

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

Verlauf von Leberregeneration und metabolischen Parametern  
nach Leberteilektomie: Bezug zu metabolischer Ausgangslage  
und anthropometrischen Charakteristika

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie Caroline Ringe  
aus Hamburg

---

Gutachter:           1. Prof.Dr.med.A.Pfeiffer  
                          2. Prof.Dr.med.H.Schatz  
                          3. Priv-Doz.Dr.D.Seehofer

Datum der Promotion: 07.09.2012

---

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, welche mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben. Ohne Herrn Dr. med. Christian von Loeffelholz wäre die Realisierung des vorliegenden Projektes nicht gelungen. Dank seiner Förderung und Vermittlungstätigkeit sowie dank Herrn Prof. Dr. med. A. F. H. Pfeiffer erhielt ich die Gelegenheit, an der Durchführung der vorliegenden Studie intensiv beteiligt gewesen zu sein. Herr Dr. med. Christian von Loeffelholz und Herr Dr. med. Johan Lock waren mir während der gesamten Zeit des Experiments wichtige Betreuer und standen mir bei verschiedensten Anliegen stets zur Seite. Den namentlich nicht erwähnten Mitarbeitern des DIfE danke ich für das angenehme Arbeitsumfeld und ihre Hilfsbereitschaft bei zahlreichen Gelegenheiten.

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Das Metabolische Syndrom.....</b>	<b>7</b>
1.1.1. Definition Metabolisches Syndrom.....	7
1.1.2. Typ 2 Diabetes mellitus – eine Folgeerkrankung des Metabolischen Syndroms .....	8
1.1.3. Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung .....	8
1.1.4. Insulinresistenz – Kern-Komponente in der Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms.....	10
1.1.5. Inflammatorische Aktivität und Insulinresistenz .....	12
1.1.6. Die Rolle ausgewählter Transskriptionsfaktoren im Kontext der NAFLD-Pathogenese .....	13
<b>1.2. Leberfunktion und Leberteilresektion.....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Beurteilung der Leberfunktion .....	15
1.2.2. Der LiMAX-Test.....	18
1.2.3. Bedeutung der Leberfunktion im Rahmen von Leberteilresektionen .....	18
<b>2. FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Wie wirkt sich eine Dysbalance des Glukose- und Lipidstoffwechsels auf die Aktivität der Transskriptionsfaktoren FOXO1 und SREBP-1c aus?.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Wie wirkt sich die metabolische Ausgangslage auf den postoperativen Verlauf der Leberregeneration nach Leberteilresektion aus?.....</b>	<b>21</b>
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Studiendesign.....</b>	<b>22</b>
3.1.1. Ethikkommission.....	22
3.1.2. Studienablauf und Vorgehensweise .....	22
3.1.3. Einschluss- und Ausschlusskriterien .....	25
<b>3.2. Patientenuntersuchung zum Studienbeginn .....</b>	<b>26</b>
3.2.1. Anthropometrische Untersuchungen.....	26
3.2.2. Blutentnahme .....	28
<b>3.3. Untersuchung von Lebergewebe.....</b>	<b>29</b>
3.3.1. Gewebeprobenentnahme und Aufbereitung .....	29
3.3.2. Western-Blot und Quantifizierung der Proteinmengen.....	32

---

<b>3.4. Untersuchung der Leberfunktion</b> .....	<b>38</b>
3.4.1. <sup>13</sup> C-Methacetin-Atemtest .....	38
3.4.2. Indocyaningrün-Test (ICG-Test).....	44
<b>3.5. Statistische Auswertung</b> .....	<b>49</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1. Patientencharakterisierung</b> .....	<b>50</b>
<b>4.2. Darstellung von hepatozellulären Transskriptionsfaktoren</b> .....	<b>53</b>
4.2.1. Ergebnisse der Separation von Nuclei und Zytoplasmata.....	53
4.2.2. Subzelluläre Lokalisation von FOXO1 .....	54
4.2.3. Subzelluläre Lokalisation von SREBP-1c.....	56
<b>4.3. Leberregeneration, Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose im perioperativen Verlauf</b> .....	<b>59</b>
4.3.1. Postoperative Leberregeneration bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern .....	59
4.3.2. Postoperative Leberregeneration bei NAFLD und Non-NAFLD – Patienten .....	61
4.3.3. Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose im perioperativen Verlauf bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern, NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten .....	63
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>68</b>
<b>5.1. Darstellung der hepatozellulären Transskriptionsfaktoren</b> .....	<b>68</b>
5.1.1. FOXO1 .....	69
5.1.2. SREBP-1c.....	73
5.1.3. Einschränkungen der Studie.....	76
<b>5.2. Leberregeneration, Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose im perioperativen Verlauf</b> .....	<b>79</b>
5.2.1. Postoperative Leberregeneration bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern.....	79
5.2.2. Postoperative Leberregeneration bei NAFLD und Non-NAFLD-Patienten.....	84
5.2.3. Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose im perioperativen Verlauf bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern, NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten .....	91
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>94</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>95</b>
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>101</b>

---

---

<b>9. ANHANG .....</b>	<b>103</b>
<b>9.1. Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>103</b>

---

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Das Metabolische Syndrom

### 1.1.1. Definition Metabolisches Syndrom

Mit dem Begriff Metabolisches Syndrom wird ein komplexes, sich aus mehreren Komponenten zusammensetzendes Krankheitsbild bezeichnet, dessen Ätiologie im Wechselspiel zwischen genetischen Komponenten und in dem in westlichen Gesellschaften vorherrschenden Lebensstil mit Überernährung und Bewegungsmangel liegt. Entsprechend ist das Metabolische Syndrom ein zunehmend bedeutendes Krankheitsbild, dessen ständig steigende Prävalenz weltweit epidemische Ausmaße annimmt und gemäß epidemiologischen Untersuchungen 20-30 % der Mitteleuropäer betreffen soll.<sup>1,2</sup> Es existieren verschiedene Definitionen des Metabolischen Syndroms, wobei bis heute Uneinigkeit über die Diagnose-Kriterien herrscht. Obwohl es keine einheitlich akzeptierte Definition gibt, werden generell folgende Pathologien als Kern-Komponenten des Metabolischen Syndroms angesehen:

- Abdominelle Adipositas,
- Insulin-Resistenz,
- Dyslipidämie
- und arterielle Hypertonie.

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Definition folgt den Kriterien der NCEP:ATPIII (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III) von 2001, der zufolge die Diagnose Metabolisches Syndrom gestellt werden kann, wenn drei oder mehr der Kriterien in Tabelle 1 erfüllt sind.

Taillenumfang bzw. zentrale Adipositas	Männer > 102 cm Frauen > 88 cm
Abnorme Nüchtern-Plasmaglukose (IFG)	≥ 110 mg/dl
Dyslipidämie	Triglyzeride: > 150 mg/dl HDL: Männer < 40 mg/dl , Frauen < 50
Arterielle Hypertonie	≥ 130/85 mmHg

***Tabelle 1: NCEP ATP III 2001<sup>3</sup>***

---

Das Metabolische Syndrom ist mit diversen Erkrankungsrisiken, insbesondere mit den Folgeerkrankungen des Typ 2 Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen assoziiert. Primäres Ziel der Definition und Diagnose des Metabolischen Syndroms ist die Identifikation von Individuen mit erhöhtem Risiko für assoziierte Endpunkte wie z.B. Schlaganfall, akutes Koronarsyndrom oder Nierenversagen. Die Diagnose eines Metabolischen Syndroms soll einen höheren prädiktiven Wert als die Diagnose der einzelnen Komponenten des Metabolischen Syndroms per se aufweisen. Es herrscht weiterhin Kontroverse über den Stellenwert bzw. die Sensitivität der Diagnose des Metabolischen Syndroms als Risikofaktor.<sup>4, 3</sup>

### **1.1.2. Typ 2 Diabetes mellitus – eine Folgeerkrankung des Metabolischen Syndroms**

Der Diabetes mellitus stellt ein in den letzten Jahren ständig an Prävalenz zunehmendes, sowohl aus medizinischer wie auch aus volkswirtschaftlicher Sicht weltweites, bedeutendes Gesundheitsproblem dar. Die Zahl der an Typ 2 Diabetes mellitus Erkrankten liegt aktuell bei ca. 220 Millionen Menschen weltweit.<sup>5</sup> Der manifeste Diabetes mellitus betraf im Jahr 2000 bereits ca. 2,8 % der Weltbevölkerung und wird bis 2030 auf mindestens 4,4 % steigen – und das nur unter der aktuell realitätsfernen Annahme, die Prävalenz von Adipositas, der zentralen, diabetogenen Einflussgröße schlechthin, bliebe konstant.<sup>6</sup>

Für den Diabetes mellitus Typ 2 kennzeichnende Pathomechanismen sind eine ungenügende Insulin-Sekretion in Kombination mit Insulinresistenz, und entsprechend resultierender Hyperglykämie. Es besteht eine enge Assoziation zwischen Metabolischem Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2. Der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 gehen meist bestimmte, diabetogene Phänomene der Stoffwechsellage voraus. Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie und Adipositas – also entscheidende Komponenten des Metabolischen Syndroms – sind in 75% bis 85% der Fälle vor der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 vorhanden.<sup>2</sup> Das Vorhandensein eines Metabolischen Syndroms erhöht das Risiko, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken um das 5-fache. Das Vorhandensein von einem Metabolischem Syndrom und Insulinresistenz zugleich erhöht das Risiko sogar um das 6–7fache.<sup>2, 5</sup>

### **1.1.3. Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung**

Die nicht-alkoholisch bedingte Fettlebererkrankung, auch Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) genannt, wird als hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms angesehen.<sup>7</sup> NAFLD ist die nicht-alkoholisch bedingte exzessive Lipidakkumulation in der Leber, bei der



Fette in Form von Lipidtropfen in den Hepatozyten gespeichert werden. Der in dieser Arbeit angewandte Score zur Diagnosestellung von NAFLD ist der „NAFLD Activity Score“ (NAS) nach Kleiner, wonach bei einem Fettgehalt der Leber von mehr als 5 % die Diagnose NAFLD gestellt werden kann.<sup>8</sup>

Das Spektrum des Krankheitsbildes von NAFLD reicht von milden Formen einer Steatosis hepatis, über NASH (nonalcoholic steatotic hepatitis) mit entzündlichen Veränderungen, bis zu Leberfibrose und Zirrhose.<sup>7</sup> Durch weitere Progression von NAFLD kann es bis zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms oder Leberversagen kommen.<sup>9, 10, 11, 12</sup>

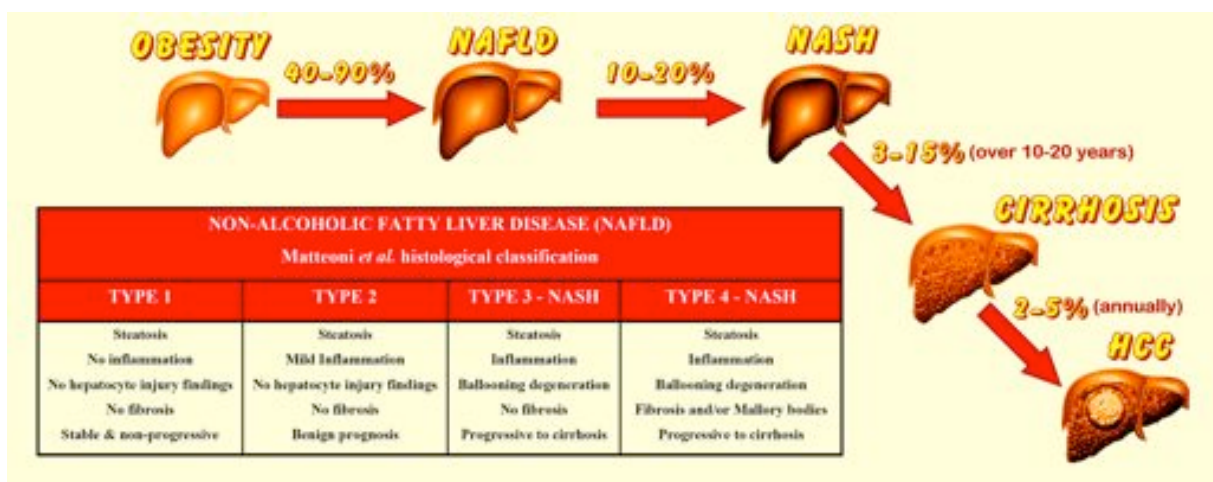


Abbildung 1: Progression von NAFLD über NASH zu Zirrhose und HCC<sup>13</sup>

Hinweise für das Vorliegen von NAFLD können eine vergrößerte Leber in der körperlichen Untersuchung, erhöhte Leberenzyme oder die Feststellung einer Fettleber in der Bildgebung, d.h. durch Ultraschall oder MRT sein. Zudem müssen obligat andere Ätiologien, insbesondere Alkoholabusus, virale, kongenitale oder autoimmune Lebererkrankungen, ausgeschlossen werden können, um NAFLD zu diagnostizieren. Eine definitive Diagnose und exakte Beurteilung des Schweregrads ist jedoch immer nur durch den Goldstandard, die Leberbiopsie mit histologischer Untersuchung, möglich.<sup>9, 10, 14</sup>

NAFLD, weltweit die häufigste Lebererkrankung überhaupt, weist in der gesamten US-amerikanischen Bevölkerung bereits jetzt eine ständig zunehmende Prävalenz von aktuell 20 % - 35 % auf, während das Metabolische Syndrom 22 % der US-Bevölkerung betrifft.<sup>10</sup> Generell korreliert das Ausmaß der Fettakkumulation in der Leber positiv mit der Ausprägung aller

---

Einzel-Komponenten des Metabolischen Syndroms. Es konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz von NAFLD bei Vorhandensein eines Metabolischen Syndroms bei Männern 4fach erhöht ist und sogar 11fach bei Frauen.<sup>2,11</sup> Adipositas ist offenbar der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung von NAFLD. 74 % der Adipositas-Fälle und 90 % der Adipositas per magna - Patienten weisen NAFLD auf. Das Fortschreiten der Adipositas korreliert positiv mit der Progression von NAFLD.<sup>2, 14, 15</sup>

#### **1.1.4. Insulinresistenz – Kern-Komponente in der Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms**

Insulinresistenz bedeutet die unzureichende Wirkung des Insulins am Zielorgan, so dass höhere als normale Insulin-Konzentrationen nötig sind, um die entsprechende Wirkung zu erreichen. Bemerkenswert ist dabei, dass Insulin-Sensitivität und Insulin-Resistenz keine statische Dichotomie darstellen, sondern vielmehr die beiden Pole auf einem Kontinuum der möglichen Stoffwechsellagen kennzeichnen.

##### **1.1.4.1. Periphere Insulinresistenz**

Die periphere Insulinresistenz umschreibt die verminderte Wirksamkeit von Insulin an der Skelettmuskulatur und am Fettgewebe. Insulin kann somit im Rahmen einer Insulinresistenz die periphere Glukose-Aufnahme und Elimination aus dem Blut nicht ausreichend fördern und es kommt zur Hyperglykämie. Weiterhin wird bei Insulinresistenz des Fettgewebes die Aktivität der lipolytischen Enzyme wie der hormonsensitiven Lipase unzureichend durch Insulin supprimiert. Die Folge ist ungehemmte Lipolyse und Freisetzung von Fettsäuren, was zu einer erhöhten Konzentration von freien Fettsäuren im Blut führt.<sup>2, 14</sup>

##### **1.1.4.2. Hepatische (zentrale) Insulinresistenz und die Entstehung von NAFLD**

Die hepatische Insulinresistenz bedeutet die mangelnde Wirkung von Insulin an der Leber, insbesondere die mangelnde Suppression der hepatischen Glukoseproduktion, d.h. der Glukoneogenese und der Glykogenolyse. Insulin bewirkt bei physiologischer Stoffwechsellage eine geringere Bereitstellung von Energiesubstraten im Plasma, indem es nicht nur die hepatische Glukoseproduktion mindert, sondern auch die VLDL - und Apolipoprotein B - Produktion und - Sekretion supprimiert und die Apolipoprotein B – Degradation fördert und

---

somit letztlich die VLDL - Freisetzung aus der Leber mindert. Umgekehrt kommt es bei hepatischer Insulinresistenz trotz anaboler Stoffwechsellage zu ungehemmter hepatischer Glukose- und VLDL – Produktion und –Sekretion, was zu konsekutiver Hyperglykämie, Hyperinsulinämie sowie Dyslipidämie führt.<sup>14</sup>

Als weiterer Faktor spielt die Adipositas eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Insulinresistenz, Metabolischem Syndrom und Fettleber. Bei großen Mengen an insulinresistentem Fettgewebe kommt es durch ein hohes Maß an ungehemmter Lipolyse zu einer Zunahme des Pools an freien Fettsäuren im Blut. Dies führt zu einer erhöhten Fettsäurezufuhr zur Leber. Die Fettsäuren-Aufnahme der Leber aus dem Pool von freien Fettsäuren ist nicht reguliert, weshalb die Einfuhr direkt mit der Fettsäuren-Konzentration im Plasma korreliert. Dies begünstigt im Sinne eines Circulus vitiosus eine vermehrte Fettspeicherung in der Leber und somit die Entstehung bzw. Verstärkung einer Steatosis hepatis und der zentralen Insulinresistenz, was wiederum die allgemeine Stoffwechsellage weiter verschlechtert. Dabei ist es insbesondere die abdominell betonte Adipositas und die vermehrte viszerale Fettspeicherung, die beschleunigend und verstärkend auf die exzessive Fettspeicherung in der Leber wirkt. Viszerale Adipozyten gelten als besonders sensitiv für die Katecholamin - bedingte Lipolyse. Hinzu kommt, dass der venöse Abfluss viszeralen Fettgewebes in die Pfortader mündet und somit hohe Mengen an freien Fettsäuren direkt in die Leber schwemmt. Entsprechend dieser „Portalen Hypothese“ fördert also insbesondere die abdominelle Adipositas die Steatosis hepatis und die hepatische Insulinresistenz.<sup>2</sup>

Hinzu kommt, dass das anabol wirkende Insulin in der Leber zu einer Förderung der Lipogenese führt, indem es eine vermehrte Expression von Enzymen der Triglyzerid – Biosynthese und zugleich eine Minderung der Fettsäuren-Oxidation bewirkt. Diese physiologische Funktion des Insulins ist auch bei Insulinresistenz erhalten, was eine zusätzlich vermehrte Fettsynthese und –speicherung in der Leber zur Folge hat. Da Insulinresistenz zu Hyperinsulinämie führt, kommt es aufgrund gesteigerter lipogenetischer Wirkung zu exzessiver de novo Lipogenese sowie permanenter Suppression des Fettabbaus in der Leber. Insgesamt wird die Entwicklung von NAFLD beschleunigt und die hepatische Insulin-Resistenz verstärkt.<sup>2, 16</sup>

---

Die in der Fettleber gespeicherten Lipide entstammen neben der De Novo Lipogenese und dem Pool an freien Fettsäuren im Serum zudem aus der Ernährung. Dabei stellt Letzteres jedoch den geringsten Anteil dar, während der Pool an freien Fettsäuren der entscheidende Faktor in der Genese von NAFLD ist. Donnelly et al konnten zeigen, dass die bei NAFLD in der Leber gespeicherten Triglyzeride zu ca. 60 % aus den freien Fettsäuren, zu ca. 26 % aus der De Novo Lipogenese und zu ca. 15 % aus der Ernährung stammen.<sup>17</sup>

#### **1.1.5. Inflammatorische Aktivität und Insulinresistenz**

Das Metabolische Syndrom wird generell mit einem chronisch inflammatorischen Zustand des Organismus und erhöhten Plasma - Konzentrationen inflammatorischer Moleküle wie z.B. CRP oder TNF- $\alpha$  assoziiert. Insbesondere eine übermäßige Zunahme an Fettgewebsmasse führt zu abnormaler Zytokin - Produktion und chronischer Inflammation mit Einwanderung von Makrophagen in das Fettgewebe. Sowohl einwandernde Makrophagen als auch die vergrößerten Adipozyten produzieren große Mengen an inflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin 6 und TNF- $\alpha$ , die sich sowohl parakrin auf andere Adipozyten des Fettgewebes auswirken, als auch über die Blutbahn an anderen Geweben wirken, wie z.B. Skelettmuskel und Leber. Auch bei diesem pathogenetischen Prozess ist bei abdominell betonter Adipositas und einem hohen viszeralen Fettanteil durch das Pfortadersystem insbesondere die Leber betroffen und einem hohen Influx an inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt. Dies kann – so die These – die zelluläre Signaltransduktion von Insulin beeinflussen und zu Insulinresistenz führen. Inflammatorische Moleküle und Zytokine können z.B. den sogenannten „Endoplasmatischen Retikulum Stress“ hervorrufen, was im Rahmen des Funktionsverlusts des Endoplasmatischen Retikulums zur Deaktivierung von Komponenten des Insulinsignalwegs und letztlich zur Wirkungsauflösung von Insulin in der Zelle führt. Auf diese Weise wird die hepatische Insulinresistenz durch chronische Inflammation der Fettgewebsmassen bei Adipositas verstärkt.<sup>2,5</sup>

Die Mitochondriale Dysfunktion stellt einen weiteren Faktor in der Entwicklung und Progression von NAFLD dar. Es konnte gezeigt werden, dass in von NAFLD betroffenem Lebergewebe Mitochondrien vermehrt dysfunktional und morphologisch abnormal werden. Der Funktionsverlust von Mitochondrien führt durch eine verminderte  $\beta$ -Oxidation zu weiterer Fettakkumulation und trägt außerdem durch Entstehung von freien Radikalen und inflammatorischen Zytokinen zur Progression der hepatischen Inflammation und Fibrose bei.<sup>10</sup>

