Die dynamische Veränderung der  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Ratio in der Ausatemluft nach Injektion wird kontinuierlich in Echtzeit mittels Infrarotspektrometer erfasst und der LiMax-Wert berechnet (A). THE: Querschnitt durch den Oberbauch eines auf der speziellen Untersuchungs-liege platzierten Patienten. Durch einen Lautsprecher werden Scherwellen erzeugt, die mittels eines Ultraschallgerätes detektiert und durch den THE-Computer zu einem zweidimensionalen Leberelastogramm verarbeitet werden. Der Schallkopf wird dabei in einem Interkostalraum positioniert (B).

## 2.4 Zeitharmonische Elastographie (THE)

Die Scherwellengeschwindigkeit des Leberparenchyms wurde mittels THE unmittelbar vor oder nach dem LiMax-Test, wie in der Literatur beschrieben, bestimmt [107]. Das THE-System bestand dabei aus einer speziell entwickelten Patientenliege mit eingebautem Lautsprecher (GAMPT mbH, Merseburg, Deutschland), einem handelsüblichen Ultraschallgerät (SonixMDP, Ultrasonix, Scottsdale, USA) mit

2,5 MHz-Schallkopf (C5-2/60 konvex) und dem THE-Computer zur Datenanalyse (GAMPT mbH, Merseburg, Deutschland). Der Aufbau des verwendeten THE-Systems ist in Abbildung 2B schematisch dargestellt.

Alle Testpersonen wurden gebeten, mindestens zwei Stunden vor dem Test keine Nahrung oder Flüssigkeit mehr zu sich zu nehmen, da dies die THE-Messung beeinflussen kann [114]. Vor Testbeginn wurde der Teilnehmer auf dem Rücken liegend mit entspannter Bauchdecke und dem rechten Arm in maximaler Abduktion auf der Liege platziert, sodass die Interkostalräume maximal geweitet werden konnten. Die Ultraschallsonde wurde nun in einem Interkostalraum der rechten Körperhälfte platziert. Anhand des *B-Mode*-Bildes wurde vor jeder Messung der entsprechende Parenchymbereich auf seine Eignung für die Elastographie hin beurteilt. Zugrundeliegende Kriterien waren: größtmöglicher Anschnitt des Leberparenchyms bei guter Bildqualität, Abwesenheit großlumiger hepatischer Gefäße. Die Lautstärke des Lautsprechers wurde individuell festgelegt, sodass eine ausreichende Vibration im Gewebe vorhanden als auch für den Teilnehmer tolerierbar war. Die Amplitude der Gewebeauslenkung lag dabei im einstelligen Mikrometerbereich. Durch Verwendung niedriger Anregungsfrequenzen wird die Vibration als tiefes Brummen empfunden, wobei eine nur geringe akustische Belastung entsteht [115]. Während jeder Einzelmessung (Dauer 1 s) wurden die Teilnehmer gebeten, die Luft in Atemruhelage anzuhalten, wobei versucht werden sollte, eine tiefe Einatmung vor dem Atemstopp zu vermeiden. Die bei tiefer Einatmung stark gespannte Bauchdecke als auch die veränderte hepatische Durchblutung kann zur Verfälschung der Messung führen. Mindestens fünf Einzelmessungen von verschiedenen repräsentativen Leberanschnitten pro Teilnehmer mussten erfasst werden, damit die Messung als valide in die Auswertung übernommen wurde. So konnte ein möglichst großer Bereich der Leber untersucht und Auswirkungen möglicher Variationen der Einzelmessungen durch Atembewegung und lokale Besonderheiten auf das Gesamtergebnis minimiert werden. Die Messungen wurden gespeichert und mit dem Programm THEDview4x (GAMPT mbH, Merseburg, Deutschland) ausgewertet. Die Untersuchung eines Teilnehmers mittels THE nahm ca. 10 min in Anspruch.

Ergebnis der Messung war eine zweidimensionale farbkodierte Darstellung der Scherwellengeschwindigkeit über das gesamte *B-Mode*-Bild. Innerhalb dieses

Elastogramms wurde ein kreisförmiger ROI manuell ausgewählt und der Mittelwert der Scherwellengeschwindigkeit im ROI vom Programm ausgegeben. Der ROI-Schwellenwert wurde für alle Messungen auf 1,3 m/s festgelegt, sodass Werte unterhalb dieses Schwellenwertes automatisch von der Mittelwertbildung ausgeschlossen wurden. Scherwellengeschwindigkeiten unter 1,3 m/s spiegeln nicht sicher die tatsächlichen viskoelastischen Gewebeeigenschaften wider und führen so potenziell zu einer Verzerrung der Messergebnisse. Aus den Mittelwerten über den ROIs der Einzelmessungen wurde ein Mittelwert der Scherwellengeschwindigkeit pro Teilnehmer in m/s als Maß für die Gewebesteifigkeit gebildet.

## 2.5 Laborparameter und serologische Scores

Laborparameter wurden aus den im Rahmen des stationären Aufenthalts der Patienten erfolgten Laboruntersuchungen am Tag der LiMax- und THE-Messung und aus Laborbefunden von eigens für die Studie gewonnenen Proben entnommen. Probanden wurde vor dem LiMax-Test Blut abgenommen und zur Analyse an Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH gesandt. Folgende Laborparameter im Blut wurden erfasst: Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten, INR, aktivierte partielle Thromboplastinzeit, Kreatinin, Bilirubin (gesamt), ALT, AST, alkalische Phosphatase und  $\gamma$ -GT.

### 2.5.1 APRI und FIB-4

Die serologischen Scores APRI und FIB-4 wurden entsprechend den Originalpublikationen wie folgt berechnet:

$$\text{APRI} = \frac{\text{AST (U/l) / obere Normgrenze}}{\text{Thrombozytenzahl (} 10^9 \text{/l)}} \times 100 \quad [93]$$

$$\text{FIB-4} = \frac{\text{Alter (Jahren)} \times \text{AST (U/l)}}{\text{Thrombozytenzahl (} 10^9 \text{/l)} \times \sqrt{\text{ALT (U/l)}}} \quad [94]$$

## 2.6 Fibrosegrade

Der Grad der Fibrosierung des Lebergewebes wurde aus dem postoperativen Pathologiebefundbericht entnommen ( $n = 44$ ) oder durch zwei unabhängige Pathologen im Rahmen der Arbeit nachbestimmt ( $n = 24$ ). Als Ausgangsmaterial diente ausschließlich chirurgisch reseziertes Lebergewebe. Dabei wurde der Desmet und Scheuer Score verwendet, der die Fibrosierung der Leber in fünf Grade einteilt:

F0 = keine Fibrose; F1 = portale Faservermehrung, keine Septen; F2 = inkomplette oder komplette portoportale Fasersepten, erhaltene Architektur; F3 = septenbildende Faservermehrung mit Architekturstörung; F4 = Zirrhose [116].

### 2.7 Zellkultur

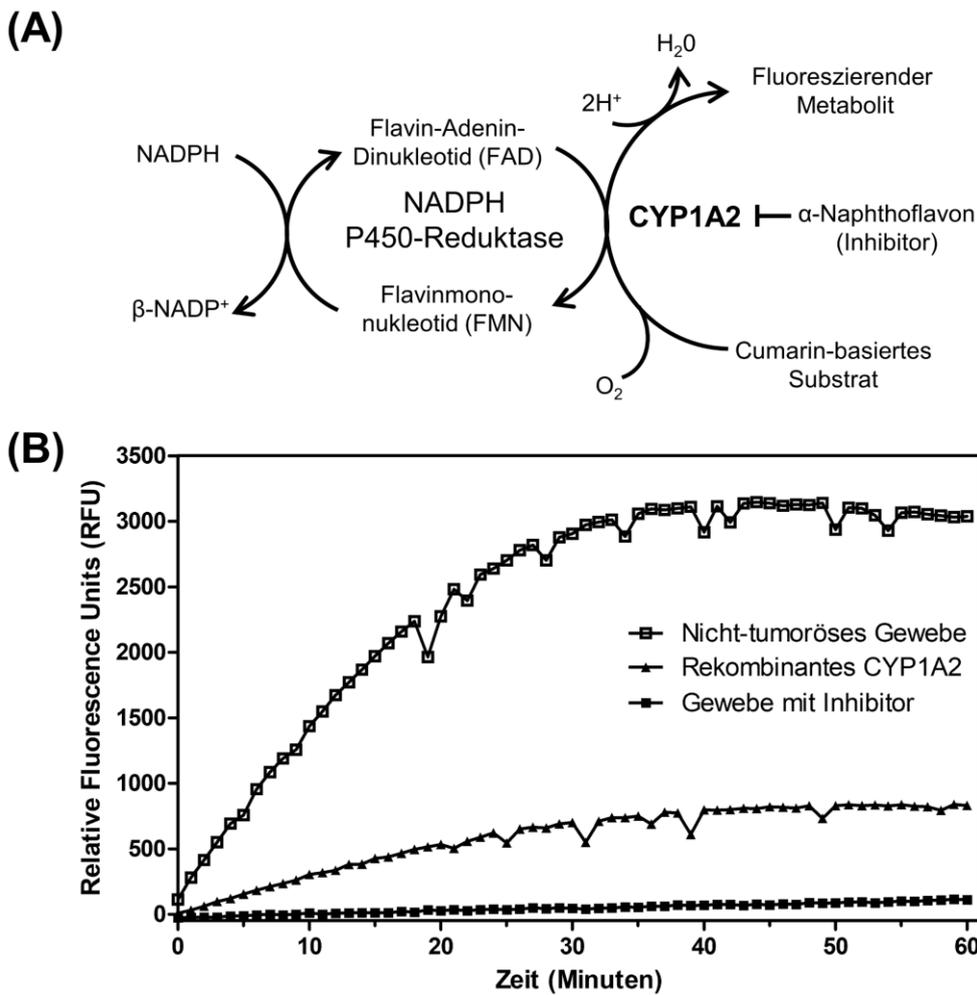
Zur Etablierung des CYP1A2-Aktivitätsassays wurde in Vorversuchen mit aus humanem Lebergewebe isolierten primären Hepatozyten sowie HepG2-Zellen (HCC-Zelllinie) in Kultur gearbeitet. Die HepG2-Zelllinie stand im Labor der Experimentellen Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung und exprimiert CYP1A2, weshalb sie zur Etablierung des CYP1A2-Aktivitätsassays geeignet erschien [117]. Die HepG2-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptomycin) kultiviert. Die primären humanen Hepatozyten wurden freundlicherweise direkt vor den jeweiligen Versuchen von Dr. Xiaohua Huang aus der Experimentellen Chirurgie bereitgestellt.

Für die CYP1A2-Aktivitätsanalysen wurden konfluent gewachsene HepG2-Zellen und primäre Hepatozyten trypsinisiert, zentrifugiert (4 min bei 400 x g) und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden 150 000, 250 000 bzw. 500 000 HepG2-Zellen und 30 000, 60 000 bzw. 90 000 primäre Hepatozyten für die CYP1A2-Aktivitätsbestimmung verwendet. Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen mechanischen Homogenisationsverfahren aufgeschlossen: 1) 20-fache Aspiration in eine Injektionskanüle (21 Gauge) oder 2) mittels Mikro-Gewebe-Handhomogenisator (*Dounce homogenizer*; aus Borosilikatglas; Wandabstand Stempel - Mörser 0,1 - 0,15 mm). Das Homogenisat wurde für 15 min bei 4 °C und 15 000 x g zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand weiterverwendet. Die CYP1A2-Aktivitätsmessung erfolgte wie im Folgenden beschrieben.

### 2.8 CYP1A2-Aktivitätsbestimmung

Die CYP1A2-Aktivität im Zellhomogenisat und den gewonnenen humanen Lebergewebeproben wurde fluorometrisch mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Assays bestimmt (CYP1A2 Activity Assay Kit, Biovision, Milpitas, USA). Die Enzymaktivität wird dabei indirekt durch die Quantifizierung eines fluoreszierenden Metaboliten gemessen, welcher CYP1A2-abhängig aus einem nicht-fluoreszierenden Substrat gebildet wird. Die Grundprinzipien des verwendeten Assays sind in Abbildung

3A dargestellt. Dabei wurde entsprechend dem herstellereigenen Protokoll vorgegangen. Alle Reaktionen erfolgten in An- und Abwesenheit des spezifischen CYP1A2-Inhibitors  $\alpha$ -Naphthoflavin, sodass der Beitrag anderer CYP-Isoenzyme zum Substratumsatz spezifisch erfasst und berücksichtigt werden konnte. Als Positivkontrolle wurde rekombinant hergestelltes humanes CYP1A2-Enzym in jeden Durchlauf mitgeführt. Eine repräsentative Messung eines nicht-tumorösen Lebergewebes in An- und Abwesenheit des CYP1A2-Inhibitors sowie des rekombinanten CYP1A2-Enzyms ist in Abbildung 3B dargestellt.



**Abbildung 3: Prinzipien der Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Aktivitätsmessung.** Durch die Umsetzung des Substrates zu einem fluoreszierenden Metaboliten wird die CYP1A2-Aktivität direkt messbar. Dabei wird die Fluoreszenzintensität jeweils in Gegenwart und Abwesenheit des spezifischen CYP1A2-Inhibitors  $\alpha$ -Naphthoflavin gemessen. Elektronendonator der Reaktion ist NADPH, dessen Elektronen über die NADPH-P450-Reduktase auf CYP1A2 übertragen werden (A). Dargestellt ist hier beispielhaft die Messung eines nicht-tumorösen Lebergewebes mit und ohne Inhibitor im Vergleich zum rekombinanten CYP1A2 als Positivkontrolle (B).

Zur Messung der CYP1A2-Aktivität im humanen Lebergewebe wurde 50 - 200 mg schockgefrorenes Gewebe mit Hilfe eines Mikro-Gewebe-Handhomogenisators in 1 - 2 ml Assaypuffer mechanisch aufgeschlossen, für 15 min bei 15 000 x g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Von jedem Gewebe wurden jeweils zwei Proben ohne Hinzugabe und zwei Proben mit Hinzugabe des spezifischen CYP1A2-Inhibitors analysiert, wobei pro Probe 10 µl Überstand des erzeugten Homogenisats verwendet wurde. Nach Hinzugabe des Cumarin-basierten CYP1A2-Substrates wurde die Fluoreszenzintensität über 60 min bei 37 °C mit Hilfe eines Mikroplattenlesers (Fluorometer) bestimmt (Exzitationswellenlänge: 405 nm, Emissionswellenlänge: 460 nm). Zeitgleich wurde eine Standardkurve unter der Verwendung von 3-Cyano-7-hydroxycoumarin (3-CHC) erstellt, um die detektierten Fluoreszenzintensitätswerte in den entsprechenden Substratumsatz umrechnen zu können. Die Proteinkonzentration des Homogenisats wurde, wie nachfolgend beschrieben, mit einem Bicinchoninsäure (BCA)-basierten Assay bestimmt.

Durch Verdünnung einer Stammlösung aus bovinem Serumalbumin (200 mg/ml) mit CYP1A2-Assaypuffer wurde zunächst eine Standardreihe mit Proteinkonzentrationen zwischen 25 - 2000 µg/ml für die Eichgerade vorbereitet. Das BCA-Reagenz wurde im Verhältnis 50:1 aus der Lösung A und der Lösung B des verwendeten Assays angesetzt. Die jeweils zu untersuchenden homogenisierten Lebergewebeproben wurden 10fach mit CYP1A2-Assay verdünnt. In eine transparente 96-Well Platte wurden nun jeweils 20 µl der Proteinstandardlösungen und der Proben in doppelter Ausführung pipettiert. Nach Hinzugabe von 200 µl/Well der BCA-Reagenz wurde die 96-Well Platte für 30 s auf einem Plattenschüttler bewegt und anschließend für 30 min bei 37 °C in einem Wärmeschrank (FD-53, Binder) inkubiert. Nach kurzer Abkühlung von 6 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption mit einem Mikroplattenleser (Wellenlänge 550 nm). Mit Hilfe der Eichgeraden konnte letztlich die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden, wobei aus den beiden Absorptionswerten pro Proteinstandard bzw. Probe jeweils der Mittelwert gebildet wurde.

Zur Berechnung der CYP1A2-Aktivität wurden anschließend zwei repräsentative Zeitpunkte innerhalb der linearen Reaktionsphase ausgewählt. Von den jeweils in Doppelmessung ermittelten Fluoreszenzwerten in An- und Abwesenheit des CYP1A2-Inhibitors zu den beiden gewählten Zeitpunkten wurden jeweils die Mittelwerte

gebildet. Danach wurde sowohl für die Messwerte ohne als auch mit Inhibitor die Differenz der Fluoreszenzintensitätswerte zwischen den gewählten Zeitpunkten gebildet. Schließlich wurde die ermittelte Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Inhibitors von der Fluoreszenzintensität ohne Inhibitor abgezogen, sodass die spezifische durch CYP1A2 erzeugte Änderung der Fluoreszenz über den gewählten Zeitraum ermittelt werden konnte.

Mit Hilfe der Standardkurve wurden dann die Enzymaktivitätswerte aus der ermittelten Fluoreszenzintensitätsänderung berechnet und in pmol/min/mg ( $\mu\text{U}/\text{mg}$ ) angegeben. Eine CYP1A2-Enzymeinheit in  $\mu\text{U}/\text{mg}$  entspricht dabei der Menge an Enzym enthalten in 1 mg Proteinhomogenisat, die 1 pmol fluorogenes Substrat in 1 pmol 3-CHC bei 37 °C innerhalb einer Minute umwandelt. Der Detektionsbereich des Assays lag entsprechend der in der Standardkurve verwendeten 3-CHC Konzentrationen zwischen 2 - 20  $\mu\text{U}/\text{mg}$ . Proben mit Werten oberhalb des Bereichs der Standardkurve wurden entsprechend verdünnt und alle Proben mit Werten unterhalb der Detektionsgrenze wurden mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

## **2.9 Gewebefärbung**

Histologische und Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten an Paraffin-Gewebeschnitten von humanem Lebergewebe prospektiv eingeschlossener Patienten. Hierzu wurde das frisch entnommene Gewebe 48 h in gepuffertem 4%igem Formaldehyd fixiert, anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült und bis zur Entwässerung in 70%igem Ethanol aufbewahrt. Nach der schrittweisen Entwässerung entsprechend Tabelle 1 erfolgte die Einbettung in Paraffin und das Schneiden der Gewebe in 5 - 7  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte mit einem Mikrotom. Die Schnitte wurden über ein auf 34 °C temperiertes Wasserbad auf die Objektträger gezogen und für mindestens 6 h bei 38 °C in einem Wärmeschrank (UM300, Memmert) getrocknet. Nach der Gewebefärbung, wie unten beschrieben, wurden die Präparate mit Hilfe eines konventionellen Mikroskops (Axio Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) analysiert und Aufnahmen erstellt.

**Tabelle 1: Ablauf der Entwässerung im Einbettautomaten**

<b>Flüssigkeit</b>	<b>Dauer</b>
Ethanol, 75 %	1 h
Ethanol, 90 %	1 h
Ethanol, 95 %	0,5 h
Ethanol, 100 % (3x)	2,5 h
Xylol (3x)	4 h
Paraffin (3x)	4 h

### 2.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zunächst in Xylol deparaffinisiert, in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert und kurz in Leitungswasser gespült. Nachfolgend wurden die Schnitte zur Anfärbung saurer Strukturen für 10 min in Hämatoxylin überführt und dann für 5 min in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung basischer Gewebestrukturen in Eosin für 1 min mit konsekutivem Spülen in kaltem Leitungswasser für 20 s. Nach einer raschen Dehydratation in 96%igem (30 s) und absolutem Ethanol (1 min) wurden die Schnitte für 5 min in Xylol überführt und abschließend mit Entellan eingedeckelt.

### 2.9.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Gewebeschnitte wurden für die Immunfluoreszenzfärbung zunächst in Xylol deparaffinisiert, in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert und für 3 min in lauwarmem Leitungswasser gespült. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Schnitte für 20 min in Zitratpuffer gekocht (pH 6,05). Der Zitratpuffer enthielt 0,1 M tri-Natriumcitrat-dihydrat und 0,1 M Zitronensäure. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 30 min in einer 5 % Milchpulverlösung in PBS inkubiert, um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren, und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Die Antikörper wurden mit Tween 20 in PBS (0,05 %) auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Die Inkubation mit den Primärantikörpern als Doppelfärbung erfolgte für 3 h in einer dunklen Wasserkammer. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern für 1,5 h in einer dunkler Wasserkammer inkubiert. Die Schnitte wurden abschließend erneut dreimal in PBS gewaschen, zur Markierung der Zellkerne für 30 s mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 0,2 µg/ml) inkubiert und unter dem Eindeckmedium Vectashield auf dem Objektträger eingedeckelt.

Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper in den Immunfluoreszenzfärbungen wurden Kontrollfärbungen von Gewebeschnitten nicht-tumorösen Leberparenchyms angefertigt. Jeweils in Ab- und Anwesenheit von DAPI wurden die Schnitte entweder nur mit den Primärantikörpern (Anti-CYP1A2- und Anti-Glutamin-Synthetase-Antikörper) als Ko-Färbung, nur mit den Sekundärantikörpern (Anti-*rabbit*- und Anti-*mouse*-Antikörper) als Ko-Färbung oder mit keinerlei Antikörpern inkubiert. Anstatt der Antikörper wurde nur PBS aufgetragen. Ansonsten blieb die Verarbeitung der Schnitte unverändert und entsprach dem oben beschriebenen Prozedere.

## 2.10 Volumen-Funktionsplanung

Die Volumen-Funktionsplanung erfolgte nach der in Stockmann *et al.* beschriebenen Methode [47]. MRT-Aufnahmen zweier Patienten (HCC und HCA) wurden mithilfe des Programms Visage 7.1 (Visage Imaging GmbH, Berlin, Deutschland) volumetrisch analysiert. Dazu wurden das Leberparenchym, der Tumor und die geplante Resektionslinie der Leberteilresektion manuell in jedem axialen MRT-Schnittbild gekennzeichnet. Anschließend erfolgte die Berechnung des Lebergesamtvolumens, des Tumolvolumens und des FLRV anhand der dreidimensionalen Rekonstruktion der Schnittbildmarkierungen durch das Programm. Mit Hilfe der unten stehenden LiMAX-Volumetrieformel konnte daraus die FLRF-LiMAX berechnet werden:

$$\text{FLRF-LiMAX } [\mu\text{g/kg/h}] = \frac{\text{FLRV [ml]}}{V_{\text{Ges}} [\text{ml}] - V_{\text{Tumor}} [\text{ml}]} \times \text{LiMAX Wert } [\mu\text{g/kg/h}]$$

## 2.11 Statistische Methoden und graphische Aufbereitung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS Statistics (Version 25; IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Ergänzende statistische Tests für diese Arbeit wie auch die Erstellung der Graphen erfolgten mit der GraphPad Prism Software (Version 5; GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Aufnahmen der histologischen und Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit der Mikroskopsoftware ZEN 2.3 lite (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) erzeugt. Außer dem Einfügen von Messbalken erfolgte keine weitere Nachbearbeitung der Originalaufnahmen.

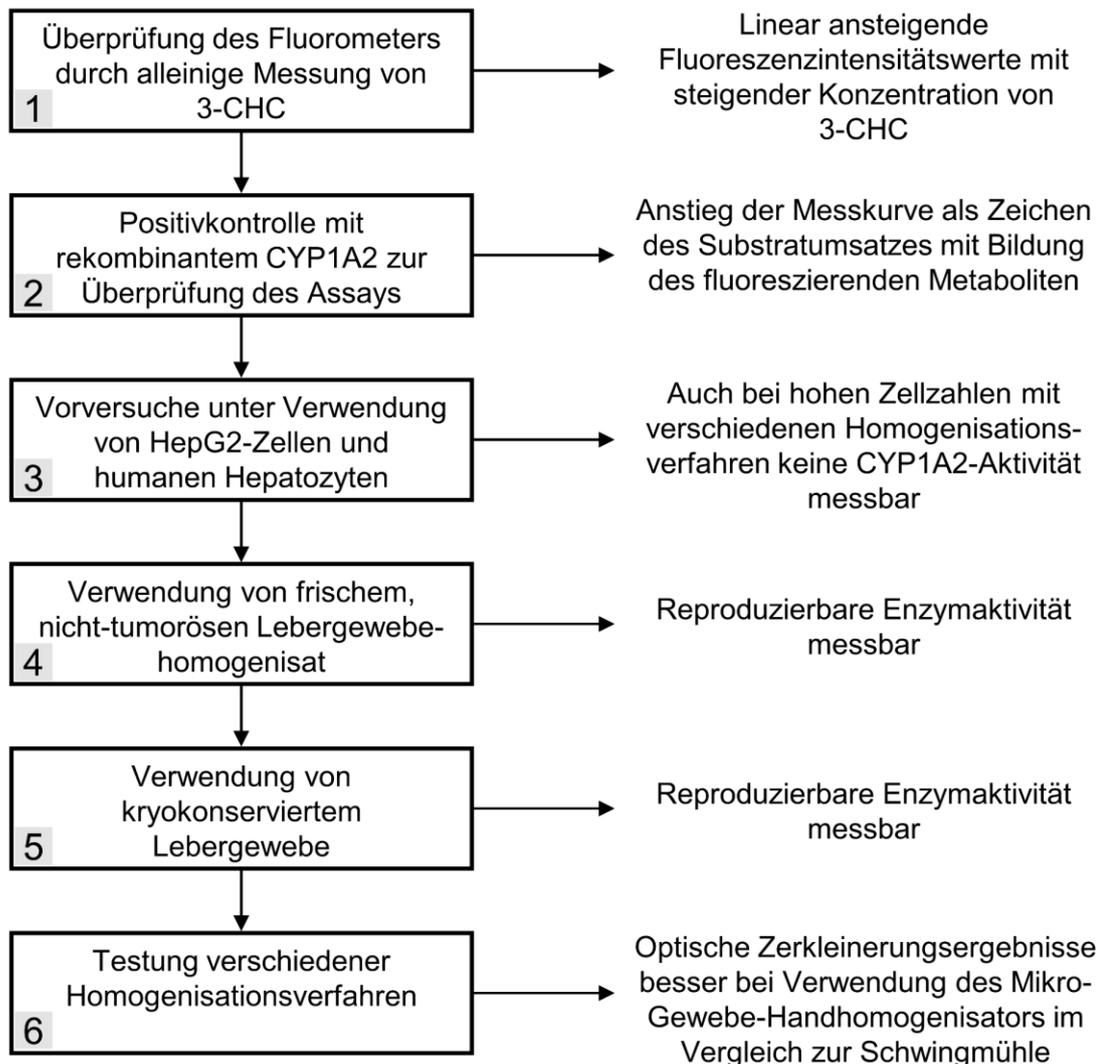
Kontinuierliche Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Die der statistischen Auswertung zugrundeliegenden Daten zeigten sich dabei als nicht

normalverteilt und wurden demzufolge unter Verwendung nicht-parametrischer Tests analysiert. Soweit nicht anders ausgewiesen, werden die Daten als Median und Interquartilsabstand (*interquartile range*, IQR: 25. - 75. Perzentile) angegeben. Zum Vergleich der zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Mehr als zwei Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Bonferroni-Test als Post-hoc-Analyse verglichen. Potenzielle Korrelationen zwischen zwei intervallskalierten Variablen wurden mit der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman (paarweiser Fallausschluss) ermittelt. Regressionsanalysen wurden mit dem linearen stufenweisen Regressionsmodell durchgeführt. *Receiver-operating-characteristic* (ROC)-Kurven wurden erstellt und die Fläche unter der ROC-Kurve (AUROC) berechnet, um die diagnostische Wertigkeit von THE, LiMAx, APRI und FIB-4 zur Unterscheidung der Gruppen gesunde Probanden + F0 (,keine Fibrose') versus F1 + F2 (,moderate Fibrose') und gesunde Probanden - F2 (,keine - moderate Fibrose') versus F3 + F4 (,schwere Fibrose') zu ermitteln. Die optimalen Schwellenwerte zur Unterscheidung zwischen den Fibrosegruppen wurden mit dem Youden-Index (Sensitivität + Spezifität - 1) ermittelt [118]. Die diagnostische Wertigkeit einer Kombination von THE, LiMAx und den serologischen Scores zur Fibrosedetektion wurde mit Hilfe multivariater logistischer Regressionsanalysen untersucht (Methode Einschluss, listenweiser Fallausschluss). Ein  $p$ -Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung des CYP1A2-Aktivitätsassays

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der CYP1A2-Aktivität in Lebertumoren auf den LiMAX-Test untersucht werden. Dazu musste zunächst eine entsprechende Messmethode der Enzymaktivität in humanem Lebergewebe basierend auf einem kommerziell erhältlichen Assay in Vorversuchen etabliert werden (Schritt 1-6, Abbildung 4). Da humanes Lebergewebe als Ausgangsmaterial rar ist, wurde zunächst mit aus humanem Lebergewebe isolierten primären Hepatozyten sowie HepG2-Zellen in Kultur gearbeitet. In keiner der beiden Zelllinien konnte unter den beschriebenen Testbedingungen eine CYP1A2-Aktivität gemessen werden, wobei durch Mitführen der Positivkontrolle in Form des rekombinanten CYP1A2-Enzyms ein technisches Problem des Assays ausgeschlossen wurde. Weder eine Erhöhung der verwendeten Zellzahl noch die Anwendung verschiedener Homogenisationsverfahren (Injektionskanüle vs. Mikro-Gewebe-Handhomogenisator) führte zu einer messbaren Enzymaktivität im Assay. Erst durch die Verwendung von homogenisiertem Lebergewebe war reproduzierbar eine Aktivität messbar. Daraufhin musste die Frage geklärt werden, ob mit dem Assay nur frisches, d. h. am Operationstag entnommenes Gewebe oder auch schockgefrorenes Gewebe untersucht werden kann. Vergleichende Messungen an einem nicht-tumorösen Lebergewebestück, welches in Teilen einmal direkt postoperativ homogenisiert und einmal bei -80 °C schockgefroren und dann weiterverarbeitet wurde, konnten zeigen, dass auch in schockgefrorenem Gewebe eine CYP1A2-Aktivität messbar ist. Dadurch war es möglich bereits lagernde Proben aus der Biobank der Chirurgischen Klinik zu verwenden. Darüber hinaus musste eine praktikable Technik zur Gewebekomposition gefunden werden. Im Vergleich zur Schwingmühle zeigte der Mikro-Gewebe-Handhomogenisator optisch wesentlich bessere Zerkleinerungsergebnisse und eine praktikablere Handhabung, weshalb er für die weitere Untersuchung favorisiert wurde.



**Abbildung 4: Schema zur schrittweisen Etablierung des Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Assays.** Da die Methode im Labor der Experimentellen Chirurgie unbekannt war, musste über Zwischenschritte ein funktionierendes Testprotokoll erarbeitet werden. 3-CHC, 3-Cyano-7-hydroxycoumarin.

### 3.2 CYP1A2-Aktivität in hepatischen Tumoren

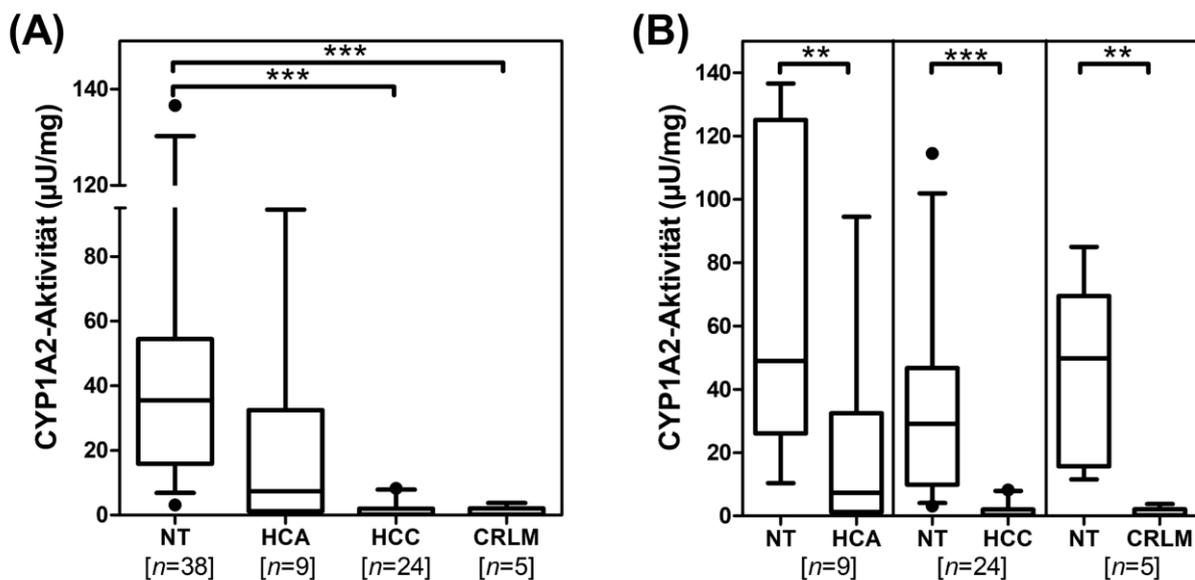
Es konnten 38 gepaarte Lebergewebeproben (nicht-tumoröses Gewebe und korrespondierendes Tumorgewebe) analysiert werden, die sich folgendermaßen zusammensetzten: 9 HCA-Proben, 24 HCC-Proben und 5 CRLM-Proben. Insgesamt 9 Patienten gaben an, aktive Raucher zu sein und weitere 9 Patienten nahmen potenziell mit CYP1A2 interagierende Medikamente ein. Davon nahmen 8 Patienten CYP1A2-Induktoren (Insulin, Omeprazol) und ein Patient ein CYP1A2-Substrat (Propranolol) ein. Keiner der eingeschlossenen Patienten gab an, CYP1A2 inhibierende Medikamente einzunehmen. Detaillierte Charakteristika der für die Untersuchung der CYP1A2-Aktivität eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Charakteristika der für die Untersuchung der Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Aktivität eingeschlossenen Patienten**

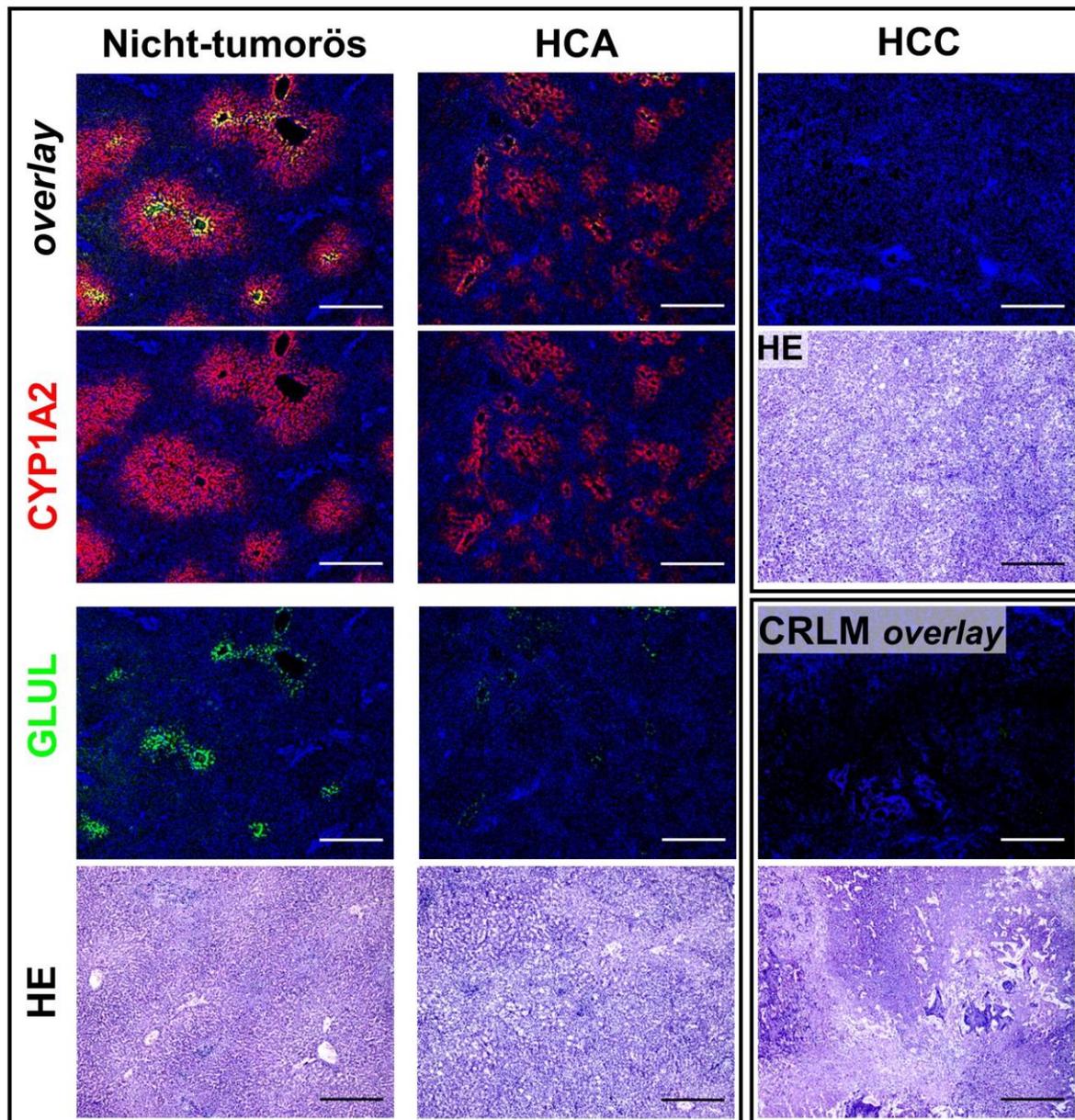
	<b>Alle</b> (n = 38)	<b>HCA</b> (n = 9)	<b>HCC</b> (n = 24)	<b>CRLM</b> (n = 5)
Alter (Jahren) [Min - Max]	67 (21 - 81)	39 (27 - 55)	72 (21 - 81)	60 (54 - 64)
Geschlecht, n (M/F)	20/18	0/9	16/8	4/1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,8 (23 - 28,7)	24,6 (21,2 - 27,6)	27,2 (23,2 - 28,8)	23,4 (22,9 - 27)
LiMAx (µg/kg/h), n = 36*	380 (290 - 465)	335 (285 - 490)	361 (261 - 473)	410 (387 - 471)
Hämoglobin (g/dl)	13,1 (12,4 - 14,2)	13,1 (12,7 - 13,5)	13,1 (12,0 - 14,3)	14,1 (13,5 - 14,7)
Leukozyten (/nl)	6,4 (5,2 - 7,9)	7,3 (5,8 - 8,5)	6,4 (5,0 - 7,7)	5,6 (4,8 - 6,9)
Thrombozyten (/nl)	235 (165 - 324)	271 (228 - 370)	215 (110 - 317)	260 (160 - 281)
INR	1,0 (1,0 - 1,1)	1,0 (1,0 - 1,1)	1,1 (1,0 - 1,2)	1,0 (1,0 - 1,0)
aPTT (s)	35 (32 - 39)	36 (34 - 40)	35 (32 - 39)	33 (31 - 35)
Kreatinin (mg/dl)	0,8 (0,7 - 0,9)	0,7 (0,6 - 0,7)	0,9 (0,7 - 1,1)	0,9 (0,8 - 1,0)
Bilirubin, gesamt (mg/dl)	0,5 (0,3 - 0,8)	0,4 (0,3 - 0,8)	0,6 (0,5 - 0,8)	0,4 (0,4 - 0,5)
Alanin-Aminotransferase (U/l)	31 (25 - 38)	30 (25 - 41)	31 (24 - 40)	32 (24 - 36)
Aspartat-Aminotransferase (U/l)	36 (29 - 46)	34 (23 - 37)	40 (30 - 56)	28 (25 - 33)
Alkalische Phosphatase (U/l)	94 (64 - 126)	95 (58 - 241)	97 (68 - 124)	78 (56 - 127)
γ-Glutamyltransferase (U/l)	84 (47 - 174)	49 (15 - 76)	117 (67 - 240)	55 (20 - 97)
MELD	7 (6 - 8)	6 (6 - 7)	8 (7 - 9)	6 (6 - 7)
Aktive Raucher, n	9	4	5	-
Einnahme CYP1A2-Induktoren/Substrate, n	9	1	7	1
Fibrosegrad, n = 35**	F0 = 7 F1 = 13 F2-3 = 9 F4 = 6	F0 = 2 F1 = 5 F2-3 = 0 F4 = 0	F0 = 3 F1 = 5 F2-3 = 9 F4 = 6	F0 = 2 F1 = 3 F2-3 = 0 F4 = 0

Die Ergebnisse sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Median (25. - 75. Perzentile) oder Anzahl *n* angeführt. aPTT, aktivierte partielle Thromboplastinzeit; BMI, Body-Mass-Index; CRLM, Kolorektale Lebermetastase; HCA, Hepatozelluläres Adenom; HCC, Hepatozelluläres Karzinom; INR, *International Normalized Ratio*; LiMAx, Liver MAXimum capacity; MELD, *Model for End-stage Liver Disease Score*.  
\* Bei zwei HCC-Patienten erfolgte kein LiMAx-Test; \*\* Desmet und Scheuer Score.

Die mediane CYP1A2-Aktivität aller nicht-tumorösen Gewebe betrug 35,5 (15,9 - 54,4)  $\mu\text{U}/\text{mg}$ . Die Enzymaktivität im Adenomgewebe betrug 7,35 (1,2 - 32,5)  $\mu\text{U}/\text{mg}$ . Gewebe aus HCC (0,18 (0 - 2,0)  $\mu\text{U}/\text{mg}$ ) und CRLM (0,17 (0 - 2,1)  $\mu\text{U}/\text{mg}$ ) zeigten signifikant niedrigere Aktivitätswerte als das nicht-tumoröse Gewebe (Abbildung 5A). Die mediane prozentuale Abnahme der CYP1A2-Aktivität in den untersuchten Lebertumoren im Vergleich zu allen nicht-tumorösen Lebergeweben betrug 79,3 % für HCA-Gewebe und 99,5 % für HCC- und CRLM-Gewebe. Die gepaarte Analyse der untersuchten Gewebe zeigte für alle drei Pathologien (HCA, HCC, CRLM) signifikant niedrigere Aktivitätswerte im Tumor im Vergleich zu den jeweiligen nicht-tumorösen Lebergeweben, während kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen nicht-tumorösen Geweben aller drei Pathologien bestand (Abbildung 5B).



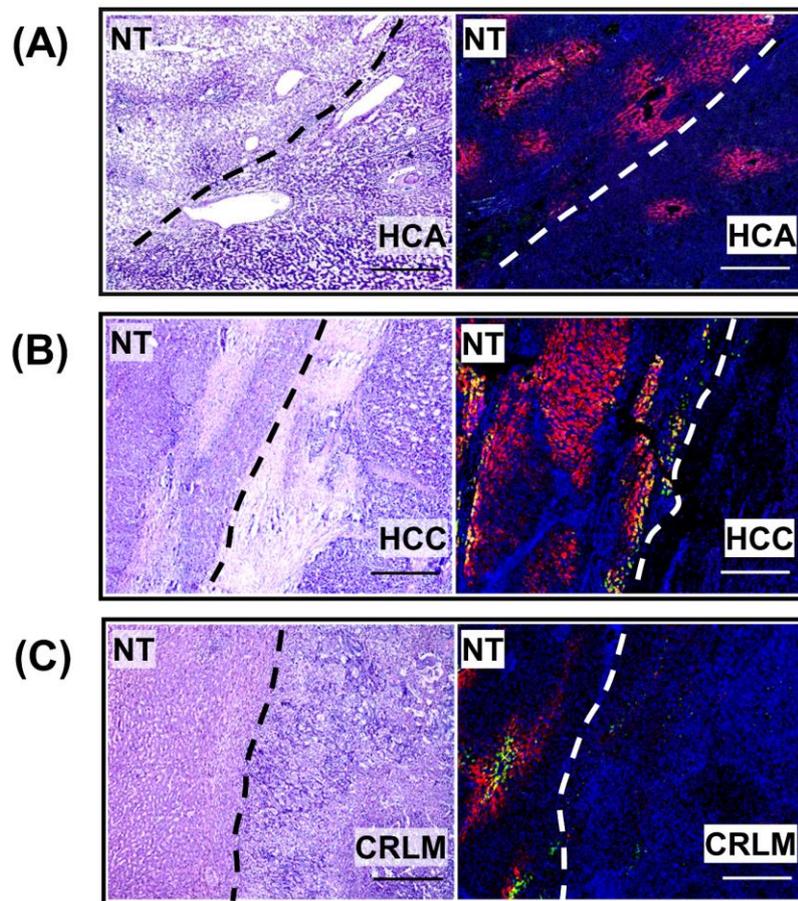
**Abbildung 5: Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Aktivität in Lebertumoren im Vergleich zum nicht-tumorösen Lebergewebe.** CYP1A2-Aktivität aller untersuchten nicht-tumorösen Lebergewebe (NT) im Vergleich zur Aktivität im Tumorgewebe von hepatozellulärem Adenom (HCA), Karzinom (HCC) und kolorektalen Lebermetastasen (CRLM) (A). Gepaarter Vergleich der CYP1A2-Aktivitätslevel im Tumorgewebe der drei untersuchten Pathologien mit den jeweilig korrespondierenden nicht-tumorösen Lebergeweben (B). Die Länge der *Whisker* reicht von der 5. bis zur 95. Perzentile. Punkte ober- oder unterhalb der *Whisker* entsprechen Ausreißern.  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ . *n*, Anzahl der untersuchten Gewebe.



**Abbildung 6:** Immunfluoreszenz- und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) nicht-tumorösen Gewebes (links), eines hepatozellulären Adenoms (HCA, Mitte), Karzinoms (HCC) und kolorektaler Lebermetastasen (CRLM, rechts). Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2, rot) und Glutamin-Synthetase (GLUL, grün) wurden parallel angefärbt. Dargestellt ist das Mehrkanalbild (*overlay*) der Doppelfärbung zusammen mit entsprechender HE-Färbung. Einzelkanäle zusätzlich für nicht-tumoröses Gewebe und HCA. Nukleäre Färbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau). Messbalken entsprechen 500  $\mu\text{m}$ .

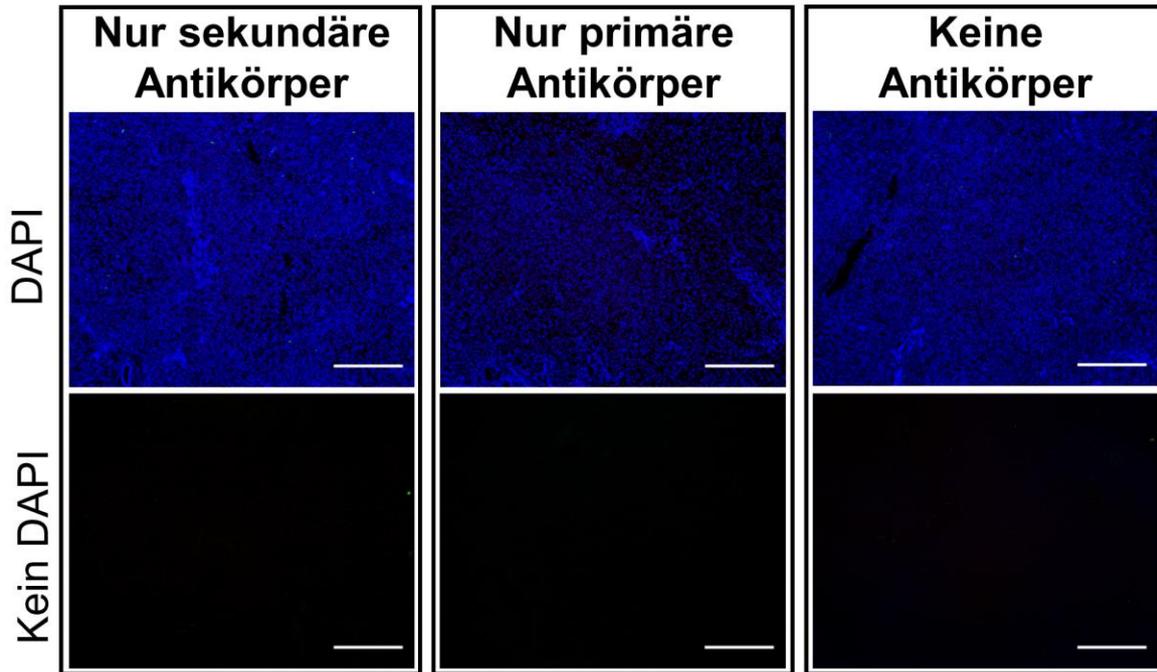
Die Aktivitätsunterschiede spiegeln sich auch in den Immunfluoreszenzfärbungen wider. Im nicht-tumorösen Gewebe zeigte sich das Fluoreszenzsignal des CYP1A2-Antikörpers räumlich um das Signal des in der Doppelfärbung verwendeten Glutamin-Synthetase-Antikörpers lokalisiert. Im Adenomgewebe, sowie deutlich stärker ausgeprägt im HCC- und CRLM-Gewebe, war das Fluoreszenzsignal von CYP1A2 im Vergleich zum nicht-tumorösen Gewebe vermindert (Abbildung 6). Auch in den gefärbten Übergangsgeweben der drei untersuchten Pathologien konnte die Abnahme des

CYP1A2-Fluoreszenzsignales vom nicht-tumorösen zum tumorösen Gewebe hin beobachtet werden (Abbildung 7). Die CYP1A2- und Glutamin-Synthetase-Fluoreszenzsignale in der Doppelfärbung waren dabei im nicht-tumorösen Gewebe von HCA, HCC und CRLM detektierbar, während innerhalb der Läsionen nur das HCA eine sichtbare Expression der Zielproteine aufwies.



**Abbildung 7: Gegenüberstellung von Immunfluoreszenz- (links) und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE, rechts) von Übergangsgewebe aus hepatozellulärem Adenom (HCA, A), Karzinom (HCC, B) und kolorektaler Lebermetastase (CRLM, C).** Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2, rot) und Glutamin-Synthetase (grün) wurden parallel angefärbt. Dargestellt ist das Mehrkanalbild (*overlay*) der Doppelfärbung zusammen mit entsprechender HE-Färbung. Zu beachten ist die starke Verfettung des dem HCA benachbarten Leberparenchyms in der HE-Färbung (links) (A). Die Grenze zwischen nicht-tumorösem Gewebe (NT) und Tumor ist mittels gestrichelter Linie angedeutet. Nukleäre Färbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau). Messbalken entsprechen 500  $\mu\text{m}$ .

In den Immunfluoreszenzkontrollfärbungen konnte weder bei alleiniger Verwendung der Sekundär- noch der Primärantikörper als Doppelfärbung ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Auch zeigte das Gewebe keine Autofluoreszenz in der Kontrollfärbung ohne jegliche Verwendung von Antikörpern (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Kontrollfärbungen von gesundem Lebergewebe.** Gewebeschnitte von gesundem Lebergewebe wurden in An- und Abwesenheit von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau) entweder nur mit sekundären Antikörpern, nur mit primären Antikörpern oder ohne jegliche Antikörper gefärbt. Messbalken entsprechen 500  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Veränderung der CYP1A2-Aktivität mit zunehmender Leberfibrose

Bei allen Patienten wurde der Grad der Fibrosierung auf Grundlage des Leberresektats bestimmt. So konnte der Zusammenhang zwischen Leberfibrose und CYP1A2-Aktivität untersucht werden. Nicht-tumoröses hepatisches Gewebe mit fortgeschrittener Fibrose (F2-3, F4) wies dabei signifikant niedrigere CYP1A2-Aktivität im Vergleich zu nicht-fibrosiertem Gewebe (F0) auf ( $p < 0,05$ , Abbildung 9A). Die mediane CYP1A2-Aktivität der verschiedenen Fibrosegrade betrug jeweils: F0 85,03 (46,04 - 129,9)  $\mu\text{U}/\text{mg}$  ( $n = 7$ ); F1 46,96 (20,89 - 52,81)  $\mu\text{U}/\text{mg}$  ( $n = 13$ ); F2-3 17,61 (8,34 - 31,48)  $\mu\text{U}/\text{mg}$  ( $n = 9$ ) und F4 26,35 (8,78 - 37,77)  $\mu\text{U}/\text{mg}$  ( $n = 6$ ). Charakteristika der untersuchten Patienten aufgeschlüsselt nach Fibrosegrad sind in Tabelle 3 dargestellt.

Entsprechend waren die CYP1A2-Fluoreszenzsignale in den Färbungen deutlich vermindert im Gewebeschnitt mit Zirrhose (F4) im Vergleich zum Gewebe mit keiner oder nur moderater Fibrose (F0, F2-3). Zwischen F0 und F2-3 erschien die Intensität der Fluoreszenzsignale ähnlich, während in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Gewebeschnittes der F2-3 Fibrose schon eine deutliche Architekturstörung sichtbar war (Abbildung 9C).

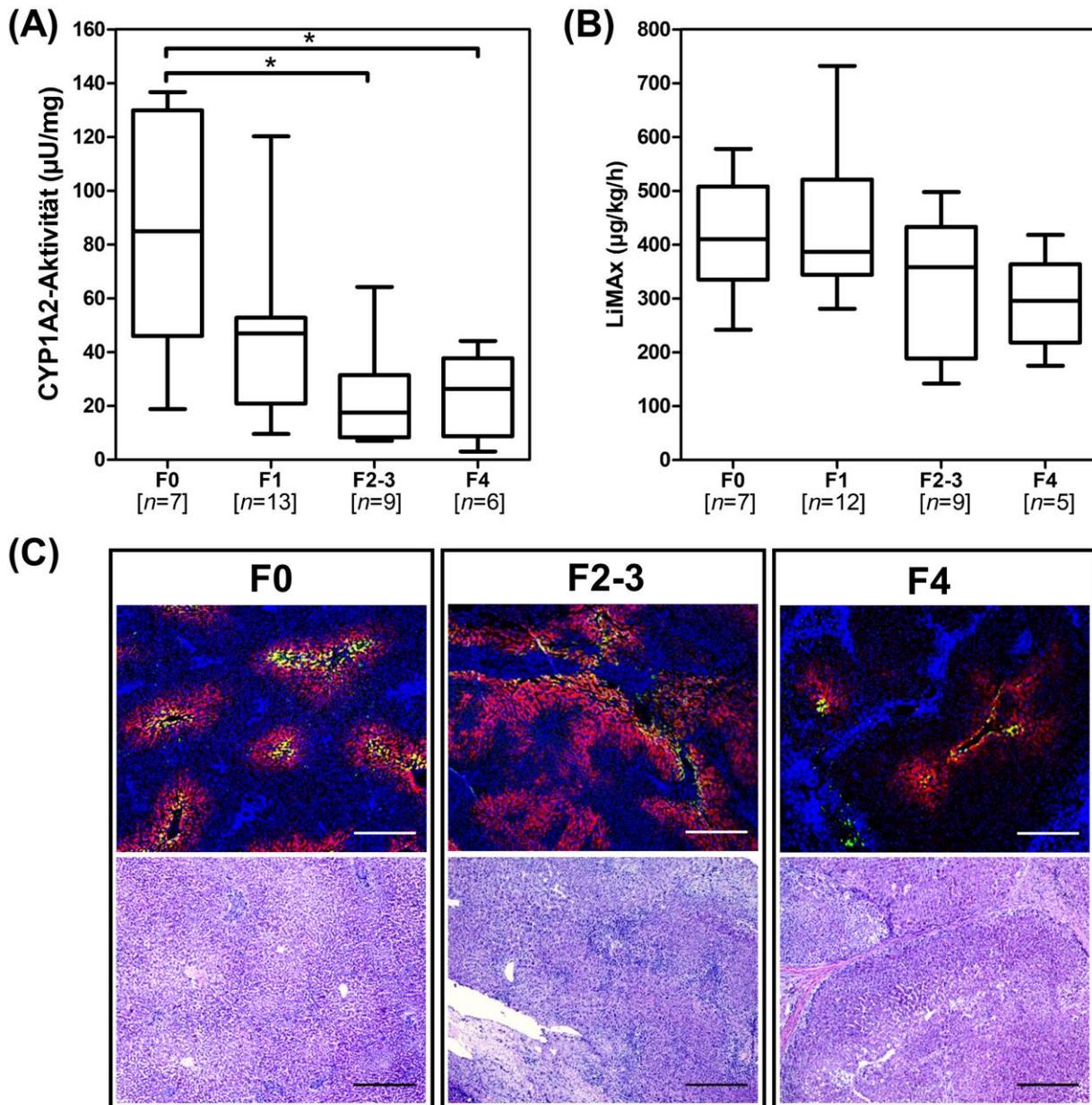
## Ergebnisse

Die Abnahme der experimentell ermittelten CYP1A2-Aktivität mit zunehmendem Fibrosegrad spiegelte sich in der Tendenz, wenn auch ohne signifikante Unterschiede, in der mit dem LiMAx-Test erfassten Gesamtleberfunktion wider (Abbildung 9B). Dabei bestand zwischen der CYP1A2-Aktivität im nicht-tumorösen Lebergewebe und den LiMAx-Werten eine signifikante positive Korrelation ( $r = 0,367$ ,  $p = 0,028$ ) (Abbildung 10).