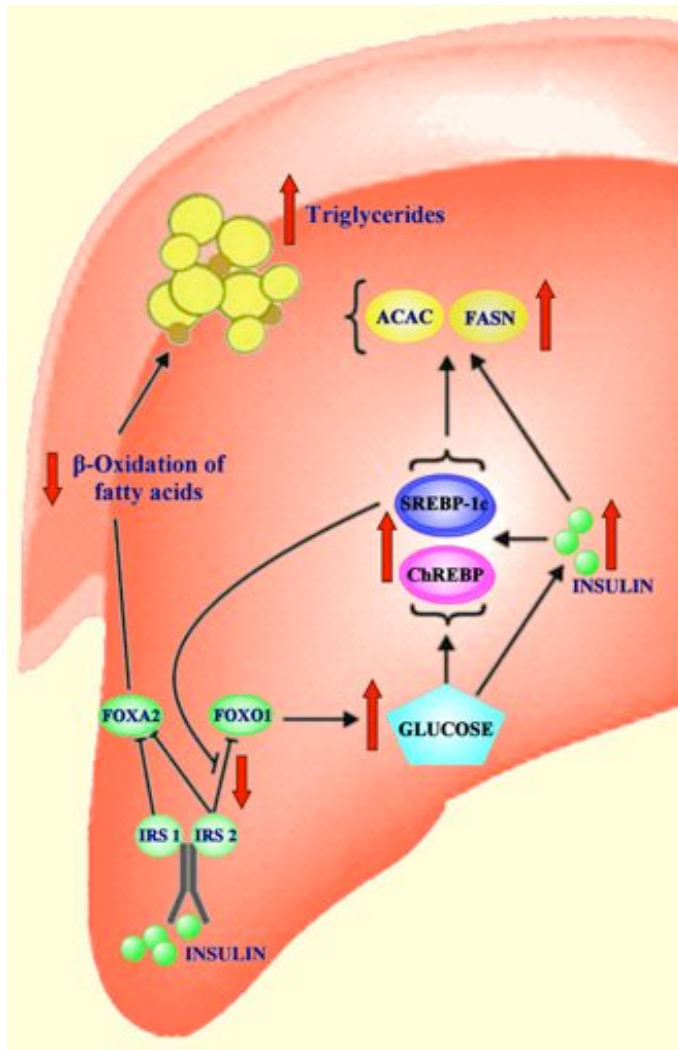
---

### **1.1.6. Die Rolle ausgewählter Transskriptionsfaktoren im Kontext der NAFLD-Pathogenese**

Als ein entscheidendes Zielorgan der Hormone Insulin und Glukagon reguliert die Leber den Energiehaushalt des Körpers und die Homeostase des Glukose- und des Lipidstoffwechsels: die hepatische Wirkung von Hormonen führt auf molekularer Ebene innerhalb des Hepatozyten zu komplexen Signalkaskaden, die sich auf die Expression von DNA-Abschnitten unter der Kontrolle von bestimmten Transskriptionsfaktoren auswirken. Von wissenschaftlichen Interesse ist nicht nur das aktuell zunehmende Verständnis des Glukose- und des Lipidstoffwechsels auf der Ebene der molekularen Vorgänge in den Hepatozyten, sondern auch die möglichen Mechanismen pathologischer Veränderungen dieser Vorgänge im Rahmen einer Steatosis hepatis und einer hepatischen Insulinresistenz. Ziel dieser Arbeit ist, die Faktoren, die zur exzessiven Fettakkumulation in der Leber führen, auf Basis der molekularen Pathways nachzuvollziehen.<sup>18</sup>

Die Forkhead box O (FOXO) – Transskriptionsfaktoren stellen eine wichtige Proteinfamilie des Zellstoffwechsels dar, die in allen Zellen des menschlichen Körpers diverse Signalwege und biochemische Prozesse, von der Regulation des Zellzyklus bis hin zu der Modulation des zellulären Glukose-Metabolismus kontrollieren.<sup>19</sup>

Insulin führt, wie Abbildung 2 zeigt, durch das Andocken an den hepatozellulären Insulinrezeptor zu einer Phosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate, IRS1 und IRS2. Dies hat eine Inhibition der FOXO – Transskriptionsfaktoren FOXO 1 und FOXA2 zur Folge: IRS 2 supprimiert die Aktivität von FOXO1, was zu einer Hemmung der hepatischen Glukoneogenese führt. Sowohl IRS1 als auch IRS2 können FOXA2 inhibieren, was die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, d.h. den hepatischen Fettabbau, mindert. Da letzterer Effekt sowohl durch IRS1 als auch durch IRS2, also auf doppeltem Wege, vermittelt wird, gilt FOXA2 als Insulin-sensitiver als FOXO1. Bei Insulin-Resistenz kann es somit zu unzureichender Glukoneogenese-Suppression kommen, während jedoch zugleich die Hemmung des Fettabbaus durch Insulin erhalten ist, was zu konsekutiver Fettakkumulation in der Leber führt.



**Abbildung 2:** Schema der bei Insulinresistenz zu hepatischer Fettakkumulation führenden Signalwege<sup>18</sup>: Die hemmende Wirkung von Insulin auf FOXA2 und FOXO1 ist bei Insulinresistenz eingeschränkt. So kann insbesondere die Glukoneogenese nur unzureichend supprimiert werden. Hyperinsulinämie und Hyperglykämie haben die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SREBP-1c (Sterol Response Element Binding Protein-1c) und ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein) zur Folge, welche synergistisch die Enzyme der hepatozellulären Lipogenese aktivieren. SREBP1c und ChREBP führen zur Transkription von entscheidenden Genen der De Novo Lipogenese, wie denen der Enzyme Acetyl-CoA carboxylase (ACAC) und fatty acid synthase (FASN).

Weiterhin aktiviert Insulin den Transkriptionsfaktor SREBP-1c (Sterol Response Element-Binding Protein 1c), wahrscheinlich vermittelt durch IRS1. Zusätzlich kann vermutlich Hyperglykämie – so zeigte eine experimentelle Studie an Mäusen – auch unabhängig von Insulin direkt SREBP1c aktivieren.<sup>18</sup> SREBP-1c fördert die Glykolyse sowie die Fettsynthese. Letzteres erfolgt durch die Aktivierung der Gene der Lipogenese-Enzyme Acetyl-CoA Carboxylase (ACAC) und Fatty acid synthase (FASN).

---

Lang andauernde Hyperinsulinämie im Rahmen einer Insulinresistenz kann somit sowohl durch Hemmung des Fettabbaus durch FOXA2, als auch durch die Aktivierung von SREBP-1c und ChREBP zur vermehrten Fettspeicherung in der Leber führen. Aus Insulinresistenz-bedingter Hyperglykämie resultiert weitere Hyperinsulinämie und somit Verfettung der Leber, welche wiederum die Insulinresistenz weiter verstärkt.<sup>18 14</sup>

## **1.2. Leberfunktion und Leberteilresektion**

### **1.2.1. Beurteilung der Leberfunktion**

Neben der herausragenden Rolle der Leber im Wechselspiel zwischen Speicherung und Bereitstellung von Energiesubstraten im Rahmen des Glukose – und Lipidstoffwechsels, übernimmt die Leber zahlreiche, weitere lebenswichtige Funktionen im Organismus: Dazu gehören die Speicherung unter anderem von Eisen und Vitaminen, die Produktion von Galle und damit einhergehend Abbau und Exkretion von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen, sowie die Produktion von wichtigen Proteinen, wie z.B. Albumin, Antithrombin III, Gerinnungsfaktoren, Transferrin, Cholinesterase, sowie Gallensäuren, Cholesterin und Harnstoff. Die Funktion der Leber stellt somit einen essentiellen, lebenswichtigen Parameter für den menschlichen Organismus dar.

Zur Beurteilung der Leberfunktion wurden bereits viele, verschiedene Methoden entwickelt, darunter sogenannte statische und dynamische Tests. Zu den statischen Tests der Leberfunktionsprüfung gehört die Bestimmung leberspezifischer Laborwerte im Blut, nämlich die Transaminasen ALT (Alanin Aminotransferase) und AST (Aspartat Aminotransferase), die Cholestaseparameter Bilirubin,  $\gamma$ -GT ( $\gamma$ - Glutamyltransferase) und AP (alkalische Phosphatase), sowie die Syntheseparameter der Leber wie Albumin, Gerinnungsfaktoren (Faktor II, VII), Cholesterin und Cholinesterase. Derartige Laborparameter liefern jedoch keine ausreichend exakte Einschätzung der Leberfunktion, da sie weitgehend unbekanntes Syntheseraten, Verteilungsvolumina, sowie möglicherweise vermehrtem Verbrauch oder vermehrter Ausscheidung über die Nieren und den Darm unterliegen können. Zudem kann z.B. ein Anstieg



---

der Transaminasen einen Hinweis auf einen möglichen hepatozellulären Schaden geben, und somit eine qualitative Aussage liefern, jedoch ist keine direkte Information über die tatsächlich vorhandene quantitative Funktionskapazität der Leber enthalten.

Eine weitere Möglichkeit zur Einschätzung der Leberfunktion ist die klinische Beurteilung des Patienten. Spezifische Scores dienen dabei einer klinischen Klassifikation. Der wohl bekannteste Score ist hierbei der Child-Pugh-Score, der nach wie vor einen hohen Stellenwert in der Beurteilung der Leberfunktion einnimmt und sich aus dem Schweregrad verschiedener klinischer Parameter wie Aszitesmenge, Enzephalopathie, sowie der Laborwerte Albumin, Bilirubin und Quickwert zusammensetzt. Die Parameter für die Erstellung des Child-Pugh-Scores sind allerdings von der Subjektivität des Untersuchers (Aszitesmenge, Enzephalopathie) und von anderen Einflussfaktoren, wie z.B. konsumierenden Erkrankungen, Eiweißverlust und Ernährung, abhängig.

Die konventionellen Methoden der Leberfunktionsbestimmung sind, insbesondere im Rahmen von Frühstadien von Leberkrankungen, generell meist unzureichend. Störungen der Leberfunktion sind aufgrund der ausgeprägten Funktionsreserve der Leber nicht immer klinisch unmittelbar erkennbar. So können z. B. bei Frühstadien von Fettleber oder von Leberzirrhose die Laborparameter und die klinische Präsentation weitgehend unauffällig sein. Erst bei hochgradigen Funktionseinschränkungen, wie z.B. schwerer Leberzirrhose, kann es zu den typischen Symptomen des Leberversagens kommen. Zu dieser Symptomatologie gehören unter anderem Aszites, Ikterus, Blutungen und die hepatische Enzephalopathie.<sup>20</sup>

Da die bisherigen Standards zur Einschätzung der Leberfunktion also keine vollkommen objektive, exakte und ausreichend sensitive Beurteilung ergeben können, oder gar, wie Leberbiopsien, einen invasiven Charakter haben, zielt die Forschung seit langem auf die Entwicklung neuer, quantitativer Leberfunktionstests.<sup>20</sup> Derartige dynamische Tests messen nicht-invasiv die Leberfunktion über die Fähigkeit zur Bildung von Stoffwechselprodukten nach Gabe einer Fremdsubstanz. Zu diesen quantitativen, metabolischen Leberfunktionstests gehört der <sup>13</sup>C-Methacetatentest, der die hepatische Metabolisierung von <sup>13</sup>C-Methacetin misst, sowie der ICG(Indocyaningrün)-Test, der die hepatische Clearanceleistung (ICG-Clearance) erfasst. Beiden Tests ist gemeinsam, dass dem Patienten eine exogenes Substrat (<sup>13</sup>C-Methacetin bzw. ICG) injiziert wird, welches leberspezifisch metabolisiert bzw. ausgeschieden wird. Das Prinzip der quantitativen Messung der Leberfunktion beruht also - im Gegensatz zu den bisher üblichen Laborparametern - auf Testsystemen, die die leberspezifische, metabolische Funktion in vivo messen können.



Klinische Anwendung finden diese dynamischen Leberfunktionstests meist zur Verlaufs- und Prognosebeurteilung chronischer Lebererkrankungen (z.B. Leberzirrhose, äthyltoxischer oder viraler Genese), sowie vor und nach großen leberchirurgischen Eingriffen (Klatskin- Tumoren, hepatozelluläres Karzinom, Cholangiozelluläres Karzinom, Lebertransplantation). Die Testverfahren wurden in den letzten Jahrzehnten in zahlreichen Studien am Patienten evaluiert. Durch wiederholte Messungen wird die Konzentration der Substanz selbst oder dessen Metabolits erfasst, um so die biologische Halbwertszeit, pharmakokinetische Daten oder die Clearance zu errechnen und somit indirekt die quantitative Leberfunktion zu ermitteln.<sup>21, 22</sup>

Ein Schwachpunkt der metabolischen Leberfunktionstests ist ihre mögliche Vulnerabilität gegenüber der Enzyminduktoren sowie -inhibitoren. Die bekannten Cytochrom P450-Enzymssysteme können durch zahlreiche Substanzen, wie z.B. Pharmaka in ihrer Aktivität beeinflusst werden, was das Messergebnis und die damit verbundene Aussagekraft negativ beeinflussen kann.

### Einteilung der Leberfunktionstests

Leberfunktionstest		
Statische Tests	Albumin	Syntheseleistung
	Gerinnungsfaktoren (F II, F VII)	Syntheseleistung
	Bilirubin	Exkretionsleistung
	γ-GT, AP, CHE	Cholestase
	ALT, AST	hepatozellulärer Schaden
Dynamische Tests	ICG-Test	Clearanceleistung
	<sup>13</sup> C-Methacetin-Atemtest	Metabolisierung

***Tabelle 2: verschiedene Leberfunktionstests***

---

### 1.2.2. Der LiMAx-Test

In der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie wurde in den letzten Jahren ein neuer Leberfunktionstest, der LiMAx- Test, ein <sup>13</sup>C-Methacetin-Atemtest, entwickelt und klinisch evaluiert. Dieser beruht auf der Trägersubstanz Methacetin, die aufgrund ihres schnellen Metabolismus sowie dem Fehlen von Toxizität (in moderaten Dosen) gut geeignet ist.<sup>21,23</sup> Methacetin ist eine Substanz mit einem hohen First-Pass-Effekt, wobei verbleibendes Methacetin mit dem Urin ausgeschieden wird.<sup>24</sup> <sup>13</sup>C-Methacetin wird von gesunden Hepatozyten aufgenommen und von dem mikrosomalen Enzymsystem Cytochrom P450 1A2 (CYP 1A2) in Paracetamol und <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> abgebaut. Letzteres gelangt über die Blutbahn in die Lunge und wird auf diese Weise über die Expirationsluft eliminiert. CYP 1A2 zeichnet sich dadurch aus, dass es ausschließlich in Hepatozyten vorkommt und im ganzen Leber-Azinus gleichmäßig vorhanden ist. Dementsprechend ist die CYP 1A2 - Aktivität proportional zu dem insgesamt vorhandenen Leberparenchym-Volumen. Im Rahmen des LiMAx-Tests wird <sup>13</sup>C-Methacetin intravenös verabreicht und durch Analyse der Ausatemluft des Patienten auf Basis des entstandenen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Quotients kann rückgeschlossen werden auf die CYP 1A2 - Aktivität und somit indirekt auf die funktionelle Kapazität der Leber.

### 1.2.3. Bedeutung der Leberfunktion im Rahmen von Leberteilresektionen

Die Inzidenz von malignen Lebertumoren hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen.<sup>25, 7</sup> Chirurgisches Vorgehen stellt bei malignen Lebererkrankungen den Goldstandard und in vielen Fällen die einzig kurative Therapie-Möglichkeit dar.<sup>26-28,29,30</sup> Die Leber besitzt als einziges parenchymatöses Organ ein großes Regenerationspotential, was auch umfangreiche Leberteilresektionen möglich macht. Die Resektion von funktionellem Leberparenchym bringt dennoch immer das Risiko einer postoperativ verringerten Leberfunktion und im schlimmsten Fall einer unzureichenden Regenerationskapazität des verbleibenden Leberparenchyms mit sich. Ein besonders radikales chirurgisches Vorgehen reduziert das Risiko eines möglichen Tumorrezidivs, ist jedoch mit einer erhöhten Rate an postoperativem Leberversagen mit hoher Mortalität assoziiert.<sup>26</sup>

Im Rahmen der Planung einer Leberresektion ist deshalb die möglichst exakte Einschätzung der Leberfunktion besonders wichtig. Ziel der Entwicklung der LiMAx-Tests war es daher, eine präoperative Vorhersage über das postoperative Outcome der Leberfunktion nach Leberteilresektion treffen zu können und somit die postoperative Mortalität zu senken. Es konnte

---

gezeigt werden, dass eine präoperative Funktions- und Volumen - Analyse in Form von CT-Volumetrie und LiMAx-Test eine exakte Errechnung der postoperativen Leberfunktion erlaubt.<sup>31</sup> Dies ist von essentiellen Nutzen für die präoperative Planung von Leberresektionen, da die postoperative, residuelle Leberfunktion den entscheidenden Einflussfaktor für die postoperative Morbidität und Mortalität darstellt.<sup>32, 20, 33</sup>

Nicht nur zur präoperativen Planung sondern auch unmittelbar postoperativ ist die Durchführung eines quantitativen Leberfunktionstest von hohem klinischen Nutzen. Die möglichst frühzeitige Einstufung des Patienten, des Schweregrads einer möglichen Leberfunktionseinschränkung und der Prognose macht ein effizienteres, gezieltes therapeutisches Management möglich. Stockmann et al konnten zeigen, dass die postoperative, residuelle LiMAx -Funktion eine lineare Korrelation mit dem verbleibenden, residuellen Lebervolumen aufweist. Zudem weist das Ergebnis des LiMAx-Tests am 1. postoperativen Tag eine hohe Vorhersagekraft für Leberversagen und Mortalität auf.<sup>31</sup>

Postoperatives Leberversagen ist eine relativ häufige und lebensgefährliche Komplikation nach erweiterter Leberresektion. Besonders risikoreich sind nicht nur erweiterte, umfangreiche Leberresektionen, sondern auch vor allem zugrundeliegende, chronische Erkrankungen des Leberparenchyms, da sie die postoperative Regenerationskapazität einschränken.<sup>20</sup>

Die Steatosis hepatis stellt die weit verbreitetste zugrundeliegende, parenchymale Erkrankung der Leber schlechthin dar und betrifft durch Ausbreitung des westlichen Lebensstils immer größere Teile der Bevölkerung.<sup>10</sup> Die Steatosis hepatis hat einen bedeutenden Einfluss auf das postoperative Outcome nach Leberteileresektion und stellt einen unabhängigen Vorhersagefaktor für postoperative Komplikationen dar.<sup>34</sup> Die Fettlebererkrankung im Rahmen von Adipositas, Diabetes mellitus und Metabolischem Syndrom nimmt weltweit zunehmend epidemische Ausmaße an. Patienten mit zugrundeliegender Steatosis hepatis haben ein höheres Risiko für postoperatives Leberversagen nach Leberteileresektion als Patienten mit gesunder Leber.<sup>35, 36</sup> Als mögliche zugrundeliegende Ursache wird postuliert, dass es im steatotisch veränderten Leberparenchym zu einer gestörten hepatischen Mikrozirkulation, zu verstärkten Ischämiebedingten Reperfusionsschäden, zu einem erhöhten hepatischen oxidativen Stress sowie einer mitochondrialen Dysfunktion kommen kann.<sup>32</sup> An Fettleber erkrankte Patienten, für die Leberresektionen vorgesehen sind, sollten deshalb präoperativ besonders sorgfältig evaluiert

---

werden und die Operationsindikation sollte nach strengen Maßstäben zu stellen sein.<sup>36</sup> So ist bei moderater bis schwerer Fettleber eher von umfangreichen Leberresektionen abzusehen, da dies zu hohe postoperative Risiken birgt. Eine präoperative Gewichtsreduktion ist eine eventuelle Möglichkeit, um das Ausmaß der Fettleber zu reduzieren und so den leberchirurgischen Eingriff sicherer zu machen.<sup>26, 37</sup>

Generell ist es bei von Fettleber oder von Diabetes betroffenen Patienten, bei denen Defizite in der hepatischen Regulation des Lipid- und Glukosestoffwechsels vorliegen, besonders wichtig, die Leberfunktion bei Leberteileresektionen prä- und postoperativ gründlich zu evaluieren. Die Stoffwechsellage ist von entscheidender Bedeutung für den postoperativen Verlauf.<sup>38</sup>

---

## **2. FRAGESTELLUNG**

### **2.1. Wie wirkt sich eine Dysbalance des Glukose- und Lipidstoffwechsels auf die Aktivität der Transskriptionsfaktoren FOXO1 und SREBP-1c aus?**

Die erste Fragestellung dieser Studie bezieht sich auf die Charakterisierung der Stoffwechselsituation der Patienten. Neben der Erhebung verschiedener anthropometrischer Basischarakteristika, wie z.B. BMI, Taillenumfang und Körperfettgehalt, sollen durch die Bestimmung der Aktivität von hepatozellulären Transskriptionsfaktoren die molekularen Signalwege bei Patienten mit Fettleber mit denen bei Leber- und Stoffwechselgesunden im Vergleich analysiert werden. Hypothese ist, dass sich eine pathologische Störung des Glukose- und Lipidhaushalts auch auf molekularbiologischer Ebene nachweisen lässt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind Studien zur Erforschung der hepatozellulären Signalwege zum besseren Verständnis der Genese von Insulinresistenz und der Entstehung von NAFLD nur anhand von Tiermodellen oder in vitro durchgeführt worden und es ist fraglich, inwieweit diese Erkenntnisse auf die menschliche Leber übertragen werden können.

### **2.2. Wie wirkt sich die metabolische Ausgangslage auf den postoperativen Verlauf der Leberregeneration nach Leberteilektomie aus?**

Die zweite Fragestellung dieser Studie stellt die Stoffwechselsituation des Patienten in Zusammenhang mit dem postoperativen Verlauf nach Leberteilektomie. Ziel ist es, zu zeigen, ob, und wenn wie, das Vorliegen von NAFLD oder Typ 2 Diabetes mellitus sich auf den Verlauf der postoperativen Leberregeneration auswirken kann. Ist bei Patienten mit steatotisch veränderter Leber die Leberfunktionsregeneration postoperativ eingeschränkt? Haben Diabetiker im Vergleich zu Nicht-Diabetikern eine unzureichende postoperative Leberregeneration? Auch der Einfluss von NAFLD und Diabetes mellitus auf den perioperativen Verlauf von Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose soll untersucht werden. Frage ist, ob Patienten, die an NAFLD oder an Diabetes mellitus erkrankt sind, die also schon präoperativ zu einer gewissen Dysbalance des Glukose- und Lipidmetabolismus neigen, im postoperativen Verlauf stärkere Veränderungen von Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose aufweisen als primär stoffwechselgesunde Patienten.

---

## **3. METHODEN**

### **3.1. Studiendesign**

Die Studie wurde an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, durchgeführt. Im Zeitraum Februar bis Juli 2009 konnten insgesamt 22 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Die prospektiv angelegte Studie beinhaltete prä- und postoperative Untersuchungen an den Patienten, sowie intraoperative Gewebeprobenentnahmen. Bezüglich der an verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Leberfunktions- und Laboruntersuchungen handelte es sich somit um eine Longitudinalstudie. Die Lebergewebeprobenentnahme erfolgte hingegen einmalig intraoperativ und dementsprechend wurde die Aktivität der hepatozellulären Transskriptionsfaktoren an einem einzigen Zeitpunkt untersucht. Allen Patienten war die medizinische Indikation einer Leberteileresektion aufgrund jeweils vorliegender, unterschiedlicher Leberläsionen gemeinsam. Die Geschlechterverteilung hatte keinen vorrangigen Aspekt, so dass sich ein Kollektiv aus 12 Frauen und 10 Männern ergab. Alle Patienten mussten den Ein- und Ausschlusskriterien entsprechen und ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie gegeben haben.