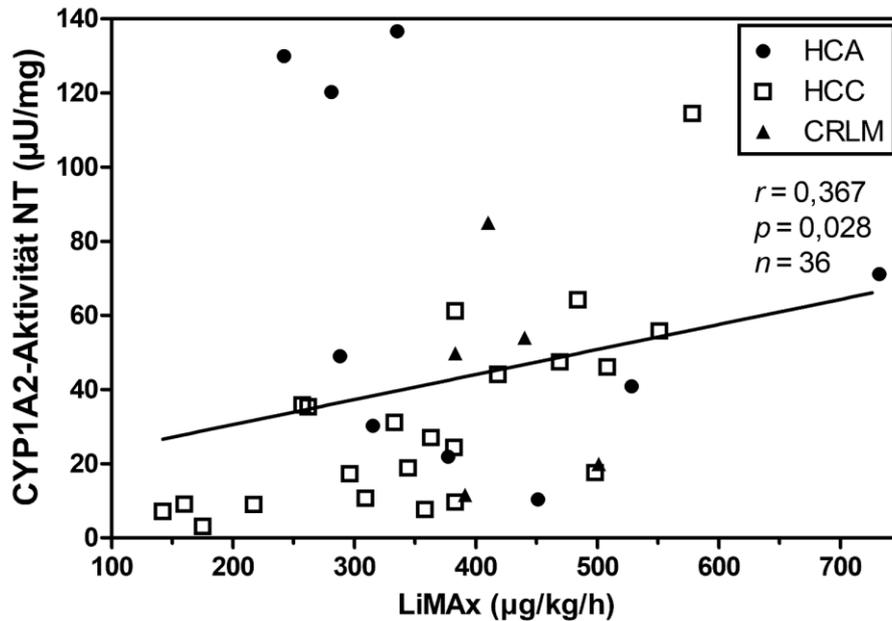
**Tabelle 3: Charakteristika der für die Untersuchung der Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Aktivität eingeschlossenen Patienten aufgeschlüsselt nach Fibrosegrad**

	<b>F0</b> ( <i>n</i> = 7)	<b>F1</b> ( <i>n</i> = 13)	<b>F2-3</b> ( <i>n</i> = 9)	<b>F4</b> ( <i>n</i> = 6)
Alter (Jahren) [Min - Max]	54 (22 - 81)	61 (27 - 80)	74 (21 - 81)	69 (55 - 81)
Geschlecht, <i>n</i> (M/F)	3/4	7/6	8/1	2/4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,0 (19,9 - 24,5)	26,0 (23,1 - 27,9)	27,5 (25,2 - 28,4)	30,6 (25,3 - 34,8)
Thrombozyten (/nl)	286 (271 - 349)	227 (167 - 292)	220 (143 - 313)	93 (81 - 152)
INR	1,0 (1,0 - 1,1)	1,0 (1,0 - 1,1)	1,1 (1,1 - 1,2)	1,1 (1,0 - 1,2)
Kreatinin (mg/dl)	0,7 (0,6 - 0,9)	0,9 (0,7 - 1,0)	0,9 (0,7 - 1,0)	0,9 (0,5 - 1,4)
Bilirubin, gesamt (mg/dl)	0,5 (0,4 - 0,7)	0,3 (0,3 - 0,5)	0,7 (0,5 - 1,0)	0,8 (0,7 - 1,4)
Alanin-Aminotransferase (U/l)	32 (31 - 59)	33 (30 - 40)	28 (17 - 61)	26 (23 - 37)
Aspartat-Aminotransferase (U/l)	38 (27 - 99)	31 (27 - 37)	44 (27 - 71)	41 (36 - 45)
Alkalische Phosphatase (U/l)	61 (43 - 125)	86 (60 - 124)	105 (69 - 146)	97 (73 - 122)
γ-Glutamyltransferase (U/l)	55 (17 - 119)	49 (27 - 132)	180 (90 - 446)	97 (86 - 161)
MELD	6 (6 - 7)	7 (6 - 8)	8 (7 - 9)	8 (7 - 9)
Aktive Raucher, <i>n</i>	3	4	0	2
Einnahme CYP1A2-Induktoren/Substrate, <i>n</i>	1	2	4	2

Die Ergebnisse sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Median (25. - 75. Perzentile) oder Anzahl *n* angeführt. BMI, Body-Mass-Index; INR, *International Normalized Ratio*; MELD, *Model for End-stage Liver Disease Score*.



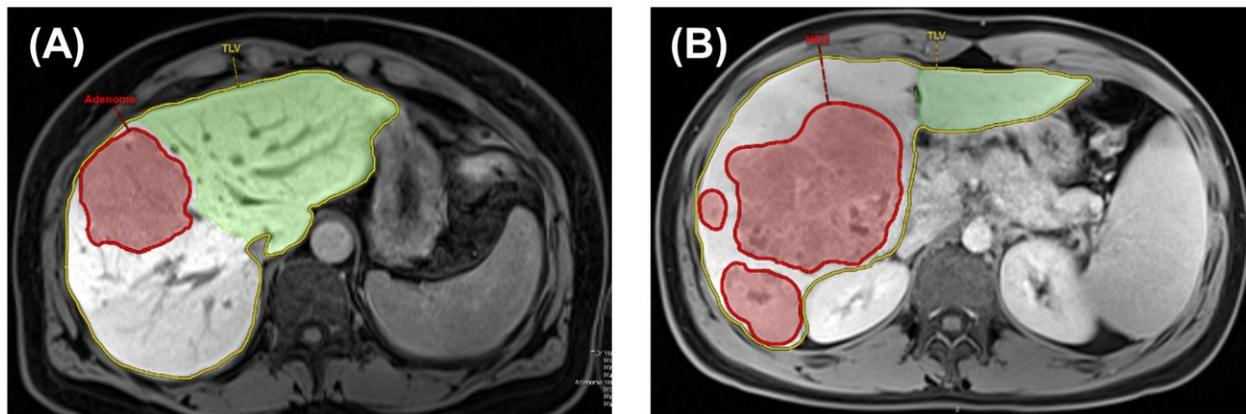
**Abbildung 9: Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Aktivitätsbestimmung und -Färbungen von nicht-tumorösen Geweben mit zunehmendem Fibrosegrad zusammen mit klinischer Leberfunktionsmessung (LiMax).** Veränderung der experimentell ermittelten CYP1A2-Aktivität im Gewebe (A) und der klinischen Leberfunktionsmessung mittels Liver MAXimum capacity (LiMax)-Tests (B) mit zunehmendem Fibrosegrad. Färbungen von nicht-tumorösen Lebergewebeschnitten mit zunehmender Fibrosierung (C). CYP1A2 (rot) und Glutamin-Synthetase (grün) wurden parallel angefärbt. Dargestellt ist das Mehrkanalbild (*overlay*) der Doppelfärbung (oben) zusammen mit entsprechender Hämatoxylin-Eosin-Färbung (unten). Nukleäre Färbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau). Messbalken entsprechen 500 µm. Die Länge der *Whisker* reicht von der 5. bis zur 95. Perzentile. \* $p < 0,05$ .  $n$ , Anzahl der untersuchten Gewebe.



**Abbildung 10: Zusammenhang zwischen Liver M<sub>A</sub>ximum capacity (LiM<sub>A</sub>x)-Werten und der Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Aktivität im nicht-tumorösen Gewebe (NT) aufgeschlüsselt nach Diagnose.** Der Graph zeigt die lineare Regressionslinie, den Korrelationskoeffizient nach Spearman  $r$ , den  $p$ -Wert und die Anzahl der untersuchten Patienten  $n$ . CRLM, Kolorektale Lebermetastase; HCA, Hepatozelluläres Adenom; HCC, Hepatozelluläres Karzinom.

### 3.4 Bedeutung der CYP1A2-Aktivität in hepatischen Tumoren für die präoperative Volumen-Funktionsplanung

Zur Untersuchung der klinischen Bedeutung der ermittelten CYP1A2-Restaktivität in Lebertumoren wurden repräsentative Volumen-Funktionsplanungen eines Patienten mit HCA und eines Patienten mit HCC auf Basis der präoperativen LiM<sub>A</sub>x- und MRT-Untersuchung erstellt, so wie sie auch vor leberchirurgischen Eingriffen routinemäßig erfolgen (Abbildung 11). Dabei erfolgte die Berechnung der FLRF-LiM<sub>A</sub>x einmal mit der aktuellen Standardmethode wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben [47] und vergleichend unter Berücksichtigung der zuvor experimentell ermittelten CYP1A2-Aktivität hepatischer Raumforderungen. Im Vergleich zur aktuellen Standardberechnung ergab sich für den Patienten mit HCC vor dem Hintergrund der gezeigten minimalen Restaktivität im HCC keine signifikante Veränderung der FLRF-LiM<sub>A</sub>x durch Berücksichtigung der CYP1A2-Aktivität des Tumors (85 versus 84,8 µg/kg/h, Unterschied < 1 %). Im Gegensatz dazu ergab die Volumen-Funktionsplanung des Patienten mit HCA durch Berücksichtigung der CYP1A2-Restaktivität von 20,7 % im Adenom einen deutlich niedrigeren Wert der FLRF-LiM<sub>A</sub>x von 193 µg/kg/h im Vergleich zur Standardberechnung, die eine FLRF-LiM<sub>A</sub>x von 216 µg/kg/h voraussagte (Unterschied 11,9 %).



(C)	HCA (A)	HCC (B)
<b>Volumetrie</b>	Lebergesamtvolumen = 1488 ml Tumorvolumen = 542 ml Resektatvolumen = 946 ml Restlebertvolumen = 542 ml	Lebergesamtvolumen = 2708 ml Tumorvolumen = 472 ml Resektatvolumen = 1968 ml Restlebertvolumen = 740 ml
<b>LiMAx</b>	LiMAx = 377 µg/kg/h	LiMAx = 257 µg/kg/h
<b>Standard-berechnung</b>	HCA-Restaktivität = 0 % Funktionelles Volumen = 946 ml % Restlebertvolumen = 57,3 %  → FLRF-LiMAx = 216 µg/kg/h	HCC-Restaktivität = 0 % Funktionelles Volumen = 2236 ml % Restlebertvolumen = 33,1 %  → FLRF-LiMAx = 85 µg/kg/h
<b>Berechnung mit CYP1A2-Restaktivität</b>	HCA-Restaktivität = 20,7 % Funktionelles Volumen = 1058 ml % Restlebertvolumen = 51,2 %  → FLRF-LiMAx = 193 µg/kg/h	HCC-Restaktivität = 0,5 % Funktionelles Volumen = 2238 ml % Restlebertvolumen = 33,0 %  → FLRF-LiMAx = 84,8 µg/kg/h

**Abbildung 11: Exemplarische präoperative Volumen-Funktionsplanung für einen Patienten mit hepatozellulärem Adenom (HCA) bzw. Karzinom (HCC).** Repräsentatives axiales Schnittbild der für die Volumetrie verwendeten MRT-Untersuchung eines Patienten mit HCA (A) bzw. HCC (B). Eingezeichnet sind: Leber (gelb), Tumor (rot), zukünftiges Restlebertvolumen (*future liver remnant volume*, FLRV; grün). Die untenstehende Tabelle zeigt die aktuelle Standardberechnungsmethode der erwarteten postoperativen Leberfunktion (*future liver remnant function-LiMAx*, FLRF-LiMAx) und die verbesserte Methode unter Berücksichtigung der Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-Restaktivität im Tumor beider Patienten (C). LiMAx, Liver MAXimum capacity.

Zusammenfassend scheint CYP1A2 also sowohl durch Fibrosierung als auch Tumorgenese beeinflusst zu werden. Im nicht-tumorösen Gewebe zeigte sich die Expression und die Aktivität von CYP1A2 mit fortschreitendem Fibrosegrad reduziert. Bei den untersuchten Lebertumoren wiesen HCC und CRLM im verwendeten Assay nahezu keinerlei enzymatische Restaktivität auf. HCA-Gewebe dahingegen zeichnete sich durch eine relevante Aktivität aus, die für eine verbesserte Volumen-Funktionsplanung mit dem LiMAx-Test von klinischer Bedeutung ist.

### **3.5 Charakteristika der Studienpopulation zur Analyse des Zusammenhangs strukturell-mechanischer und funktioneller Lebergewebeeigenschaften**

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen strukturell-mechanischen Veränderungen des Leberparenchyms und den LiMAx-Werten wurden konsekutiv 66 Patienten (M/F 44/22, Alter Median 66 Jahre, Minimum - Maximum 33 - 81 Jahre) eingeschlossen. Detaillierte Charakteristika der Studienpopulation sind in Tabelle 4 dargestellt. Bei der Mehrheit der eingeschlossenen Patienten (57/66; 86,4 %) wurde eine hepatische Raumforderung diagnostiziert, wobei das HCC dabei am häufigsten auftrat (31/66; 47 %). Insgesamt 9 Patienten litten an einer chronischen Lebererkrankung ohne Lebertumor, wobei die häufigste zugrundeliegende Ätiologie chronischer Alkoholkonsum war (3/9). Eine Übersicht über die Lebererkrankungen der Patienten ist in Tabelle 5 enthalten. Zusätzlich wurden insgesamt 20 Probanden (M/F 12/8, Alter Median 45 Jahre, Minimum - Maximum 23 - 59 Jahre) als gesunde Vergleichsgruppe rekrutiert. Sechzehn Patienten und ein Proband waren aktive Raucher, fünf Patienten erhielten vor der präoperativen LiMAx-Messung eine PVE. Diese Teilnehmer wurden von allen den LiMAx betreffenden Analysen ausgeschlossen, da sowohl Zigarettenrauch als auch eine PVE den LiMAx-Wert potenziell beeinflussen können [48, 119]. LiMAx ( $p = 0,002$ ), Scherwellengeschwindigkeit ( $p < 0,001$ ) sowie APRI und FIB-4 ( $p < 0,001$ ) waren signifikant unterschiedlich zwischen Patienten und Probanden.

Valide Gewebesteifigkeitsmessungen mittels THE konnten bei 55 Patienten und allen 20 Probanden erreicht werden (Median Messungen pro Teilnehmer: 9). Gründe für das Fehlen valider Steifigkeitsmessungen waren: Patient aus zeitlich-organisatorischen Gründen keine Messung erhalten ( $n = 4$ ); erforderliche Mindestanzahl von 5 validen Einzelmessungen pro Patienten nicht erreicht ( $n = 7$ ), wobei hier Systemabstürze des THE-Computers hauptursächlich waren. Die mediane Scherwellengeschwindigkeit betrug 1,8 (1,61 - 1,92) m/s für Patienten und 1,56 (1,52 - 1,63) m/s für Probanden. Zwischen Body-Mass-Index (BMI) und Scherwellengeschwindigkeit bestand keine signifikante Korrelation ( $r = 0,175$ ;  $p = 0,134$ ), Alter und Scherwellengeschwindigkeit waren schwach positiv korreliert ( $r = 0,384$ ;  $p < 0,001$ ). Die Lebersteifigkeit zwischen Männern und Frauen war nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,357$ ).

Bei 65 Patienten und 19 Probanden konnten valide LiMAx-Werte ermittelt werden, was 97,7 % der Gesamtstudienpopulation entspricht. Gründe für das Fehlen der LiMAx-Werte bei zwei Studienteilnehmern waren: Testabbruch aufgrund psychischer Intoleranz der

Atemmaske; fehlender stabiler Basalwert des individuellen  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Verhältnisses vor Applikation der Testsubstanz (= invalide Messung). Mediane LiMAx-Werte waren 308 (180 - 423)  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  für Patienten und 395 (377 - 502)  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  für Probanden. Zwischen Alter und LiMAx der Studienteilnehmer zeigte sich keine signifikante Korrelation ( $r = -0,202$ ;  $p = 0,065$ ), BMI und LiMAx waren schwach negativ korreliert ( $r = -0,260$ ;  $p = 0,017$ ). Die LiMAx-Werte zwischen Männern und Frauen waren nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,103$ ).

Insgesamt erfolgte bei 47 der eingeschlossenen Patienten eine chirurgische Resektion von Lebergewebe mit anschließender histologischer Bestimmung des Fibrosegrades (Abstand zwischen Einschluss und OP: Median 3 Tage, Minimum - Maximum 1 - 62 Tage). Bei 19 Patienten konnte kein Fibrosegrad ermittelt werden, da diese nach Studieneinschluss als inoperabel eingestuft wurden. Eine repräsentative Gegenüberstellung der individuellen Ergebnisse der präoperativen Leberfunktions- und Lebersteifigkeitsmessungen eines Patienten ohne Leberfibrose versus eines Patienten mit Leberzirrhose zusammen mit entsprechenden Gewebefärbungen der beiden Patienten basierend auf dem jeweilig resezierten Lebergewebe ist in Abbildung 12 zusammengefasst. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Patienten mit Leberzirrhose war die Architekturstörung mit brückenbildenden Septen klar erkennbar, wohingegen beim Patienten mit gesundem Leberparenchym keine Fibrosierung zu sehen war. Beim Vergleich der LiMAx-Kurvenverläufe fiel auf, dass der maximale *delta over baseline* Wert ( $DOB_{\text{max}}$ -Wert), der die Berechnungsgrundlage für den LiMAx-Wert darstellt, beim Patienten ohne Leberfibrose deutlich schneller erreicht wurde und größer ausfiel als beim Patienten mit Leberzirrhose. Dies äußerte sich letztlich in dem deutlich höheren absoluten LiMAx-Wert des gesunden Patienten (gesund: 440  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ , Leberzirrhose: 159  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ). Die Lebersteifigkeit schließlich wurde wie oben beschrieben in einem definierten Gewebeabschnitt (ROI) nach vorheriger Definition einer Untergrenze für die Scherwellengeschwindigkeit erfasst. Anhand des *B-Mode* konnte gezielt ein geeigneter Abschnitt aufgesucht werden. Entsprechend dem histologischen Bild fanden sich deutlich höhere Scherwellengeschwindigkeiten beim Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zum gesunden Leberparenchym in den gezeigten exemplarischen Aufnahmen aus den jeweiligen elastographischen Messreihen und schließlich auch in den errechneten Steifigkeitswerten (gesund: 1,51 m/s; Leberzirrhose: 2,1 m/s).

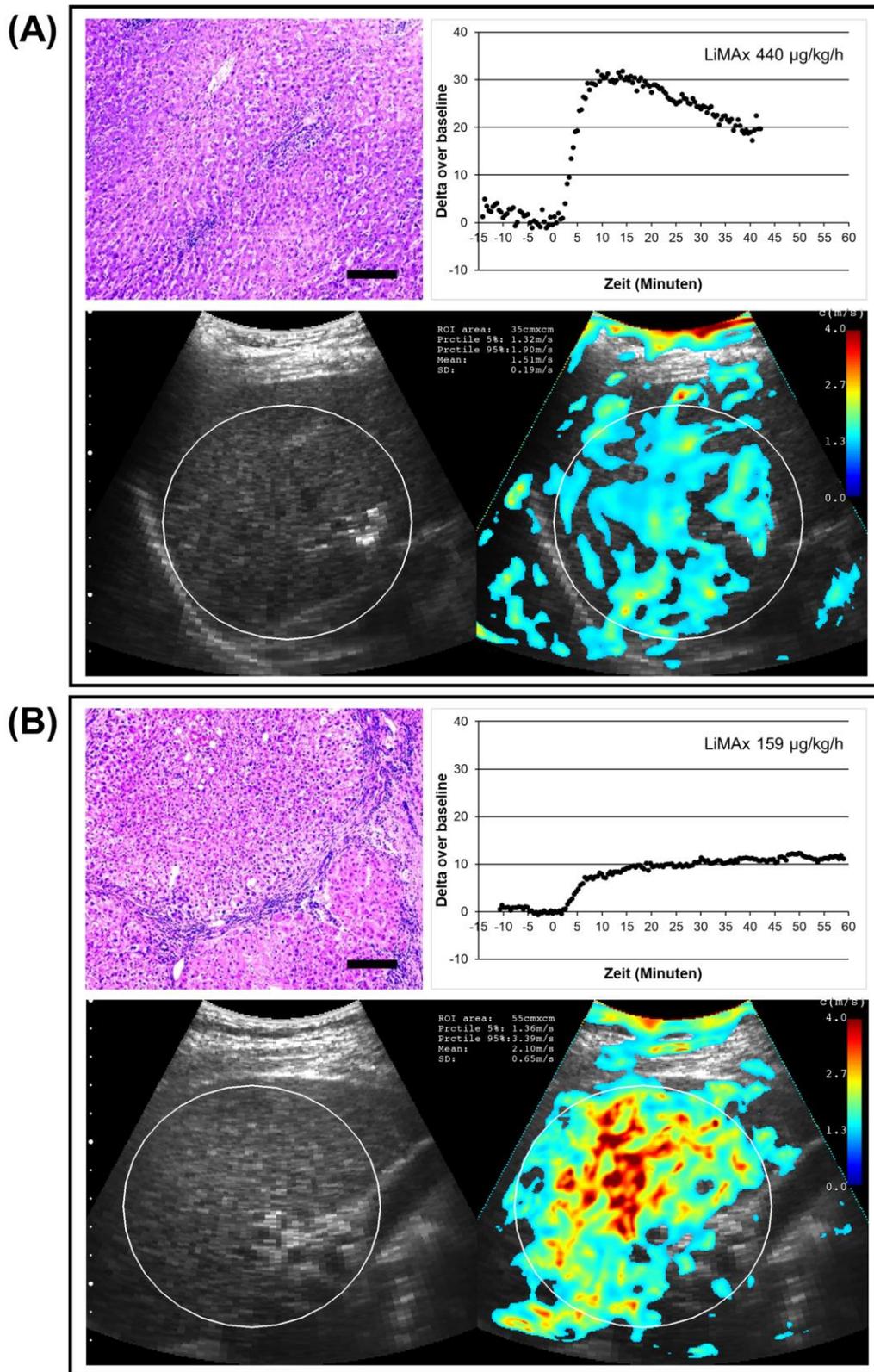
**Tabelle 4: Charakteristika der Studienpopulation zur Untersuchung strukturell-mechanischer und funktioneller Lebereigenschaften**

	<b>Patienten</b> (n = 66)	<b>Probanden</b> (n = 20)	<b>p-Wert</b>
Alter (Jahren) [Min - Max]	66 (33 - 81)	45 (23 - 59)	< 0,001
Geschlecht (M/F), n (%)	44 (66,7) / 22 (33,3)	12 (60) / 8 (40)	-
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,2 (23,5 - 29,6)	25,1 (22,2 - 26,8)	0,015
Vorstellungsgrund, n (%)			
Hepatozelluläres Karzinom	31 (47)	-	-
Cholangiozelluläres Karzinom	13 (19,7)	-	-
Kolorektale Lebermetastasen	12 (18,2)	-	-
Evaluation Lebertransplantation	9 (13,6)	-	-
Hepatozelluläres Adenom	1 (1,5)	-	-
Hämoglobin (g/dl)	13,1 (11,9 - 14,5)	13,9 (12,7 - 14,8)	0,142
Leukozyten (/nl)	6,7 (5,3 - 8,4)	6,0 (4,9 - 6,9)	0,111
Thrombozyten (/nl)	213 (158 - 253)	225 (206 - 257)	0,172
INR	1,1 (1,0 - 1,2)	1,0 (1,0 - 1,1)	0,016
aPTT (s)	36 (33 - 41)	36 (33 - 38)	0,616
Kreatinin (mg/dl)	0,9 (0,7 - 1,1)	0,8 (0,8 - 0,9)	0,344
Bilirubin, gesamt (mg/dl)	0,5 (0,3 - 1,1)	0,4 (0,3 - 0,6)	0,085
Alanin-Aminotransferase (U/l)	32 (23 - 47)	19 (16 - 27)	< 0,001
Aspartat-Aminotransferase U/l)	39 (30 - 58)	26 (24 - 30)	< 0,001
Alkalische Phosphatase (U/l)	99 (79 - 145)	58 (50 - 64)	< 0,001
γ-Glutamyltransferase (U/l)	111 (57 - 168)	18 (12 - 29)	< 0,001
APRI	0,42 (0,29 - 0,85)	0,25 (0,21 - 0,31)	< 0,001
FIB-4	2,3 (1,32 - 4,20)	0,97 (0,79 - 1,24)	< 0,001
MELD	8 (7 - 10)	6 (6 - 7)	< 0,001
Scherwellengeschwindigkeit (m/s)	1,8 (1,61 - 1,92) [n = 55]	1,56 (1,52 - 1,63)	< 0,001
LiMAx (µg/kg/h)	308 (180 - 423) [n = 65]	395 (377 - 502) [n = 19]	0,002
Fibrosegrade, n (%)*			
F0	4 (8,5)	-	-
F1	18 (38,3)	-	-
F2	5 (10,6)	-	-
F3	4 (8,5)	-	-
F4	16 (34)	-	-
Aktive Raucher, n (%)	16 (24,2)	1 (5)	-
Portalvenöse Embolisation, n (%)	5 (7,6)	-	-

Die Ergebnisse sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Median (25. - 75. Perzentile) oder Anzahl n (%) angeführt. Bei fehlenden Werten ist die tatsächliche Anzahl [n] gegeben. APRI, *Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index*; aPTT, aktivierte partielle Thromboplastinzeit; BMI, Body-Mass-Index; FIB-4, *Fibrosis-4 Index*; INR, *International Normalized Ratio*; LiMAx, Liver MAXimum capacity; MELD, *Model for End-stage Liver Disease Score*. \* Desmet und Scheuer Score.

Tabelle 5: Übersicht der Lebererkrankungen der 66 Studienpatienten

Lebererkrankung	Anzahl, <i>n</i>
<b>Hepatozelluläres Karzinom, Ätiologie</b>	<b>31</b>
Keine bekannte chronische Lebererkrankung	11
Hepatitis-B-Virusinfektion	4
Hepatitis-C-Virusinfektion	3
Alkoholinduzierte Lebererkrankung	3
Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)	2
Kryptogene Leberzirrhose	8
<b>Cholangiozelluläres Karzinom</b>	<b>13</b>
<b>Kolorektale Lebermetastasen</b>	<b>12</b>
<b>Chronische Lebererkrankung (ohne Tumor), Ätiologie</b>	<b>9</b>
Alkoholinduzierte Lebererkrankung	3
Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)	3
Primär sklerosierende Cholangitis	1
Morbus Wilson	1
Hepatische Sarkoidose	1
<b>Hepatozelluläres Adenom</b>	<b>1</b>

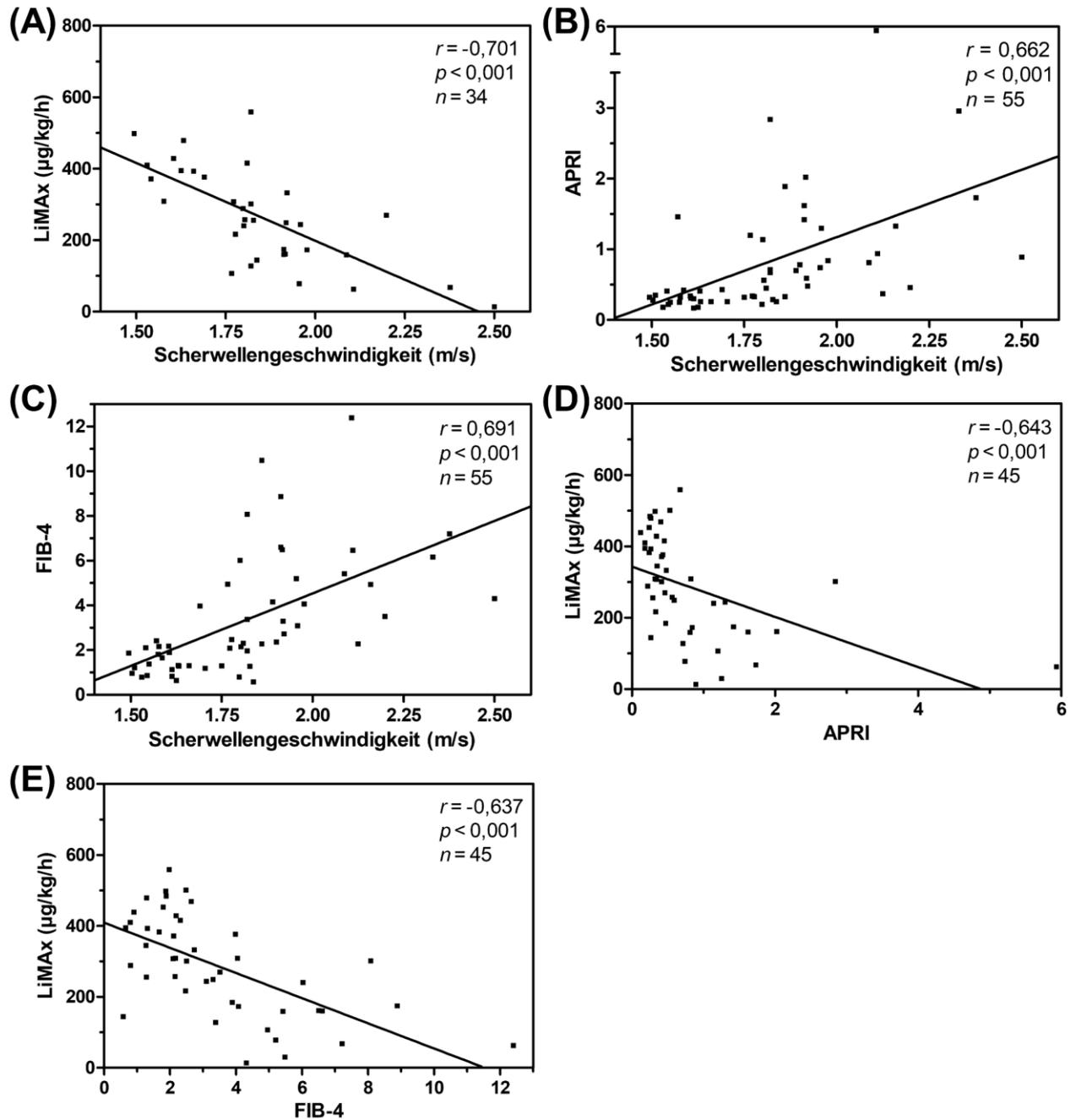


**Abbildung 12: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, LiMAx-Test und Lebersteifigkeitsmessung mittels zeitharmonischer Elastographie eines Patienten ohne Leberfibrose (A) und eines Patienten mit Zirrhose (B).** Gezeigt ist neben der Gewebefärbung (Messbalken 200 µm) und dem Liver MAximum capacity (LiMAx)-Test jeweils ein exemplarisches Elastogramm (rechts, ausgewertete *Region of Interest* mit Schwellenwert 1,3 m/s als weißer Kreis und Farbskala von blau  $\pm$  0 m/s bis rot  $\pm$  4 m/s) zusammen mit dem der Elastographie zugrundeliegenden *B-Mode*-Bild (links) aus der Messreihe beider Patienten. Die Scherwellengeschwindigkeit der gezeigten Messungen betragen: A - 1,51 m/s; B - 2,1 m/s.

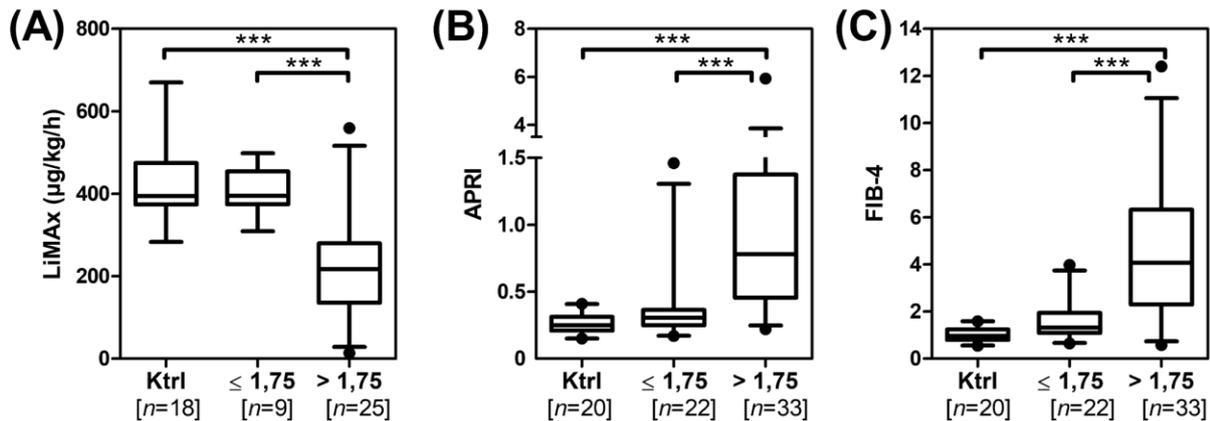
### 3.6 Zusammenhang zwischen Lebersteifigkeit, serologischen Scores und Leberfunktion

Zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen den strukturell-mechanischen Gewebeeigenschaften und der Leberfunktion erfasst mit dem LiMAx-Test wurden zunächst die nicht-invasiven Leberfunktions- und Leberstrukturparameter innerhalb der Gruppe der Patienten untersucht. Dabei wurde eine stark negative Korrelation zwischen der Scherwellengeschwindigkeit und den LiMAx-Werten der Patienten gefunden ( $r = -0,701$ ,  $p < 0,001$ ). Die Korrelationen zwischen der Scherwellengeschwindigkeit und den beiden erfassten serologischen Scores waren weniger stark ausgeprägt (APRI:  $r = 0,662$ ,  $p < 0,001$ ; FIB-4:  $r = 0,691$ ,  $p < 0,001$ ). Zwischen den LiMAx-Werten und den serologischen Scores zeigte sich eine negative Korrelation (APRI:  $r = -0,643$ ,  $p < 0,001$ ; FIB-4:  $r = -0,637$ ,  $p < 0,001$ ) (Abbildung 13A-E). Innerhalb der Gruppe der Probanden zeigten sich zwischen den untersuchten Variablen keine signifikanten Korrelationen, außer zwischen Scherwellengeschwindigkeit und APRI ( $r = -0,579$ ,  $p = 0,007$ ). Die LiMAx-, THE-, APRI- und FIB-4 Werte der Probanden waren jeweils mehrheitlich im nicht-pathologischen Bereich: LiMAx (Minimum - Maximum 283 - 670  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ), THE (1,49 - 1,75 m/s), APRI (0,15 - 0,41), FIB-4 (0,55 - 1,59).

Zur weiteren Analyse des Zusammenhangs zwischen Lebersteifigkeit und Leberfunktion wurde die Studienpopulation in drei Gruppen unterteilt: Patienten mit niedriger und hoher Scherwellengeschwindigkeit sowie den Probanden. Als Schwellenwert zwischen den beiden Patientengruppen diente dabei die maximale Scherwellengeschwindigkeit unter den gesunden Probanden (1,75 m/s). Die Patientengruppe mit hoher Lebersteifigkeit ( $> 1,75$  m/s) wies signifikant niedrigere LiMAx-Werte auf im Vergleich zur Patientengruppe mit niedriger Lebersteifigkeit ( $\leq 1,75$  m/s) und im Vergleich zu den Probanden. APRI und FIB-4 waren ebenso signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Patientengruppen als auch zwischen der Patientengruppe mit hoher Lebersteifigkeit und den Probanden (Abbildung 14).



**Abbildung 13: Korrelation zwischen Scherwellengeschwindigkeit und LiMAX-Werten (A), APRI (B) bzw. FIB-4 (C) zusammen mit der Korrelation zwischen LiMAX-Werten und APRI (D) bzw. FIB-4 (E) der untersuchten Patienten.** Jeder Graph zeigt die lineare Regressionslinie, den Korrelationskoeffizient nach Spearman  $r$ , den  $p$ -Wert und die Anzahl der untersuchten Patienten  $n$ . APRI, *Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index*; FIB-4, *Fibrosis-4 Index*; LiMAX, *Liver MAXimum capacity*.



**Abbildung 14: Gegenüberstellung von LiMAX-Werten (A), APRI (B) und FIB-4 (C) in gesunden Probanden (Ktrl) sowie in Patienten mit niedriger ( $\leq 1,75$  m/s) vs. hoher ( $> 1,75$  m/s) Lebersteifigkeit.** Der Schwellenwert der Scherwellengeschwindigkeit von 1,75 m/s entsprach dem Maximalwert bei den Probanden. Die Länge der *Whisker* reicht von der 5. bis zur 95. Perzentile. Punkte ober- oder unterhalb der *Whisker* entsprechen Ausreißern. \*\*\*  $p < 0,001$ . APRI, *Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index*; FIB-4, *Fibrosis-4 Index*; LiMAX, *Liver MAXimum capacity*;  $n$ , Anzahl der untersuchten Teilnehmer.

### 3.7 Einfluss fortschreitender Leberfibrose auf Lebersteifigkeit, serologische Scores und Leberfunktion

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen fortschreitender Fibrosierung und der Lebersteifigkeit, den erfassten serologischen Fibrose-Scores sowie der Leberfunktion wurden die Studienteilnehmer mit bekanntem Fibrosegrad in drei Gruppen unterteilt: gesunde Probanden + F0 (,keine Fibrose'), F1 + F2 (,moderate Fibrose'), F3 + F4 (,schwere Fibrose'). Detaillierte Patientencharakteristika aufgeschlüsselt nach Fibrosegrad sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Die mediane Scherwellengeschwindigkeit nahm mit fortschreitendem Fibrosegrad progressiv zu von 1,56 (1,53 - 1,62) m/s in der Gruppe ,keine Fibrose' zu 1,6 (1,54 - 1,67) m/s in der Gruppe ,moderate Fibrose' bis hin zu 1,85 (1,76 - 1,92) m/s in der Gruppe ,schwere Fibrose'. Signifikante Unterschiede der Scherwellengeschwindigkeit fanden sich dabei zwischen den Gruppen ,keine Fibrose' und ,schwere Fibrose' ( $p < 0,001$ ) sowie zwischen den Gruppen ,moderate Fibrose' und ,schwere Fibrose' ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 15A).

**Tabelle 6: Charakteristika der Studienpopulation zur Untersuchung strukturell-mechanischer und funktioneller Lebereigenschaften aufgeschlüsselt nach Fibrosegrad**

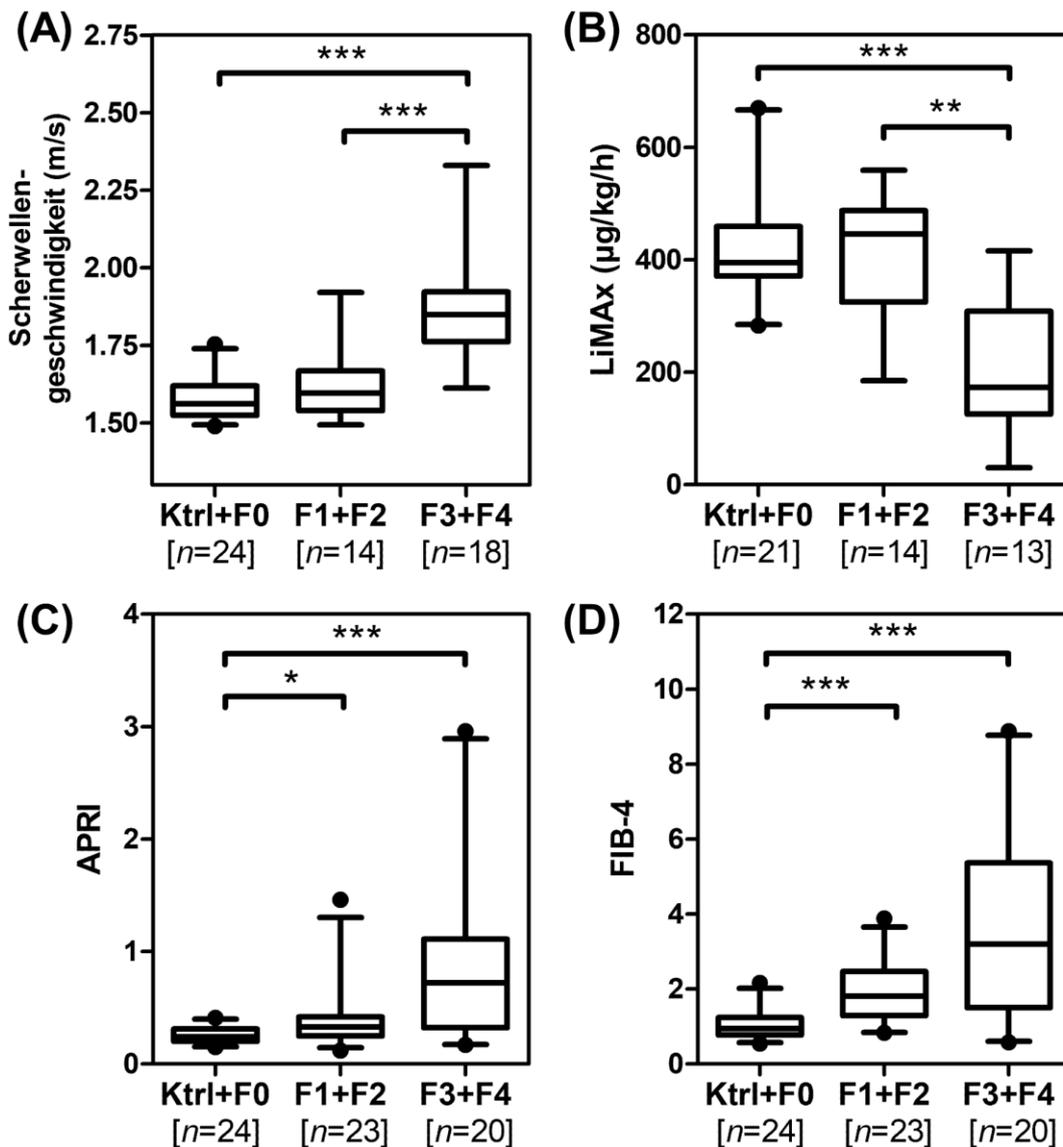
	Ktrl + F0 ,Keine Fibrose' (n = 24)	F1 + F2 ,Moderate Fibrose' (n = 23)	F3 + F4 ,Schwere Fibrose' (n = 20)
Alter (Jahren) [Min - Max]	50 (23 - 76)	67 (39 - 80)	65 (34 - 80)
Geschlecht, n (M/F)	15/9	17/6	12/8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,1 (22,2 - 26,8)	26,5 (23,4 - 30,0)	27,4 (24,4 - 30,3)
Thrombozyten (/nl)	231 (207 - 264)	229 (189 - 260)	168 (117 - 237)
INR	1,0 (0,9 - 1,0)	1,0 (1,0 - 1,1)	1,1 (1,0 - 1,2)
Kreatinin (mg/dl)	0,8 (0,8 - 0,9)	0,9 (0,7 - 1,1)	0,8 (0,7 - 1,1)
Bilirubin, gesamt (mg/dl)	0,4 (0,3 - 0,6)	0,4 (0,3 - 0,5)	0,6 (0,4 - 1,3)
Alanin-Aminotransferase (U/l)	19 (17 - 29)	32 (22 - 46)	36 (26 - 47)
Aspartat-Aminotransferase (U/l)	28 (24 - 30)	31 (28 - 43)	46 (33 - 64)
Alkalische Phosphatase (U/l)	60 (51 - 69)	94 (69 - 126)	101 (82 - 127)
γ-Glutamyltransferase (U/l)	20 (13 - 31)	79 (31 - 141)	118 (67 - 160)
MELD	6 (6 - 7)	7 (6 - 8)	8 (7 - 10)
Aktive Raucher, n (%)	1 (4,2)	4 (17,4)	7 (35)
Portalvenöse Embolisation, n (%)	1 (4,2)	4 (17,4)	-

Die Ergebnisse sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Median (25. - 75. Perzentile) oder Anzahl n (%) angeführt. BMI, Body-Mass-Index; INR, *International Normalized Ratio*; Ktrl, gesunde Probanden; MELD, *Model for End-stage Liver Disease Score*.

Die medianen LiMAx-Werte nahmen mit fortschreitender Fibrosierung ab von 395 (371 - 460) µg/kg/h in der Gruppe ‚keine Fibrose‘ zu 173 (126 - 309) µg/kg/h in der Gruppe ‚schwere Fibrose‘. Dabei waren die LiMAx-Werte zwischen den Gruppen ‚keine Fibrose‘ und ‚schwere Fibrose‘ ( $p < 0,001$ ) sowie zwischen den Gruppen ‚moderate Fibrose‘ und ‚schwere Fibrose‘ ( $p < 0,01$ ) signifikant unterschiedlich. Zwischen den Gruppen ‚keine Fibrose‘ und ‚moderate Fibrose‘ (446 (325 - 488) µg/kg/h) waren die LiMAx-Werte hingegen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 15B). Die Scherwellengeschwindigkeit war positiv ( $r = 0,681$ ,  $p < 0,001$ ), während der LiMAx negativ mit dem Grad der hepatischen Fibrosierung korreliert war ( $r = -0,504$ ,  $p < 0,001$ ).

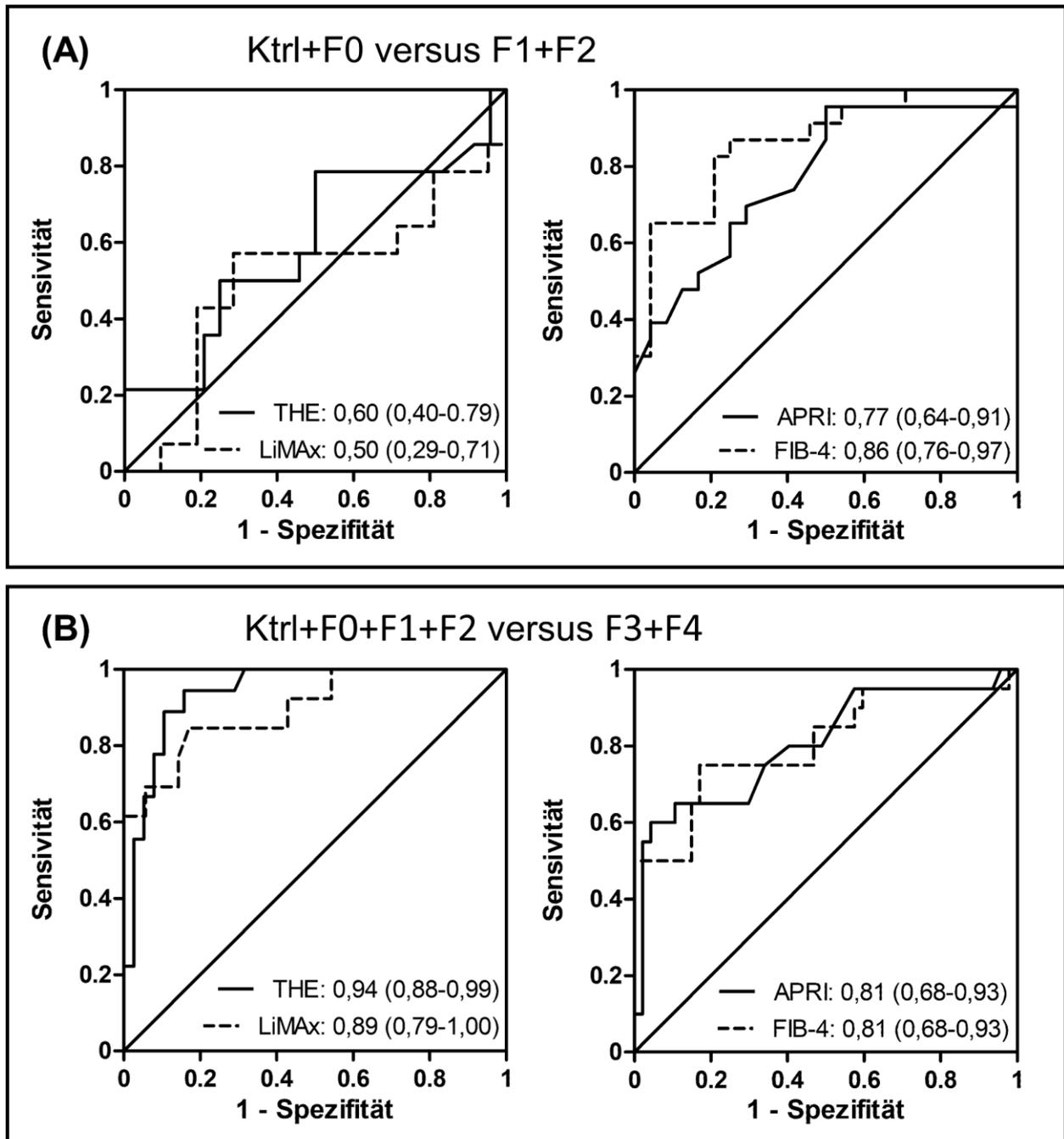
Beide untersuchten serologischen Scores zeigten höhere Zahlenwerte in Patienten mit fortgeschrittener Fibrose. Die medianen APRI-Werte nahmen mit steigendem Fibrosegrad zu von 0,24 (0,2 - 0,31) in der Gruppe ‚keine Fibrose‘ zu 0,33 (0,25 - 0,42) in der Gruppe ‚moderate Fibrose‘ bis hin zu 0,72 (0,32 - 1,11) in der Gruppe ‚schwere

Fibrose'. Die medianen FIB-4 Werte nahmen mit steigendem Fibrosegrad zu von 0,94 (0,77 - 1,24) in der Gruppe ‚keine Fibrose‘ zu 1,81 (1,29 - 2,47) in der Gruppe ‚moderate Fibrose‘ bis hin zu 3,2 (1,5 - 5,36) in der Gruppe ‚schwere Fibrose‘. Beide serologischen Scores waren signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen ‚keine Fibrose‘ und ‚moderate Fibrose‘ (APRI:  $p < 0,05$ ; FIB-4:  $p < 0,001$ ) sowie zwischen den Gruppen ‚keine Fibrose‘ und ‚schwere Fibrose‘ ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 15C-D).



**Abbildung 15: Zusammenhang zwischen Fibrosegrad und strukturell-mechanischen bzw. funktionellen Lebergewebeeigenschaften.** Fibrosegrade gruppiert in: Ktrl+F0 (‚keine Fibrose‘), F1+F2 (‚moderate Fibrose‘) und F3+F4 (‚schwere Fibrose‘). Die Länge der *Whisker* reicht von der 5. bis zur 95. Perzentile. Punkte ober- oder unterhalb der *Whisker* entsprechen Ausreißern. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ . APRI, *Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index*; FIB-4, *Fibrosis-4 Index*; Ktrl, gesunde Probanden; LiMAX, *Liver MAXimum capacity*; n, Anzahl der untersuchten Teilnehmer.

Die AUROC-Werte von THE, LiMAx, APRI und FIB-4 für die Detektion moderater Fibrose (F1+F2) waren: 0,60 (95 % Konfidenzintervall 0,40 - 0,79), 0,50 (0,29 - 0,71), 0,77 (0,64 - 0,91) bzw. 0,86 (0,76 - 0,97). Die entsprechenden AUROC-Werte von THE, LiMAx, APRI und FIB-4 für die Detektion schwerer Fibrose (F3+F4) waren: 0,94 (0,88 - 0,99), 0,89 (0,79 - 1,00), 0,81 (0,68 - 0,93) bzw. 0,81 (0,68 - 0,93) (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Receiver-operating-characteristic (ROC)-Kurven für die Detektion moderater (A) und schwerer Fibrose (B).** Dargestellt sind jeweils zeitharmonische Elastographie (THE) und Liver Maximum capacity (LiMAx)-Test bzw. Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI) und Fibrosis-4 Index (FIB-4) gemeinsam. Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUROC) mit 95 % Konfidenzintervall ist angegeben. Ktrl, gesunde Probanden.

Der optimale Schwellenwert für die Detektion moderater Fibrose entsprechend dem maximalen Youden-Index betrug 1,55 m/s für die THE (Sensitivität 79 %, Spezifität 50 %) und 355 µg/kg/h für den LiMAX-Test (Sensitivität 36 %, Spezifität 81 %). Für die Detektion schwerer Fibrose (F3+F4) betrug der Schwellenwert 1,65 m/s für die THE (Sensitivität 94 %, Spezifität 84 %) und 319 µg/kg/h für den LiMAX-Test (Sensitivität 85 %, Spezifität 83 %). Die logistische Regressionsanalyse zeigte, dass ein Modell mit Kombination von THE, LiMAX und serologischen Werten zur Detektion moderater als auch schwerer Fibrose zu keiner Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit führt.

Zusammenfassend zeigte sich in der Studienpopulation eine stark negative Korrelation zwischen dem LiMAX und der Scherwellengeschwindigkeit. Eine fortschreitende hepatische Fibrosierung ging mit höheren Scherwellengeschwindigkeiten und serologischen Fibrose-Scores (APRI, FIB-4) sowie niedrigeren LiMAX-Werten einher. Die funktionellen und strukturell-mechanischen Veränderungen bei leichtgradiger Fibrose ließen sich nicht sicher mit LiMAX und THE detektieren, hier erschienen die serologischen Scores überlegen. Dahingegen waren funktionelle und strukturell-mechanische Veränderungen der schweren Fibrose sicher mit THE und LiMAX erfassbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ergebnisbewertung

#### 4.1.1 Einfluss von Fibrosierung und Tumorgenese auf CYP1A2

Eine Methode zur experimentellen Bestimmung der CYP1A2-Aktivität im humanen Lebergewebe konnte erfolgreich etabliert werden. Weder bei Verwendung primärer Hepatozyten noch der HepG2-Zellen als Ausgangsmaterial war mit dem Assay eine Aktivität messbar, obwohl eine Expression von CYP1A2 in den Zelllinien beschrieben ist. In Bezug auf die HepG2-Zellen gibt es allerdings Hinweise, dass die CYP1A2-Expression durch die Kulturbedingungen beeinflusst werden kann [117, 120]. Eine zu geringe Zellzahl, ungeeignete Homogenisationsverfahren als auch letztlich das Alter der verwendeten Zelllinie könnten zudem die fehlende Aktivität in den hier erfolgten Experimenten erklären. Da im weiteren Verlauf eine erfolgreiche Aktivitätsbestimmung in humanem Lebergewebe gelang, wurde auf eine genauere Betrachtung der Ursachen verzichtet.

Die Enzymaktivitätslevel im nicht-tumorösen Leberparenchym der Studienpatienten wiesen interindividuell große Unterschiede auf (IQR 15,9 - 54,4  $\mu\text{U}/\text{mg}$ ), was in der Literatur ebenfalls so beschrieben ist [54, 56]. Potenzielle Einflussfaktoren auf die CYP1A2-Aktivität, wie Raucherstatus, Medikamenteneinnahme und Fibrosegrad, wurden systematisch erfasst. Auch bei alleiniger Betrachtung aller Patienten ohne Leberfibrose konnten diese großen interindividuellen Unterschiede (F0-Fibrose IQR 46,04 - 129,9  $\mu\text{U}/\text{mg}$ ) beobachtet werden, was die Bedeutung von Umweltfaktoren für die CYP1A2-Enzymaktivität unterstreicht.

Die Immunfluoreszenzfärbungen im nicht-tumorösen Gewebe zeigten ein CYP1A2-Signal, welches sich räumlich vor allem um das Glutamin-Synthetase-Signal verteilte. Die hepatische Glutamin-Synthetase spielt eine entscheidende Rolle in der Ammoniakentgiftung und wird hauptsächlich perivenös exprimiert [121]. Durch die simultane Anfärbung von CYP1A2 und der Glutamin-Synthetase konnte so auf eine ebenfalls eher perivenös betonte Expression von CYP1A2 geschlossen werden, was der vorbeschriebenen Lokalisation von CYP1A2 im Lebergewebe entspricht [122, 123]. Dieses Expressionsmuster fand sich, wenn auch in reduzierter Intensität, ebenfalls im HCA.

Die beschriebene Abnahme der Enzymaktivität mit fortschreitender Leberfibrose konnte reproduziert werden. So wie von Zhou *et al.* gezeigt [81], waren die Aktivitätswerte von Patienten ohne Leberfibrose signifikant höher als die von Patienten mit Leberfibrose und -zirrhose. Dabei bestand zwischen den Gruppen mit Leberfibrose und Leberzirrhose kein signifikanter Unterschied. In den erstellten Immunfluoreszenzfärbungen war das CYP1A2-Signal im zirrhotischen Gewebe deutlich vermindert im Vergleich zum nicht-fibrotischen Parenchym, was auf eine verminderte Expression von CYP1A2 im zirrhotischen Gewebe hindeutet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Daten aus qPCR- und Proteomanalysen [76, 80], die sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Verminderung der Expression von CYP1A2 im fibrotischen Gewebe feststellen konnten.