#### **3.1.1. Ethikkommission**

Die durchgeführte Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Jeder Patient wurde mündlich über den Sinn und Zweck, sowie über Belastungen und Risiken der Studie aufgeklärt, zudem erhielten alle Patienten ein Informationsblatt über den Ablauf der Studie und konnten sich zunächst überlegen, ob sie an der Studie teilnehmen wollen. Es bestand jederzeit die Möglichkeit, die Teilnahme an der Studie abubrechen. Alle in dieser Studie vertretenen Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

#### **3.1.2. Studienablauf und Vorgehensweise**

In der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité, Berlin, erfolgte zunächst - bereits vor stationärer Aufnahme der Patienten - die Selektion der den Ein- und Ausschlusskriterien entsprechenden Probanden unter allen für Leberteileresektionen vorgesehenen Patienten. Bei Eintreffen des Patienten im Klinikum wurde zuerst eine Aufklärung über die Studie durchgeführt.

Anschließend wurden präoperativ die Stammdaten und weitere anthropometrische Befunde erhoben, siehe Tabelle 3 und 4.

Alter		
Hauptdiagnose		
Nebendiagnosen		
vorgesehene Operationsprozedur		
Vorhandensein eines Diabetes mellitus	Ja	Einnahme oraler Antidiabetika
		Insulinabhängigkeit
	Nein	
Vorhandensein einer Paracetamolallergie		
Aktuelle Medikamenteneinnahme		
Rauchen anamnestisch in pack years		
Alkoholkonsum anamnestisch		

***Tabelle 3: Stammdaten***

Körpergröße (cm)
Körpergewicht (kg)
Body-Mass-Index (BMI)
Taillenumfang (cm)
Hüftumfang (cm)

***Tabelle 4: anthropometrische Befunde***

Außerdem wurde eine Messung der subkutanen Fettfalten durchgeführt zur Ermittlung des Körperfettgehalts (s.u.).

Ferner wurden präoperativ der LiMAX-Test, der ICG-Test, sowie die präoperative Blutentnahme im Nüchternzustand des Patienten durchgeführt.

---

Am Operationstag wurde um 7:00 Uhr im Nüchternzustand des Patienten eine weitere Blutentnahme durchgeführt.

Intraoperativ erfolgte folgende Gewebeprobenentnahme: 2 g Lebergewebe, 1 g subkutanes Fettgewebe und 1 g viszerales Fettgewebe. Es erfolgte die sofortige Probenverarbeitung im OP und im Labor. Zeitgleich erfolgte eine weitere Blutentnahme zur Bestimmung von Glucose, Insulin und C-Peptid.

An den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 wurden im Nüchternzustand des Patienten jeweils der LiMAx-Test, der ICG-Test und eine Blutentnahme durchgeführt.

Die Tabelle 5 zeigt den Ablauf der Studie im Überblick.

**Zeitpunkt/ Datum**

Eintreffen des Patienten (1 – 3 T prä-OP)	Aufklärung, Einwilligung Erhebung von Stammdaten und anthropometrischen Befunden LiMAx-Test, ICG-Test Labor
OP Tag: 07:00	Labor: Insulin, C-Peptid, Lipid-Labor, HbA1c, FFS
Intraoperativ	Gewebeprobenentnahme: 2 g Lebergewebe, 1 g subkutanes Fettgewebe und 1 g viszerales Fettgewebe Labor zeitgleich zu Gewebesentnahme (Glucose, Insulin, C-Peptid) Probenverarbeitung im OP und Labor
1 T post-OP	LiMAx-Test, ICG-Test Labor
3 T post-OP	LiMAx-Test, ICG-Test Labor
5 T post-OP	LiMAx-Test, ICG-Test Labor



---

10 T post-OP	LiMAx-Test, ICG-Test
	Labor
14 T post-OP	LiMAx-Test, ICG-Test
	Labor

***Tabelle 5: Ablaufplan Studie***

### 3.1.3.      **Einschluss- und Ausschlusskriterien**

Die Patienten wurden entsprechend der in Tabelle 6 dargestellten Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt.

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>Ausschlusskriterien</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Männliche oder weibliche Patienten, die für eine Leberteilektomie vorgesehen sind</li> <li>• Patientenalter &gt; 18 Jahre, &lt; 75 Jahre</li> <li>• Patienten, die ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie gegeben haben</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einnahme von Medikamenten, die zu einer Insulinresistenz führen (Cortisol, WH, Rheumamittel)</li> <li>• Eine Chemotherapie innerhalb von 8 Wochen vor dem Eingriff</li> <li>• Eine fortgeschrittene Lebererkrankung (Leberzirrhose)</li> <li>• Patienten, die bereits eine Organtransplantation erhalten haben</li> <li>• Patienten mit einer schweren Infektionskrankheit</li> <li>• Jegliche Faktoren, die die Fähigkeit des Patienten einschränken, während der Studie zu kooperieren (z.B. mentale Funktion oder Drogenmissbrauch)</li> </ul>

***Tabelle 6: Ein- und Ausschlusskriterien***

---

## 3.2. Patientenuntersuchung zum Studienbeginn

### 3.2.1. Anthropometrische Untersuchungen

#### 3.2.1.1. Body-Mass-Index (BMI)

Zur Beurteilung des Ernährungszustandes ist der BMI ein international anerkanntes Maß. Er ist wie folgt definiert:

$$\text{BMI} = \text{Körpermasse in kg} / (\text{Körperhöhe in m})^2$$

Nach den Richtlinien der WHO gelten folgende Grenzwerte (Biesalski 1999):

Einteilung		BMI (kg/m <sup>2</sup> )
Untergewichtig		< 18,5
Normalgewichtig		18,5 bis 24,9
Übergewichtig (Prä-Adipositas)		25 bis 29,9
Adipositas	I	30 bis 34,9
	II	35 bis 39,9
	III	≥ 40

***Tabelle 7: BMI-Einteilung***

#### 3.2.1.2. Messung der Fettdicke

Der BMI allein erlaubt keine genauere Aussage über die Körperzusammensetzung, da eine erhöhte Körpermasse das Ergebnis von Körperfett, aber auch von einem erhöhten Muskelanteil, z.B. bei Sportlern, sein kann. Die gesamte Körpermasse unterteilt sich in Gesamtkörperfettanteil (GKF) und die Magermasse, die aus Muskelmasse, Skelett und inneren Organen besteht. Entscheidend für das gesundheitliche Risiko ist der Körperfettanteil. Deshalb wurde an den Patienten dieser Studie neben der Berechnung des BMI auch eine Bestimmung der Körperzusammensetzung durch die Fettdickenmessung durchgeführt. Aus der Messung der subkutanen Fettschichtdicke an definierten Messpunkten ist eine Einschätzung von Gesamtkörperfettanteil und Magermasse möglich. Dabei wird eine doppelte Schicht aus Haut und subkutanem Fettgewebe von der Muskulatur abgehoben und die Dicke der entstandenen

---

Hautfalte gemessen. Die Messung der Hautfaltendicke bei den Probanden dieser Studie erfolgte mit einem standardisierten Hautfaltendickenmesser, dem Lange Skinfold Caliper, Beta Technology Incorporated, Cambridge, Maryland. Dieses Messgerät hat - unabhängig vom Öffnungswinkel - einen konstanten Messdruck von 10g/mm<sup>2</sup>. Nach Knusmann 1988 und Johnson 1990 haben sich 12 Messpunkte als prädiktiv erwiesen. Im Rahmen dieser Studie wurde die subkutane Fettschichtdicke an den 3 folgenden Messpunkten bestimmt, da für diese Punkte praktikable Tabellen zur Bestimmung des Gesamtkörperfettes vorliegen:

*Trizeps:* Hautfalte auf der dorsalen Seite des Oberarms über dem *Musculus*

*triceps brachii* in der Mitte zwischen *Akromiale* und *Olekranon*;

Hautfaltenabhebung parallel zur Längsachse des Oberarmes.

*Rücken:* Hautfalte direkt unterhalb der unteren Spitze der *Scapula* bei hängendem

Arm; Hautfaltenabhebung schräg zur Längsachse des Körpers.

*Hüfte:* Hautfalte auf der seitlichen *Axillarlinie* direkt oberhalb des Becken-

kammes; Hautfaltenabhebung parallel zur Längsachse des Körpers.

Der Gesamtkörperfettanteil kann aufgrund der hohen Korrelation mit dem Unterhautfettgewebe über multiple Regressionsgleichungen errechnet werden.<sup>39</sup>



**Abbildung 3: Lange Skinfold Caliper**

---

### 3.2.2. Blutentnahme

Die präoperative Blutentnahme wurde immer nur im Nüchternzustand des Patienten durchgeführt und beinhaltete im Einzelnen die klinische Chemie (Kreatinin, Harnstoff, Natrium, Kalium, Bilirubin (gesamt und konjugiert), ALT, AST, AP,  $\gamma$ -GT, GLDH, PCHE, Ammoniak, Glucose, Albumin), die Endokrinologie (GH, IGF-1), die Gerinnung (Quick, INR Faktor II, Faktor VII) sowie ein kleines Blutbild.

Die Blutentnahme um 7:00 Uhr am Operationstag im Nüchternzustand des Patienten beinhaltete: Insulin, C-Peptid, Lipid-Labor (Triglyceride, Cholesterin, HDL-und LDL-Cholesterin), HbA1c und Freie Fettsäuren. Die intraoperative Blutentnahme wurde zeitgleich bzw. maximal 5 Min nach der Gewebeprobenentnahme durchgeführt und beinhaltete: Glucose, Insulin, C-Peptid.

Die postoperative Blutentnahme an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10, 14 erfolgte immer im Nüchternzustand des Patienten vor Durchführung des  $^{13}\text{C}$ -Methacetin-Atemtests und des ICG-Tests und beinhaltete wie die präoperative Blutentnahme bestimmte Routinelaborparameter, die Hinweise auf Leberparenchymschäden, Störungen der Lebersyntheseleistung und Störungen der Gallensäureausscheidung geben können. Die postoperative Blutentnahme beinhaltete im Einzelnen die klinische Chemie (Kreatinin, Harnstoff, Natrium, Kalium, Bilirubin (gesamt und konjugiert), ALT, AST, AP,  $\gamma$ -GT, GLDH, PCHE, Ammoniak, Glucose, Albumin, Triglyceride, Cholesterin, HDL-und LDL-Cholesterin), die Endokrinologie (GH, IGF-1, Insulin, C-Peptid), die Gerinnung (Quick, INR Faktor II, Faktor VII) sowie ein kleines Blutbild.

Zur Erfassung der Insulinresistenz wurde in dieser Studie der HOMA-IR-Index für Insulinresistenz genutzt, der aus Nüchtern-Insulin- und Nüchtern-Glukose-Spiegel wie folgt berechnet wurde:  $\text{Nüchtern-Insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Nüchtern-Glukose (mmol/l)} / 22.5$ . Katsuki et al konnten 2001 zeigen, dass der HOMA-IR-Index eine valide Methode zur Erfassung der Insulinresistenz darstellt.<sup>40</sup>

---

### 3.3. Untersuchung von Lebergewebe

#### 3.3.1. Gewebeprobenentnahme und Aufbereitung

Die Lebergewebsprobe wurde unmittelbar nach der Entnahme zügig mit Einwegskalpell und Pinzette in drei gleichgroße Gewebeproben geteilt. Die so gewonnenen drei Lebergewebsproben wurden folgendermaßen verarbeitet:

Bei Probe 1) wurde unmittelbar nach der Entnahme mittels eines kommerziellen Kits (Nuclear Extract Kit, Active Motif, USA) eine nukleäre Extraktion vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde die Probe in PBS-Phosphataseinhibitor in einem 50 ml-Falcon (Carl Roth GmbH, Deutschland) überführt und dieser sofort in Crush-Eis gelagert. Der PBS-Phosphataseinhibitor war bereits präoperativ aus PBS 10x 0,8 ml, Reinstwasser 6,8 ml und Phosphataseinhibitor 0,4 ml vorbereitet worden.

Probe 2) wurde unmittelbar mit der zuvor dem flüssigen Stickstoff exponierten Spezialzange durchgefrostet und anschließend mittels Pinzette kleinere Aliquots auf Kryo-Tubes (Carl Roth GmbH, Deutschland) verteilt und diese sofort in einem Behältnis mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Probe 3) wurde nochmals mit dem Skalpell geteilt. Der eine Teil dieser Probe wurde in Formaldehyd (Histofix 4 %, Carl Roth GmbH, Deutschland) eingelegt. Der zweite Teil wurde in einem Cryomold-Kästchen (Cryomold, Electron Microscopy Sciences, USA) mit tissue freezing medium (Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences, USA) beschichtet und anschließend zwischen Trockeneisplatten durchgefrostet und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer Kartonbox gelagert.

Die Proben an subkutanem und viszeralem Fettgewebe wurden jeweils mit der zuvor dem flüssigen Stickstoff exponierten Spezialzange durchgefrostet und mittels Pinzette kleinere Aliquots auf mehrere Kryo-Tubes verteilt. Die Tubes wurden in ein Behältnis mit flüssigem Stickstoff gegeben und später bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer Kartonbox gelagert.

Im OP wurden folgende Daten festgehalten:

Art des Eingriffs
OP-Beginn
OP-Ende

---

Lebersegment, aus dem die Probenentnahme erfolgte
Genauer Zeitpunkt der Probenentnahme
Genauer Zeitpunkt der intraoperativen Blutentnahme (möglichst zeitgleich mit Probenentnahme)

***Tabelle 8:OP-Daten***

Zur Aufbereitung der in PBS-Phosphataseinhibitor konservierten Lebergewebsprobe (Probe 1) im Labor wurde zunächst der den PBS-Phosphataseinhibitor und die Lebergewebsprobe enthaltende Falcon auf der Laborwaage gewogen. Von dem Ergebnis wurde das präoperativ gewogene Gewicht (von Falcon und Puffer ohne Probe) abgezogen, um so das Gewicht der Lebergewebsprobe zu ermitteln.

Anschließend wurde aus hypotonem Puffer, Reinstwasser, Detergent (Nuclear Extract Kit, Active Motif, USA) und 1 M DTT (Nuclear Extract Kit, Active Motif, USA) eine Pufferlösung im 5ml-Glas-Potter-Gefäß vorbereitet. Diese Pufferlösung musste immer in 3facher Menge des Probengewichts vorhanden sein. Der Potter-Zylinder (Potter S Homogenisator, B.Braun Biotech International, Deutschland) wurde dann mit Crush-Eis gefüllt, um eine Überhitzung der Probe während des Potters zu vermeiden.



***Abbildung 4: Pottergerät***

Daraufhin konnte die Probe in das 5 ml-Homogenisatorgefäß (B.Braun Biotech International, Deutschland) mit enthaltenem Puffer überführt und in das Potter-Gerät eingespannt werden. Das Pottern zur mechanischen Trennung der zellulären Nuklei von den Zytoplasmata wurde folgendermaßen durchgeführt: Langsam Starten mit 2 x Pottern bei 500 U/min.; kurze Pause um die Probe nicht zu sehr zu erwärmen, dann 2 x Pottern bei 1000 U/min.; wieder kurze Pause, dann 5 x Pottern bei max. 1000 U/min.; letzte Pause, dann nochmals 5 x Pottern bei max. 1000 U/min. Das fertige Homogenisat wurde dann mittels Spritze auf zwei 1,5 ml Tubes transferiert und 15 Minuten auf Crush-Eis inkubiert. Dann wurden die Tubes für 10 Minuten bei 4 °C und 850 G zentrifugiert. Der entstehende „Zytosol-Überstand“ wurde auf weitere 1,5 ml Tubes überführt und auf Eis gestellt. In die beiden ursprünglichen 1,5 ml-Tubes mit den Sedimenten wurde jeweils 500 µl hypotonen Puffers gegeben, sowie zur vollkommenen Durchmischung die Sedimente mittels Pipette einige Male aufgenommen und wieder zurückgegeben. Weiterhin wurde in die Sediment-Tubes jeweils 25 µl Detergent zugegeben, für 10 Sekunden gevortext, dann 15 Minuten auf Crush-Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde der Complete Lysis Buffer in einem 2 ml-Tube hergestellt:

- 
- Lysis Buffer AM1 356 µl (Nuclear Extract Kit, Active Motif, USA)
  - DTT (Dithiothreitol) 10 mM 40 µl (Nuclear Extract Kit, Active Motif, USA)
  - AM-Protease-Inhibitor 4 µl (Nuclear Extract Kit, Active Motif, USA)

Der Complete Lysis Buffer wurde anschließend bis zur Verwendung auf Eis gestellt.

Außerdem wurde der Complete Mini EDTA-free vorbereitet - 1 Tablette/1 ml Reinstwasser in 2 ml-Tube, kurz gevortext – und ebenfalls bis zur Verwendung auf Eis gelegt.

Dann erfolgte das Zentrifugieren der Sediment-Tubes für 30 Sekunden bei 4°C und 14000 G. Der Überstand wurde mittels Spritze abgezogen und jeweils auf die ersten beiden 1,5 ml-Tubes (Zytosol) gegeben, sowie 1/10 vol. Complete Mini EDTA-free hinzugefügt.

Das Sediment/Pellet wurde im vorbereiteten Complete Lysis Buffer resuspendiert, für 10 Sekunden gevortext, dann für 30 Minuten bei 150 rpm auf Eis auf einen Probenschüttler gelagert.

Zum Klären der zytoplasmatischen Fraktion wurden die Zytoplasma-Tubes für 30 Sekunden gevortext, dann für 10 Minuten bei 4°C und 14000 G zentrifugiert. Anschließend wurden die gewonnenen endgültigen Zytoplasmafraktionen (= Überstand) zur Aliquotgewinnung in mehrere Tubes überführt und dann bei -80°C in Box gelagert.

Das Sediment/Pellet wurde nach 30 Minuten für 30 Sekunden gevortext, dann für 10 Minuten bei 4°C und 14000 G zentrifugiert. Die gewonnene nukleären Fraktion wurde zur Aliquotgewinnung in mehrere Tubes überführt und dann bei -80°C in einer Kartonbox gelagert.

### **3.3.2. Western-Blot und Quantifizierung der Proteinmengen**

#### **3.3.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Chemikalien:

- Bovines Serumalbumin (BSA)-Stammlösung 50 mg/ml Sigma USA, Missouri, St. Louis
- BCA Kit Pierce BioTechnology USA, Illinois, Rockford

hergestellte Lösungen

*Proteinstandards*

0 µg/µl; 0,5 µg/µl; 1 µg/µl; 2 µg/µl; 3 µg/µl; 4 µg/µl

BSA-Stammlösung in Lysepuffer



---

### BCA Arbeitsreagenz

Reagenz A und B im Verhältnis 50 : 1

Verbrauchsmaterial

- Combitips plus (5 ml) Eppendorf Deutschland, Hamburg
- PS Microplatte (96 well) greiner bio one Deutschland, Frickenhausen

Geräte

- Multipette plus Eppendorf Deutschland, Hamburg
- Victor2 1420 Multilabel Counter Wallac (Perkin Elmer) Italien, Mailand
- Brutschrank Heraeus Deutschland, Hanau

Das für die Erfassung der Proteinkonzentration angewandte BCA-Verfahren basiert auf dem Nachweis von Proteinen durch Bicinchonin-Säure (engl: *bicinchoninic acid*, BCA): Reagenz A enthält u.a. BCA in seiner wasserlöslichen Form als Natriumsalz und wird im Verhältnis 50:1 mit Reagenz B, welche CuSO<sub>4</sub> enthält, vermischt. Die enthaltenen Cu<sup>2+</sup>-Ionen reagieren im alkalischen Milieu, bei einem pH-Wert von 11,25 mit dem Protein. Bei dieser Biuret-Reaktion entstehende Cu<sup>1+</sup>-Ionen reagieren hochspezifisch mit der BCA und erzeugen einen purpurfarbenen, stabilen Komplex, der bei 563 nm photometrisch erfassbar ist.<sup>41</sup> Die Bestimmung der Konzentration erfolgte in einer 96well-Platte mittels des *Multilabel Counter* der Firma Wallac, nach Inkubation der BSA-Standard-Reihe sowie der Proben mit BCA-Arbeitsreagenz im Verhältnis 20:1 bei 37 °C für 30 Minuten.

### 3.3.2.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Chemikalien:

- Acrylamid (30 %) Carl Roth GmbH, Deutschland
- Tris-Base Merck Deutschland, Darmstadt
- Natriumdodecylsulfat (SDS) Merck Deutschland, Darmstadt
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) Carl Roth GmbH, Deutschland
- N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (99 %) Sigma USA, Missouri, St. Louis
- Isopropanol Merck Deutschland, Darmstadt
- Tris HCl Merck Deutschland, Darmstadt
- Dithiothreitol (DTT) Applichem Deutschland, Darmstadt

- 
- 2-Mercaptoethanol (99 %) Sigma USA, Missouri, St. Louis
  - PyroninY Sigma USA, Missouri, St. Louis
  - Glycerin Merck Deutschland, Darmstadt
  - Glycin CalBiochem Deutschland, Darmstadt
  - Proteingrößenmarker Biotinylated Protein Ladder Cell Signaling USA, Massachusetts, Danvers

Hergestellte Lösungen:

*Proteinprobenpuffer (4fach):*

200 mM Tris HCl (pH 6,8)

400 mM DTT

20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

8 % (w/v) SDS

0,04 % (w/v) PyroninY

40 % (v/v) Glycerin

*Proteinlaufpuffer (10fach) :*

2 M Glycin

250 mM Tris Base

1 % (w/v) SDS

*Lower Tris (pH 8,8):*

1,5M Tris Base

*Upper Tris (pH 6,8):*

0,5M Tris Base

Gele:

*Sammelgel (5,1 %)*

12,5 % (v/v) Upper Tris

5,1 % (v/v) Acrylamid

0,1 % (v/v) SDS

0,01 % (v/v) TEMED

0,1 % (v/v) APS

*Trenngel (12 %)*

25 % (v/v) Lower Tris

12 % (v/v) Acrylamid

0,01 % (v/v) SDS

---

0,066 % (v/v) TEMED

0,01 % (v/v) APS

Geräte:

- Polyacrylamidgel - Elektrophorese
- SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit mit Zubehör, GE Healthcare, USA
- Gelgießapparatur mit Zubehör, GE Healthcare, USA
- Spacer-Platten, GE Healthcare, USA
- Kamm, 2 Taschen, GE Healthcare, USA

Bei der für die Auftrennung der Proteine angewandten Methode der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Im denaturierenden Probenpuffer sind SDS (engl.: *sodium dodecyl sulfat*), ein anionisches Detergenz, sowie die reduzierenden Reagenzien Mercaptoethanol und DTT enthalten. SDS führt durch eine negative Beladung der Proteine zu einem einheitlichen Ladung-zu Masse-Verhältnis. Somit ist die Mobilität der Proteine nur noch von deren Größe und der Porenweite des Gels abhängig. Die Proteine bewegen sich aufgrund der negativen Ladung in Richtung Anode. Kleinere Proteine wandern dabei schneller als größere. Eine Erhitzung auf 95 °C führt zur Zerstörung der Sekundär- und der Tertiärstruktur der Proteine. Mercaptoethanol und DTT mindern die Stärke der Disulfidbrücken.