Die vorliegende Untersuchung setzte erstmalig die *in vitro* gemessene CYP1A2-Aktivität im nicht-tumorösen Leberparenchym direkt in Beziehung mit dem LiMAx-Wert, der die hepatische CYP1A2-Gesamtaktivität widerspiegelt. So wie bei den CYP1A2-Aktivitätswerten zeigte sich auch bei den LiMAx-Werten eine Abnahme mit fortschreitender Fibrosierung, sodass eine signifikant positive Korrelation zwischen den beiden Parametern bestand ( $r = 0,367$ ). In der Literatur sind nur wenige Studien zu finden, die experimentell gemessene Aktivitätslevel von CYP-Enzymen mit den Ergebnissen der korrespondierenden *in vivo*-Tests vergleichen. Fuhr *et al.* untersuchten beispielsweise den Metabolismus des CYP1A2-Substrates Koffein [124]. Dazu erfassten sie intraindividuell in 25 Patienten sowohl experimentell die hepatische CYP1A2-Aktivität (Caffeine 3-Demethylation, Phenacetin O-Deethylation) als auch die Stoffwechselprodukte des oral applizierten Koffeins im Blut, Speichel und Urin. Dabei zeigte sich eine starke Korrelation zwischen den gemessenen Enzymaktivitätswerten und der Koffein-Pharmakokinetik, sodass Koffein als Testsubstanz für die Phänotypisierung von CYP1A2 geeignet erschien. Eine ähnliche Untersuchung existiert für den <sup>13</sup>C-Phenylalanin-basierten Atemtest, der die Aktivität der hauptsächlich hepatisch exprimierten Phenylalaninhydroxylase misst [125]. Für den LiMAx-Test war bisher soweit bekannt noch keine Korrelation experimenteller und klinischer Aktivitätswerte verfügbar. Durch die vorliegende Untersuchung konnte diese Lücke geschlossen werden.

Es gilt jedoch zu beachten, dass der LiMAx-Test die globale Leberfunktion erfasst, wohingegen die experimentell ermittelte Aktivität nur einen punktuellen Wert innerhalb des gesamten Leberparenchyms widerspiegelt. Vor dem Hintergrund potenziell

heterogener Enzymexpression stellt sich die Frage, inwiefern ein lokaler Aktivitätswert als repräsentativ für die gesamte Leber gelten darf und so mit dem LiMAx-Wert vergleichbar ist. Bekannt ist, dass innerhalb des Leberazinus als funktionelle Gliederungseinheit der Leber hepatische Enzyme heterogen exprimiert werden [126]. Aufgrund unterschiedlicher Hormon-, Sauerstoff- und Metabolitenkonzentration innerhalb des Leberazinus zeichnen sich periportale Hepatozyten beispielsweise durch eine höhere Aktivität der Gluconeogenese oder  $\beta$ -Oxidation aus, während perivenöse Hepatozyten vermehrt Enzyme der Glykolyse, Lipogenese oder des Fremdstoffmetabolismus exprimieren. Da aber bei den hier erfolgten Aktivitätsmessungen durch die Analyse eines 50 - 200 mg schweren Gewebestücks eine Vielzahl an Leberazini erfasst wurde, hat diese mikroskopische Heterogenität im Lebergewebe keinen Einfluss auf die Repräsentativität des gemessenen Aktivitätswertes. Entscheidend dagegen ist, ob relevante Aktivitätsunterschiede von CYP-Enzymen zwischen verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Leber bestehen. Watkins *et al.* untersuchten in einer Studie aus dem Jahr 1989 unter anderem die Gesamtkonzentration an CYP-Enzym in Lebergewebeproben aus 10 verschiedenen Entnahmeorten einer humanen Leber [127]. Dabei fanden sie eine homogene Verteilung des CYP-Gehaltes zwischen den Entnahmeorten. Eine spezifische Untersuchung intraindividuelle Unterschiede in der Expression und Aktivität von humanem CYP1A2 innerhalb der Leber ist soweit bekannt bisher nicht erfolgt. Experimentelle Daten aus Versuchen mit Lebergewebe von Schweinen [128] und Javaneraffen [129] deuten aber auf eine homogene Verteilung von CYP1A2 in der Leber hin. Somit erscheint es legitim, die hier erhobenen punktuellen Aktivitätswerte als repräsentativ für die Gesamtaktivität des hepatischen CYP1A2-Enzyms anzusehen. Eine direkte Berechnung des LiMAx-Wertes aus der experimentell ermittelten Enzymaktivität ist dennoch nicht möglich, da die CYP1A2-Aktivität auf die Proteinmenge im Homogenisat und der LiMAx-Wert auf das Körpergewicht normiert sind.

Trotz der anzunehmenden Repräsentativität der Aktivitätswerte für die gesamte Leber zeigte sich bei einigen Patienten eine starke Diskrepanz und somit ein insgesamt nur moderater Korrelationskoeffizient zwischen der experimentell gemessenen CYP1A2-Aktivität und den LiMAx-Werten (vgl. Abbildung 10). Zu Bedenken ist dabei, dass nicht-tumoröse Lebergewebeproben mit verschieden starker Fibrosierung analysiert wurden. Leberfibrose und -zirrhose sind intrahepatisch potenziell inhomogen verteilt [90]. Vor

diesem Hintergrund ist es denkbar, dass die singulären Proben nicht repräsentativ für den Fibrosegrad der Gesamtleber waren, wodurch sich eine Abweichung der ermittelten Aktivitätswerte vom LiMAX-Wert erklären ließe.

Bei allen untersuchten hepatischen Tumoren konnte eine reduzierte CYP1A2-Aktivität im Vergleich zum jeweiligen nicht-tumorösen Gewebe gemessen werden. Gewebe aus HCC wiesen dabei eine Restaktivität auf ( $< 1\%$ ). Auch Yan *et al.* untersuchten in einer Studie die Aktivitätslevel von CYP1A2 im HCC-Gewebe von ausschließlich an chronischer Hepatitis B erkrankten Patienten [79] und fand dabei ebenfalls eine deutlich reduzierte Aktivität im Tumorgewebe.

In den für die Arbeit angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen vom HCC-Gewebe war kein spezifisches CYP1A2-Signal detektierbar. Dies stimmt mit verfügbaren Färbungen aus dem *Human Protein Atlas* überein [130] und deutet darauf hin, dass die beobachtete Aktivitätsabnahme im HCC eher durch eine Abnahme des Expressionslevels verursacht zu sein scheint, denn durch Veränderungen der funktionellen Eigenschaften des CYP-Enzyms selbst. Zu diesem Ergebnis kommen auch Yan *et al.* in ihrer Studie. Sie untersuchten zusätzlich zur reinen Aktivitätsmessung auch noch funktionelle Parameter des CYP1A2-Enzyms. So konnten sie unter anderem zeigen, dass die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ -Wert) von CYP1A2, als Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat, im HCC im Vergleich zum nicht-tumorösen Gewebe unverändert ist [79]. Zu beachten ist die Diskrepanz zwischen dem fehlenden CYP1A2-Signal in der Immunfluoreszenzfärbung und einer nachweisbaren CYP1A2-Restaktivität im HCC-Gewebe. Ursächlich könnte hier insbesondere vor dem Hintergrund sehr niedriger Expressionslevel unter anderem ein Unterschreiten der Detektionsgrenze des verwendeten CYP1A2-Antikörpers sein.

Funktionelle Enzymeigenschaften scheinen bei der Tumorgenese also unverändert zu bleiben. Diese Annahme wird unterstützt durch Studien, die sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene im HCC eine Verminderung der Expression nachweisen konnten [73, 74, 77, 78]. Die verringerte CYP1A2-Expression scheint dabei sowohl im Prozess der HCC- als auch der Fibroseentstehung durch eine Abnahme der Expression des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR), der als Transkriptionsfaktor die Expression von CYP1A2 steuert, verursacht zu sein [74, 76]. Darüber hinaus war kein spezifisches Fluoreszenzsignal des verwendeten Glutamin-Synthetase-Antikörpers im HCC detektierbar, was auf eine fehlende Expression im hier untersuchten Gewebe hindeutet.

Dennoch ist in der Literatur bei etwa 70 % aller HCC-Gewebe eine Expression der Glutamin-Synthetase von mindestens 5 % aller Zellen in den entsprechenden Färbungen beschrieben [131, 132]. Es ist daher zu vermuten, dass die fehlende Immunreaktivität in den hier angefertigten Färbungen dadurch bedingt ist, dass das zugrundeliegende HCC-Gewebe zu den Glutamin-Synthetase negativen Tumoren gehörte.

In Bezug auf die CYP1A2-Aktivität in CRLM lagen bisher soweit bekannt keine experimentellen Daten vor. Vor dem Hintergrund fehlender mRNA- und Proteinexpression von CYP1A2 im Gastrointestinaltrakt [133] sowie im kolorektalen Karzinom [134] scheint eine Expression von CYP1A2 in CRLM auch unwahrscheinlich. Zudem konnte gezeigt werden, dass zumindest auf mRNA-Ebene die Genexpressionsmuster von gepaarten Proben aus kolorektalen Karzinomen und den korrespondierenden CRLM hoch konkordant sind [135, 136]. Auch das würde gegen eine Expression in CRLM sprechen. Nichtsdestotrotz stehen wenig Daten hinsichtlich der tatsächlichen Proteinexpression von CYP1A2 in CRLM zur Verfügung. In einer Studie von Lane *et al.* wurden 6 gepaarte Gewebeproben von CRLM und umgebendem tumorfreien Lebergewebe mit Massenspektroskopie auf die Proteinmenge von CYP1A2 untersucht [85]. Komplementär zu den hier angefertigten Gewebefärbungen und der ermittelten Aktivitätsabnahme in den CRLM-Proben fanden sie eine stark verminderte bis fehlende Proteinexpression in den Proben der CRLM.

HCA-Gewebe wies als einziger der untersuchten Lebertumoren relevante Enzymaktivität auf (20,7 %) und zeigte auch in den Immunfluoreszenzfärbungen ein detektierbares Signal in der Raumforderung. Ein CYP1A2-Signal im Adenomgewebe, als Zeichen vorhandener Enzymexpression, wurde auch in einer Studie von Haas *et al.* nachgewiesen [84]. Hinsichtlich der Aktivitätslevel im HCA liegen soweit bekannt bisher keine experimentellen Daten vor, was die Bedeutung der vorliegenden Arbeit unterstreicht.

### 4.1.2 Verbesserung der präoperativen Volumen-Funktionsplanung

Bisher bestand Unklarheit darüber, inwieweit potenziell vorhandene CYP1A2-Restaktivität hepatischer Tumoren die Vorhersagegenauigkeit der Volumen-Funktionsplanung mit dem LiMAX-Test beeinflusst. Dieses Problem wurde in der Arbeit durch ein translationales Vorgehen mit Übertragung der gewonnenen experimentellen Daten auf die klinische Anwendung adressiert.

Dabei konnte das bisherige Vorgehen zur Bestimmung der FLRF-LiMAx für HCC- und CRLM-Patienten vor dem Hintergrund der geringen Aktivität von < 1 % im tumorösen Gewebe bestätigt werden. Eine Berechnung der FLRF-LiMAx ohne Berücksichtigung des Tumorgewebes mit der aktuell verwendeten Standardformel ist angesichts der experimentellen Daten legitim. Die CYP1A2-Restaktivität von 20,7 % im HCA-Gewebe hat einen deutlicheren Einfluss auf die Genauigkeit der Volumen-Funktionsplanung. Bei Verwendung der aktuellen Standardformel besteht die Gefahr der systematischen Überschätzung der Leberfunktion mit folglich falscher Therapieentscheidung. Denn es wird angenommen, dass die gemessene Leberfunktion vollständig durch das nicht-tumoröse Gewebe generiert wird. Der Anteil des HCA an dem LiMAx-Wert wird fälschlicherweise dem nicht-tumorösen Gewebe zugeschlagen. Leberadenome sind seltene, benigne Raumforderungen. Der Hauptrisikofaktor für die HCA-Entstehung ist eine Exposition gegenüber Östrogen, sodass hauptsächlich Frauen im gebärfähigen Alter betroffen sind und die Einnahme östrogenhaltiger Kontrazeptiva mit ihrem Auftreten assoziiert ist [137]. Oftmals besteht keine chronische Lebererkrankung, sodass auf eine präoperative Volumen-Funktionsplanung verzichtet werden kann. Nichtsdestotrotz sollte insbesondere bei Patienten mit großem HCA oder Verdacht auf eine vorbestehende Leberfunktionseinschränkung die FLRF-LiMAx entsprechend der vorgeschlagenen verbesserten Methode unter Berücksichtigung der CYP1A2-Aktivität im HCA-Gewebe berechnet werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sind möglicherweise auch übertragbar auf andere Leberfunktionstests, die ebenfalls durch Verwendung von z. B. oral appliziertem Koffein, <sup>13</sup>C-Methacetin oder <sup>13</sup>C-Phenacetin spezifisch die Aktivität des CYP1A2-Enzyms erfassen.

#### 4.1.3 Struktur-Funktionsbeziehung im Progress chronischer Lebererkrankungen

Die THE konnte erstmalig zusammen mit dem LiMAx-Test in einer Kohorte leberkranker, erwachsener Patienten eingesetzt werden. Die ermittelte mediane Scherwellengeschwindigkeit von 1,56 (1,52 - 1,63) m/s bei den Probanden entspricht sowohl vorbeschriebenen Werten der ultraschallbasierten [107] als auch der magnetresonanzbasierten THE [138]. In der Studienpopulation ließ sich weder beim BMI noch beim Geschlecht ein Zusammenhang mit der Lebersteifigkeit feststellen. Der BMI selbst scheint also keinen Einfluss auf die Höhe der Scherwellengeschwindigkeit zu haben, was Studien mit anderen Verfahren der Scherwellenelastographie ebenfalls zeigten [139-141]. Hinsichtlich des Geschlechts berichten die meisten veröffentlichten

Untersuchungen eine höhere Lebersteifigkeit bei Männern als bei Frauen [142-144]. Dennoch existieren auch Studien, die, wie in der vorliegenden Untersuchung, keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern feststellen konnten [145, 146]. Das Alter zeigte eine schwach positive Korrelation mit der Scherwellengeschwindigkeit, obwohl in der Mehrzahl der verfügbaren Studien gezeigt werden konnten, dass die Lebersteifigkeit nicht durch das Alter beeinflusst wird [109, 147, 148].

In Bezug auf die Leberfunktion entsprach der ermittelte mediane LiMAx-Wert der Probanden von 395 (377 - 502)  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  weitestgehend zuvor publizierten Daten für lebergesunde Testteilnehmer [35, 46]. In der Studienpopulation ließ sich weder beim Alter noch beim Geschlecht ein Zusammenhang mit den LiMAx-Werten feststellen. Der BMI wies hingegen eine schwach negative Korrelation mit den LiMAx-Werten auf. Die verfügbaren Studien zum Thema zeigen jedoch, dass der LiMAx-Test weder durch Alter, Geschlecht noch durch BMI beeinflusst wird [34, 35, 149].

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den erfassten strukturell-mechanischen und funktionellen Lebereigenschaften offenbarte eine stark negative Korrelation zwischen Scherwellengeschwindigkeit und LiMAx-Werten, die stärker war als alle Korrelationen zwischen Scherwellengeschwindigkeit bzw. LiMAx-Werten und den serologischen Scores APRI und FIB-4. Erstmals ist dabei überhaupt eine gemeinsame Anwendung der THE und des LiMAx-Tests erfolgt.

Hinweise auf einen bestehenden Zusammenhang zwischen beiden Parametern lieferten einzelne Studien mit dem LiMAx-Test. So korrelierten die LiMAx-Werte stark mit dem *Model for End-stage Liver Disease Score* (MELD) sowie dem Child-Pugh-Score als etablierte klinische Werkzeuge zur Einschätzung der Krankheitsschwere bei Patienten mit Leberzirrhose [44]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die mit dem LiMAx-Test erfasste Leberfunktion ein unabhängiger Prädiktor für das Kurzzeitüberleben von Patienten mit Leberzirrhose darstellt [45].

Eine vergleichbare nicht-invasive Struktur-Funktionsanalyse der Leber mit Kombination von Elastographie und quantitativem Leberfunktionstest wurde von Sun *et al.* vorgestellt, bei der in einer Kohorte von 76 Patienten mit Lebertumoren simultan die pSWE sowie der ICG-Test angewandt wurden [150]. Die erfasste Scherwellengeschwindigkeit und die ICG-Plasmaverschwinderate (*plasma disappearance rate*, PDR) als Maß für die

hepatische Funktion korrelierten dabei ebenfalls stark negativ miteinander ( $r = -0,673$ ,  $p < 0,01$ ), eine hohe Lebersteifigkeit ging mit herabgesetzter funktioneller Leberkapazität einher. In einer kleinen Kohorte von 32 Patienten, die gleichzeitig mit dem ICG-Test und der Magnetresonanzelastographie untersucht worden sind, konnten Li *et al.* diesen Zusammenhang bestätigen [151].

Diese klinisch erfasste Struktur-Funktionsbeziehung spiegelt letztlich die pathophysiologischen Veränderungen im Progress chronischer Lebererkrankungen wider. Die Zunahme der EZM bei fortschreitender hepatischer Fibrosierung, die durch elastographische Verfahren messbar wird, geht mit einer Abnahme an funktionellem Lebergewebe einher, was sich in niedrigerer quantitativer Leberfunktion äußert. Entscheidend dabei ist ein Verständnis der zeitlichen Abfolge pathophysiologischer Prozesse im Progress chronischer Lebererkrankungen. Hierbei stellt sich insbesondere die Frage, ob einer der beiden beschriebenen Prozesse, Funktionsverlust oder Strukturveränderung, initial führend ist. Abhängig davon wäre dann entweder ein quantitativer Leberfunktionstest oder ein elastographisches Verfahren für die Detektion früher Krankheitsstadien geeigneter. Leberfibrose entsteht, wenn die Homöostase zwischen Inflammation und Regeneration verloren geht und als Reaktion auf persistierende lebertoxische Noxen histologisch fassbare Umbauvorgänge des Gewebes einsetzen. Bekannt ist, dass dabei sowohl ein Untergang der Hepatozyten als auch eine erhöhte EZM-Produktion verursacht wird. Hepatische Sternzellen (Ito-Zelle; *hepatic stellate cell*, HSC) werden aktuell als Hauptquelle der EZM in der Leberfibrose angesehen. Ein Schlüsselmechanismus bei der Fibroseentstehung ist die Aktivierung der ruhenden Vitamin-A speichernden Sternzellen (*quiescent HSC*) zu EZM-produzierenden Myofibroblasten [152]. Es konnte gezeigt werden, dass geschädigte Hepatozyten durch die Freisetzung von Interleukin 33 (IL-33) hepatische Sternzellen aktivieren können [153, 154]. Dies würde bedeuten, dass ein Hepatozytenschaden notwendige Bedingung für die Entstehung einer Leberfibrose wäre. Somit müsste theoretisch ein Funktionsverlust vor einer Strukturveränderung messbarer werden. Nichtsdestotrotz ist auch eine Vielzahl anderer molekularer Mechanismen unabhängig von einem hepatozellulären Schaden beschrieben worden, die zu einer Aktivierung hepatischer Sternzellen beitragen [152]. Insgesamt lässt sich also vermuten, dass sich die funktionellen und strukturellen Veränderungen weitestgehend parallel entwickeln und somit sowohl Elastographie als auch Leberfunktionstests vielversprechende Verfahren darstellen.

### 4.1.4 THE und LiMAx als diagnostische Werkzeuge der Fibrosedetektion

Schlussendlich sollte anhand einer möglichen klinischen Anwendung, der nicht-invasiven Fibrosedetektion, überprüft werden, ob sich die gewonnenen Erkenntnisse über die erhobenen Lebergewebeparameter klinisch nutzen lassen können. Bei der Evaluation der diagnostischen Wertigkeit nicht-invasiver Testverfahren wird der Fibrosegrad meist auf Grundlage einer Leberbiopsie bestimmt. Dennoch sind, wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, gerade Biopsien durch ihre geringe auswertbare Masse im Vergleich zur Gesamtleber insbesondere vor dem Hintergrund der Fibrose als ein diffuses, räumlich heterogenes Phänomen potenziell verfälscht [90]. Daher wurden Ergebnisse von Leberbiopsien nicht für die Auswertung herangezogen. Lediglich chirurgisch reseziertes Gewebe wurde histopathologisch analysiert, um so den Stichprobenfehler so klein wie möglich zu halten. Die Untersuchung der diagnostischen Wertigkeit der analysierten Verfahren erfolgte durch Konstruktion von ROC-Kurven mit Berechnung der AUROC-Werte. Dabei zeigte sich, dass die graduellen Veränderungen einer beginnenden Fibrose nicht sicher mit THE und LiMAx detektierbar waren. Dahingegen waren sie in der Lage, die Veränderungen der schweren Fibrose zuverlässig zu erfassen und zeigten sich dabei den serologischen Scores überlegen.

In Bezug auf die THE scheint es, als hätten die mit einer moderaten Fibrose einhergehenden histopathologischen Veränderungen wie portale Bindegewebevermehrung und Septenbildung noch keine signifikant messbaren Auswirkungen auf die Scherwellengeschwindigkeit. Die einzige weitere, klinische Anwendung der ultraschallbasierten THE in leberkranken Patienten mit bekanntem Fibrosegrad wurde kürzlich von Hudert *et al.* vorgelegt. In der Studie wurde die THE prospektiv in einer Kohorte von 67 Jugendlichen mit NAFLD angewandt [109]. Zu beachten ist jedoch, dass die Fibrose in der Studie mit dem *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN)* Klassifikationssystem unterteilt wurde und es keinen Studienteilnehmer mit einer Zirrhose gab. Die Studie ist daher nur eingeschränkt mit der vorliegenden Untersuchung vergleichbar. Eine Gegenüberstellung soll in Ermangelung anderer Studien aber dennoch kurz erfolgen. Im Gegensatz zu den hier ermittelten Tendenzen konnte in der Studie von Hudert *et al.* gezeigt werden, dass die THE auch leichte ( $F \geq 1$ ) sowie moderate Fibrose ( $F \geq 2$ ) zuverlässig detektieren kann. Der AUROC-Wert für die Detektion schwerer Fibrose ( $F \geq 3$ ) betrug 0,88 und war damit kleiner als der hier ermittelte Wert von 0,94. Der ermittelte Schwellenwert für schwere Fibrose betrug bei

Hudert *et al.* 1,64 m/s und entspricht damit soweit vergleichbar dem hier ermittelten Wert von 1,65 m/s. Scherwellengeschwindigkeit und der Fibrosegrad korrelierten in der Studie ebenfalls stark positiv, wobei der beobachtete Zusammenhang von  $r = 0,816$  deutlich größer war als in der vorliegenden Untersuchung ( $r = 0,681$ ).

Hinsichtlich des LiMAx-Tests scheint es, als seien die funktionellen Veränderungen einer beginnenden Fibrose nicht sicher detektierbar. Darauf deutet der fehlende signifikante Unterschied zwischen den Gruppen ‚keine Fibrose‘ und ‚moderate Fibrose‘ sowie der niedrige AUROC-Wert für die Detektion moderater Fibrose. Diese Beobachtung findet sich auch bei Betrachtung der im ersten Teil der Arbeit experimentell gemessenen CYP1A2-Aktivität im nicht-tumorösen Gewebe wieder. Auch dort konnte kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen Gewebe mit dem Fibrosegrad F0 und F1 gefunden werden (vgl. Abbildung 9). Bei Betrachtung der zentralen Tendenzen der drei Fibrosegruppen waren die LiMAx-Werte der Gruppe ‚moderate Fibrose‘ höher als die der Gruppe ‚keine Fibrose‘. Vor dem Hintergrund großer interindividueller Schwankungen der LiMAx-Werte mit sich überlappenden IQR und fehlendem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen scheint es sich gleichwohl eher um eine rein statistische Beobachtung zu handeln, die den tatsächlichen biologischen Vorgängen im Leberparenchym nicht entspricht. Schwere Fibrose und Zirrhose konnten sicher detektiert werden. Zu diesem Ergebnis kommt auch eine kürzlich veröffentlichte Studie von Büchter *et al.* In der retrospektiven, monozentrischen Analyse war der LiMAx-Test allen anderen untersuchten nicht-invasiven Verfahren (APRI, FIB-4, De-Ritis-Quotient, TE) in der Detektion schwerer Fibrose und Zirrhose in einer Kohorte von 102 Patienten mit verschiedenen chronischen Lebererkrankungen überlegen [46]. Die Fibrose wurde dabei auch mit dem Desmet und Scheuer Score klassifiziert. Der AUROC-Wert für den LiMAx-Test zur Detektion schwerer Fibrose (F3+F4) war mit 0,84 vergleichbar mit dem in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Wert von 0,89. Überraschenderweise war in der Studie die diagnostische Wertigkeit des LiMAx auch bei niedrigen Fibrosegraden hoch und den serologischen Scores APRI und FIB-4 überlegen. LiMAx-Werte und der Fibrosegrad korrelierten in der Studie ebenfalls negativ, wobei der Korrelationskoeffizient von  $r = -0,680$  etwas höher war als der hier ermittelte Koeffizient von  $r = -0,504$ . Die erhobenen LiMAx-Werte in der Studie von Büchter *et al.* nahmen entsprechend mit fortschreitender Fibrose ab, wobei leider kein Vergleich der zentralen Tendenzen der einzelnen Gruppen mit Hilfe eines statistischen Tests erfolgte. Zudem erfolgte in der

Studie keine Gruppierung der einzelnen Fibrosegrade, sodass ein direkter Vergleich mit hier erhobenen LiMAX-Werten nicht möglich ist. Eine mögliche Erklärung für die Überlegenheit des LiMAX gegenüber der TE in der Fibrosedetektion wurde in der Studie nicht diskutiert.

Auch andere quantitative Leberfunktionstests wurden schon auf ihre Eignung zur Detektion hepatischer Fibrose hin überprüft. So konnte gezeigt werden, dass der orale <sup>13</sup>C-Methacetin-Leberfunktionstest in Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion verlässlich schwere Fibrose sowie Zirrhose (F3+F4) detektieren kann [155, 156]. Forestier *et al.* untersuchten in einer Patientenkohorte mit chronischen Lebererkrankungen verschiedenster Genese den oralen <sup>13</sup>C-Aminopyrin-Leberfunktionstest und konnten eine gute diagnostische Wertigkeit für die Detektion der Leberzirrhose nachweisen (AUROC 0,82) [157]. Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf den <sup>13</sup>C-Aminopyrin-Leberfunktionstest liegen für ausschließlich an chronischer Hepatitis C erkrankte Patienten vor [158].

Die Werte der serologischen Scores APRI und FIB-4 stimmten weitestgehend mit vorbeschriebenen Daten überein. In Bezug auf den APRI sprechen Werte  $\leq 0,3$  gegen eine signifikante Fibrose ( $F \geq 2$ ). Der mediane APRI-Wert in der Gruppe ‚keine Fibrose‘ betrug 0,24 und war damit unterhalb des Schwellenwertes. Ab APRI-Werten von  $> 0,3$  ist eine signifikante Fibrose möglich, eine Zirrhose selbst aber unwahrscheinlich. Der mediane Wert von 0,33 (0,25 - 0,42) in der Gruppe ‚moderate Fibrose‘ fällt somit in diese Kategorie, überschneidet aber mit seinem IQR den Schwellenwert zur unteren Kategorie. Bei APRI-Werten  $> 0,5$  aber  $\leq 1,5$  ist sowohl eine signifikante Fibrose als auch eine Zirrhose möglich [159]. Der mediane Wert von 0,72 (0,32 - 1,11) in der Gruppe ‚schwere Fibrose‘ fällt somit in diesen Bereich, überschneidet aber ebenso mit seinem IQR den Schwellenwert zur unteren Kategorie. Zu beachten ist allerdings, dass der APRI ursprünglich nur für durch chronische Hepatitis C verursachte Leberfibrose und -zirrhose entwickelt und entsprechend validiert wurde [93]. Darüber hinaus sind dann für weitere Krankheitsätiologien Schwellenwerte ermittelt worden, die sich zum Teil unterscheiden. Die vorliegende Studienpopulation war klein und vereinigte multiple Ätiologien, sodass eine sinnvolle Berechnung der APRI-Werte für die einzelnen Ätiologien nicht möglich war. Daher erfolgte der Vergleich der erhobenen Werte hier mit Schwellenwerten, die ursprünglich für die chronische Hepatitis C entwickelt worden sind.

Der FIB-4 wurde ebenfalls initial für die nicht-invasive Fibrosediagnostik bei Patienten mit chronischer Hepatitis C entwickelt. Dabei spricht ein Wert  $< 1,45$  gegen und ein Wert  $> 3,25$  stark für das Vorhandensein einer schweren Fibrose (F3+F4), wobei Werte dazwischen keine sichere Aussage zulassen [160]. Der mediane Wert von 0,94 (0,77 - 1,24) in der Gruppe ‚keine Fibrose‘ lag damit entsprechend unterhalb des unteren Schwellenwertes. In der Gruppe ‚schwere Fibrose‘ war der mediane Wert 3,2 (1,5 - 5,36) und befand sich damit knapp unter dem oberen Schwellenwert für schwere Fibrose. Zudem überschritt der IQR den oberen Schwellenwert. Der mediane Wert von 1,81 (1,29 - 2,47) in der Gruppe ‚moderate Fibrose‘ lag genau zwischen den beiden Schwellenwerten. Die serologischen Scores APRI und FIB-4 wiesen bei der Detektion moderater Fibrose höhere AUROC-Werte auf, waren also scheinbar bei dieser Anwendung überlegen. Es scheint, als existierten im Bereich moderater Fibrosierung weniger potenzielle Störfaktoren für die serologischen Scores. Bei fortschreitender Leberfibrose mit zunehmend extrahepatischen Folgeschäden erscheinen die serologischen Scores dann störanfällig, was die Überlegenheit von LiMAx-Test und THE erklären könnte. Die genauen Ursachen dieser Beobachtung bleiben jedoch letztlich unklar.

Eine gemeinsame Anwendung von THE, LiMAx und den serologischen Scores brachte in der vorliegenden Untersuchung keine Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit für die Detektion moderater wie auch schwerer Fibrose. Im Gegensatz dazu konnten Büchter *et al.* in ihrer Studie zeigen, dass eine Kombination von TE und LiMAx-Test die diagnostische Genauigkeit bei der Detektion der Leberzirrhose noch einmal erhöhen kann. So schlagen sie letztlich einen sequenziellen diagnostischen Algorithmus vor, der zunächst die TE vorsieht und gegebenenfalls mit dem LiMAx-Test ergänzt werden sollte [46]. Auch die synchrone Kombination von serologischen Parametern, quantitativen Leberfunktionstests und elastographischen Methoden erwies sich in Studien als überlegen gegenüber den jeweiligen Verfahren allein bei der Diagnose fortgeschrittener Fibrose und Zirrhose verschiedenster Genese [161, 162]. Bei Betrachtung einer Kohorte von 217 Patienten mit alkoholinduzierter Lebererkrankung konnte allerdings keine signifikante Steigerung der diagnostischen Wertigkeit durch einen kombinierten Einsatz von serologischen Parametern und TE festgestellt werden [163]. Letztlich deutet die Mehrheit der vorhandenen Studien auf einen Vorteil einer kombinierten Struktur-Funktionsanalyse bei chronischen Lebererkrankungen hin. Inwiefern speziell die THE

und der LiMAX-Test in diagnostischen Algorithmen eingesetzt werden können, sollte in weiteren Studien mit größeren Patientenkollektiven untersucht werden.

### 4.2 Limitationen

#### 4.2.1 Charakterisierung von CYP1A2 in der Leber

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete CYP1A2-Aktivitätsassay weist Limitationen auf. Zum einen wurde die CYP1A2-Aktivität nur indirekt durch die Messung der Fluoreszenzintensität einer CYP1A2-abhängigen Reaktion bestimmt. Der dabei notwendige Zwischenschritt über eine Standardkurve ist potenziell fehleranfällig. Es existieren Verfahren der Enzymaktivitätsbestimmung, die eine direkte Messung der Menge des Reaktionsproduktes erlauben. Eine häufig eingesetzte Technik ist dabei die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mit gekoppeltem UV-Spektrometer oder Massenspektrometer. Für die Messung der CYP1A2-Aktivität wird dabei oft die Menge an aus Phenacetin gebildetem Paracetamol als Reaktionsprodukt gemessen (Phenacetin O-Deethylation) [79, 81]. Phenacetin und Methacetin sind chemisch sehr ähnliche Verbindungen, die beide zur Gruppe der Acetamide gehören [164]. Bei Verwendung dieser Technik wird also letztlich nahezu die Reaktion untersucht, die der LiMAX-Test durch Verwendung des <sup>13</sup>C-Methacetin als Testsubstanz auch adressiert. Eine experimentelle Simulation der klinischen LiMAX-Messung wäre also möglich. Dennoch erfordern die genannten Verfahren einen hohen Grad technischer Ausstattung und Expertise, die für die Arbeit nicht zur Verfügung standen.

Darüber hinaus war durch die Verwendung einer Standardkurve der Messbereich des Assays eingeschränkt. Alle Proben mit Werten unterhalb der Detektionsgrenze wurden mit Hilfe der Standardkurve berechnet und nicht gemessen. Gerade bei tumorösen Proben aus HCC oder CRLM mit sehr niedriger enzymatischer Aktivität kann es dabei zu Ungenauigkeiten kommen.

In den Vorversuchen zur Assayetablierung wurde zunächst mit frischen, direkt postoperativ untersuchten Lebergewebeproben gearbeitet. Zum Erreichen einer ausreichend hohen *n*-Zahl war aber die Verwendung kryokonservierter Proben aus der Biobank unumgänglich. Vergleichende Messungen konnten auch in schockgefrorenem Gewebe eine CYP1A2-Aktivität nachweisen. Dennoch konnte in einem Versuch eine

geringere CYP1A2-Aktivität der kryokonservierten Probe im Vergleich zur frischen Probe beobachtet werden (Ergebnis nicht dargestellt). Eine Reduktion der CYP1A2-Aktivität durch die Kryokonservierung scheint also möglich und entspricht dem in der Literatur beschriebenen Effekt der Kryokonservierung auf die Aktivität der CYP-Enzyme. Pearce *et al.* untersuchten die Aktivitätslevel verschiedener CYP-Enzyme im humanen Lebergewebe direkt postoperativ und nach 1, 2, 4 und 6 Monaten Lagerung bei -80 °C. Sowohl der Gehalt als auch die Aktivität der CYP-Enzyme wurde durch die Lagerung signifikant reduziert, wobei zwischen den verschiedenen Lagerzeiten kein Unterschied bestand. Die Enzymaktivitätsabnahme durch die Kryokonservierung sei dabei laut den Autoren weniger auf direkte partielle Inaktivierung, als vielmehr auf Kontamination des zentrifugierten Überstandes mit Proteinen wie Hämoglobin zurückzuführen. Diese Proteine könnten durch das Einfrieren und Auftauen in den Überstand gelangen und dann zur Inaktivierung der CYP-Enzyme beitragen [165]. Das würde auch erklären, warum die eigentliche Lagerdauer dann keinen Effekt mehr auf die Aktivitätslevel hat, da die Ursache mehr das Einfrieren und Auftauen als die Lagerung selbst ist. Dennoch wirkt sich diese Beobachtung auf die vorliegende Untersuchung nur bedingt aus. Zwar würden systematisch niedrigere Absolutwerte der Enzymaktivität gemessen werden, da aber keinerlei frische, sondern ausschließlich kryokonservierte Proben untersucht wurden, würde sich der Effekt auf die gesamte Studienpopulation auswirken. Und selbst bei insgesamt niedrigen Absolutwerten bleibt das eigentlich untersuchte Verhältnis der Aktivitätslevel zwischen nicht-tumorösen und tumorösen Gewebe unbeeinflusst.

Bei der Untersuchung wurden das Rauchverhalten sowie die Medikamenteneinnahme der Studienteilnehmer als wichtige Einflussfaktoren der CYP1A2-Aktivität systematisch erfasst. Zudem wurden alle Patienten darauf hingewiesen, mindestens 24 h vor dem LiMAX-Test nicht zu rauchen, um dessen Einfluss möglichst gering zu halten. Dennoch wurden weder aktive Raucher noch Patienten, die potenziell mit CYP1A2 interagierende Medikamente einnahmen, von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Eine Beeinflussung der absoluten Messergebnisse ist also nicht auszuschließen. Vor allem beim interindividuellen Vergleich der Aktivitätswerte der nicht-tumorösen Gewebe mit fortschreitender Fibrose ist ein Einfluss vorstellbar. So befanden sich unter den Patienten mit Fibrosegrad 2-3 keine Raucher, während unter den Patienten mit Zirrhose Raucher waren (vgl. Tabelle 3). Dies könnte den fehlenden signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen erklären. Beim Vergleich der Aktivitäten im nicht-tumorösen und

tumorösen Gewebe innerhalb einer Pathologie wurden dahingegen nur die relativen Unterschiede betrachtet, eine Enzyminduktion durch Rauchen oder Medikamente würde sich nur in erhöhten absoluten bei unveränderten relativen Aktivitätswerten beider Gewebe äußern.

Zusätzlich zur CYP1A2-Aktivität in den Lebertumoren wurde der Einfluss zunehmender Leberfibrose auf die Enzymaktivität im nicht-tumorösen Gewebe analysiert. Leider wurden dabei die verschiedenen Ätiologien der zugrundeliegenden chronischen Lebererkrankungen nicht erfasst, sodass keine spezifischen Aussagen zu den einzelnen Erkrankungen gemacht werden konnten. Oftmals blieb bei den eingeschlossenen Patienten die Krankheitsursache ungeklärt. Zudem wäre eine differenzierte Untersuchung der CYP1A2-Aktivität bei Leberfibrose verschiedener Ätiologie in der vorliegenden kleinen Studienpopulation aufgrund zu geringer *n*-Zahlen schwer möglich gewesen. Weiterführende Studien mit selektiver Betrachtung einzelner Erkrankungen sind hier notwendig.

Neben den Aktivitätsmessungen erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen die Untersuchung der CYP1A2-Expression im Gewebe. Hierbei erfolgte keine quantitative Einschätzung der Enzymexpression wie es z. B. mit Proteomanalysen möglich wäre. Zudem erfolgte keine systematische Anfärbung aller verfügbaren Gewebe. Es wurden nur einzelne, repräsentative Gewebe untersucht.

Die Volumen-Funktionsplanungen wurden nur exemplarisch für zwei Patienten mit HCA und HCC durchgeführt. Eine Auswertung über das gesamte Studienkollektiv war nicht möglich, da nicht bei allen Patienten CT- oder MRT-Untersuchungen der Leber verfügbar waren. Zudem konnte mit Hilfe der experimentellen Daten die aktuelle Berechnungsmethode weitestgehend bestätigt werden, was einen dezidierten Vergleich der beiden Berechnungsmethoden (mit vs. ohne Restaktivität im Tumor) erübrigt.

### 4.2.2 Erfassung strukturell-mechanischer Lebergewebeeigenschaften

Für die Untersuchung strukturell-mechanischer Lebergewebeeigenschaften wurden Patienten mit chronischen Lebererkrankungen verschiedener Ätiologie sowie lebergesunde Probanden als Vergleichsgruppe rekrutiert. Die Rekrutierung fand dabei nur an einem Zentrum statt. Die Anzahl der eingeschlossenen Teilnehmer (Patienten *n* = 66, Probanden *n* = 20) war insgesamt gering, was eine mögliche Ursache für den

fehlenden signifikanten Unterschied der Scherwellengeschwindigkeit bzw. LiMAx-Werte zwischen den Gruppen ‚keine Fibrose‘ und ‚moderate Fibrose‘ darstellen könnte. Darüber hinaus war das Patientenkollektiv sehr heterogen mit Lebererkrankungen verschiedenster Ätiologie. Die gestellte Forschungsfrage erforderte die simultane Erfassung einer Vielzahl an zum Teil schwierig zu erhebenden Parametern. Um dennoch die Belastung für die Patienten und den Zeit- sowie Organisationsaufwand möglichst gering zu halten, wurden vorrangig Patienten rekrutiert, die ohnehin für einen LiMAx-Test im Rahmen eines leberchirurgischen Eingriffes oder einer Lebertransplantation vorgesehen waren. Das brachte den Vorteil, dass Informationen zur Leberfunktion und -histologie ohne weiteres Zutun zur Verfügung standen und nur noch durch serologische Analysen sowie die THE ergänzt werden mussten. Obwohl die Untersuchung an einem großen leberchirurgischen Zentrum stattfand, war die Anzahl potenzieller Studienteilnehmer beschränkt. Denn nicht bei allen leberchirurgischen Patienten ist entsprechend dem in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen Algorithmus überhaupt ein LiMAx-Test präoperativ indiziert. Um dennoch ein möglichst großes Patientenkollektiv rekrutieren zu können und auch vor dem Hintergrund der erstmalig gemeinsamen Anwendung von THE und LiMAx-Test wurde daher zunächst beim Einschluss der Patienten nicht auf die Krankheitsätiologie Rücksicht genommen. Damit war die untersuchte Studienpopulation sehr heterogen und dementsprechend nicht optimal geeignet für die Bestimmung der diagnostischen Genauigkeit der betrachteten nicht-invasiven Methoden. Insbesondere die Ermittlung krankheitsspezifischer Grenzwerte war so nicht möglich. Nichtsdestotrotz ließen die erhobenen Daten eine erstmalige, orientierende Einschätzung zu, die nun aufbauend in weiteren Studien für jede Krankheitsätiologie differenzierter betrachtet werden kann. Hierbei erscheint eine vertiefende Evaluation vorrangig für Krankheitsentitäten sinnvoll, bei denen eine frühzeitige Diagnose oder wiederholte, nicht-invasive Verlaufskontrollen unerlässlich für die Therapie und Prognose des Patienten sind.

Die Probanden wurden lediglich anhand klinischer und serologischer Parameter als lebergesund definiert. Der Fibrosegrad der Probanden wurde dabei ohne weitere histologische Untersuchung als F0-Fibrose eingestuft. Hier ist eine mögliche Falschgruppierung mit entsprechendem Einfluss auf die Ergebnisse durchaus denkbar. Idealerweise hätten auch die Probanden eine Leberbiopsie erhalten müssen, was aber ethisch in Anbetracht der damit einhergehenden Risiken nicht vertretbar ist. Alternativ

wäre beispielsweise eine Vergleichsgruppe bestehend aus potenziellen Spendern für eine Leberlebendtransplantation denkbar gewesen, die im Rahmen der Eignungsprüfung für die Transplantation oft auch eine Leberbiopsie bekommen [166]. Dennoch wären hier gerade bei monozentrischer Rekrutierung schwer repräsentative  $n$ -Zahlen der Probandengruppe zu erreichen. Interessanterweise zeigen gerade Studien mit gesunden, potenziellen Spendern für eine Leberlebendtransplantation, dass auch bei Abwesenheit von klinischen oder laborchemischen Hinweisen für eine zugrundeliegende Lebererkrankung in mehr als 50 % der Fälle abnormale histopathologische Befunde wie Hepatitis, Steatose oder Fibrose in der Biopsie zu finden sind [167]. Auch diese Limitation muss bei der Interpretation der Ergebnisse Beachtung finden.

Bei den Patienten wurde das Ausmaß der Fibrose unabhängig von der zugrundeliegenden Krankheitsätiologie anhand des Desmet und Scheuer Scores klassifiziert. Darüber hinaus existieren weitere, teilweise krankheitsspezifische Klassifizierungssysteme der Leberfibrose [168]. So unterscheidet beispielsweise der Ishak-Score insgesamt sechs verschiedene Fibrosegrade und ist damit in der Lage, auch geringe Veränderungen der Fibrosierung abzubilden [169]. Nichtsdestotrotz erlaubt der Desmet und Scheuer Score ursachenunabhängig eine Einschätzung der Fibrose und ist in der Routinediagnostik weit verbreitet, weshalb er für die Untersuchung am geeignetsten erschien. Bei Betrachtung der Verteilung der Fibrosegrade in der Patientenpopulation fiel auf, dass die Fibrosegrade F1 ( $n = 18$ ) und F4 ( $n = 16$ ) gegenüber F0, F2 sowie F3 ( $n = 13$ ) überwogen. Damit hatten 34 % der untersuchten Patientenpopulation eine Leberzirrhose. Diese ungleiche Verteilung schränkt die Repräsentativität der Stichprobe für die Grundgesamtheit ein, wobei ursächlich wohlmöglich ein Selektionsbias bei der Teilnehmerrekrutierung war. Es wurden vorrangig Patienten eingeschlossen, bei denen im Rahmen der präoperativen Routine die Indikation für einen LiMAx-Test gestellt wurde. Entsprechend dem in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen LiMAx-Algorithmus sollte nun gerade bei Patienten mit einer vermuteten Leberfunktionseinschränkung oder einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung mit ausgedehnter Leberteilresektion ein LiMAx-Test erfolgen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Pool an potenziellen Studienteilnehmern *a priori* schon kränker war als die Grundgesamtheit der Patienten mit chronischer Lebererkrankung. Zudem wurden die Fibrosegrade nicht einzeln untersucht, sondern gruppiert (‘keine Fibrose’, ‘moderate Fibrose’ und ‘schwere Fibrose’) analysiert. Nur so war eine

vertretbare Gruppengröße erreichbar. Gleichzeitig sind damit aber die gewonnenen Erkenntnisse nur beschränkt mit Daten aus anderen Studien vergleichbar.

Als weitere Limitation müssen die fehlenden Werte bei der THE, beim LiMAX-Test sowie beim Fibrosegrad angesehen werden. Hinsichtlich der erhobenen Laborparameter standen dagegen für alle Studienteilnehmer Werte zur Verfügung. Von den insgesamt eingeschlossenen Patienten konnte nur bei 83,3 % (55/66) die Scherwellengeschwindigkeit bestimmt werden und nur bei 71,2 % (47/66) war der Fibrosegrad bekannt. Immerhin 98,5 % (65/66) der eingeschlossenen Patienten erhielten einen validen LiMAX-Test, wobei hier nachträglich einige Patienten aufgrund eines positiven Raucherstatus (16/66) bzw. bei Zustand nach PVE (5/66) ausgeschlossen wurden.

Die Lebersteifigkeit wird nicht nur vom Grad der hepatischen Fibrose beeinflusst. Es existiert eine Reihe von Störfaktoren, die das Messergebnis beeinflussen können. Obwohl technisch eine Untersuchung der gesamten Leber möglich ist, wurde bei den Studienteilnehmern nur der rechte Leberlappen mit der THE erfasst. Vergleichende Messungen in beiden Leberlappen konnten zeigen, dass die Scherwellengeschwindigkeit im linken Leberlappen signifikant höher ist und eine größere Streuung im Vergleich zum rechten Leberlappen aufweist [170, 171]. Entsprechend der *European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology* (EFSUMB)-Leitlinie zur klinischen Anwendung der Leberelastographie wurde daher der rechte Leberlappen als Messort bevorzugt [97]. Die Messung erfolgte standardisiert nach mindestens 2 h Nüchternheit und während einer Atempause in Atemruhelage, da sowohl die Aufnahme von Flüssigkeit und Nahrung als auch eine tiefe Inspiration über eine Veränderung der hepatischen Durchblutung die Scherwellengeschwindigkeit beeinflussen kann [114, 172, 173]. Darüber hinaus ist ein Einfluss hepatischer Inflammation [174], Cholestase [175], Steatose [176] wie auch hepatovenöser Kongestion [177] auf die Leberelastographie beschrieben worden. Diese Störfaktoren sind teilweise über die Laborwerte erfasst, aber nicht systematisch in der Auswertung berücksichtigt worden. Auch geht die Anwesenheit hepatischer Raumforderungen potenziell mit einer Verzerrung des Messergebnisses einher. Peritumorales Gewebe kann beispielsweise durch die einsetzende desmoplastische Reaktion deutlich bindegewebsreicher und damit steifer sein. So konnten vergleichende Steifigkeitsmessungen an 163 Patienten im peritumoralen

Gewebe < 2 cm und > 2 cm entfernt vom HCC zeigen, dass die Lebersteifigkeitswerte mit < 2 cm Tumorabstand eine deutlich größere Streuung und somit geringe Verlässlichkeit aufweisen [178]. Nichtsdestotrotz war es unter Verwendung des *B-Mode*-Bildes möglich, die elastographische Messung in tumorfreien Anschnitten der Leber zu platzieren.

### 4.3 Ausblick und weitere Forschung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnten klinisch relevante Fragestellungen im Zusammenhang mit dem LiMAx-Test aufgeklärt werden. Nichtsdestotrotz bleiben wichtige Problematiken nur ungenügend adressiert und sollten Gegenstand künftiger Forschungsvorhaben sein.

Nach erfolgreicher Aufklärung der CYP1A2-Aktivität in relevanten hepatischen Raumforderungen sollten im nächsten Schritt insbesondere die regionalen CYP1A2-Aktivitätsunterschiede im nicht-tumorösen Leberparenchym weiter untersucht werden. Der LiMAx-Test erfasst spezifisch die Lebergesamtfunktion. Obwohl einzelne experimentelle Daten auf eine homogene Verteilung innerhalb der Leber hindeuten, steht nach wie vor eine Analyse der Beiträge einzelner hepatischer Regionen zum LiMAx-Wert aus. Insbesondere im operativen Setting kann die Kenntnis dieser regionalen Heterogenität entscheidend sein bei der gezielten Auswahl der zu resezierenden Leberteile. Weiterhin sollte der Einfluss von Tabakrauch und mit CYP1A2 interagierenden Medikamenten auf das LiMAx-Testergebnis aufgeklärt werden. Experimentelle Daten zeigen, dass die CYP1A2-Aktivität durch externe Einflussfaktoren verändert werden kann. Ein gesteigerter Substratumsatz am Enzym bei Rauchern hätte falsch hohe LiMAx-Werte zur Folge, weshalb 24 h vor dem Test nicht mehr geraucht werden soll. Dennoch steht bis jetzt eine systematische Analyse insbesondere der zeitlichen Dimension der Enzyminduktion nach Rauch- und Medikamentenexposition aus. Darüber hinaus besteht Evidenz, dass das in der Leber freiwerdende  $^{13}\text{CO}_2$  nicht ausschließlich über die Atmung eliminiert wird, was einen Einfluss auf das LiMAx-Testergebnis hätte [179]. Die Aufklärung alternativer Metabolisierungsrouten des  $^{13}\text{CO}_2$  und deren Einfluss auf den LiMAx-Test sind entscheidend für einen verlässlichen Einsatz in der Diagnostik und Therapieplanung von Lebererkrankungen.

Die erste orientierende Anwendung des LiMAx-Tests gemeinsam mit der THE in Patienten mit chronischen Lebererkrankungen legt den Grundstein für weiterführende

Forschung in Bezug auf die diagnostischen Kapazitäten beider nicht-invasiver Testverfahren. Neben wichtigen mechanistischen Einblicken in den Struktur-Funktionszusammenhang bei chronischen Lebererkrankungen wurde in der vorliegenden Arbeit exemplarisch die diagnostische Wertigkeit der THE und des LiMAX-Tests für die Fibrosedetektion untersucht. Anspruch an jegliches Testverfahren ist dabei, frühe Veränderungen zentraler struktureller und funktioneller Gewebeparameter verlässlich zu detektieren und die Schwere der Beeinträchtigung zu erfassen, bevor es zu erhöhten Laborwerten oder einer klinischen Verschlechterung des Patienten kommt. Beide Verfahren zeigten gute diagnostische Qualitäten zur Detektion fortgeschrittener hepatischer Fibrosierung, während frühe Fibrosegrade noch nicht sicher erfasst werden konnten. Diese Beobachtung sollte in Patientenkollektiven mit nur jeweils einer zugrundeliegenden Lebererkrankung überprüft werden. Auch sollte als weiteres wichtiges Einsatzgebiet die nicht-invasive Erfassung hepatischer Steatose und Steatohepatitis mittels THE und LiMAX untersucht werden. Kürzlich konnte erstmalig in einer Kohorte stark übergewichtiger Patienten ( $\text{BMI} > 35 \text{ kg/m}^2$ ) gezeigt werden, dass der LiMAX-Test zur Detektion der NASH prinzipiell geeignet ist [180]. Auch die THE mit ihrer im Vergleich zu anderen Elastographieverfahren hohen Eindringtiefe macht verlässliche Steifigkeitsmessungen in adipösen Patienten möglich [109] und könnte somit ein geeignetes diagnostisches Werkzeug zur Unterscheidung von hepatischer Steatose und NASH darstellen.

In Bezug auf die THE als neue Technik steht ein direkter Vergleich mit etablierten Elastographieverfahren aus. Eigene Vorversuche zeigten hier eine gute Übereinstimmung mit der TE als das am weitesten verbreitete Elastographieverfahren. Weitere Studien sind hier notwendig. Zudem sollten valide Qualitätskriterien für die THE-Messung erarbeitet und empirisch überprüft werden, so wie sie auch für die TE-Messung existieren. Nur so kann eine Vergleichbarkeit zwischen Studienergebnissen gewährleistet werden. Letztlich sollten weitere Untersuchungen den Einfluss von Inflammation und Cholestase auf die Lebersteifigkeitsmessung mit der THE genauer erfassen.

Als Diagnosekriterium, prognostischen Marker und Basis von Therapieentscheidungen bei chronischen Lebererkrankungen ist das Ausmaß hepatischer Fibrosierung von herausragender Bedeutung. Traditionelle histologische Klassifizierungssysteme unterteilen die Leberfibrose semiquantitativ, werden damit aber dem Prozess der

Fibrosierung als dynamischen Prozess nicht gerecht. Eine kontinuierliche, objektive Quantifizierung des Ausmaßes der Leberfibrose, beispielsweise mittels computergestützter digitaler Bildanalyse, erscheint hier überlegen [181] und sollte in künftigen Studien standardisiert angewandt und perspektivisch als Goldstandard etabliert werden. Schlussendlich sollte der LiMAx-Test wie auch die THE über rein diagnostische Fragestellungen hinaus auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Einschätzung der Krankheitsschwere, zur Vorhersage von Komplikationen und der Überlebensdauer von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen untersucht werden. Dabei ist immer auch ein genaues Verständnis der den nicht-invasiven Testverfahren zugrundeliegenden Mechanismen sowie potenzieller Einflussfaktoren entscheidend, sodass weiterhin experimentelle Grundlagenstudien unerlässlich sind.

#### **4.4 Schlussfolgerungen**

Der LiMAx-Test ist ein vielversprechendes diagnostisches Werkzeug, das nicht-invasiv die Leberfunktion erfassen kann. Aufgrund der Einzigartigkeit des Testsystems mit Verwendung einer <sup>13</sup>C-markierten Testsubstanz besitzt er einen festen Platz unter den etablierten Testverfahren zur klinischen Erfassung von Leberparametern. Eine genaue Kenntnis der dem Test zugrundeliegenden Mechanismen und potenzieller Einflussfaktoren sind Voraussetzung für eine sichere Ergebnisinterpretation sowie letztlich einen gezielten Einsatz im klinischen Alltag.

Zur Verbesserung der Genauigkeit der präoperativen Volumen-Funktionsplanung vor leberchirurgischen Eingriffen als derzeitige Hauptanwendung des Tests wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst experimentell die CYP1A2-Aktivität in relevanten Lebertumoren bestimmt. Dabei konnte in Gewebe aus HCC und CRLM im Vergleich zu korrespondierendem nicht-tumorösen Leberparenchym keine signifikante Restaktivität gemessen werden. Gewebe aus HCA hingegen wies eine deutliche Enzymaktivität auf, was auch in den entsprechenden Immunfluoreszenzfärbungen nachvollzogen werden konnte. Insgesamt konnte somit das gegenwärtige Vorgehen zur Berechnung der FLRF-LiMAx für Patienten mit HCC und CRLM bestätigt werden. Für Patienten mit voluminösen HCA und einer hepatischen Funktionseinschränkung sollte hingegen die CYP1A2-Aktivität im Tumor mit in die Berechnung der FLRF-LiMAx einbezogen werden, da sonst falsche Therapieentscheidungen getroffen werden könnten. Darüber hinaus konnten die *in vitro* gemessenen CYP1A2-Aktivitätswerte im nicht-tumorösen Gewebe mit den

simultan erfassten LiMAx-Werten als Ausdruck der CYP1A2-Gesamtaktivität *in vivo* korreliert werden. Die Eignung des LiMAx-Tests zur klinischen Phänotypisierung der CYP1A2-Aktivität konnte so erstmalig auch durch experimentelle Daten belegt werden.