Es wurde eine diskontinuierliche Trennung durchgeführt, d.h., dass die Proben zunächst im Sammelgel fokussiert wurden, um vor der eigentlichen Trennung im Trenngel unabhängig von der aufgetragenen Probenmenge eine scharfe Bande zu erreichen. Das Sammelgel weist im Vergleich zum Trenngel einen niedrigeren pH-Wert, eine niedrigere Salzkonzentration und eine größere Porenweite auf.

Eine handelsübliche Apparatur diente der Herstellung des diskontinuierlichen Gels. Den Gellösungen beigegebenes APS führte zur Polymerisierung des Acrylamid. TEMED beschleunigte diesen Prozess, indem es in seiner Funktion als Katalysator die Radikalfreisetzung aus APS begünstigte. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren wurde das Einfüllen der Proben in die Geltaschen durchgeführt.

Die nötige Menge an zu trennenden Proteinen wurde mit 4fachem Proteinprobenpuffer im Verhältnis 1:4 versetzt, auf 95 °C erhitzt und anschließend im elektrischen Feld aufgetrennt. Die

---

Markerproteine bekannter Größe dienen der Identifizierung der aufgetrennten Probenproteine. Als Elektrolyt wurde ein SDS-haltiger Tris-Glycin-Puffer in einfacher Konzentration genutzt. Bei einer Spannung von 80 V wurde die Fokussierung der Proteine im Sammelgel für circa 20 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung im Trenngel bei 120 V, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

### 3.3.2.3 Immuno-Blotting

Chemikalien:

- Arginin Merck Deutschland, Darmstadt
- Methanol Merck Deutschland, Darmstadt
- Magermilchpulver TSI Deutschland, Zeven
- BSA Sigma USA, Missouri, St. Louis
- FoxO1 Antikörper, Cell Signaling USA
- ChREBP Antikörper, Novus Biologicals, USA
- $\alpha$ -Tubulin Antikörper, Cell Signaling, USA
- Lamin A/C Antikörper, Cell Signaling, USA
- Anti-Rabbit, HRP-linked Cell Signaling, USA
- Anti-Biotin, HRP-linked Cell Signaling, USA
- Natriumchlorid Sigma USA, Missouri, St. Louis
- Salzsäure 37% Merck Deutschland, Darmstadt
- Tween Sigma USA, Missouri, St. Louis
- 20 x LumiGLO® Reagent and 20 x Peroxide, Cell Signaling, USA

Hergestellte Lösungen:

*Kathodenpuffer:*

100 mM L-Arginin

0,01 % (w/v) SDS

*Anodenpuffer 1:*

300 mM Tris Base

20 % (v/v) Methanol

*Anodenpuffer 2:*

20 mM Tris Base

20 % (v/v) Methanol

---

*10fach TBS pH 7,6*

0,2M Tris-Base

8 % (w/v) Natriumchlorid

*BSA-Lösung*

5 % (v/v) BSA in TBST

*Milchlösung*

5 % (v/v) Magermilchpulver

in TBST

*Detektionslösung*

90 % (v/v) Reinstwasser

5 % (v/v) 20fach LumiGLO®

5 % (v/v) 20fach Peroxid

*TBST*

0,1 % (v/v) Tween in 1fach TBS

*Primärantikörper*

FoxO1 Antikörper, 78–82 kDa 1:1000 in 5 % BSA-Lösung

ChREBP 95 kDa 1:500 in 5 % BSA-Lösung

α-Tubulin 52 kDa 1:1000 in 5 % BSA-Lösung

Lamin A/C 70 kDa 1:2000 in 5 % BSA-Lösung

*Sekundärantikörper*

Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 1:2000 in 5 % Milchlösung

*Antikörper für den Größenmarker*

Anti-Biotin, HRP-linked Antibody 1:1000 in TBST Verbrauchsmaterial

- PVDF(Polyvinylidendifluorid)-Membran Millipore USA, Massachusetts, Billerica
- Whatman 3MM Filterpapier Schleicher & Schuell Deutschland, Dassel Geräte
- TE 62 Transfer Unit mit TE50X Power Lid (Stromversorgung), Hoefer, Holliston, MA, USA
- Schüttler WT 12 Biometra Deutschland, Göttingen
- Intelligent Dark Box Fuji Foto Film Co. Ltd. Japan, Tokio Software
- Image Reader LAS-1000 Fuji Foto Film Co. Ltd. Japan, Tokio
- AIDA/ 2D Densitometry 2.11 Raytest Deutschland, Straubenhardt
- Excel Microsoft USA, Washington, Redmond

Beim Western Blot handelt es sich um ein Verfahren zur Übertragung von Proteinen. Dabei werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes negativ geladene Proteine senkrecht auf eine

---

---

positiv geladene PVDF-Membran transferiert. Das Trennmuster der zuvor im SDS-Gel separierten Proteine bleibt erhalten, sodass ein immunochemischer Nachweis möglich ist. Nach Zuschneidung der benötigten 12 Whatman-3MM Filterpapiere und Befeuchtung im jeweiligen Puffer wurden diese zusammen mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran sowie dem Trenngel luftblasenfrei zu einem sogenannten Sandwich zusammengefügt. Der Transfer der Proteine erfolgte für zwei Gele bei 70 V innerhalb von 90 Minuten. Nach der erfolgreichen Übertragung der Proteine mittels Western Blot konnten diese durch Immunodetektion nachgewiesen werden.

Das Verfahren der Immunodetektion basiert auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung: Der Primärantikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein und anschließend bindet an diesen ein markierter Sekundärantikörper, der die Detektion ermöglicht. Für Letzteres wurde hier die Meerrettichperoxidase genutzt, die in Anwesenheit von Wasserstoff das in der Detektionslösung befindliche Luminol in ein angeregtes, nicht stabiles Dianion überführt. Dieses emittiert beim Übergang in seinen Grundzustand Licht, welches gemessen werden kann. Zuerst wurde der Marker von der Membran entfernt und in TBST bei 4 °C konserviert. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur mit einer Milchlösung blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Der Marker wurde ebenfalls für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit Meerrettichperoxidase gekoppeltem anti-Biotin inkubiert. Anschließend wurden Membran und Marker mit der Detektionslösung behandelt und in der Intelligent Dark Box fotografiert.

Die Auswertung der Pixelintensität der Banden wurde mit der Software Aida 2.11 vorgenommen, die Intensität des Hintergrundes von den erhaltenen Bandenintensitäten subtrahiert und die Ergebnisse der Zielproteine mit dem der Haushaltsgene ins Verhältnis gesetzt.

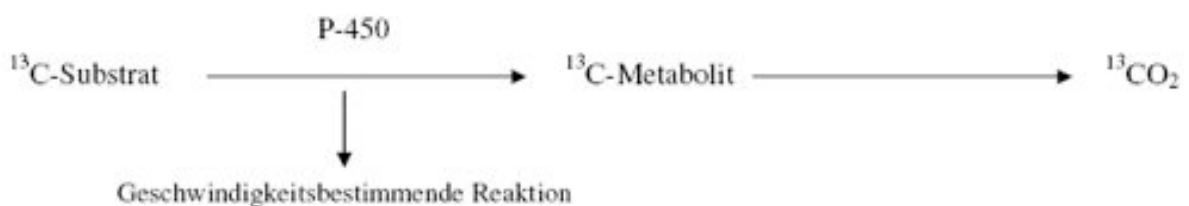
### **3.4. Untersuchung der Leberfunktion**

#### **3.4.1. <sup>13</sup>C-Methacetin-Atemtest**

##### 3.4.1.1. Allgemeines zum <sup>13</sup>C-Methacetin Atemtest

Seit langem besteht der Wunsch nach einem quantitativen Leberfunktionstest der binnen kürzester Zeit die aktuelle Leberfunktionskapazität höchst genau und objektiv darstellen kann.

Dabei soll der Test nicht-invasiv und möglichst ohne große Anstrengung für den Patienten durchführbar sein. Es wurden eine Vielzahl solcher quantitativer Leberfunktionstests in der Literatur beschrieben z.B. der  $^{13}\text{C}$ -Aminopyrin Atemtest, der  $^{13}\text{C}$ -Coffein-Clearance, der Ethyl- $^{13}\text{C}$ -Phenacethin Atemtest und der  $^{13}\text{C}$ -Methacetin-Atemtest. Alle diese Tests basieren auf dem Prinzip einer nicht-invasiven, quantitativen Bestimmung der hepatischen Funktionskapazität, bestimmte Fremdstoffe zu metabolisieren. Eine markierte Substanz, deren Stoffwechselweg bekannt ist, wird in einer festgelegten Dosis parenteral oder oral appliziert. Die Markierung der Substanz besteht dabei meist aus einem schweren Kohlenstoffatom der funktionellen Gruppe, wie z.B. das stabile, nicht radioaktive Kohlenstoff-Isotop  $^{13}\text{C}$ . Das grundlegende Prinzip der Atemtests beruht auf der enzymatischen Umwandlung einer  $^{13}\text{C}$ -markierten Substanz zu einem Metaboliten und  $^{13}\text{CO}_2$ . Das in der Ausatemluft vorhandene  $^{13}\text{CO}_2$  wird quantitativ bestimmt, um letztlich auf die Cytochrom P450-abhängige O-Dealkylierungs-Funktion der Leber rückzuschließen.

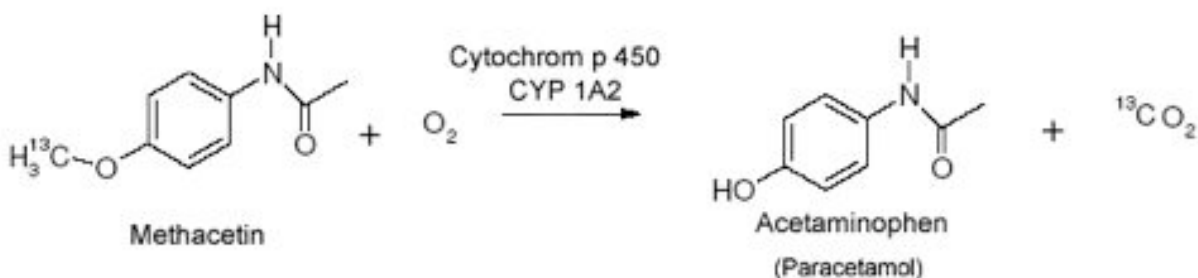


**Abbildung 5: Prinzip des Atemtests**

### 3.4.1.2. Testprinzip des $^{13}\text{C}$ -Methacetin Atemtests

Im Rahmen des  $^{13}\text{C}$  Methacetin-Atemtests gelangt die intravenös verabreichte Fremdschubstanz,  $^{13}\text{C}$ -Methacetin, in die Leber und wird dort durch das Enzymsystem CYP P 450 oxidativ dealkyliert zu Paracetamol (Acetaminophen) und  $^{13}\text{CO}_2$ .<sup>20</sup>

#### Metabolismus des Substrats: Oxidative Dealkylierung



---

### **Abbildung 6: Umwandlung von Methacetin in Paracetamol und $^{13}\text{CO}_2$**

Das entstehende  $^{13}\text{CO}_2$  kann in der Expirationsluft des Patienten gemessen werden.

Pfaffenbach et al. demonstrierten den Einsatz der nichtdispersiven isotopenselektiven Infrarot-Spektroskopie (NDIRS) beim Methacetin Atemtest und leisteten somit erheblichen Einsatz, um die viel aufwendigere und teurere massenspektrometrische Messung, abzulösen.<sup>42, 43</sup> Zudem konnten Adamek et al. mit der neuen Methode (NDIRS) hohe Korrelationen zu den gemessenen Werten mit dem Isotopenmassenspektrometer (IRMS) nachweisen.<sup>24</sup>

Während des Testes zieht das Gerät zu bestimmten Zeiten die Ausatemluft des Patienten in die Messeinheit, um die Änderung des im  $^{13}\text{C}$ -Anteil des abgeatmeten  $\text{CO}_2$  über die Zeit zu bestimmen. Zu jedem Messzeitpunkt wird die Vergrößerung des  $^{13}\text{C}$ -Anteils im Vergleich zum Basalwert der Atemluft (Veränderung des Verhältnisses  $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ ) als „**Delta over Base**“ (DOB) bestimmt. Dieses Resultat wird mit der  $\text{CO}_2$ -Produktion multipliziert und ergibt die  $^{13}\text{C}$ -Produktion. Aus diesem Ergebnis kann dann die sogenannte prozentuale Wiederfindungsrate (PDR) des Indikators errechnet werden. Daraus wiederum kann die kumulative Dosis (cPDR) berechnet werden, welche oft als Endergebnis des Atemtest angewandt wird.<sup>44</sup>

#### 3.4.1.3. Durchführung des LiMAx-Tests

Der LiMAx-Test, ein  $^{13}\text{C}$ -Methacetin-Atemtest, wurde bei allen Patienten an bestimmten prä- und postoperativen Tagen durchgeführt.  $^{13}\text{C}$  ist zu bestimmten Anteilen in allen kohlenstoffhaltigen Produkten unserer Nahrung enthalten. Der natürliche  $^{13}\text{C}$ -Anteil liegt in einer Größenordnung von 1,08% vor. Deshalb war es wichtig, dass alle Patienten immer eine Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz von mindestens 6 Stunden vor Durchführung des Tests einhielten. Nach erfolgter Operation wurden alle Patienten auf die Intensivstation verlegt. So war es teilweise nötig, die Messung am 1. postoperativen Tag auf der Intensivstation durchzuführen. Insofern es der Allgemeinzustand des Patienten erlaubte, wurde auch auf der Intensivstation darauf geachtet, dass alle Patienten eine 6-stündige Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz einhielten. Dabei durften keine kohlenhydrathaltigen Infusionen, parenterale Ernährung, Insulin oder Blutprodukte verabreicht werden. In bestimmten Fällen musste von dieser Bestimmung Abstimmung Abstand genommen werden, da es aus medizinischer und ethischer Sicht unumgänglich war, bestimmte Produkte zu geben. Nach nächtlicher Nahrungs- und



---

Flüssigkeitskarenz wurde der Test stets am liegenden Patienten durchgeführt. Die Patienten wurden zudem vor Testbeginn instruiert sich möglichst ruhig zu verhalten, um jegliche körperliche Anstrengung und damit verbundene Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.<sup>45</sup>

Vor Startbeginn des LiMAX-Tests wurden an dem Messgerät Studiennummer, Größe, Gewicht und Methacetinmenge des Patienten eingegeben. Dem Patienten wurde eine Braunüle möglichst in eine Kubitalvene gelegt. Danach wurde dem Patienten eine speziell angefertigte Gesichtsmaske, ähnlich einer CPAP- Maske, auf das Gesicht gesetzt. Dabei war zu beachten, dass die Maske gut auf dem Gesicht saß und keine Atemluft entweichen konnte. Die Maske war mittels eines Kunststoffschlauches mit einem Feuchtigkeitsaustauscher, welcher sich an der Messeinheit befand, verbunden. Als Messeinheit fungierte ein auf der Basis der Nichtdispersiven-Isotopen-Selektiven-Spektroskopie – arbeitendes Gerät, FANci 2 db 16, Fischer Analyseinstrumente, Leipzig, Germany.

Tabelle 9 zeigt den Ablauf LiMAX-Tests während der 120 Minuten-Testdauer. Während der ersten zehn Testminuten wurden - zunächst ohne Gabe von Methacetin – der Normalwert an Ausatem-<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> des Patienten bestimmt. Zu jedem Messzeitpunkt gelangte die Atemgasprobe über den Kunststoffschlauch in die Messeinheit des Geräts und dort wurde das <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-Verhältnis bestimmt. Die ersten 6 gemessenen Werte dienten somit der Bestimmung des Basalwerts des <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>- Verhältnisses. Nach Ablauf dieser ersten 6 Messungen bzw. der ersten 10 Testminuten wurde zu Beginn der Messung 7 dem Patienten eine <sup>13</sup>C Methacetindosis von 2mg / kg KG über die Braunüle injiziert.<sup>42, 46</sup> Zum Nachspülen wurde 20 ml NaCl injiziert.



**Abbildung 7: Methacetin-Flasche**



**Methacetin-System**

Wie Tabelle 9 zeigt, wurden während der nächsten laufenden 60 Minuten die Messungen 7 bis 46 bestimmt. Der Patient atmete während der gesamten Messung vollkommen normal und ohne verstärkte Ventilation. Die Atemmaske wurde nach Beendigung des Tests immer gereinigt und

in ein Desinfektionsbad für mindestens eine Stunde gelegt. Anschließend wurde sie gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und durch die Raumluft getrocknet.

**<sup>13</sup>C-Methacetin-Atemtest  
Zeitverlauf**

Pat.-Pseudonym: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Testnummer: \_\_\_\_\_

✓	Zeitpunkt	Beutel-Nr.	Uhrzeit	Bemerkungen
	0 min (VOR)	1 + 2		
	Injektion			
	2,5 min	3		
	5 min	4		
	10 min	5		
	15 min	6		
	20 min	7		
	30 min	8		
	40 min	9		
	50 min	10		
	60 min	11		
	80 min	12		
	100 min	13		
	120 min	14		

*Tabelle 9: Ablauf des LiMax-Tests*

---

#### 3.4.1.4. Isotopenselektive nicht-dispersive Infrarotspektrometrie

Die vormals für den Methacetin Atemtest verwendeten Isotopenmassenspektrometer (IRMS) waren sehr aufwendig und teuer. Dank der Entwicklung von den viel kostengünstigeren isotopenselektiven nicht-dispersiven Infrarotspektrometern (NDIRS) ist es heute möglich auf einfachere und billigere Weise den Methacetin Atemtest durchzuführen.<sup>42</sup>

Für die in der Studie durchgeführten Messungen zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses  $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$  in den Atemgasproben, stand das NDIRS – Gerät FANci 2db-16 (Fischer Analysen Instrumente, Leipzig) zur Verfügung. Im Inneren des Gerätes befindet sich der wichtigste Teil des NDIRS, ein für die Isotopenanalyse modifizierter Analysator (URAS 10), der für die quantitative Analyse von  $\text{CO}_2$  und anderen Gasen eingesetzt wird.



*Abbildung 8: NDIRS FANci 2db16. – Messgerät*

---

### **3.4.2. Indocyaningrün-Test (ICG-Test)**

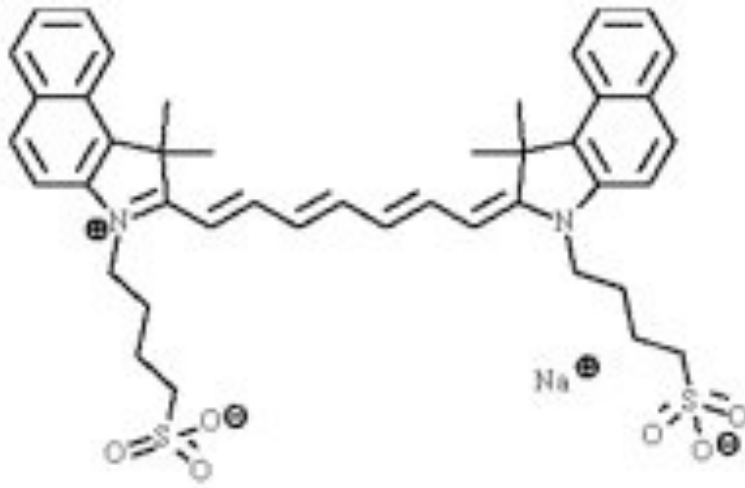
#### 3.4.2.1. Anwendungsgebiete von Indocyaningrün (ICG)

Indocyaningrün (ICG) wurde von den Kodak Research Laboratories als Fluoreszenzfarbstoff entwickelt und 1956 erstmalig produziert. Es diente der kardialen Diagnostik zur Messung hämodynamischer Funktionen.<sup>47</sup> Als man entdeckte, dass ICG nur über die Leber eliminiert wird, wurde der ICG-Test zur Leberfunktionsdiagnostik entwickelt.<sup>48,49</sup> Heute ist der ICG-Test nun seit Jahrzehnten als wertvolles, zuverlässiges Instrument für die Ermittlung der exkretorischen Leberfunktion etabliert. Des Weiteren wird ICG genutzt, um die Durchblutung einzelner Organe und Gewebe zu bestimmen, z.B. im Rahmen der allgemeinen Chirurgie zur Bestimmung der Perfusion von Ulzera oder bei Wundheilungsstörungen. Vor allem in der Chirurgie dient ICG auch der nicht-invasiven Überwachung der Leber- bzw. Splanchnikusperfusion.

#### 3.4.2.2. Chemische und pharmakologische Eigenschaften von ICG

ICG ist ein anionischer, hydrophiler Tricarbocyaninfarbstoff und hat ein Molekulargewicht von 775 Dalton. ICG wird innerhalb weniger Sekunden nach der intravenösen Injektion fast vollständig (98%) an Plasmaeiproteine gebunden, vor allem an Albumin und  $\alpha$ 1-Lipoproteine, und verlässt aus diesem Grund nicht den intravasalen Raum.<sup>50,51</sup> Beim Gesunden ist ICG weder im Urin noch im Liquor nachweisbar.