Zur Erschließung weiterer möglicher Einsatzgebiete des LiMAx-Tests wurde darüber hinaus der Zusammenhang zwischen strukturell-mechanischen Gewebeeigenschaften und der mit dem LiMAx-Test erfassten Leberfunktion genauer untersucht. Als strukturell-mechanische Parameter wurden nicht nur der Fibrosegrad, sondern auch die mit Hilfe der THE als neuartiges elastographisches Verfahren erfasste Lebersteifigkeit sowie die serologischen Scores APRI und FIB-4 erhoben. Die THE wurde dabei erstmals überhaupt in einer Kohorte von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen angewandt. Zwischen der Lebersteifigkeit und den LiMAx-Werten zeigte sich eine stark negative Korrelation ( $r = -0,701$ ). Abschließend konnte gezeigt werden, dass sowohl die THE als auch der LiMAx-Test potenziell zur nicht-invasiven Detektion fortgeschrittener Fibrose und Zirrhose als ein mögliches klinisches Einsatzgebiet beider Verfahren geeignet sind.

## Literaturverzeichnis

1. Marcellin, P. und Kutala, B.K., *Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening*. *Liver Int*, 2018. **38** (Suppl 1): S. 2-6.
2. GBD 2017 Causes of Death Collaborators, *Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. *Lancet*, 2018. **392**(10159): S. 1736-1788.
3. Schuppan, D. und Afdhal, N.H., *Liver cirrhosis*. *Lancet*, 2008. **371**(9615): S. 838-51.
4. Tsochatzis, E.A., Bosch, J., und Burroughs, A.K., *Liver cirrhosis*. *Lancet*, 2014. **383**(9930): S. 1749-1761.
5. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., und Jemal, A., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): S. 394-424.
6. El-Serag, H.B., *Hepatocellular carcinoma*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(12): S. 1118-27.
7. Kulik, L. und El-Serag, H.B., *Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma*. *Gastroenterology*, 2019. **156**(2): S. 477-491 e1.
8. Krenzien, F., Schmelzle, M., Struecker, B., Raschzok, N., Benzing, C., Jara, M., Bahra, M., Ollinger, R., Sauer, I.M., Pascher, A., Pratschke, J., und Andreou, A., *Liver Transplantation and Liver Resection for Cirrhotic Patients with Hepatocellular Carcinoma: Comparison of Long-Term Survivals*. *J Gastrointest Surg*, 2018. **22**(5): S. 840-848.
9. Galle, P.R., Forner, A., Llovet, J.M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J.-L., Schirmacher, P., und Vilgrain, V., *EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2018. **69**(1): S. 182-236.
10. Shoup, M., Gonen, M., D'Angelica, M., Jarnagin, W.R., DeMatteo, R.P., Schwartz, L.H., Tuorto, S., Blumgart, L.H., und Fong, Y., *Volumetric analysis predicts hepatic dysfunction in patients undergoing major liver resection*. *J Gastrointest Surg*, 2003. **7**(3): S. 325-30.
11. Clavien, P.A., Emond, J., Vauthey, J.N., Belghiti, J., Chari, R.S., und Strasberg, S.M., *Protection of the liver during hepatic surgery*. *J Gastrointest Surg*, 2004. **8**(3): S. 313-27.
12. Corless, J.K. und Middleton, H.M., 3rd, *Normal liver function. A basis for understanding hepatic disease*. *Arch Intern Med*, 1983. **143**(12): S. 2291-4.
13. Pugh, R.N., Murray-Lyon, I.M., Dawson, J.L., Pietroni, M.C., und Williams, R., *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices*. *Br J Surg*, 1973. **60**(8): S. 646-9.

14. Kamath, P.S., Wiesner, R.H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T.M., Kosberg, C.L., D'Amico, G., Dickson, E.R., und Kim, W.R., *A model to predict survival in patients with end-stage liver disease*. Hepatology, 2001. **33**(2): S. 464-470.
15. Hoekstra, L.T., de Graaf, W., Nibourg, G.A., Heger, M., Bennink, R.J., Stieger, B., und van Gulik, T.M., *Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review*. Ann Surg, 2013. **257**(1): S. 27-36.
16. Helmke, S., Colmenero, J., und Everson, G.T., *Noninvasive assessment of liver function*. Curr Opin Gastroenterol, 2015. **31**(3): S. 199-208.
17. Cherrick, G.R., Stein, S.W., Leevy, C.M., und Davidson, C.S., *Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction*. J Clin Invest, 1960. **39**: S. 592-600.
18. Olmedilla, L., Lisbona, C.J., Perez-Pena, J.M., Lopez-Baena, J.A., Garutti, I., Salcedo, M., Sanz, J., Tisner, M., Asencio, J.M., Fernandez-Quero, L., und Banares, R., *Early Measurement of Indocyanine Green Clearance Accurately Predicts Short-Term Outcomes After Liver Transplantation*. Transplantation, 2016. **100**(3): S. 613-20.
19. Le Roy, B., Gregoire, E., Cosse, C., Serji, B., Golse, N., Adam, R., Cherqui, D., Mabrut, J.Y., Le Treut, Y.P., und Vibert, E., *Indocyanine Green Retention Rates at 15 min Predicted Hepatic Decompensation in a Western Population*. World J Surg, 2018. **42**(8): S. 2570-2578.
20. De Gasperi, A., Mazza, E., und Prospero, M., *Indocyanine green kinetics to assess liver function: Ready for a clinical dynamic assessment in major liver surgery?* World J Hepatol, 2016. **8**(7): S. 355-67.
21. Stockmann, M., Malinowski, M., Lock, J.F., Seehofer, D., und Neuhaus, P., *Factors influencing the indocyanine green (ICG) test: additional impact of acute cholestasis*. Hepatogastroenterology, 2009. **56**(91-92): S. 734-8.
22. Oellerich, M., Raude, E., Burdelski, M., Schulz, M., Schmidt, F.W., Ringe, B., Lamesch, P., Pichlmayr, R., Raith, H., und Scheruhn, M., *Monoethylglycinexylidide formation kinetics: a novel approach to assessment of liver function*. J Clin Chem Clin Biochem, 1987. **25**(12): S. 845-53.
23. Braden, B., Lembcke, B., Kuker, W., und Caspary, W.F., *<sup>13</sup>C-breath tests: current state of the art and future directions*. Dig Liver Dis, 2007. **39**(9): S. 795-805.
24. Stravitz, R.T. und Ilan, Y., *Potential use of metabolic breath tests to assess liver disease and prognosis: has the time arrived for routine use in the clinic?* Liver Int, 2017. **37**(3): S. 328-336.
25. Geisel, D., Lüdemann, L., Hamm, B., und Denecke, T., *Imaging-Based Liver Function Tests – Past, Present and Future*. Fortschr Röntgenstr, 2015. **187**(10): S. 863-871.
26. Ha-Kawa, S.K. und Tanaka, Y., *A quantitative model of technetium-99m-DTPA-galactosyl-HSA for the assessment of hepatic blood flow and hepatic binding receptor*. J Nucl Med, 1991. **32**(12): S. 2233-40.

27. Erdogan, D., Heijnen, B.H., Bennink, R.J., Kok, M., Dinant, S., Straatsburg, I.H., Gouma, D.J., und van Gulik, T.M., *Preoperative assessment of liver function: a comparison of <sup>99m</sup>Tc-Mebrofenin scintigraphy with indocyanine green clearance test*. Liver Int, 2004. **24**(2): S. 117-23.
28. Cieslak, K.P., Runge, J.H., Heger, M., Stoker, J., Bennink, R.J., und van Gulik, T.M., *New perspectives in the assessment of future remnant liver*. Dig Surg, 2014. **31**(4-5): S. 255-68.
29. Theilig, D., Steffen, I., Malinowski, M., Stockmann, M., Seehofer, D., Pratschke, J., Hamm, B., Denecke, T., und Geisel, D., *Predicting liver failure after extended right hepatectomy following right portal vein embolization with gadoxetic acid-enhanced MRI*. Eur Radiol, 2019. **29**(11): S. 5861-5872.
30. Theilig, D., Tsereteli, A., Elkilany, A., Raabe, P., Ludemann, L., Malinowski, M., Stockmann, M., Pratschke, J., Hamm, B., Denecke, T., und Geisel, D., *Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI T1 relaxometry as an imaging-based liver function test compared with (13)C-methacetin breath test*. Acta Radiol, 2020. **61**(3): S. 291-301.
31. Guengerich, F.P., Krauser, J.A., und Johnson, W.W., *Rate-limiting steps in oxidations catalyzed by rabbit cytochrome P450 1A2*. Biochemistry, 2004. **43**(33): S. 10775-88.
32. Rubin, T.M., Heyne, K., Luchterhand, A., Bednarsch, J., Vondran, F.W., Polychronidis, G., Malinowski, M., Nikolic, A., Tautenhahn, H.M., Jara, M., Wuensch, T., Stockmann, M., und Lock, J.F., *Kinetic validation of the LiMax test during 10,000 intravenous <sup>13</sup>C-methacetin breath tests*. J Breath Res, 2017. **12**(1): S. 016005.
33. Stockmann, M., *Wertigkeit eines neu entwickelten Verfahrens zur Bestimmung der Leberfunktion in der Leberchirurgie (LiMax-Test) [Habilitationsschrift]*. Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2009.
34. Stockmann, M., Lock, J.F., Riecke, B., Heyne, K., Martus, P., Fricke, M., Lehmann, S., Niehues, S.M., Schwabe, M., Lemke, A.J., und Neuhaus, P., *Prediction of postoperative outcome after hepatectomy with a new bedside test for maximal liver function capacity*. Ann Surg, 2009. **250**(1): S. 119-125.
35. Jara, M., Bednarsch, J., Valle, E., Lock, J.F., Malinowski, M., Schulz, A., Seehofer, D., Jung, T., und Stockmann, M., *Reliable assessment of liver function using LiMax*. J Surg Res, 2015. **193**(1): S. 184-189.
36. Pauwels, S., Geubel, A.P., Dive, C., und Beckers, C., *Breath <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> after intravenous administration of [<sup>14</sup>C]aminopyrine in liver diseases*. Dig Dis Sci, 1982. **27**(1): S. 49-56.
37. Kasicka-Jonderko, A., Nita, A., Jonderko, K., Kamińska, M., und Błońska-Fajfrowska, B., *C-methacetin breath test reproducibility study reveals persistent CYP1A2 stimulation on repeat examinations*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(45): S. 4979-86.
38. Stockmann, M., Lock, J.F., Malinowski, M., Seehofer, D., Puhl, G., Pratschke, J., und Neuhaus, P., *How to define initial poor graft function after liver transplantation? - a new functional definition by the LiMax test*. Transpl Int, 2010. **23**(10): S. 1023-32.

39. Lock, J.F., Schwabauer, E., Martus, P., Videv, N., Pratschke, J., Malinowski, M., Neuhaus, P., und Stockmann, M., *Early diagnosis of primary nonfunction and indication for reoperation after liver transplantation*. Liver Transpl, 2010. **16**(2): S. 172-80.
40. Jara, M., Malinowski, M., Luttgert, K., Schott, E., Neuhaus, P., und Stockmann, M., *Prognostic value of enzymatic liver function for the estimation of short-term survival of liver transplant candidates: a prospective study with the LiMAx test*. Transpl Int, 2015. **28**(1): S. 52-8.
41. Kaffarnik, M.F., Lock, J.F., Vetter, H., Ahmadi, N., Lojewski, C., Malinowski, M., Neuhaus, P., und Stockmann, M., *Early diagnosis of sepsis-related hepatic dysfunction and its prognostic impact on survival: a prospective study with the LiMAx test*. Crit Care, 2013. **17**(5): S. R259.
42. Lock, J.F., Kotobi, A.N., Malinowski, M., Schulz, A., Jara, M., Neuhaus, P., und Stockmann, M., *Predicting the prognosis in acute liver failure: results from a retrospective pilot study using the LiMAx test*. Ann Hepatol, 2013. **12**(4): S. 556-62.
43. Wicha, S.G., Frey, O.R., Roehr, A.C., Pratschke, J., Stockmann, M., Alraish, R., Wuensch, T., und Kaffarnik, M., *Linezolid in liver failure: exploring the value of the maximal liver function capacity (LiMAx) test in a pharmacokinetic pilot study*. Int J Antimicrob Agents, 2017. **50**(4): S. 557-563.
44. Malinowski, M., Jara, M., Luttgert, K., Orr, J., Lock, J.F., Schott, E., und Stockmann, M., *Enzymatic liver function capacity correlates with disease severity of patients with liver cirrhosis: a study with the LiMAx test*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(12): S. 2983-2991.
45. Jara, M., Dziodzio, T., Malinowski, M., Luttgert, K., Nikolov, R., Ritschl, P.V., Ollinger, R., Pratschke, J., und Stockmann, M., *Prospective Assessment of Liver Function by an Enzymatic Liver Function Test to Estimate Short-Term Survival in Patients with Liver Cirrhosis*. Dig Dis Sci, 2019. **64**(2): S. 576-584.
46. Buechter, M., Thimm, J., Baba, H.A., Bertram, S., Willuweit, K., Gerken, G., und Kahraman, A., *Liver Maximum Capacity: A Novel Test to Accurately Diagnose Different Stages of Liver Fibrosis*. Digestion, 2018: S. 1-10.
47. Stockmann, M., Lock, J.F., Malinowski, M., Niehues, S.M., Seehofer, D., und Neuhaus, P., *The LiMAx test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery*. HPB, 2010. **12**(2): S. 139-46.
48. Malinowski, M., Lock, J.F., Seehofer, D., Gebauer, B., Schulz, A., Demirel, L., Bednarsch, J., Stary, V., Neuhaus, P., und Stockmann, M., *Preliminary study on liver function changes after trisectionectomy with versus without prior portal vein embolization*. Surg Today, 2016. **46**(9): S. 1053-61.
49. Blüthner, E., Jara, M., Shrestha, R., Faber, W., Pratschke, J., Stockmann, M., und Malinowski, M., *The predictive value of future liver remnant function after liver resection for HCC in noncirrhotic and cirrhotic patients*. HPB, 2019. **21**(7): S. 912-922.

50. Jara, M., Reese, T., Malinowski, M., Valle, E., Seehofer, D., Puhl, G., Neuhaus, P., Pratschke, J., und Stockmann, M., *Reductions in post-hepatectomy liver failure and related mortality after implementation of the LiMAx algorithm in preoperative work-up: a single-centre analysis of 1170 hepatectomies of one or more segments*. HPB, 2015. **17**(7): S. 651-8.
51. Stockmann, M., Vondran, F.W.R., Fahrner, R., Tautenhahn, H.M., Mittler, J., Bektas, H., Malinowski, M., Jara, M., Klein, I., Lock, J.F., und Collaborative Fast-track Liver Study Group, *Randomized clinical trial comparing liver resection with and without perioperative assessment of liver function*. BJS Open, 2018. **2**(5): S. 301-309.
52. Danielson, P.B., *The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans*. Curr Drug Metab, 2002. **3**(6): S. 561-97.
53. Sychev, D.A., Ashraf, G.M., Svistunov, A.A., Maksimov, M.L., Tarasov, V.V., Chubarev, V.N., Otdelenov, V.A., Denisenko, N.P., Barreto, G.E., und Aliev, G., *The cytochrome P450 isoenzyme and some new opportunities for the prediction of negative drug interaction in vivo*. Drug Des Devel Ther, 2018. **12**: S. 1147-1156.
54. Schweikl, H., Taylor, J.A., Kitareewan, S., Linko, P., Nagorney, D., und Goldstein, J.A., *Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver*. Pharmacogenetics, 1993. **3**(5): S. 239-49.
55. Zhou, S.F., Wang, B., Yang, L.P., und Liu, J.P., *Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2*. Drug Metab Rev, 2010. **42**(2): S. 268-354.
56. Schrenk, D., Brockmeier, D., Mörike, K., Bock, K.W., und Eichelbaum, M., *A distribution study of CYP1A2 phenotypes among smokers and non-smokers in a cohort of healthy Caucasian volunteers*. Eur J Clin Pharmacol, 1998. **53**(5): S. 361-367.
57. Koonrungsomboon, N., Khatsri, R., Wongchompoo, P., und Teekachunhatean, S., *The impact of genetic polymorphisms on CYP1A2 activity in humans: a systematic review and meta-analysis*. Pharmacogenomics J, 2018. **18**(6): S. 760-768.
58. Na Takuathung, M., Hanprasertpong, N., Teekachunhatean, S., und Koonrungsomboon, N., *Impact of CYP1A2 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of antipsychotic drugs: a systematic review and meta-analysis*. Acta Psychiatr Scand, 2019. **139**(1): S. 15-25.
59. Jiang, Z., Dragin, N., Jorge-Nebert, L.F., Martin, M.V., Guengerich, F.P., Aklillu, E., Ingelman-Sundberg, M., Hammons, G.J., Lyn-Cook, B.D., Kadlubar, F.F., Saldana, S.N., Sorter, M., Vinks, A.A., Nassr, N., von Richter, O., Jin, L., und Nebert, D.W., *Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype*. Pharmacogenet Genomics, 2006. **16**(5): S. 359-67.
60. Relling, M.V., Lin, J.S., Ayers, G.D., und Evans, W.E., *Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities*. Clin Pharmacol Ther, 1992. **52**(6): S. 643-58.

61. Ou-Yang, D.S., Huang, S.L., Wang, W., Xie, H.G., Xu, Z.H., Shu, Y., und Zhou, H.H., *Phenotypic polymorphism and gender-related differences of CYP1A2 activity in a Chinese population*. Br J Clin Pharmacol, 2000. **49**(2): S. 145-51.
62. Nakajima, M., Yokoi, T., Mizutani, M., Shin, S., Kadlubar, F.F., und Kamataki, T., *Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(5): S. 413-21.
63. Catteau, A., Poisson, N., Bonaïti-Pellié, C., Bechtel, Y.C., und Bechtel, P.R., *A population and family study of CYP1A2 using caffeine urinary metabolites*. Eur J Clin Pharmacol, 1995. **47**(5): S. 423-430.
64. Kalow, W. und Tang, B.K., *Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities*. Clin Pharmacol Ther, 1991. **50**(5): S. 508-19.
65. Gunes, A., Ozbey, G., Vural, E.H., Uluoglu, C., Scordo, M.G., Zengil, H., und Dahl, M.L., *Influence of genetic polymorphisms, smoking, gender and age on CYP1A2 activity in a Turkish population*. Pharmacogenomics, 2009. **10**(5): S. 769-78.
66. Ghotbi, R., Christensen, M., Roh, H.K., Ingelman-Sundberg, M., Aklillu, E., und Bertilsson, L., *Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans*. Eur J Clin Pharmacol, 2007. **63**(6): S. 537-46.
67. Sesardic, D., Boobis, A.R., Edwards, R.J., und Davies, D.S., *A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form d in the rat, catalyses the O-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking*. Br J Clin Pharmacol, 1988. **26**(4): S. 363-72.
68. Parsons, W.D. und Neims, A.H., *Effect of smoking on caffeine clearance*. Clin Pharmacol Ther, 1978. **24**(1): S. 40-5.
69. Kall, M.A. und Clausen, J., *Dietary effect on mixed function P450 1A2 activity assayed by estimation of caffeine metabolism in man*. Hum Exp Toxicol, 1995. **14**(10): S. 801-7.
70. Vistisen, K., Poulsen, H.E., und Loft, S., *Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine*. Carcinogenesis, 1992. **13**(9): S. 1561-8.
71. Flockhart, D.A., *Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table*. Indiana University School of Medicine, 2007 [Zugriffsdatum: 12.11.2018]; Verfügbar unter: <https://drug-interactions.medicine.iu.edu>.
72. Gunes, A. und Dahl, M.L., *Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(5): S. 625-37.
73. Ren, J., Chen, G.G., Liu, Y., Su, X., Hu, B., Leung, B.C., Wang, Y., Ho, R.L., Yang, S., Lu, G., Lee, C.G., und Lai, P.B., *Cytochrome P450 1A2 Metabolizes 17beta-Estradiol to Suppress Hepatocellular Carcinoma*. PLoS One, 2016. **11**(4): S. e0153863.

74. Chen, H., Shen, Z.Y., Xu, W., Fan, T.Y., Li, J., Lu, Y.F., Cheng, M.L., und Liu, J., *Expression of P450 and nuclear receptors in normal and end-stage Chinese livers*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(26): S. 8681-90.
75. Nakai, K., Tanaka, H., Hanada, K., Ogata, H., Suzuki, F., Kumada, H., Miyajima, A., Ishida, S., Sunouchi, M., Habano, W., Kamikawa, Y., Kubota, K., Kita, J., Ozawa, S., und Ohno, Y., *Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na<sup>+</sup>-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(9): S. 1786-93.
76. Hanada, K., Nakai, K., Tanaka, H., Suzuki, F., Kumada, H., Ohno, Y., Ozawa, S., und Ogata, H., *Effect of nuclear receptor downregulation on hepatic expression of cytochrome P450 and transporters in chronic hepatitis C in association with fibrosis development*. Drug Metab Pharmacokinet, 2012. **27**(3): S. 301-6.
77. Naboulsi, W., Megger, D.A., Bracht, T., Kohl, M., Turewicz, M., Eisenacher, M., Voss, D.M., Schlaak, J.F., Hoffmann, A.C., Weber, F., Baba, H.A., Meyer, H.E., und Sitek, B., *Quantitative Tissue Proteomics Analysis Reveals Versican as Potential Biomarker for Early-Stage Hepatocellular Carcinoma*. J Proteome Res, 2016. **15**(1): S. 38-47.
78. Gao, Y., Wang, X., Sang, Z., Li, Z., Liu, F., Mao, J., Yan, D., Zhao, Y., Wang, H., Li, P., Ying, X., Zhang, X., He, K., und Wang, H., *Quantitative proteomics by SWATH-MS reveals sophisticated metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma tissues*. Sci Rep, 2017. **7**: S. 45913.
79. Yan, T., Lu, L., Xie, C., Chen, J., Peng, X., Zhu, L., Wang, Y., Li, Q., Shi, J., Zhou, F., Hu, M., und Liu, Z., *Severely Impaired and Dysregulated Cytochrome P450 Expression and Activities in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Personalized Treatment in Patients*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(12): S. 2874-86.
80. Prasad, B., Bhatt, D.K., Johnson, K., Chapa, R., Chu, X., Salphati, L., Xiao, G., Lee, C., Hop, C., Mathias, A., Lai, Y., Liao, M., Humphreys, W.G., Kumer, S.C., und Unadkat, J.D., *Abundance of Phase 1 and 2 Drug-Metabolizing Enzymes in Alcoholic and Hepatitis C Cirrhotic Livers: A Quantitative Targeted Proteomics Study*. Drug Metab Dispos, 2018. **46**(7): S. 943-952.
81. Zhou, J., Wen, Q., Li, S.F., Zhang, Y.F., Gao, N., Tian, X., Fang, Y., Gao, J., Cui, M.Z., He, X.P., Jia, L.J., Jin, H., und Qiao, H.L., *Significant change of cytochrome P450s activities in patients with hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(31): S. 50612-50623.
82. Frye, R.F., Zgheib, N.K., Matzke, G.R., Chaves-Gnecco, D., Rabinovitz, M., Shaikh, O.S., und Branch, R.A., *Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism*. Clin Pharmacol Ther, 2006. **80**(3): S. 235-45.
83. Holstege, A., Staiger, M., Haag, K., und Gerok, W., *Correlation of caffeine elimination and Child's classification in liver cirrhosis*. Klin Wochenschr, 1989. **67**(1): S. 6-15.

84. Haas, S., Merkelbach-Bruse, S., Justenhoven, C., Brauch, H., und Fischer, H.P., *Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in hepatocellular tumors of the non-cirrhotic liver*. *Pathol Res Pract*, 2009. **205**(10): S. 716-25.
85. Lane, C.S., Nisar, S., Griffiths, W.J., Fuller, B.J., Davidson, B.R., Hewes, J., Welham, K.J., und Patterson, L.H., *Identification of cytochrome P450 enzymes in human colorectal metastases and the surrounding liver: a proteomic approach*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(14): S. 2127-34.
86. Fielding, L., *Current imaging strategies of primary and secondary neoplasms of the liver*. *Semin Intervent Radiol*, 2006. **23**(1): S. 3-12.
87. Friedman, S.L., *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(6): S. 1655-69.
88. Karsdal, M.A., Manon-Jensen, T., Genovese, F., Kristensen, J.H., Nielsen, M.J., Sand, J.M., Hansen, N.U., Bay-Jensen, A.C., Bager, C.L., Krag, A., Blanchard, A., Krarup, H., Leeming, D.J., und Schuppan, D., *Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015. **308**(10): S. G807-30.
89. Tapper, E.B. und Lok, A.S., *Use of Liver Imaging and Biopsy in Clinical Practice*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(8): S. 756-768.
90. Regev, A., Berho, M., Jeffers, L.J., Milikowski, C., Molina, E.G., Prysopoulos, N.T., Feng, Z.Z., Reddy, K.R., und Schiff, E.R., *Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(10): S. 2614-2618.
91. European Association for Study of Liver und Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado, *EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis*. *J Hepatol*, 2015. **63**(1): S. 237-64.
92. Piccinino, F., Sagnelli, E., Pasquale, G., und Giusti, G., *Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies*. *J Hepatol*, 1986. **2**(2): S. 165-73.
93. Wai, C.T., Greenson, J.K., Fontana, R.J., Kalbfleisch, J.D., Marrero, J.A., Conjeevaram, H.S., und Lok, A.S., *A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2003. **38**(2): S. 518-526.
94. Sterling, R.K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M.C., Montaner, J., M, S.S., Torriani, F.J., Dieterich, D.T., Thomas, D.L., Messinger, D., und Nelson, M., *Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection*. *Hepatology*, 2006. **43**(6): S. 1317-1325.
95. Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Pieroni, L., Charlotte, F., Benhamou, Y., und Poinard, T., *Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study*. *Lancet*, 2001. **357**(9262): S. 1069-1075.
96. Chou, R. und Wasson, N., *Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review*. *Ann Intern Med*, 2013. **158**(11): S. 807-20.

97. Dietrich, C.F., Bamber, J., Berzigotti, A., Bota, S., Cantisani, V., Castera, L., Cosgrove, D., Ferraioli, G., Friedrich-Rust, M., Gilja, O.H., Goertz, R.S., Karlas, T., de Knegt, R., de Ledingen, V., Piscaglia, F., Procopet, B., Saftoiu, A., Sidhu, P.S., Sporea, I., und Thiele, M., *EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version)*. *Ultraschall Med*, 2017. **38**(4): S. e16-e47.
98. Friedrich-Rust, M., Poynard, T., und Castera, L., *Critical comparison of elastography methods to assess chronic liver disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **13**(7): S. 402-411.
99. Tzschätzsch, H., *Methods and Approaches in Ultrasound Elastography*, in Sack, I. und Schaeffter, T. (Hrsg.), *Quantification of Biophysical Parameters in Medical Imaging*, Cham: Springer International Publishing; 2018. S. 281-302.
100. Varghese, T., *Quasi-Static Ultrasound Elastography*. *Ultrasound Clin*, 2009. **4**(3): S. 323-338.
101. Nightingale, K., Soo, M.S., Nightingale, R., und Trahey, G., *Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility*. *Ultrasound Med Biol*, 2002. **28**(2): S. 227-235.
102. Sandrin, L., Fourquet, B., Hasquenoph, J.M., Yon, S., Fournier, C., Mal, F., Christidis, C., Ziou, M., Poulet, B., Kazemi, F., Beaugrand, M., und Palau, R., *Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis*. *Ultrasound Med Biol*, 2003. **29**(12): S. 1705-1713.
103. Palmeri, M.L., Wang, M.H., Dahl, J.J., Frinkley, K.D., und Nightingale, K.R., *Quantifying hepatic shear modulus in vivo using acoustic radiation force*. *Ultrasound Med Biol*, 2008. **34**(4): S. 546-58.
104. Bercoff, J., Tanter, M., und Fink, M., *Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping*. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2004. **51**(4): S. 396-409.
105. Bamber, J., Cosgrove, D., Dietrich, C.F., Fromageau, J., Bojunga, J., Calliada, F., Cantisani, V., Correas, J.M., D'Onofrio, M., Drakonaki, E.E., Fink, M., Friedrich-Rust, M., Gilja, O.H., Havre, R.F., Jenssen, C., Klausner, A.S., Ohlinger, R., Saftoiu, A., Schaefer, F., Sporea, I., und Piscaglia, F., *EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology*. *Ultraschall Med*, 2013. **34**(2): S. 169-84.
106. Tzschätzsch, H., *Entwicklung, Anwendung und Validierung der zeitharmonischen in vivo Ultraschallelastografie an der menschlichen Leber und am menschlichen Herzen [Dissertation]*. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät; 2017.
107. Tzschätzsch, H., Nguyen Trong, M., Scheuermann, T., Ipek-Ugay, S., Fischer, T., Schultz, M., Braun, J., und Sack, I., *Two-Dimensional Time-Harmonic Elastography of the Human Liver and Spleen*. *Ultrasound Med Biol*, 2016. **42**(11): S. 2562-2571.

108. Tzschätzsch, H., Ipek-Ugay, S., Trong, M.N., Guo, J., Eggers, J., Gentz, E., Fischer, T., Schultz, M., Braun, J., und Sack, I., *Multifrequency time-harmonic elastography for the measurement of liver viscoelasticity in large tissue windows*. *Ultrasound Med Biol*, 2015. **41**(3): S. 724-733.
109. Hudert, C.A., Tzschätzsch, H., Guo, J., Rudolph, B., Blaker, H., Loddenkemper, C., Luck, W., Müller, H.P., Baumgart, D.C., Hamm, B., Braun, J., Holzhütter, H.G., Wiegand, S., und Sack, I., *US Time-Harmonic Elastography: Detection of Liver Fibrosis in Adolescents with Extreme Obesity with Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Radiology*, 2018. **288**(1): S. 99-106.
110. Tzschätzsch, H., Elgeti, T., Rettig, K., Kargel, C., Klaua, R., Schultz, M., Braun, J., und Sack, I., *In Vivo time harmonic elastography of the human heart*. *Ultrasound Med Biol*, 2012. **38**(2): S. 214-22.
111. Schaafs, L.A., Tzschätzsch, H., van der Giet, M., Reshetnik, A., Steffen, I.G., Hamm, B., Braun, J., Sack, I., und Elgeti, T., *Time-Harmonic Ultrasound elastography of the Descending Abdominal Aorta: Initial Results*. *Ultrasound Med Biol*, 2017. **43**(11): S. 2550-2557.
112. Marticorena Garcia, S.R., Grossmann, M., Lang, S.T., Nguyen Trong, M., Schultz, M., Guo, J., Hamm, B., Braun, J., Sack, I., und Tzschätzsch, H., *Full-Field-of-View Time-Harmonic Elastography of the Native Kidney*. *Ultrasound Med Biol*, 2018. **44**(5): S. 949-954.
113. Tzschätzsch, H., Kreft, B., Schrank, F., Bergs, J., Braun, J., und Sack, I., *In vivo time-harmonic ultrasound elastography of the human brain detects acute cerebral stiffness changes induced by intracranial pressure variations*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): S. 17888.
114. Ipek-Ugay, S., Tzschätzsch, H., Hudert, C., Marticorena Garcia, S.R., Fischer, T., Braun, J., Althoff, C., und Sack, I., *Time Harmonic Elastography Reveals Sensitivity of Liver Stiffness to Water Ingestion*. *Ultrasound Med Biol*, 2016. **42**(6): S. 1289-1294.
115. Sack, I., *Magnetresonanz-Elastographie*. *Dtsch med Wochenschr*, 2008. **133**(06): S. 247-251.
116. Desmet, V.J., Gerber, M., Hoofnagle, J.H., Manns, M., und Scheuer, P.J., *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. *Hepatology*, 1994. **19**(6): S. 1513-20.
117. Choi, J.M., Oh, S.J., Lee, S.Y., Im, J.H., Oh, J.M., Ryu, C.S., Kwak, H.C., Lee, J.Y., Kang, K.W., und Kim, S.K., *HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics*. *Arch Pharm Res*, 2015. **38**(5): S. 691-704.
118. Youden, W.J., *Index for rating diagnostic tests*. *Cancer*, 1950. **3**(1): S. 32-35.
119. Anderson, G.D. und Chan, L.N., *Pharmacokinetic Drug Interactions with Tobacco, Cannabinoids and Smoking Cessation Products*. *Clin Pharmacokinet*, 2016. **55**(11): S. 1353-1368.
120. Hewitt, N.J. und Hewitt, P., *Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines*. *Xenobiotica*, 2004. **34**(3): S. 243-56.

121. Moorman, A.F., Vermeulen, J.L., Charles, R., und Lamers, W.H., *Localization of ammonia-metabolizing enzymes in human liver: ontogenesis of heterogeneity*. Hepatology, 1989. **9**(3): S. 367-72.
122. Oinonen, T. und Lindros, K.O., *Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation*. Biochem J, 1998. **329**(Pt 1): S. 17-35.
123. McKinnon, R.A., Hall, P.D., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H., und McManus, M.E., *Localization of CYP1A1 and CYP1A2 messenger RNA in normal human liver and in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization*. Hepatology, 1991. **14**(5): S. 848-56.
124. Fuhr, U., Rost, K.L., Engelhardt, R., Sachs, M., Liermann, D., Belloc, C., Beaune, P., Janezic, S., Grant, D., Meyer, U.A., und Staib, A.H., *Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations*. Pharmacogenetics, 1996. **6**(2): S. 159-76.
125. Ishii, Y., Suzuki, S., Kohno, T., Aoki, M., Kohno, T., Ito, A., Takayama, T., und Asai, S., *L-[1-13C] phenylalanine breath test reflects phenylalanine hydroxylase activity of the whole liver*. J Surg Res, 2003. **112**(1): S. 38-42.
126. Traber, P.G., Chianale, J., und Gumucio, J.J., *Physiologic significance and regulation of hepatocellular heterogeneity*. Gastroenterology, 1988. **95**(4): S. 1130-43.
127. Watkins, P.B., Murray, S.A., Thomas, P.E., und Wrighton, S.A., *Distribution of cytochromes P-450, cytochrome b5, and NADPH-cytochrome P-450 reductase in an entire human liver*. Biochem Pharmacol, 1990. **39**(3): S. 471-6.
128. Rasmussen, M.K., Zamaratskaia, G., und Ekstrand, B., *Comparable constitutive expression and activity of cytochrome P450 between the lobes of the porcine liver*. Toxicol In Vitro, 2014. **28**(7): S. 1190-5.
129. Nakanishi, Y., Matsushita, A., Matsuno, K., Iwasaki, K., Utoh, M., Nakamura, C., und Uno, Y., *Regional distribution of drug-metabolizing enzyme activities in the liver and small intestine of cynomolgus monkeys*. Drug Metab Pharmacokinet, 2011. **26**(3): S. 288-94.
130. The Human Protein Atlas. *Expression of CYP1A2 in liver cancer*. [Zugriffsdatum: 19.06.2019]; Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140505-CYP1A2/pathology/tissue/liver+cancer>.
131. Long, J., Wang, H., Lang, Z., Wang, T., Long, M., und Wang, B., *Expression level of glutamine synthetase is increased in hepatocellular carcinoma and liver tissue with cirrhosis and chronic hepatitis B*. Hepatol Int, 2011. **5**(2): S. 698-706.
132. Di Tommaso, L., Franchi, G., Park, Y.N., Fiamengo, B., Destro, A., Morengi, E., Montorsi, M., Torzilli, G., Tommasini, M., Terracciano, L., Tornillo, L., Vecchione, R., und Roncalli, M., *Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis*. Hepatology, 2007. **45**(3): S. 725-34.
133. The Human Protein Atlas. *Tissue expression of CYP1A2*. [Zugriffsdatum: 07.07.2019]; Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140505-CYP1A2/tissue>.

134. The Human Protein Atlas. *Expression of CYP1A2 in colorectal cancer*. [Zugriffsdatum: 07.07.2019]; Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140505-CYP1A2/pathology/tissue/colorectal+cancer>.
135. Lee, J.-R., Kwon, C.H., Choi, Y., Park, H.J., Kim, H.S., Jo, H.-J., Oh, N., und Park, D.Y., *Transcriptome analysis of paired primary colorectal carcinoma and liver metastases reveals fusion transcripts and similar gene expression profiles in primary carcinoma and liver metastases*. BMC cancer, 2016. **16**: S. 539-539.
136. Blank, A., Roberts, D.E., 2nd, Dawson, H., Zlobec, I., und Lugli, A., *Tumor Heterogeneity in Primary Colorectal Cancer and Corresponding Metastases. Does the Apple Fall Far From the Tree?* Front. Med., 2018. **5**: S. 234-234.
137. Nault, J.C., Paradis, V., Cherqui, D., Vilgrain, V., und Zucman-Rossi, J., *Molecular classification of hepatocellular adenoma in clinical practice*. J Hepatol, 2017. **67**(5): S. 1074-1083.
138. Tzschätzsch, H., Guo, J., Dittmann, F., Hirsch, S., Barnhill, E., Johrens, K., Braun, J., und Sack, I., *Tomoelastography by multifrequency wave number recovery from time-harmonic propagating shear waves*. Med Image Anal, 2016. **30**: S. 1-10.
139. Hudson, J.M., Milot, L., Parry, C., Williams, R., und Burns, P.N., *Inter- and intra-operator reliability and repeatability of shear wave elastography in the liver: a study in healthy volunteers*. Ultrasound Med Biol, 2013. **39**(6): S. 950-5.
140. Guzman-Aroca, F., Reus, M., Berna-Serna, J.D., Serrano, L., Serrano, C., Gilabert, A., und Cepero, A., *Reproducibility of shear wave velocity measurements by acoustic radiation force impulse imaging of the liver: a study in healthy volunteers*. J Ultrasound Med, 2011. **30**(7): S. 975-9.
141. Son, C.Y., Kim, S.U., Han, W.K., Choi, G.H., Park, H., Yang, S.C., Choi, J.S., Park, J.Y., Kim, D.Y., Ahn, S.H., Chon, C.Y., und Han, K.H., *Normal liver elasticity values using acoustic radiation force impulse imaging: a prospective study in healthy living liver and kidney donors*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27**(1): S. 130-6.
142. Ling, W., Lu, Q., Quan, J., Ma, L., und Luo, Y., *Assessment of impact factors on shear wave based liver stiffness measurement*. Eur J Radiol, 2013. **82**(2): S. 335-41.
143. Colombo, S., Belloli, L., Zaccanelli, M., Badia, E., Jamoletti, C., Buonocore, M., und Del Poggio, P., *Normal liver stiffness and its determinants in healthy blood donors*. Dig Liver Dis, 2011. **43**(3): S. 231-6.
144. Dong, Y., Sirli, R., Ferraioli, G., Sporea, I., Chiorean, L., Cui, X., Fan, M., Wang, W.P., Gilja, O.H., Sidhu, P.S., und Dietrich, C.F., *Shear wave elastography of the liver - review on normal values*. Z Gastroenterol, 2017. **55**(2): S. 153-166.
145. Popescu, A., Sporea, I., Sirli, R., Bota, S., Focsa, M., Danila, M., Nicolita, D., Martie, A., Sendroiu, M., und Juchis, A., *The mean values of liver stiffness assessed by Acoustic Radiation Force Impulse elastography in normal subjects*. Med Ultrason, 2011. **13**(1): S. 33-7.
146. Alsebaey, A., Allam, N., Alswat, K., und Waked, I., *Normal liver stiffness: A study in living donors with normal liver histology*. World J Hepatol, 2015. **7**(8): S. 1149-53.

147. Sirli, R., Sporea, I., Tudora, A., Deleanu, A., und Popescu, A., *Transient elastographic evaluation of subjects without known hepatic pathology: does age change the liver stiffness?* J Gastrointestin Liver Dis, 2009. **18**(1): S. 57-60.
148. Huang, Z., Zheng, J., Zeng, J., Wang, X., Wu, T., und Zheng, R., *Normal liver stiffness in healthy adults assessed by real-time shear wave elastography and factors that influence this method.* Ultrasound Med Biol, 2014. **40**(11): S. 2549-55.
149. Lock, J.F., Malinowski, M., Seehofer, D., Hoppe, S., Rohl, R.I., Niehues, S.M., Neuhaus, P., und Stockmann, M., *Function and volume recovery after partial hepatectomy: influence of preoperative liver function, residual liver volume, and obesity.* Langenbecks Arch Surg, 2012. **397**(8): S. 1297-304.
150. Sun, X.L., Liang, L.W., Cao, H., Men, Q., Hou, K.Z., Chen, Z., und Zhao, Y.E., *Liver reserve function assessment by acoustic radiation force impulse imaging.* World J Gastroenterol, 2015. **21**(32): S. 9648-9655.
151. Li, B., Min, J., Liang, W.R., Zhang, G.Q., Wu, J.J., Jin, K., Huang, W., Ying, C.Y., und Chao, M., *Use of magnetic resonance elastography for assessing liver functional reserve: A clinical study.* World J Gastroenterol, 2015. **21**(24): S. 7522-8.
152. Seki, E. und Brenner, D.A., *Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis.* J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015. **22**(7): S. 512-8.
153. McHedlidze, T., Waldner, M., Zopf, S., Walker, J., Rankin, A.L., Schuchmann, M., Voehringer, D., McKenzie, A.N., Neurath, M.F., Pflanz, S., und Wirtz, S., *Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis.* Immunity, 2013. **39**(2): S. 357-71.
154. Kotsiou, O.S., Gourgoulianis, K.I., und Zarogiannis, S.G., *IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis.* Front Immunol, 2018. **9**: S. 2432.
155. Dinesen, L., Caspary, W.F., Chapman, R.W., Dietrich, C.F., Sarrazin, C., und Braden, B., *13C-methacetin-breath test compared to also noninvasive biochemical blood tests in predicting hepatic fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis C.* Dig Liver Dis, 2008. **40**(9): S. 743-8.
156. Fierbinteanu-Braticevici, C., Papacocea, R., Tribus, L., und Cristian, B., *Role of 13C methacetin breath test for non invasive staging of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C.* Indian J Med Res, 2014. **140**(1): S. 123-9.
157. Forestier, J., Dumortier, J., Guillaud, O., Ecochard, M., Roman, S., Boillot, O., Lutringer, D., Scoazec, J.Y., Subtil, F., und Mion, F., *Noninvasive diagnosis and prognosis of liver cirrhosis: a comparison of biological scores, elastometry, and metabolic liver function tests.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010. **22**(5): S. 532-40.
158. Giannini, E., Fasoli, A., Chiarbonello, B., Malfatti, F., Romagnoli, P., Botta, F., Testa, E., Polegato, S., Fumagalli, A., und Testa, R., *13C-aminopyrine breath test to evaluate severity of disease in patients with chronic hepatitis C virus infection.* Aliment Pharmacol Ther, 2002. **16**(4): S. 717-725.
159. Loaeza-del-Castillo, A., Paz-Pineda, F., Oviedo-Cardenas, E., Sanchez-Avila, F., und Vargas-Vorackova, F., *AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis.* Ann Hepatol, 2008. **7**(4): S. 350-7.

160. Vallet-Pichard, A., Mallet, V., Nalpas, B., Verkarre, V., Nalpas, A., Dhalluin-Venier, V., Fontaine, H., and Pol, S., *FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest*. *Hepatology*, 2007. **46**(1): S. 32-6.
161. Boursier, J., Vergniol, J., Sawadogo, A., Dakka, T., Michalak, S., Gallois, Y., Le Tallec, V., Oberti, F., Fouchard-Hubert, I., Dib, N., Rousselet, M.C., Konate, A., Amrani, N., de Ledinghen, V., and Cales, P., *The combination of a blood test and Fibroscan improves the non-invasive diagnosis of liver fibrosis*. *Liver Int*, 2009. **29**(10): S. 1507-1515.
162. Mitsuka, Y., Midorikawa, Y., Abe, H., Matsumoto, N., Moriyama, M., Haradome, H., Sugitani, M., Tsuji, S., and Takayama, T., *A prediction model for the grade of liver fibrosis using magnetic resonance elastography*. *BMC Gastroenterol*, 2017. **17**(1): S. 133.
163. Voican, C.S., Louvet, A., Trabut, J.B., Njike-Nakseu, M., Dharancy, S., Sanchez, A., Corouge, M., Lamouri, K., Lebrun, A., Balian, A., Prevot, S., Lachgar, M., Maitre, S., Agostini, H., Mathurin, P., Perlemuter, G., and Naveau, S., *Transient elastography alone and in combination with FibroTest® for the diagnosis of hepatic fibrosis in alcoholic liver disease*. *Liver Int*, 2017. **37**(11): S. 1697-1705.
164. Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Turner, S., Swainston, N., Mendes, P., and Steinbeck, C., *ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(D1): S. D1214-9.
165. Pearce, R.E., McIntyre, C.J., Madan, A., Sanzgiri, U., Draper, A.J., Bullock, P.L., Cook, D.C., Burton, L.A., Latham, J., Nevins, C., and Parkinson, A., *Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **331**(2): S. 145-69.
166. Sharma, A., Ashworth, A., Behnke, M., Cotterell, A., Posner, M., and Fisher, R.A., *Donor selection for adult-to-adult living donor liver transplantation: well begun is half done*. *Transplantation*, 2013. **95**(3): S. 501-6.
167. Ryan, C.K., Johnson, L.A., Germin, B.I., and Marcos, A., *One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation*. *Liver Transpl*, 2002. **8**(12): S. 1114-22.
168. Goodman, Z.D., *Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases*. *J Hepatol*, 2007. **47**(4): S. 598-607.
169. Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., Denk, H., Desmet, V., Korb, G., and MacSween, R.N., *Histological grading and staging of chronic hepatitis*. *J Hepatol*, 1995. **22**(6): S. 696-9.
170. Toshima, T., Shirabe, K., Takeishi, K., Motomura, T., Mano, Y., Uchiyama, H., Yoshizumi, T., Soejima, Y., Taketomi, A., and Maehara, Y., *New method for assessing liver fibrosis based on acoustic radiation force impulse: a special reference to the difference between right and left liver*. *J Gastroenterol*, 2011. **46**(5): S. 705-11.

171. Karlas, T., Pfrepper, C., Wiegand, J., Wittekind, C., Neuschulz, M., Mossner, J., Berg, T., Troltsch, M., und Keim, V., *Acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) for non-invasive detection of liver fibrosis: examination standards and evaluation of interlobe differences in healthy subjects and chronic liver disease*. Scand J Gastroenterol, 2011. **46**(12): S. 1458-67.
172. Ipek-Ugay, S., Tzschätzsch, H., Braun, J., Fischer, T., und Sack, I., *Physiologic Reduction of Hepatic Venous Blood Flow by the Valsalva Maneuver Decreases Liver Stiffness*. J Ultrasound Med, 2017. **36**(7): S. 1305-1311.
173. Tzschätzsch, H., Sack, I., Marticorena Garcia, S.R., Ipek-Ugay, S., Braun, J., Hamm, B., und Althoff, C.E., *Time-Harmonic Elastography of the Liver is Sensitive to Intrahepatic Pressure Gradient and Liver Decompression after Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt (TIPS) Implantation*. Ultrasound Med Biol, 2017. **43**(3): S. 595-600.
174. Coco, B., Oliveri, F., Maina, A.M., Ciccorossi, P., Sacco, R., Colombatto, P., Bonino, F., und Brunetto, M.R., *Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases*. J Viral Hepat, 2007. **14**(5): S. 360-369.
175. Millonig, G., Reimann, F.M., Friedrich, S., Fonouni, H., Mehrabi, A., Buchler, M.W., Seitz, H.K., und Mueller, S., *Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis*. Hepatology, 2008. **48**(5): S. 1718-1723.
176. Petta, S., Maida, M., Macaluso, F.S., Di Marco, V., Camma, C., Cabibi, D., und Craxi, A., *The severity of steatosis influences liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2015. **62**(4): S. 1101-1110.
177. Millonig, G., Friedrich, S., Adolf, S., Fonouni, H., Golriz, M., Mehrabi, A., Stiefel, P., Poschl, G., Buchler, M.W., Seitz, H.K., und Mueller, S., *Liver stiffness is directly influenced by central venous pressure*. J Hepatol, 2010. **52**(2): S. 206-210.
178. Lu, Q., Ling, W., Lu, C., Li, J., Ma, L., Quan, J., He, D., Liu, J., Yang, J., Wen, T., Wu, H., Zhu, H., und Luo, Y., *Hepatocellular carcinoma: stiffness value and ratio to discriminate malignant from benign focal liver lesions*. Radiology, 2015. **275**(3): S. 880-8.
179. Holzhütter, H.G., Lock, J.F., Taheri, P., Bulik, S., Goede, A., und Stockmann, M., *Assessment of hepatic detoxification activity: proposal of an improved variant of the (13)c-methacetin breath test*. PLoS One, 2013. **8**(8): S. e70780.
180. Alizai, P.H., Lurje, I., Kroh, A., Schmitz, S., Luedde, T., Andruszkow, J., Neumann, U.P., und Ulmer, F., *Noninvasive Evaluation of Liver Function in Morbidly Obese Patients*. Gastroenterol Res Pract, 2019. **2019**: S. 4307462.
181. Almpanis, Z., Demonakou, M., und Tiniakos, D., *Evaluation of liver fibrosis: "Something old, something new..."*. Ann Gastroenterol, 2016. **29**(4): S. 445-453.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Niklas Heucke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung molekularer und strukturell-mechanischer Lebergewebeeigenschaften zur Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit eines <sup>13</sup>C-Leberfunktionstests“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (*International Committee of Medical Journal Editors*; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Ich, Niklas Heucke, hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### PUBLIKATION 1:

Wuensch, T.\*, Heucke, N.\*, Wizenty, J., Quint, J., Sinn, B., Arsenic, R., Jara, M., Kaffarnik, M., Pratschke, J., und Stockmann, M., *Hepatic CYP1A2 activity in liver tumors and the implications for preoperative volume-function analysis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019. **316**(5): S. G608-G614.

[\* geteilte Erstautorschaft]

### Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit am Versuchsdesign; Literaturrecherche; Patientenrekrutierung mit Erfassung klinischer Daten sowie der Probengewinnung; Etablierung und Durchführung der in den Methoden beschriebenen Versuche inklusive Gewebefärbungen, CYP1A2-Aktivitätsassay sowie der exemplarischen Volumen-Funktionsplanung; Mitarbeit an der Durchführung des LiMAx-Test; Mitarbeit an Auswertung und Interpretation der erhobenen Daten; Erstellung sämtlicher Tabellen und Abbildungen; Mitarbeit am Verfassen des Manuskripts und finale Überarbeitung

### PUBLIKATION 2:

Heucke, N.\*, Wuensch, T.\*, Mohr, J., Kaffarnik, M., Arsenic, R., Sinn, B., Müller, T., Pratschke, J., Stockmann, M., Sack, I., und Tzschätzsch, H., *Non-invasive structure-function assessment of the liver by 2D time-harmonic elastography and the dynamic Liver MMaximum capacity (LiMAx) test*. J Gastroenterol Hepatol, 2019. **34**(9): S. 1611-1619.

[\* geteilte Erstautorschaft]

### Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit am Versuchsdesign; Literaturrecherche; Patienten- und Probandenrekrutierung mit Erfassung klinischer Daten; Durchführung der gesamten elastographischen Messungen mit Ausnahme der transienten Elastographie; Mitarbeit an der Durchführung des LiMAx-Test; Mitarbeit an Auswertung und Interpretation der erhobenen Daten; Erstellung sämtlicher Tabellen und Abbildungen; Mitarbeit am Verfassen des Manuskripts und finale Überarbeitung

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

### ORIGINALARBEITEN

Wuensch, T.\*, Heucke, N.\*, Wizenty, J., Quint, J., Sinn, B., Arsenic, R., Jara, M., Kaffarnik, M., Pratschke, J., und Stockmann, M., *Hepatic CYP1A2 activity in liver tumors and the implications for preoperative volume-function analysis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019. **316**(5): S. G608-G614.

[\* geteilte Erstautorschaft]

Heucke, N.\*, Wuensch, T.\*, Mohr, J., Kaffarnik, M., Arsenic, R., Sinn, B., Müller, T., Pratschke, J., Stockmann, M., Sack, I., und Tzschätzsch, H., *Non-invasive structure-function assessment of the liver by 2D time-harmonic elastography and the dynamic Liver MAXimum capacity (LiMAX) test*. J Gastroenterol Hepatol, 2019. **34**(9): S. 1611-1619.

[\* geteilte Erstautorschaft]

Berndt, N., Eckstein, J., Heucke, N., Gajowski, R., Stockmann, M., Meierhofer, D., und Holzhütter, H.G., *Characterization of Lipid and Lipid Droplet Metabolism in Human HCC*. Cells, 2019. **8**(5).

### KURZVORTRÄGE

Wuensch, T., Heucke, N., Wizenty, J., Quint, J., Sinn, B., Arsenic, R., Kaffarnik, M., Jara, M., Pratschke, J., und Stockmann, M., *Untersuchung der hepatischen CYP1A2-Aktivität im gesunden und krankhaft veränderten Lebergewebe*. Z Gastroenterol, 2018. **56**(08): p. KV 157.

Wuensch, T., Heucke, N., Quint, J., Kaffarnik, M., Arsenic, R., Sinn, B., Müller, T., Sack, I., Tzschätzsch, H., Pratschke, J., und Stockmann, M., *Struktur-Funktions-Analyse der Leber mittels nichtinvasiver Verfahren bei Patienten mit einer Lebererkrankung und gesunden Kontrollpersonen*. Z Gastroenterol, 2018. **56**(08): p. KV 171.

### POSTERBEITRÄGE

Wuensch, T., Quint, J., Heucke, N., Mohr, J., Kaffarnik, M., Arsenic, R., Müller, T., Sinn, B., Meierhofer, D., Gajowski, R., Pratschke, J., Sack, I., Tzschätzsch, H., König, M., Holzhütter, H.G., und Stockmann, M., *Improving non-invasive liver function tests and applying computational algorithms for more precise diagnostics*. LiSym Midterm Evaluation Mannheim, 2018.

Heucke, N., Wuensch, T., Mohr, J., Klingberg, O., Pratschke, J. und Stockmann, M., *Towards a better understanding of regional CYP1A2 activity distribution within the liver*. LiSym Jamboree Dresden, 2017.

Heucke, N., Steinemann, G., Kuzyniak, W., Hoffmann, B., und Höpfner, M., *Evaluation of the new HDAC Inhibitor Ethyl-Animacroxam-Gold for the Treatment of Testicular Germ Cell Tumours*. European Students' Conference, 2015.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von 2017 bis 2019 im Labor der Experimentellen Chirurgie und an der Chirurgischen Klinik, Campus Virchow-Klinikum der Charité unter den stets wachsamen Augen meiner Betreuer, Professor Dr. Martin Stockmann und Dr. Tilo Wunsch, erstellt. Ihnen beiden gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, ihre kontinuierliche Unterstützung und konstruktive Kritik.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Professor Dr. Ingolf Sack sowie Dr. Heiko Tzschätzsch aus der Radiologie der Charité bedanken, ohne deren unermüdliche Hilfe keine der elastographischen Messungen möglich gewesen wäre. Darüber hinaus bin ich PD Dr. Ruza Arsenic und Dr. Bruno Sinn aus der Pathologie der Charité für ihre Unterstützung bei der histopathologischen Befundung der zahlreichen Lebergewebeprobe zu Dank verpflichtet.

Ich danke auch allen Kolleginnen und Kollegen aus der Chirurgischen Klinik sowie dem Labor der Experimentellen Chirurgie für ihre Ratschläge und ihre Bereitschaft, sich Zeit zu nehmen für all meine Fragen und Anliegen. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Maximilian Jara, Dr. Xiaohua Huang, Janina Quint und Olga Klingberg sowie bei Anja Schirmeier, Kirsten Führer, Steffen Lippert und Peter Tang.

Ein weiterer Dank geht an Dipl.-Math. Klaus Lenz vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité für die exzellente Beratung in allen statistischen Fragen.

Für die vielen warmen Worte zur rechten Zeit und dafür, dass sie mich stets zum Weitermachen motiviert haben, danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Insbesondere mein Bruder war mir eine große Hilfe beim Entwurf der Abbildungen zur Funktionsweise der THE und des LiMAX.

Zu guter Letzt gilt mein Dank all den Studienteilnehmern, die wie selbstverständlich bereit waren, einen kleinen Beitrag für die Forschung zu leisten. Und selbst im Angesicht unklarer Befunde und angsteinflößender Diagnosen gaben alle Patienten mit einem Lächeln ein kleines Stückchen ihrer Leber her, um die medizinische Versorgung zukünftiger, ihnen völlig unbekannter Menschen zu verbessern.