Da keinerlei Metabolisation von ICG stattfindet und die Substanz unverändert über die Leber ausgeschieden wird, gilt sie beim Menschen als nicht-toxisch, sehr gut verträglich. Äußerst selten ist das Vorkommen von allergischen Reaktionen beschrieben worden (1: 40.000), wobei hier Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz am meisten betroffen waren.<sup>52</sup>



**Abbildung 9: Summenformel Indocyaningrün (ICG):  $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$**

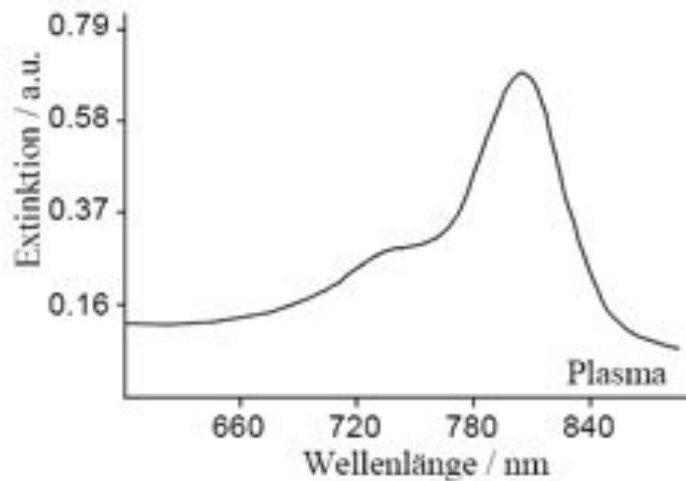
### 3.4.2.3. Elimination von ICG

ICG wird nahezu ausschließlich von der Leber durch einen aktiven Transportmechanismus aus dem Blut eliminiert, unverändert mit der Galle sezerniert und unterliegt keinem enterohepatischen Kreislauf.<sup>48, 49, 53</sup>

Die Elimination des Indocyaningrün (ICG) ist hierbei abhängig von:

- dem total zirkulierenden Blutvolumen
- der hepatozellulären Aufnahme
- der Leberdurchblutung
- der biliären Exkretion
- dem intrazellulären Transport

Die physiologische Exkretionsrate durch die Leber beträgt ca. 70-80%.<sup>54</sup> Bei Bolus-Injektion von ICG ist bereits nach 10 Minuten nur noch ein geringer Anteil der applizierten Menge im Blut vorhanden. Die Plasmahalbwertszeit beträgt ca. 3 Minuten. Die Gewebahalbwertszeit liegt bei weniger als 10 Minuten.<sup>55</sup> Das Absorptionsmaximum von ICG im Blut, Plasma oder Serum liegt zwischen 795 und 805 nm.<sup>56, 57</sup>



**Abbildung 10: Absorptionsspektrum von Indocyaningrün im Serum**

#### 3.4.2.4. Zubereitung des ICG-Präparates

Für die Leberfunktionstestung in Form des ICG-Tests an den Probanden in dieser Studie wurde die Substanz ICG-Pulsion<sup>®</sup> der Firma PULSION, Medical Systems AG aus München verwendet. In einer Packung werden 5 Durchstechampullen der Trockensubstanz ICG, sowie das zur Herstellung der Lösung benötigte Aqua ad injectabile mitgeliefert. Eine Stechampulle enthält 50 mg der Trockensubstanz Indocyaningrün, Mononatriumsalz. Zur Auflösung der Trockensubstanz wurden als Lösungsmittel stets die mitgelieferten Aqua ad injectabile (10 ml) - Ampullen benutzt.

In der Leberfunktionsdiagnostik beträgt die zu injizierende ICG-Dosis zwischen 0,25 bis 0,5 mg/kg Körpergewicht (ICG-Pulsion<sup>®</sup> Gebrauchsanweisung). Für unsere ICG-Tests erhielten alle Patienten die Dosis von 0,5mg/kg Körpergewicht.

Paumgartner und Leevy konnten zeigen, dass die Geschwindigkeit der Elimination von ICG aus dem Blut und die Aufnahme in die Leber dosisabhängig sind, und empfahlen eine Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht.<sup>54</sup>

#### 3.4.2.5. Durchführung des ICG-Tests

Bei allen Probanden dieser Studie wurde der ICG-Test stets nur nach einer mindestens 6-stündigen Nüchternphase durchgeführt.

Vor Beginn des Tests wurde zunächst immer eine Braunüle, möglichst in die Kubitalvene, platziert. Der DGG- 2001, Dye Densitogram Analyzer, Nihon Kodan, Japan, ein nicht-invasives

---

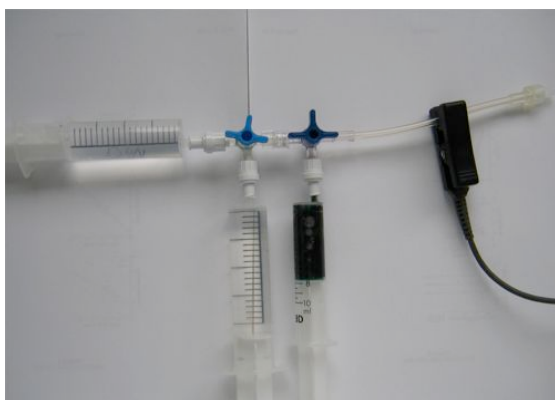
Gerät zur ICG-Densitometrie mit einer Messsonde in Form eines Fingerclips (DGG Analyzer Finger Probe for adult TL- 301P, Nihon Kodan, Japan) diente der Messung der ICG-Clearance. Der Fingerclip wurde an einem Finger befestigt, und zwar stets kontralateral des Armes mit der Braunüle.

An die Braunüle wurde eine Heidelberger Verlängerung mit einem Dreiwegehahn, zwei Rückschlagventilen, die berechnete Menge Indocyaningrün (0,5 mg/kg Körpergewicht) in einer Spritze, eine 20ml Spritze mit Aqua, sowie eine 20ml Spritze mit 0,9%-iger Kochsalzlösung angeschlossen. An die Heidelberger Verlängerung wurde ein Injektionsdetektor angeschlossen.

Alle Patienten wurden vorher stets instruiert, während des Tests den Finger mit dem Sensor möglichst ruhig zu halten und sich nicht zu bewegen, da dies mitunter zu Verfälschungen des Testergebnisses führen kann.

Nach Installation von Braunüle mit dem Injektionssystem sowie dem Fingerclip, wurden Gewicht, Größe des Patienten, Hämoglobin-Wert, die ICG-Dosis in das Gerät eingegeben und der Countdown gestartet. Nach erfolgreicher Injektion des ICG im Bolus wurde zuerst die 20ml Aqua-Spritze und dann erst die 20ml NaCl-Spritze injiziert, um den Farbstoff schnell in den Blutkreislauf einzuschwemmen.

Die Abnahme der Konzentration des ICG im Blut durch die zunehmende Aufnahme in die Leber und Elimination in die Gallenwege wurde über den Fingerclip nicht-invasiv spektrophotometrisch gemessen. Das Gerät zeigte nach 6-10 Minuten das Ergebnis als Plasmaverschwinderate (PDR) an und stellte diese in Form einer Graphik dar. Die ausgerechneten Daten wurden im PC gespeichert und Patientenkürzel sowie der jeweilige Messtag hinzugefügt.



**Abbildung 11: ICG-System**



**ICG-Trockenlösung**



**Abbildung 12: Nihon Koden Gerät für die ICG-Messung**

#### 3.4.2.6. Messmethodik und Funktionsweise des ICG-Tests

Die ICG-Clearance bezeichnet den Anteil der ICG-Menge, der beim Durchfluss durch die Leber von ihr aufgenommen und über die Galle eliminiert wird. Die ICG-Clearance stellt ein sehr sensitives Maß für die Leberfunktion dar. Die Exkretion des ICGs erfolgt nach der Kinetik 1.Ordnung. Die ICG-Konzentration nimmt im Blut logarithmisch ab. Die dem Kurvenverlauf entsprechende Gerade zeigt einen negativen Anstieg, der als  $k$  beschrieben wird. Die ICG-Elimination durch die Leber kann als sogenannte Plasmaverschwinderate, engl. Indocyanine green plasma disappearance rate, *ICG-PDR*, d.h. die prozentuale Änderung der ICG-Konzentration zum Zeitpunkt  $t_0$  (= 100 %), ausgedrückt werden. 18 -25 % /Minute gilt als Normwert für die ICG- PDR. Diese Plasmaverschwinderate (PDR), sowie die Blutclearance (CB), das Blutvolumen (BV), die aktuelle Sauerstoffsättigung und die Herzfrequenz können im Rahmen des ICG-Tests mittels der Pulsdensitometrie über den Fingerclip innerhalb von 6-10 Minuten die bestimmt werden.

Dabei basiert die Bestimmung Plasmaverschwinderate der ICG-Konzentration durch den Sensor analog zur Pulsoxymetrie auf der Streuung und Absorption von Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen im sichtbaren und nah-infraroten Spektralbereich. Das Extinktionsmaximum von ICG liegt bei 805 nm, nahe dem infraroten Spektralbereich bei 900 nm. Die Plasmaverschwinderate (PDR) des ICGs wird über die quantitative Messung der ICG-Menge pro Flächeneinheit erfasst. Das Prinzip ist folgendermaßen: Das Licht definierter Wellenlänge durchdringt die Haut, arterielle oder venöse Gefäße und Bindegewebe und wird von diesen zu einem bestimmten Anteil absorbiert und gestreut. Der Ausgangswert der Lichtquelle wird mit



---

dem Licht, welches zurückgesendet wird, verglichen. Die Absorption des Lichts ändert sich in Abhängigkeit des Blutvolumens und der ICG-Farbstoff-Konzentration. Liegt eine hohe ICG-Konzentration vor, wird aufgrund von Absorption nur wenig Licht zurückgesendet.

### **3.5. Statistische Auswertung**

Bei der Patientencharakteristik und den Western-Immunoblots wurden für alle statistischen Auswertungen SPSS (Version 16.0, Chicago, Illinois) genutzt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Korrelationen wurden im Fall einer Normalverteilung der Daten mittels Pearson-Korrelationskoeffizient, sonst mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman geprüft. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test verifiziert. Das Signifikanzniveau wurde mit  $P < 0,05$  festgelegt.

Bei den Ergebnissen der Verläufe der Leberregenerations-Werte, der Nüchtern-Glukose und des Homa-Indexes wurden zur Erstellung der Graphiken, sowie zur Berechnung der Mediane und den Quartile der Patientengruppen zum jeweiligen Zeitpunkt das Programm Microsoft Excel (Version 12.0) genutzt. Die Berechnung der Signifikanzen zwischen den Werten der jeweiligen Gruppen erfolgte durch SPSS (Version 16.0, Chicago, Illinois). Auch hier wurde das Signifikanzniveau auf  $P < 0,05$  festgelegt.

---

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Patientencharakterisierung

Die 22 in diese Studie eingeschlossenen Patienten konnten in zwei nahezu gleich große Gruppen aufgeteilt werden. Die Tabelle 10 zeigt die Basischarakteristik der zwei Gruppen. Die histologische Diagnosestellung erfolgte entsprechend dem „NAFLD activity score“ (NAS) nach Kleiner et al, wonach ab mehr als 5 % Leberfettgehalt die Diagnose NAFLD gestellt werden kann.<sup>8</sup> 12 der Patienten wiesen im Rahmen der histologischen Untersuchung des Lebergewebes einen Fettgehalt von  $\leq 5$  %, und somit keine Fettleber auf, während bei den weiteren 10 Patienten aufgrund eines Fettgehalts der Leber von  $> 5$  % die Diagnose NAFLD gestellt werden konnte. Tabelle 11 zeigt die prozentualen Leberverfettungswerte der einzelnen Patienten in den jeweiligen Gruppen. Die auf Basis der histologischen Beurteilung vorgenommene Einteilung in Fettleber- und Nicht-Fettleber-Patienten konnte durch die Messung des hepatischen Triglyzeridgehalts bestätigt werden: Die Validität der histopathologischen Einschätzung der Lebersteatose konnte dadurch untermauert werden, dass sich eine enge Korrelation mit dem experimentell bestimmten hepatozellulären Triglyzeridgehalt zeigte ( $r=0,736$ ;  $P<0,001$ ).

	Non-NAFLD ( $\leq 5$ %)	NAFLD ( $> 5$ %)	<i>P</i>
<b>Geschlecht n (m/w)</b>	12 (4/8)	10 (5/5)	-
<b>Alter (Jahre)</b>	53,7 $\pm$ 4,6	67,4 $\pm$ 3,2	0,050
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24,0 $\pm$ 1,1	29,3 $\pm$ 1,5	0,011
<b>Taillenumfang (cm)</b>	93,4 $\pm$ 3,9	108,1 $\pm$ 4,3	0,029
<b>Körperfettgehalt nach Hautfaltenmethode (%)</b>	35,8 $\pm$ 1,1	38,2 $\pm$ 0,7	0,173
<b>RR systolisch (mm Hg)</b>	128 $\pm$ 6	137 $\pm$ 5	0,152
<b>RR diastolisch (mm Hg)</b>	69 $\pm$ 3	72 $\pm$ 4	0,600
<b>GGT (U/l)</b>	116,73 $\pm$ 33,21	187,21 $\pm$ 83,40	0,346

<b>ALT (U/l)</b>	29,40 ± 7,17	54,81 ± 12,25	0,043
<b>AST (U/l)</b>	29,04 ± 3,57	43,69 ± 7,31	0,123
<b>Triglyzeride (mmol/l)</b>	1,11 ± 0,16	1,86 ± 0,15	0,002
<b>HDL (mmol/l)</b>	1,29 ± 0,11	1,11 ± 0,82	0,314
<b>Freie Fettsäuren (mmol/l)</b>	0,88 ± 0,13	0,91 ± 0,1	0,780
<b>HbA1c (%)</b>	5,38 ± 0,15	5,81 ± 0,22	0,156
<b>HOMA-IR</b>	0,64 ± 0,14	2,21 ± 0,55	0,014
<b>Triglyzeridgehalt der Leber (mg/mg Protein)</b>	0,22 ± 0,05	0,61 ± 0,12	0,012
<b>Metabolisches Syndrom nach NCEP ATP III (n=6)</b>	2	4	-
<b>Typ 2 Diabetes mellitus (n=5)</b>	1	4	-
<b>Insulintherapie (n=1)</b>	0	1	-
<b>Orale Antidiabetika (n=4)</b>	1	3	-
<b>Anthypertensiva (n=5)</b>	2	3	-
<b>Andere (Thyroxin, Pantozol, Novamin, Lithium, Heparin, Levodopa)</b>			
<b>(n=11)</b>	5	6	-

Dargestellt sind Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. ALT, Alanin Aminotransferase; AST, Aspartat Aminotransferase, BMI, Body Mass Index; GGT, Gamma-Glutamyl-Transferase; HbA1c, Hämoglobin A1c; HDL, high density lipoprotein; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment - Insulinresistenz; NCEP ATP III, National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III 2001; RR, Blutdruck nach Riva-Rocci

*Table 10: Basischarakteristik der untersuchten Patienten*

	Anzahl	
	Patienten	Verfettungsgrad (%)
<b>12 Non-NAFLD</b>	10	0
<b>-Patienten</b>	2	5
<b>10 NAFLD-</b>	2	10
<b>Patienten</b>	1	20
	1	30
	2	40
	1	50
	1	60
	1	70
	1	80

***Tabelle 11: Ergebnisse der histologischen Leberverfettungsbestimmung***

Auffallend ist, dass vier der zehn NAFLD-Patienten ein Metabolisches Syndrom aufweisen, während bei lediglich zwei der zwölf Non-NAFLD-Patienten ein Metabolisches Syndrom vorliegt. Zudem sind vier der zehn NAFLD-Patienten an Typ 2 Diabetes mellitus erkrankt, während nur einer der zwölf Non-NAFLD-Patienten einen Typ 2 Diabetes mellitus aufweist. Wie aufgrund der unterschiedlichen Prävalenz von Typ 2 Diabetes mellitus und Metabolischem Syndrom zu erwarten, zeigen sich bezüglich einiger Basischarakteristika signifikante Unterschiede zwischen Probanden mit und ohne hepatische Steatose.

Die NAFLD-Patienten weisen einen signifikant größeren Taillenumfang ( $P=0,029$ ), sowie einen signifikant höheren BMI ( $P=0,011$ ) als die Non-NAFLD-Patienten auf. Ebenso erweist sich der Körperfettgehalt bei den NAFLD-Patienten als leicht höher als bei den Non-NAFLD-Patienten, doch ohne Signifikanz. Weiterhin erweist sich der HOMA-IR-Index (homeostasis model assessment of insulin resistance) als Maßstab für die Gesamt-Insulinresistenz als deutlich höher

---

bei den NAFLD-Patienten als bei Non-NAFLD Patienten ( $P=0,014$ ). Hinzu kommt, dass die NAFLD-Patienten einen signifikant höheren Triglyzerid-Spiegel (mmol/l) als die Non-NAFLD Patienten aufweisen ( $P=0,002$ ).

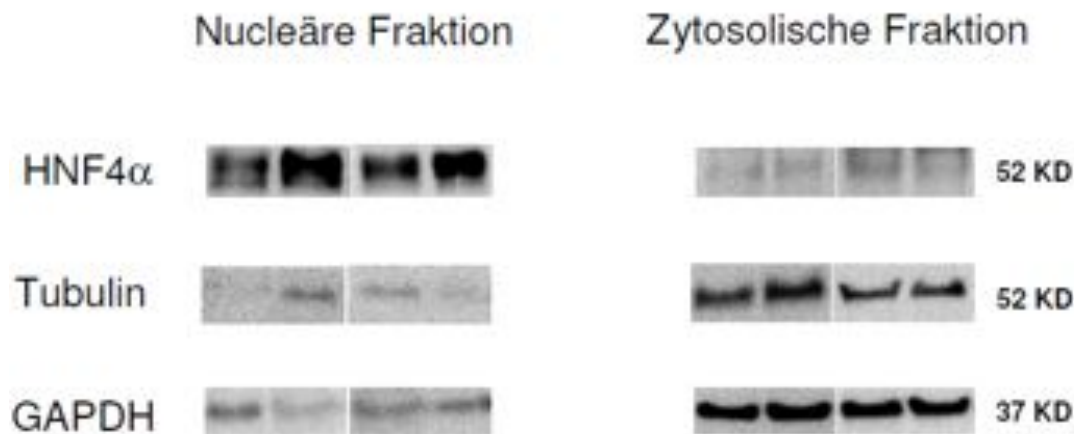
Weiterhin sind die hepatischen Laborparameter bei den Fettleber-Erkrankten gegenüber denen bei Non-NAFLD-Patienten erhöht. Besonders die ALT (Alanin Aminotransferase) zeigt signifikant höhere Werte ( $P=0,043$ ) bei NAFLD- gegenüber den Non-NAFLD-Patienten.

Insgesamt konnten bei den NAFLD-Patienten im Gegensatz zu den Non-NAFLD Patienten die klassischen Komponenten des Metabolischen Syndroms, wie ein hoher BMI, eine besonders abdominelle Adipositas, eine Dyslipidämie sowie eine hohe Gesamt-Insulinresistenz, aufgefunden werden. Auf Basis der dargestellten Eigenschaften der beiden Patientengruppen waren charakteristische Unterschiede in der Aktivität der Transkriptionsfaktoren FOXO1 und SREBP-1c in den durchgeführten Western-Immunoblots zu erwarten.

## **4.2. Darstellung von hepatozellulären Transskriptionsfaktoren**

### **4.2.1. Ergebnisse der Separation von Nuclei und Zytoplasmata**

Die Abbildung 13 zeigt die Trennung von nukleärer und zytosolischer Fraktion der Hepatozyten in repräsentativen, mit Patientenlebergewebe durchgeführten, Western-Immunoblots. Die erfolgreiche Trennung der Zellkompartimente und somit die Validität der Ergebnisse zeigt sich in der Verteilung der nukleären und zytosolischen Referenzproteine. Das nukleäre Referenzprotein, Hepatic Nuclear Factor 4- $\alpha$ , findet sich in hoher Konzentration im Nukleus und ist im Zytosol kaum vorhanden. Ebenso weisen die zytosolischen Referenzproteine, Tubulin und GAPDH, eine hohe Konzentration im Zytosol auf und sind hingegen im Nukleus kaum nachweisbar.



**Abbildung 13:** Nachweis der subzellulären Hepatocyten-Fraktionierung anhand der Konzentration geeigneter Referenzproteine in repräsentativen Western-Immunoblots. GAPDH, Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenas; HNF4 $\alpha$ , Hepatic Nuclear Factor 4 $\alpha$ ; KD, Kilo-Dalton.

#### 4.2.2. Subzelluläre Lokalisation von FOXO1

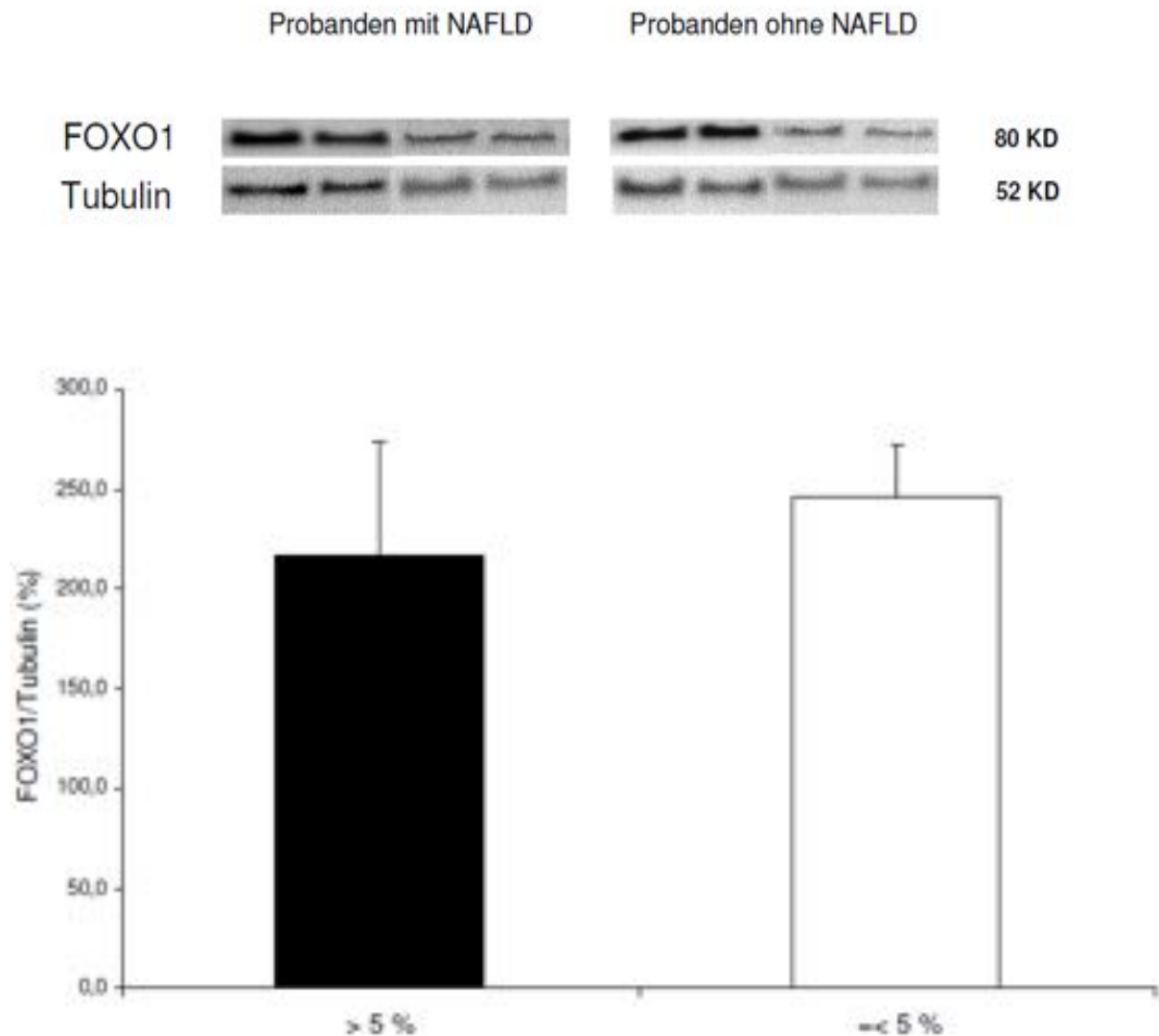
Die Ergebnisse der Western-Immunoblots bezüglich der Konzentration von FOXO1 im hepatozellulären Zytosol (s. Abbildung 14) weisen keinen signifikanten Unterschied der zytosolischen FOXO1 Konzentration zwischen NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten auf.

Die Konzentration von FOXO1 innerhalb der nukleären hepatozellulären Fraktion ist in Abbildung 15 dargestellt. Es ergab sich eine leicht geringere Konzentration von FOXO1 im Nukleus bei NAFLD- als bei Non-NAFLD-Patienten, jedoch ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Dargestellt ist sowohl im Zytosol als auch in den Nuklei der Quotient aus FOXO1 und dem jeweiligen Housekeeping-Gen, d.h. FOXO1 im Bezug auf Tubulin im Zytosol und FOXO1 im Bezug auf Lamin im Nukleus. Hervorzuheben ist, dass im Zytosol ein wesentlich kleinerer Quotient (ca. 2,5-3) als in den Nuclei (dort bis zu 15) aufzufinden war. Daher könnte man, unter der Prämisse, dass die Housekeeping-Gene höchstwahrscheinlich in ihrer Expression relativ konstant und meist hoch exprimiert sind, aus den Befunden möglicherweise schlussfolgern, dass die Patienten zum Entnahmzeitpunkt eine höhere FOXO1-Konzentration in den Nuclei als in

den Zytoplasmata aufwiesen. Eine höhere nukleäre FOXO1-Konzentration würde im Sinne einer verstärkten hepatozellulären Glukoneogenese-Förderung zu der Tatsache passen, dass alle Patienten sich OP-bedingt in einem Fastenzustand von mindestens 10 Stunden befanden.

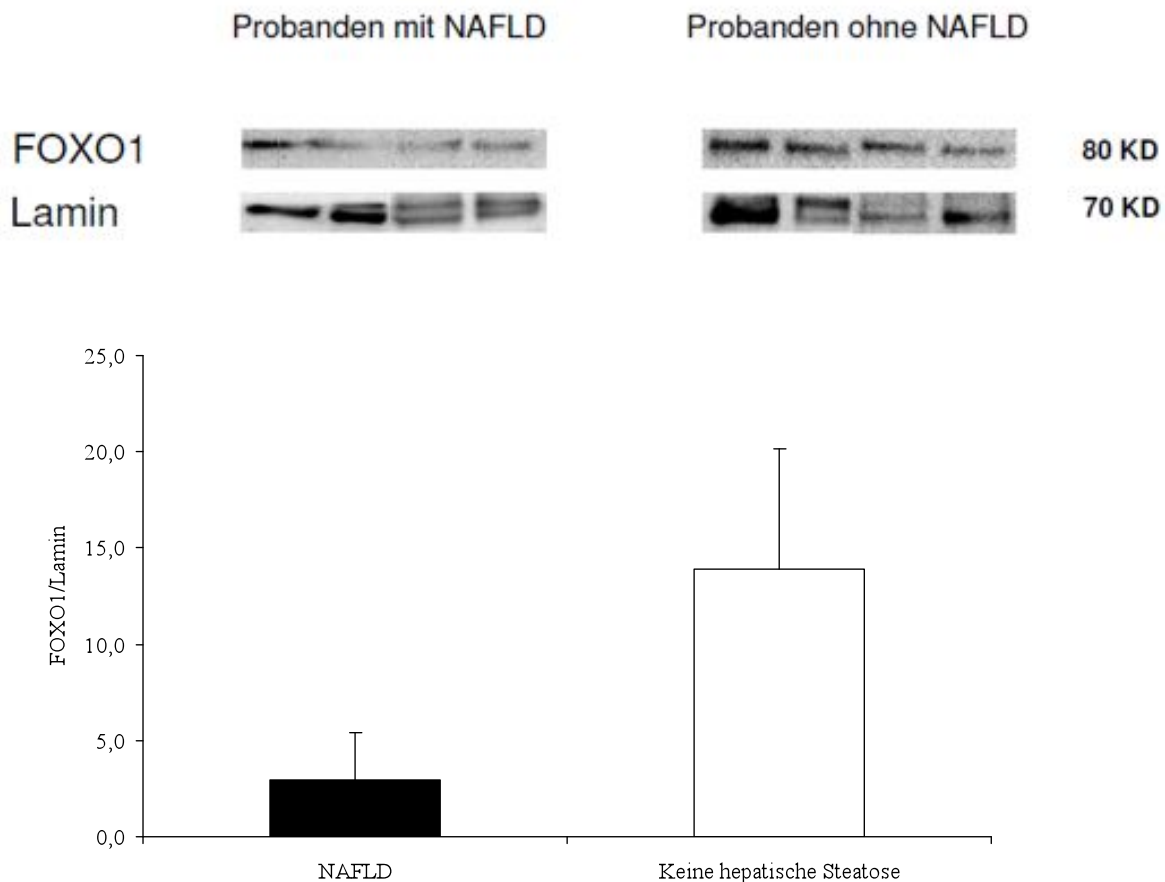
### Zytosolische Konzentration von FOXO1



**Abbildung 14:** Mittels Western-Immunoblot ermittelte und auf Tubulin bezogene Konzentration von FOXO1 innerhalb der zytosolischen hepatozellulären Fraktion. Dargestellt sind die Daten von jeweils vier Probanden mit (> 5%) und ohne (≤ 5%) NAFLD. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant ( $P=0,114$ ). KD, Kilo-Dalton.

---

## Nukleäre Konzentration von FOXO1



**Abbildung 15:** Mittels Western-Immunoblot ermittelte, auf Lamin bezogene Konzentration von FOXO1 innerhalb der nukleären hepatozellulären Fraktion. Dargestellt sind die Daten von jeweils vier Probanden mit (> 5%) und ohne ( $\leq$  5%) NAFLD . Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $P=0,057$ ). KD, Kilo-Dalton.

### 4.2.3. Subzelluläre Lokalisation von SREBP-1c

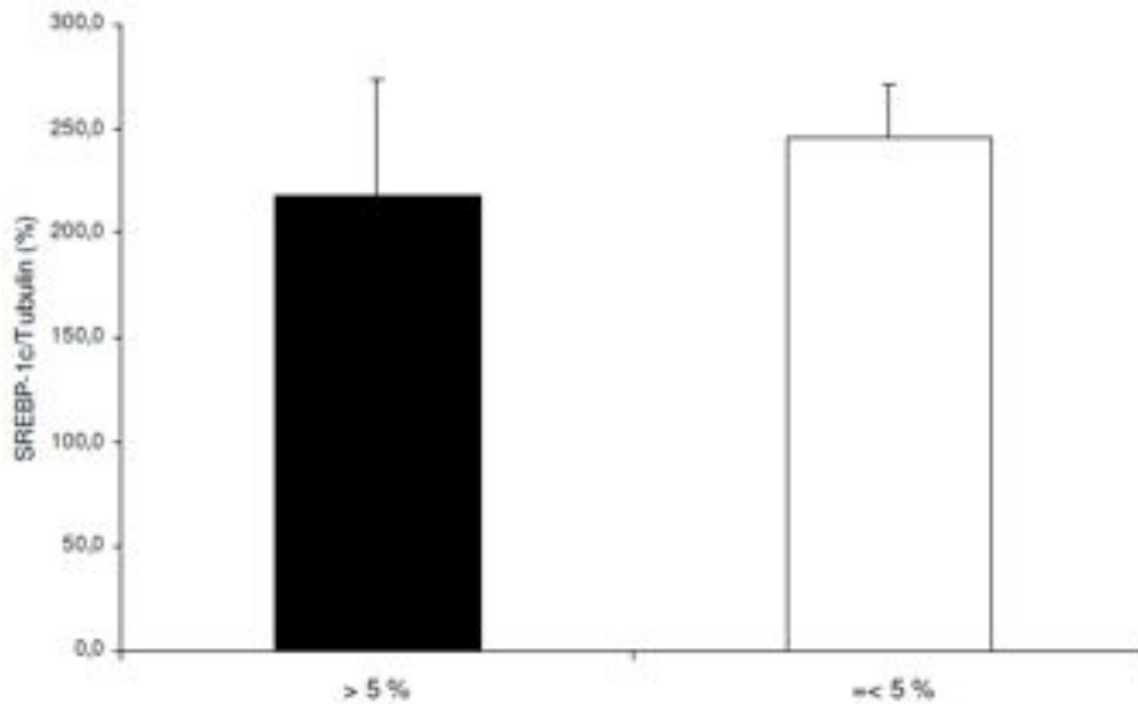
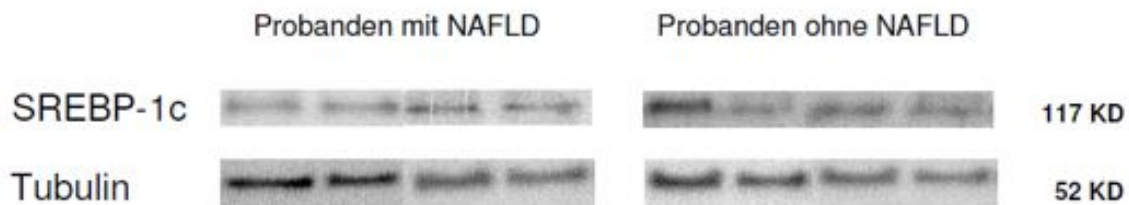
Die Ergebnisse der Western-Immunoblots zur Detektion von SREBP-1c in der zytosolischen hepatozellulären Fraktion (Abbildung 16) zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten besteht. Bezüglich der Konzentration von SREBP-1c innerhalb der nukleären hepatozellulären Fraktion (Abbildung 17) ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten.

In beiden Patientengruppen zeigten sich hier deutlich höhere Quotienten von SREBP-1c zu Tubulin im Zytosol gegenüber den Quotienten von SREBP-1c zu Lamin im Nukleus. Die zytosolische Konzentration von SREBP-1c scheint zum Entnahmezeitpunkt im Zytosol höher



gewesen zu sein. Dies entspricht im Sinne einer verminderten Lipogenese-Förderung der katabolen Stoffwechselsituation der Patienten, die sie sich zum Entnahmezeitpunkt alle in einem Nüchternzustand befanden.

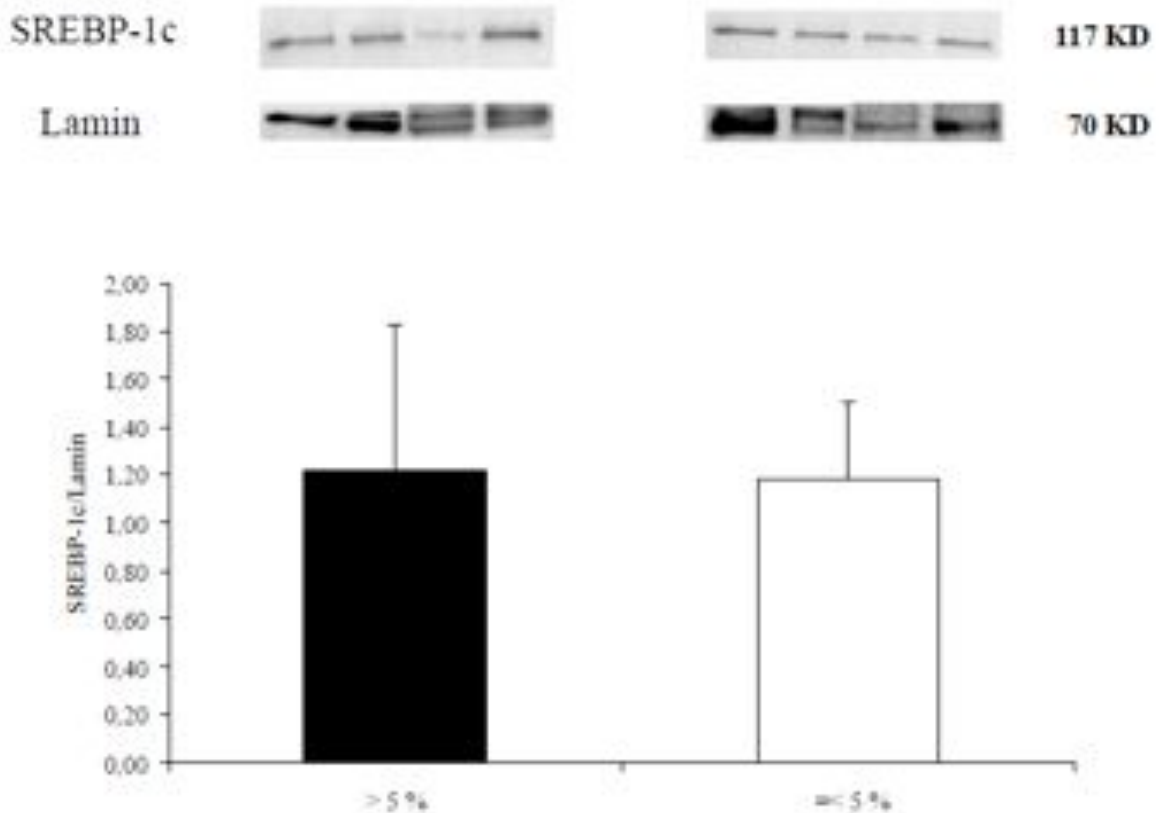
### Zytosolische Konzentration von SREBP-1c



**Abbildung 16:** Mittels Western-Immunoblot ermittelte, auf Tubulin bezogene Konzentration von SREBP-1c innerhalb der zytosolischen hepatozellulären Fraktion. Dargestellt sind die Daten von jeweils vier Probanden mit (> 5%) und ohne (≤ 5%) NAFLD. Die Unterschiede zwischen Probanden mit und ohne hepatische Steatose waren nicht signifikant (P=0,686). KD, Kilo-Dalton.

---

### Nukleäre Konzentration von SREBP-1c



**Abbildung 17:** Mittels Western-Immunoblot ermittelte, auf Lamin bezogene Konzentration von SREBP-1c innerhalb der nukleären hepatozellulären Fraktion. Dargestellt sind die Daten von jeweils vier Probanden mit (> 5%) und ohne ( $\leq$  5%) NAFLD. Die Unterschiede zwischen Probanden mit und ohne hepatische Steatose waren nicht signifikant ( $P=0,629$ ). KD, Kilo-Dalton.

---

### **4.3. Leberregeneration, Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose im perioperativen Verlauf**

An den 22 leberteilresezierten Patienten dieser Studie wurde die Leberfunktion durch den LiMAx- und den ICG-Test präoperativ, sowie an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 evaluiert.

Bei den Operationsindikationen zur Leberteilresektion handelte es sich in 6 der Fälle um kolorektale Lebermetastasen, in 3 Fällen um Klatskin-Tumoren, in 4 Fällen um ein hepatozelluläres Karzinom und in weiteren 4 Fällen um ein cholangiozelluläres Karzinom. 5 weitere Patienten wiesen weitere, unterschiedliche Diagnosen wie u.a. Hämangiome auf. Zu den durchgeführten operativen Prozeduren gehörten insgesamt 12 Hemihepatektomien, 6 erweiterte Hemihepatektomien, sowie 4 atypische Resektionen. Unter allen 22 Patienten ergaben sich im postoperativen Verlauf keine Todesfälle.

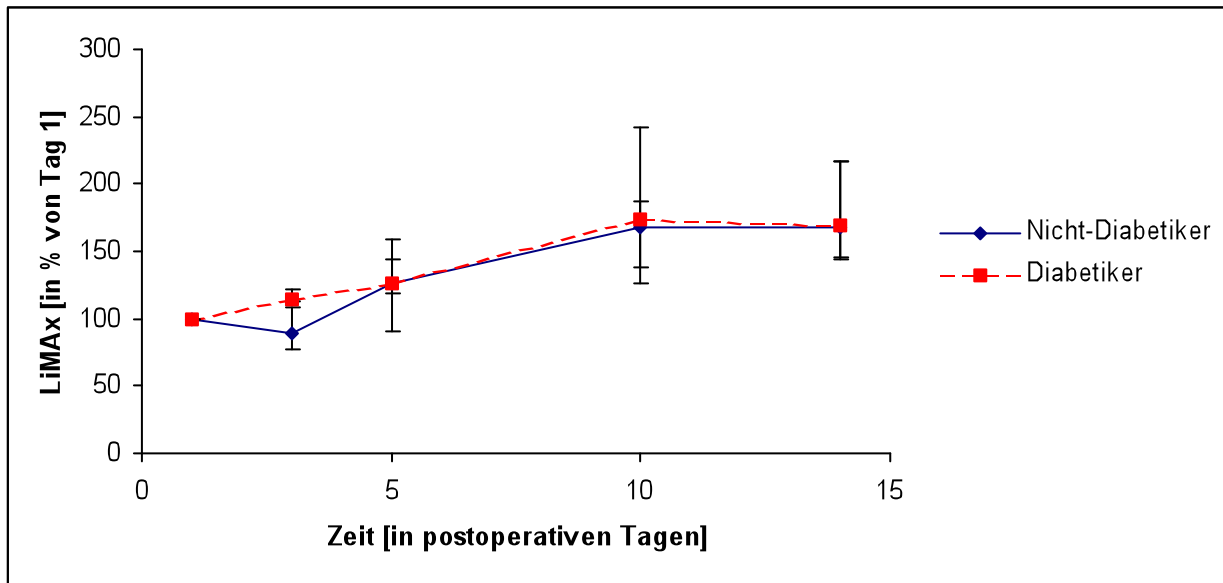
Die Abbildungen 18 bis 25 zeigen den postoperativen Verlauf der Leberregeneration anhand der LiMAx- und ICG - Leberfunktionswerte, sowie die metabolische Situation im postoperativen Verlauf anhand von Nüchtern-Glukose und HOMA-IR-Index für Insulinresistenz. Verglichen werden dabei die Daten von Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern und von NAFLD-Erkrankten im Vergleich zu Patienten ohne NAFLD.

Bei allen im perioperativen Verlauf dargestellten Daten handelt es sich immer um den Median der jeweiligen Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt. In den Darstellungen der LiMAx- und ICG-Werte wurden in allen Patientengruppen jeweils die Werte am postoperativen Tag 1 mit 100 % gleichgesetzt; die Werte an den postoperativen Tagen 3, 5, 10 und 14 sind prozentual zum Ausgangswert an Tag 1 dargestellt.

#### **4.3.1. Postoperative Leberregeneration bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern**

Die Abbildung 18 zeigt die postoperativen Verläufe der Leberregeneration anhand der LiMAx-Test-Werte bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern. Es zeigt sich ein nahezu völlig übereinstimmender Verlauf der Leberregeneration bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern. Am 3. postoperativen Tag liegt der LiMAx-Wert der Diabetiker minimal, ca. 10 %, über dem der Nicht-Diabetiker ( $P=0,409$ ). An den Tagen 5, 10 und 14 sind die LiMAx-Werte von Diabetikern und

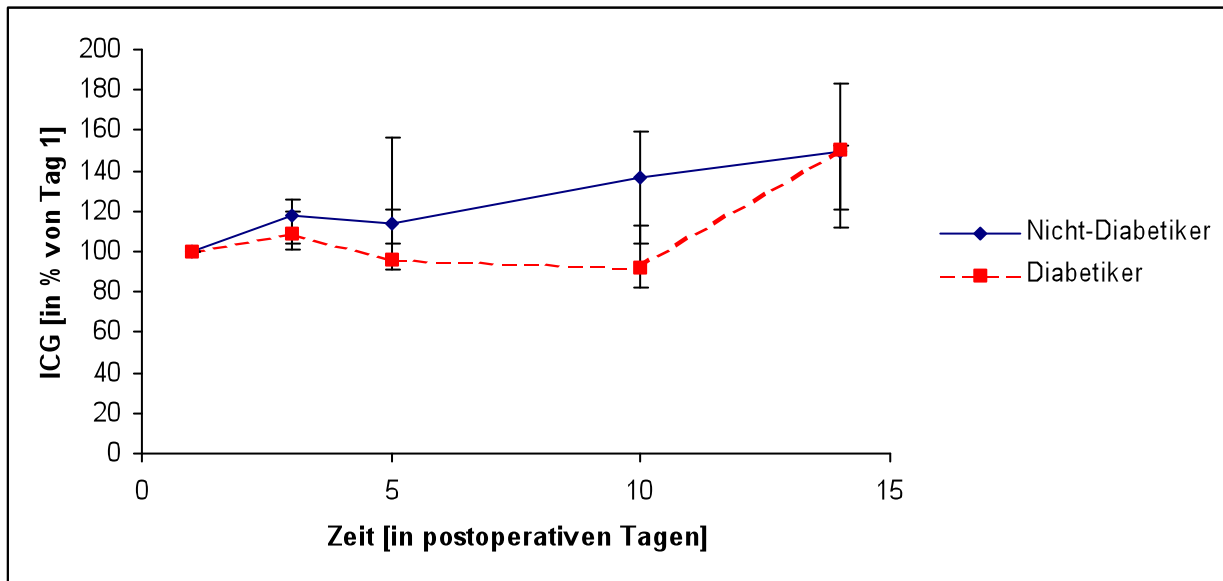
Nicht-Diabetikern übereinstimmend. Die entsprechenden  $P$ -Werte sind 0,827 an Tag 5, 0,089 an Tag 10 und 0,079 an Tag 14. Beide Gruppen weisen bis zum 10.Tag einen stetigen Anstieg der LiMAx-Werte auf, mit ca. 75 % gegenüber dem Ausgangswert in beiden Gruppen an Tag 10. Zwischen Tag 10 und Tag 14 stagnieren die Werte beider Gruppen weiterhin auf ca. 70-75 % über dem Ausgangswert.



**Abbildung 18: Leberregeneration anhand des LiMAx-Tests bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern.** Dargestellt sind die Mediane und die jeweiligen Quartile der prozentual zum postoperativen Ausgangswert an Tag 1 berechneten LiMAx-Werte an den postoperativen Tagen 3, 5, 10 und 14. LiMAx, maximal liver function capacity based on  $^{13}\text{C}$ -methacetin (MA) kinetics

Abbildung 19 zeigt die Leberregeneration anhand des ICG-Tests bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern im Vergleich. An Tag 3 zeigt sich ein ca. 10 %, signifikant höherer Wert bei den Nicht-Diabetikern als bei den Diabetikern ( $P=0,024$ ). An Tag 5 fällt der Wert der Diabetiker deutlich, während der Wert der Nicht-Diabetiker nur minimal sinkt. Die Werte unterscheiden sich an Tag 5 ebenfalls signifikant ( $P=0,005$ ). Insgesamt weisen die Nicht-Diabetiker an Tag 5 einen fast 20 % höheren Wert als die Diabetiker auf. An Tag 10 weitet sich der Vorsprung der Nicht-Diabetiker weiter aus: während der Wert der Diabetiker weiter minimal fällt, liegt der Wert der Nicht-Diabetiker um mehr als 40 % darüber. Die Werte sind an Tag 10 weiterhin signifikant unterschiedlich ( $P=0,004$ ). Der Wert der Diabetiker liegt am 10. Tag einige Prozentpunkte unter dem Ausgangswert von Tag 1. Es zeigt sich eine tendenziell höhere Leberfunktionsleistung und eine schnellere Leberregeneration bei Nicht-Diabetikern gegenüber Diabetikern. Allerdings steigt der Wert der Diabetiker zwischen Tag 10 und Tag 14 sehr stark,

um mehr als 50 %, an und die beiden Gruppen erreichen an Tag 14 den gleichen, maximalen Wert ( $P=9,09$ ), der ca. 50 % über dem Ausgangswert von Tag 1 liegt.

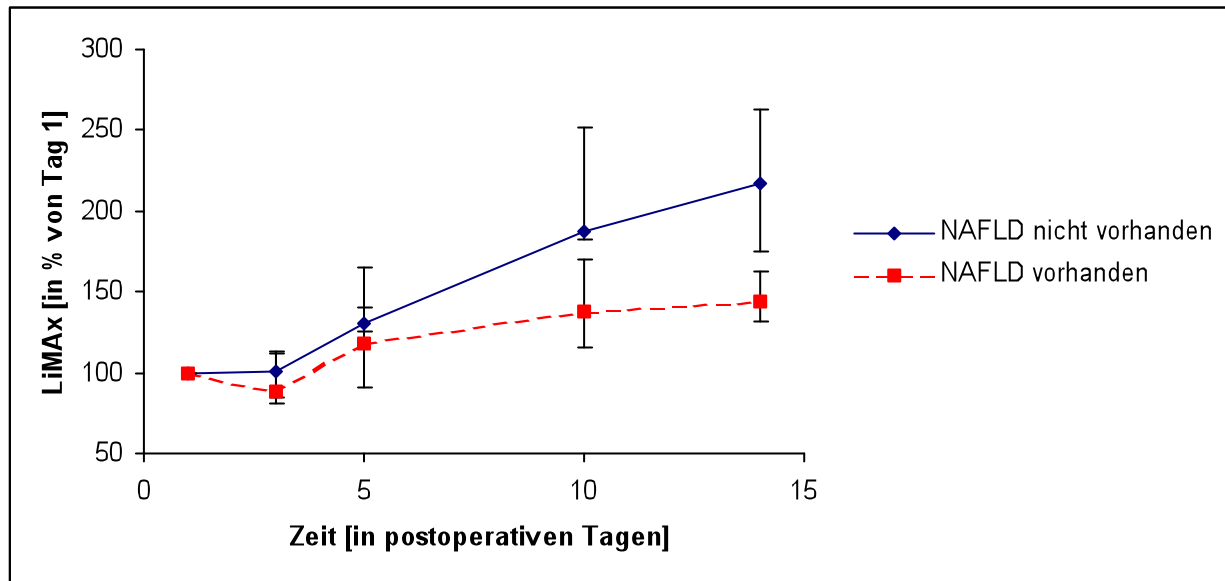


**Abbildung 19: Leberregeneration anhand des ICG-Tests bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern. Dargestellt sind die Mediane und die jeweiligen Quartile der prozentual zum postoperativen Ausgangswert an Tag 1 berechneten ICG-Werte an den postoperativen Tagen 3, 5, 10 und 14. ICG, Indocyaningrün-Test**

#### 4.3.2. Postoperative Leberregeneration bei NAFLD und Non-NAFLD – Patienten

In Abbildung 20 ist die postoperative Leberregeneration mittels des LiMAX-Tests bei NAFLD-Patienten und Patienten ohne NAFLD dargestellt. Während der LiMAX-Wert bei den NAFLD-Patienten an Tag 3 auf dem gleichen Wert wie an Tag 1 liegt, zeigen die NAFLD-Patienten sogar eine leichte Verschlechterung der Leberfunktion, mit einem LiMAX-Wert ca.10 % unter dem Ausgangswert an Tag 1. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen an Tag 3 ( $P=0,88$ ). Die LiMAX-Werte sowohl von den Non-NAFLD-Patienten als auch von den NAFLD-Patienten steigen graduell zwischen Tag 3 und Tag 5 an, sodass die Non-NAFLD-Patienten einen Wert von 30 % über dem Ausgangswert und die NAFLD-Patienten einen Wert, knapp darunter, von 25 % erreichen. An Tag 5 sind die Werte zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ( $P=0,305$ ). Zwischen Tag 5 und Tag 10 steigen besonders die Werte der Non-NAFLD-Patienten stark an, auf einen Wert von 90 % gegenüber dem Ausgangswert. Die LiMAX-Werte der NAFLD-Patienten verbessern sich hingegen nur schwach auf 40 %. An

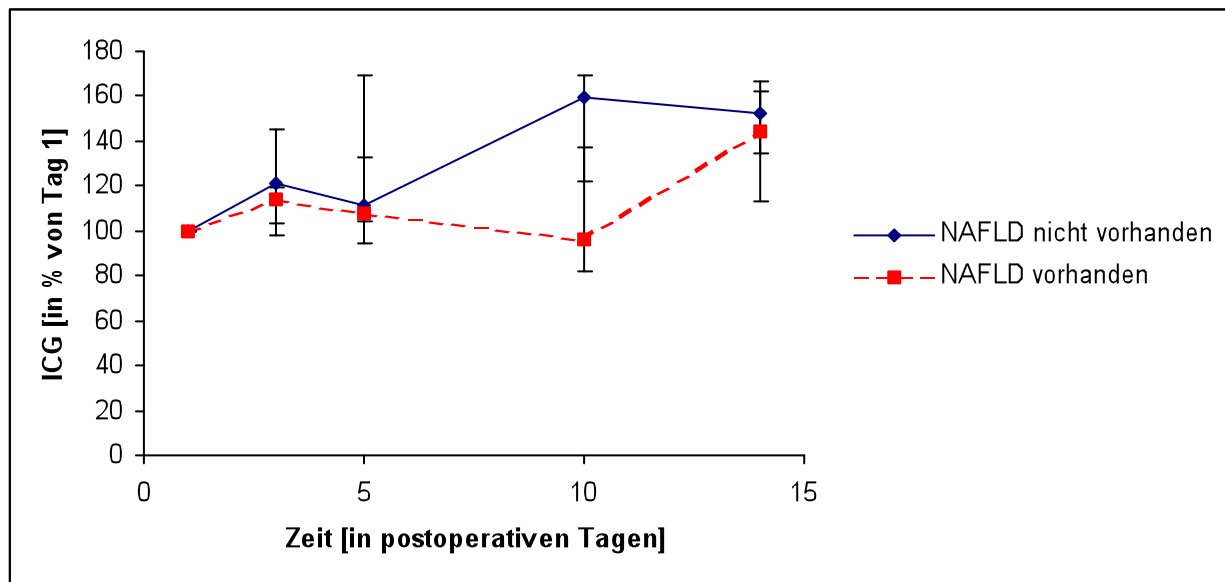
Tag 10 sind die Werte signifikant unterschiedlich ( $P=0,018$ ). Zwischen Tag 10 und 14 steigen die LiMAX-Werte der Non-NAFLD-Patienten weiterhin stark an auf ein Maximum an Tag 14 von 120 % über dem Ausgangswert von Tag 1. Die NAFLD-Patienten hingegen zeigen nur einen schwachen Anstieg mit einem maximalen Wert am Tag 14 von knapp 50 % über dem Ausgangswert. Die Werte sind an Tag 14 weiterhin signifikant unterschiedlich ( $P=0,028$ ). Insgesamt zeigt sich bei den Patienten ohne NAFLD eine bessere Erholung der Leberfunktion mit stärker und schneller ansteigenden LiMAX-Werten an den postoperativen Tagen 3-14.



**Abbildung 20: Leberregeneration anhand des LiMAX-Tests bei NAFLD und Non-NAFLD.** Dargestellt sind die Mediane und die jeweiligen Quartile der prozentual zum postoperativen Ausgangswert an Tag 1 berechneten LiMAX-Werte an den postoperativen Tagen 3, 5, 10 und 14. LiMAX-Test, maximal liver function capacity based on  $^{13}\text{C}$ -methacetin (MA) kinetics

Der postoperative Verlauf der Leberfunktion anhand der ICG-Testwerte wird in Abbildung 21 dargestellt. In beiden Gruppen steigen die ICG-Werte zwischen dem 1. und dem 3. Tag stark an. An Tag 3 ( $P=0,25$ ) und an Tag 5 ( $P=0,29$ ) sind die Werte der beiden Gruppen gleich. Von 20 % über dem Ausgangswert an Tag 3 fällt der ICG-Wert bei den Non-NAFLD-Patienten auf ca. 10 % an Tag 5. Der Wert bei den NAFLD-Patienten fällt leicht von ca. 15 % auf ebenfalls 10 % gegenüber dem Ausgangswert an Tag 5. Zwischen Tag 5 und 10 fällt der Wert der NAFLD-Patienten leicht, und erreicht an Tag 10 einen Wert minimal unter dem Ausgangswert. Der Wert der Non-NAFLD-Patienten steigt jedoch stark an und liegt an Tag 10 60 % über dem Ausgangspunkt. Die Werte sind an Tag 10 signifikant unterschiedlich ( $P=0,30$ ). Der Wert der Non-NAFLD-Patienten fällt zwischen Tag 10 und 14 nochmals minimal und liegt bei 55 % an Tag 14. Währenddessen steigt der Wert der NAFLD-Patienten wieder stark an, sodass er an Tag

14 knapp unter dem der Non-NAFLD-Patienten bei 45 % über dem Ausgangswert liegt. Es ergibt sich wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen an Tag 14 ( $P=0,831$ ). Insgesamt scheinen die Patienten ohne Fettlebererkrankung im Gegensatz zu denen mit NAFLD einen schnelleren Verlauf der Leberregeneration aufzuweisen. An Tag 14 jedoch erreichen die Gruppen einen nahezu übereinstimmenden ICG-Wert.

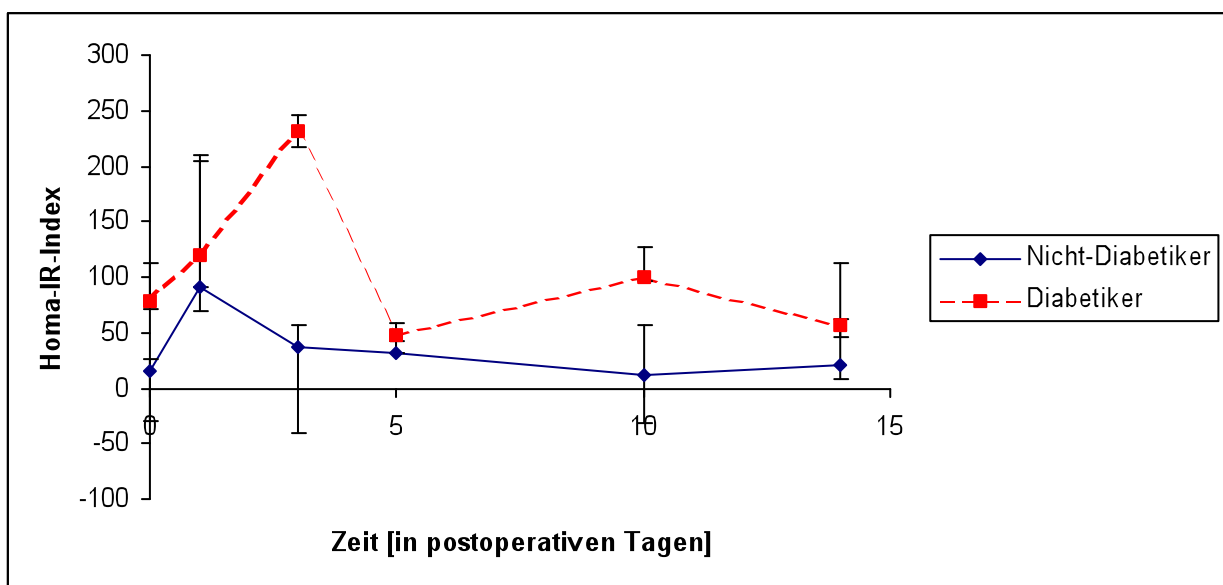


**Abbildung 21: Leberregeneration anhand des ICG-Tests bei NAFLD und Non-NAFLD.** Dargestellt sind die Mediane und die jeweiligen Quartile der prozentual zum postoperativen Ausgangswert an Tag 1 berechneten ICG-Werte an den postoperativen Tagen 3, 5, 10 und 14. ICG, Indocyaningrün.

#### 4.3.3. Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose im perioperativen Verlauf bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern, NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten

In Abbildung 22 ist der prä- und postoperative Verlauf des Homa-IR-Indexes bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern im Vergleich dargestellt. Es handelt sich um die Mediane der jeweiligen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt. Wie zu erwarten ist, weisen die Diabetiker insgesamt höhere Homa-IR-Index-Werte und damit eine höhere Gesamt-Insulinresistenz im Gegensatz zu den Nicht-Diabetikern auf. Zwischen dem Operationszeitpunkt und dem 1. postoperativen Tag steigen die Werte des Homa-IR-Indexes in beiden Gruppen stark an: So steigt der Wert bei Nicht-Diabetikern von ca. 20 auf fast 100 an; bei den Diabetikern steigt der Wert von 60 auf 120. Die Werte der Nicht-Diabetiker und Diabetiker sind zu diesem Zeitpunkt signifikant

unterschiedlich ( $P=0,001$ ). Zwischen Tag 1 und 3 findet sich eine starke Abnahme des Homa-IR-Indexes in der Gruppe der Nicht-Diabetiker auf 40, während bei den Diabetikern der Wert weiterhin extrem stark ansteigt und an Tag 3 sein Maximum im Verlauf mit einem Wert von 240 erreicht. Es zeigt sich dabei weder an Tag 1 ( $P=1,00$ ) noch an Tag 3 ( $P=0,405$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. An Tag 5 findet sich ein minimaler weiterer Abfall des Wertes der Nicht-Diabetiker. Der Wert der Diabetiker fällt extrem stark ab und liegt bei 50, nur noch minimal über dem der Nicht-Diabetiker, um dann aber wieder mäßig anzusteigen auf einen Wert von 100 an Tag 10. Der Wert der Nicht-Diabetiker hingegen fällt langsam weiter ab zwischen Tag 5 und 10, sodass er an Tag 10 beim präoperativen Ausgangswert von 20 liegt. Zwischen Tag 10 und Tag 14 steigt der Wert der Nicht-Diabetiker noch minimal an, während der Wert der Diabetiker wieder mäßig sinkt und Tag 14 mit 55 leicht über dem der Nicht-Diabetiker von 25 liegt. Auch an Tag 5 ( $P=0,153$ ), an Tag 10 ( $P=0,112$ ) und an Tag 14 ( $P=0,424$ ) zeigen sich keine Signifikanzen bezüglich des Unterschieds zwischen den Gruppen.

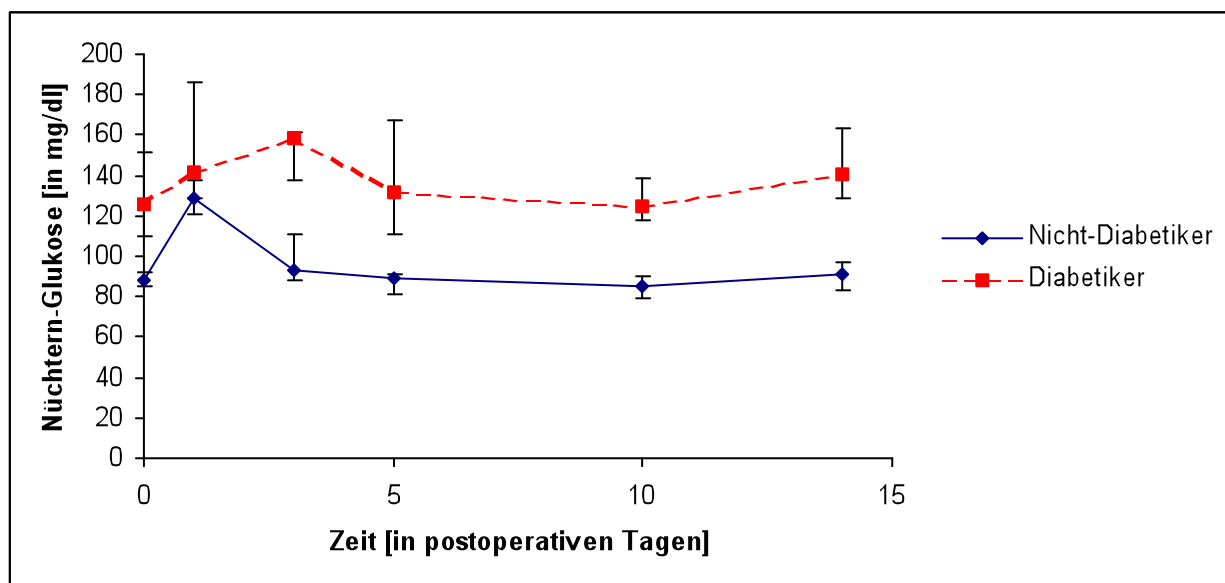


**Abbildung 22: HOMA-IR-Index als Maßstab der Gesamt-Insulinresistenz an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern, Tag 0=präoperativ. Dargestellt sind die Mediane und die Quartile der jeweiligen Gruppen. HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance**

Abbildung 23 zeigt den prä- und postoperativen Verlauf der Mediane der Nüchtern-Glukose-Werte zum jeweiligen Zeitpunkt bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern. Den Erwartungen entsprechend weisen die Diabetiker weitaus höhere Nüchtern-Glukose-Werte als die Nicht-Diabetiker auf. In beiden Gruppen zeigt sich eine kurzfristige Zunahme der Glukose-Spiegel unmittelbar postoperativ an Tag 1, bei den Diabetikern auf einen Wert von 140 mg/dl und bei



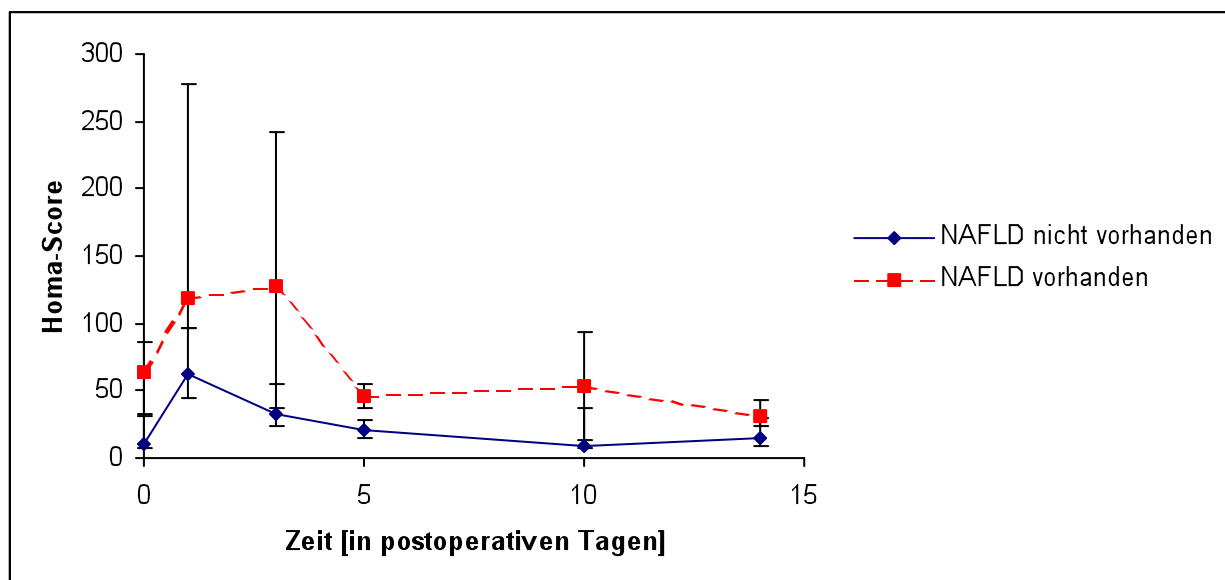
den Nicht-Diabetikern auf einen Wert von 130 mg/dl. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist dabei nicht signifikant ( $P=0,52$ ). Bei den Diabetikern steigt der Wert kontinuierlich zwischen Tag 1 und Tag 3 und erreicht dort einen Peak von 160 mg/dl. Währenddessen fällt der Glukose-Wert der Nicht-Diabetiker zwischen Tag 1 und 3 stark ab auf ca. 95 mg/dl, einem knapp über dem präoperativen Ausgangspunkt liegenden Wert. An Tag 3 zeigt sich weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $P=0,214$ ). Zwischen Tag 3 und 10 sinkt der Wert der Nicht-Diabetiker weiter leicht und erreicht an Tag 10 den präoperativen Ausgangswert von etwa 90 mg/dl. Die Glukose-Werte der Diabetiker hingegen sinken stark zwischen Tag 3 und Tag 5, an dem sie bei ca. 135 mg/dl liegt. Der Wert der Diabetiker sinkt weiter leicht zwischen Tag 5 und 10 auf 125 mg/dl. Während an Tag 5 ( $P=0,095$ ) und an Tag 14 ( $P=0,135$ ) sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergeben, ist einzig an Tag 10 der Unterschied signifikant ( $P=0,039$ ). Beide Gruppen weisen jeweils nochmals einen leichten Anstieg der Glukose-Werte zwischen Tag 10 und 14 auf, sodass die Diabetiker an Tag 14 einen Wert von 140 mg/dl und die Nicht-Diabetiker einen Wert von 95 mg/dl erreichen. Die Diabetiker liegen damit weiter deutlich über dem präoperativen Ausgangswert von 125 mg/dl. Die Nicht-Diabetiker erreichen fast wieder den präoperativen Ausgangswert von 90 mg/dl.



**Abbildung 23: Nüchtern-Glukose an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern, Tag 0=präoperativ. Dargestellt sind die Mediane und die Quartile der jeweiligen Gruppen.**

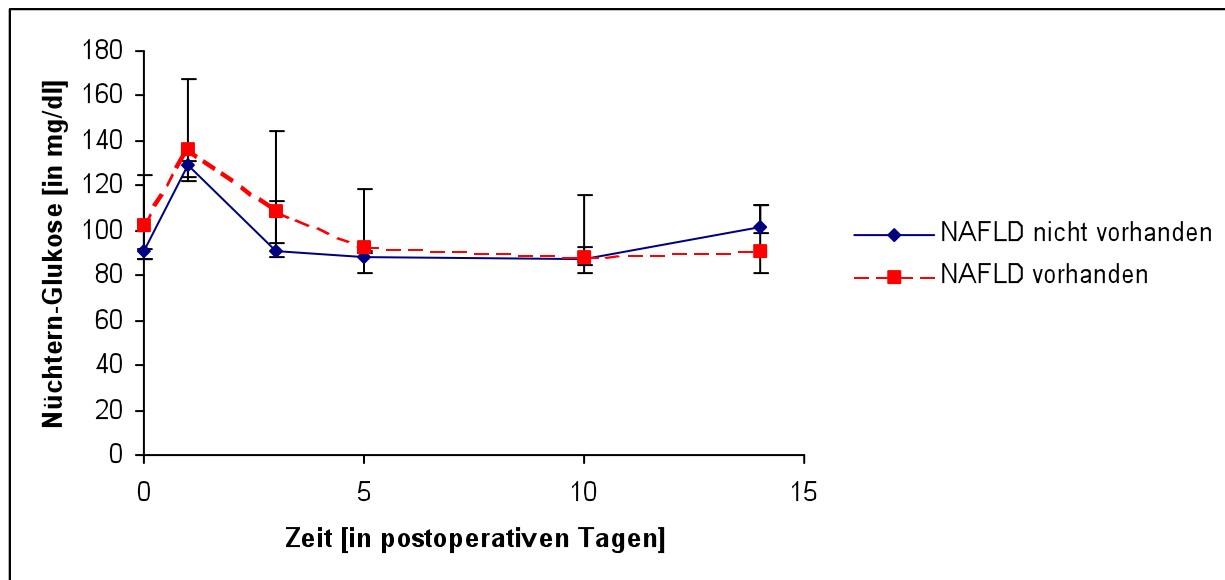
In Abbildung 24 wird der postoperative Verlauf des Homa-IR-Indexes bei NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten dargestellt. Es handelt sich um die Mediane der jeweiligen Gruppen zum

jeweiligen Zeitpunkt. Die NAFLD-Patienten weisen bereits präoperativ mit einem Wert von 60 einen weit höheren Ausgangswert als die Non-NAFLD-Patienten mit einem Wert von 10 auf. Zwischen dem Operationszeitpunkt und dem 1. postoperativen Tag steigt der Homa-IR-Index in beiden Gruppen stark an, auf einen Wert von 125 bei den NAFLD-Patienten, und auf einen Wert von 60 bei den Non-NAFLD-Patienten. Der Wert an Tag 1 ist signifikant unterschiedlich ( $P=0,047$ ). An Tag 3 weisen die Non-NAFLD-Patienten einen minimal erhöhten Wert von 130 auf, während bei den Non-NAFLD-Patienten der Wert stark sinkt auf 30 ( $P=0,214$ ). Bei den NAFLD-Patienten zeigt sich ein starker Abfall des Indexes zwischen Tag 3 und 5, sodass sie an Tag 5 einen Wert von 50 erreichen ( $P=0,035$ ). Bei den Non-NAFLD-Patienten ist zugleich nur ein schwacher Abfall zu finden, mit einem Wert von 25 an Tag 5. Ein leichter, minimaler Anstieg ist bei den NAFLD-Patienten zwischen Tag 5 und Tag 10 zu sehen, gefolgt von wiederum einem stärkeren Abfall des Indexes, sodass der Wert an Tag 14 bei 30 liegt. Bei den Non-NAFLD-Patienten zeigt sich ein konträrer Verlauf: zwischen Tag 5 und 10 fällt der Index leicht ab, um dann wieder minimal anzusteigen, und erreicht an Tag 14 einen Wert von 20, leicht unter dem der NAFLD-Patienten. Die Werte sind an Tag 10 ( $P=0,158$ ) und 14 ( $P=0,391$ ) nicht signifikant unterschiedlich. Insgesamt weisen die NAFLD-Patienten einen deutlich höheren Homa-IR-Index im ganzen postoperativen Verlauf auf und es zeigen sich insbesondere an den postoperativen Tagen 1 und 3 besonders hohe Indexe, die sich weniger schnell erholen als bei den Non-NAFLD-Patienten.



**Abbildung 24:** HOMA-IR-Index als Maßstab der Gesamt-Insulinresistenz an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 bei NAFLD und Non-NAFLD, Tag 0=präoperativ. Dargestellt sind die Mediane und die Quartile der jeweiligen Gruppen. HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance

In Abbildung 25 findet sich die Darstellung der Nüchtern-Glukose im postoperativen Verlauf bei NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten. Bei den NAFLD-Patienten liegt der präoperative Ausgangswert mit 105 mg/dl über dem der Non-NAFLD-Patienten von 90 mg/dl ( $P=0,252$ ). Sowohl bei NAFLD- als auch bei Non-NAFLD-Patienten steigen die Werte zwischen Operationszeitpunkt und dem 1. postoperativen Tag stark an: auf fast 140 mg/dl bei den NAFLD-Patienten und auf 130 mg/dl bei den Non-NAFLD-Patienten ( $P=0,291$ ). In beiden Gruppen fallen die Werte zwischen Tag 1 und Tag 3 stark ab: die NAFLD-Patienten weisen einen Wert von 115 mg/dl an Tag 3 auf, während bei den Non-NAFLD-Patienten die Werte an Tag 3 wieder den präoperativen Ausgangspunkt von 90 mg/dl erreichen ( $P=0,197$ ). Während bei den Non-NAFLD-Patienten die Glukose-Werte von Tag 3 bis Tag 10 konstant auf ca. 90 mg/dl bleiben, fallen die Werte der NAFLD-Patienten langsam ab und erreichen an Tag 10 ebenfalls einen Wert von 90 mg/dl. Dieser Wert ändert sich bis an Tag 14 kaum und steigt nur minimal an. Bei den Non-NAFLD-Patienten steigt der Wert leicht an und liegt an Tag 14 bei 100 mg/dl. An Tag 5 ( $P=0,082$ ), Tag 10 ( $P=0,557$ ) und Tag 14 ( $P=0,392$ ) zeigen sich jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Insgesamt weisen die NAFLD-Patienten leicht höhere Glukose-Werte im postoperativen Verlauf auf. Bei beiden Gruppen zeigt sich ein starker Anstieg der Werte am 1. postoperativen Tag und in beiden Gruppen normalisieren sich die Werte zwischen dem 1. und dem 5. postoperativen Tag und bleiben dann zwischen Tag 5 und 14 relativ konstant.



**Abbildung 25: Nüchtern-Glukose an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 bei NAFLD und Non-NAFLD, Tag 0=präoperativ. Dargestellt sind die Mediane und die Quartile der jeweiligen Gruppen.**

---

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Darstellung der hepatozellulären Transskriptionsfaktoren

Die in dieser Studie untersuchten Patientengruppen entsprechen sehr gut dem angestrebten Kollektiv: eine Gruppe stoffwechselgesunder Patienten ohne NAFLD wird einer Gruppe Fettleber-erkrankter Patienten, die die Basischarakteristika des Metabolischen Syndroms aufweisen, gegenübergestellt.

Anhand einiger Parameter des Metabolischen Syndroms nach NCEP:ATPIII (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III) 2001 lassen sich entscheidende Unterschiede zwischen den Gruppen aufzeigen. Zwar findet sich bei den NAFLD-Patienten im Vergleich zu den Non-NAFLD-Patienten kein signifikanter Unterschied des systolischen und diastolischen Blutdrucks. Jedoch der zentrale, pathophysiologische Einflussfaktor des Metabolischen Syndroms, die Adipositas, zeigt sich erwartungsgemäß vermehrt in der Gruppe der NAFLD-Patienten: Die NAFLD-Patienten weisen einen signifikant höheren BMI als die Non-NAFLD-Patienten auf, haben also eine höhere Körpermasse. Ebenso erweist sich der Körperfettgehalt bei den NAFLD-Patienten als leicht höher als bei den Nicht-NAFLD-Patienten. Die höhere Körpermasse begründet sich somit in dem höheren Körperfettgehalt. Die NAFLD-Patienten weisen zudem einen größeren Taillenumfang als die Non-NAFLD-Patienten auf, was eine besonders abdominelle Speicherung des überschüssigen Körperfetts anzeigt. Aus der insbesondere abdominellen bzw. viszeralen Fettspeicherung resultiert die Kern-Komponente des Metabolischen Syndroms, die Insulinresistenz: die Werte des HOMA-IR-Index (homeostasis model assessment of insulin resistance) als Maßstab für die Gesamt-Insulinresistenz zeigen eine deutlich höhere Insulinresistenz bei NAFLD-Patienten als bei Non-NAFLD Patienten auf. Die NAFLD-Patienten weisen also insgesamt die typische pathophysiologische Konstellation des Metabolischen Syndroms auf: ein hoher BMI führt zu Insulinresistenz und einem hohen HOMA-IR-Index, wobei insbesondere ein weiter Taillenumfang, d.h. die vizerele Adipositas, die durch vermehrten portalen Zufluss freier Fettsäuren die hepatische Insulinresistenz fördert, welche letztlich die Gesamtinsulinresistenz weiter intensiviert. Eine exzessive hepatische Fettakkumulation und eine hohe hepatische Insulinresistenz haben eine ungebremsste hepatische VLDL-Triglyzerid-Produktion zur Folge, was zu Hypertriglyzeridämie führt. Entsprechend zeigt sich bei den NAFLD-Patienten ein signifikant höherer Triglyzerid-Spiegel (mmol/l) als bei den Non-NAFLD Patienten.

---

Studien, u.a. von Abrams et al, konnten zeigen, dass die große Mehrheit der NAFLD-Fälle sich in Assoziation mit Adipositas und dem Metabolischen Syndrom manifestiert.<sup>58,59</sup> Wie die Zusammenschau der Literatur zeigt, gilt die Fettleber gilt als hepatische Manifestation von Metabolischem Syndrom und Adipositas.<sup>2,7,14</sup> Dies entspricht insofern sehr gut den Charakteristika der Stoffwechselsituation der NAFLD-Patienten dieser Studie.

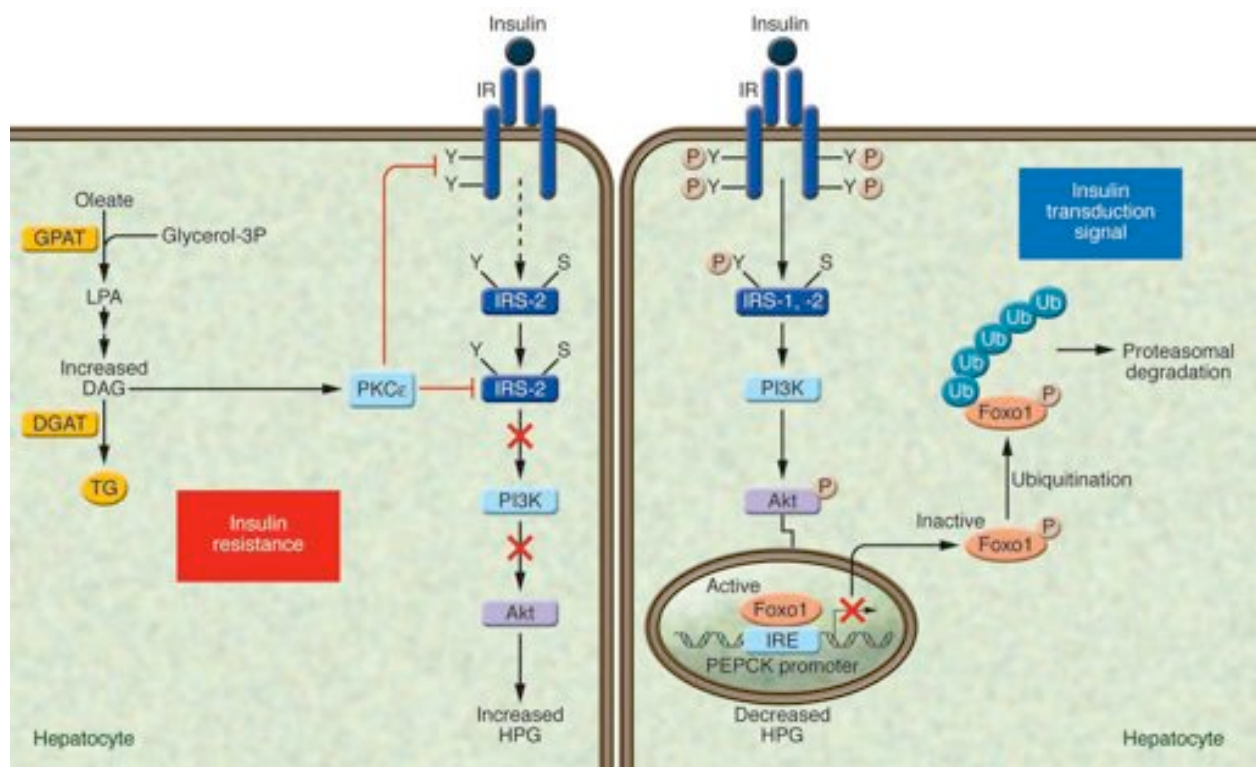
Weiterhin sind die hepatischen Laborparameter bei den Fettleber-Erkrankten gegenüber denen bei Non-NAFLD-Patienten erhöht. Insbesondere die ALT (Alanin Aminotransferase) zeigt signifikant höhere Werte ( $p=0,043$ ) bei NAFLD- gegenüber den Non-NAFLD-Patienten. Dies ist kongruent mit Befunden von Marchesini et al, die zeigen konnten, dass ein hoher BMI mit einer erhöhten Prävalenz an Fettlebererkrankungen und einer Erhöhung von Leberenzymen einhergeht. Manifeste Adipositas bedeutet ein 15fach erhöhtes Risiko, an Steatosis hepatis zu erkranken und zugleich ein 2-3fach erhöhtes Risiko eines Anstiegs von Leberenzymen wie ALT.<sup>60</sup>

Insgesamt konnte durch die Charakterisierung der Patienten-Gruppen die These der Fettleber als hepatische Manifestation von Metabolischen Syndrom und Adipositas, sowie die einhergehende Leberenzymhöhung, bestätigt werden.

### **5.1.1. FOXO1**

Bezüglich FOXO1 wäre beim NAFLD-Patienten eine Insulinresistenz-bedingte, insuffiziente Hemmung der FOXO1-Aktivität im Nukleus mit pathologisch überschießender Glukoneogenese plausibel. Die bisherigen, tierexperimentell erworbenen Kenntnisse suggerieren folgendes Modell: Wie Abbildung 25 zeigt, führt Insulin physiologischerweise bei Insulinsensitivität durch Andocken an den hepatozellulären Insulinrezeptor über Phosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS), anschließender Aktivierung der Protein-Kinase-B (Akt) zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO1, was zur Ausschleusung von FOXO1 aus dem Nukleus führt und die Ubiquitynylierung und den proteosomalen Abbau von FOXO1 zur Folge hat. Auf diese Weise sinkt die nukleäre Konzentration von FOXO1 und die von FOXO1 geförderte Transskription und Expression der rate limiting Glukoneogenese-Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) nimmt ab. Letztlich hemmt Insulin also auf diesem Wege die Glukoneogenese und senkt den Blutglukose-Spiegel.<sup>61</sup> Die

Mechanismen, die den FOXO1-Signalweg bei Insulinresistenz außer Funktion setzen, sind bisher weitgehend unklar. Eine Hypothese ist, wie Abbildung 26 zeigt, dass eine zunehmende Fettakkumulation in der Leber zur Insulinresistenz führt. Demnach führen exzessiv gespeicherte Lipid-Metabolite wie Diacylglycerol (DAG) zur Aktivierung der Protein-Kinase  $\epsilon$  (PK $\epsilon$ ), welche einerseits an den Insulinrezeptor bindet und dessen Tyrosin-Kinase-Aktivität unterbindet oder andererseits auch die Phosphorylierung von IRS-2 hemmt. Daher kann bei Insulinresistenz aufgrund unzureichender Insulinwirkung die Aktivität des Transskriptionsfaktors FOXO1 nicht adäquat supprimiert werden. So ist beim insulinresistenten Individuum trotz Hyperglykämie und Hyperinsulinämie zu erwarten, dass sich FOXO1 in erhöhter Konzentration im Nukleus findet und ungebremst die Aktivität der Glukoneogenese-Enzyme fördert.<sup>61</sup>



**Abbildung 26:** Rechts: Das Andocken von Insulin an den insulinären Rezeptor hat bei adäquater Signalübertragung über Phosphorylierung der Tyrosin-Reste der IRS (Insulin Rezeptor Substrate), Aktivierung der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und Phosphorylierung von Akt (Protein-Kinase-B) die Phosphorylierung von FOXO1 zur Folge. Dies führt durch Ausschleusung aus dem Nukleus, Ubiquitinylierung und proteosomaler Degradation zur Senkung der nukleären FOXO1 Konzentration. Infolgedessen findet weniger Glukoneogenese statt und der Blutglukosespiegel sinkt. Links: Exzessiv akkumulierte Lipid-Metabolite wie Diacylglycerol (DAG) aktivieren die Protein-Kinase  $\epsilon$  (PK $\epsilon$ ), welche die Tyrosin-Kinase-Aktivität des Insulinrezeptors unterbindet, sowie die Phosphorylierung von IRS-2 hemmt. Daher wird im experimentellen Modell bei Insulinresistenz die Aktivität des Transskriptionsfaktors FOXO1 nur unzureichend supprimiert.<sup>61</sup>



---

Bei der Anwendung dieser tierexperimentell erhobenen Kenntnisse auf die Ergebnisse in der vorliegenden Studie ist hier zu bedenken, dass das dargestellte Modell vor allem der postprandialen Stoffwechselsituation entspricht: trotz postprandial bedingter Hyperglykämie und Hyperinsulinämie herrscht bei Insulinresistenz eine hohe nukleäre FOXO1-Konzentration und eine anhaltende hepatische Glukoneogenese. Die Patienten der vorliegenden Studie jedoch befanden sich operations-bedingt zum Zeitpunkt der Lebergewebsentnahme in einem mindestens 10-stündigen Fastenzustand. Es konnten daher keinesfalls Lebergewebsentnahmen in einer postprandialen Stoffwechselsituation erfolgen. Die in einer postprandialen bzw. anabolen Stoffwechselsituation eventuell noch stärker hervortretenden Unterschiede in der FOXO1-Aktivität zwischen NAFLD und Non-NAFLD-Patienten konnten in der vorliegenden Studie daher nicht untersucht werden.

Bei den Patienten dieser Studie zeigte sich weder bezüglich der zytosolischen noch der nukleären Konzentration von FOXO1 ein signifikanter Unterschied zwischen den NAFLD und Non-NAFLD-Patienten. Die These der Insulinresistenz-bedingten unzureichenden Hemmung der Aktivität von FOXO1 und das somit vermehrte Vorhandensein von FOXO1 im Nukleus konnte nicht bestätigt werden. Wichtig hervorzuheben jedoch ist, dass es in dieser Studie nur eine geringe Stichprobe an Patienten beobachtet wurde, was zu einer gewissen Verzerrung und Verfälschung der eigentlichen Zusammenhänge führen könnte. So sind unter den 12 Non-NAFLD-Patienten immerhin 3 Patienten mit einer Stoffwechselstörung vorhanden, nämlich 2 Patienten mit Metabolischem Syndrom und 1 Patient mit Typ 2 Diabetes mellitus. Bei diesen Patienten könnte eine hohe nukleäre FOXO1-Konzentrationen vorgelegen haben, was die Ergebnisse der Non-NAFLD-Patienten verzerrt haben kann. Andersherum sind unter den NAFLD-Patienten möglicherweise ebensolche Ausreißer vorhanden, d.h. Patienten, die zwar von NAFLD betroffen sind, dabei jedoch einen weitgehend ungestörten Glukose-/Lipidstoffwechsel und somit geringe nukleäre FOXO1-Konzentrationen aufweisen. Derartige Einzelfälle können sich im Rahmen einer geringen Stichprobenzahl nachhaltig auf die Ergebnisse auswirken. Bei einer größeren Patientenanzahl würden sich derart verfälschende Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit nivellieren.

Der Erforschung der Aktivität von FOXO1 in der menschlichen Leber wurde auch von Valenti et al 2008 nachgegangen.<sup>62</sup> Ausgangspunkt dieser Studie war die These, dass NAFLD und insbesondere die inflammatorischen Vorgänge bei NASH (non-alcoholic steatohepatitis) zur hepatischen Insulinresistenz führen. Es wurden die Leberbiopsate von 26 Patienten mit NASH,

---

28 Patienten mit reiner Fettleber und 14 Patienten mit gesundem Lebergewebe untersucht. Nach Zelllyse der Gewebeproben konnte durch Western-Immunoblotting eine höhere Expression der glukoneogenetischen Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) bei NASH im Vergleich zur gesunden Leber, und eine höhere Expression der glukoneogenetischen Glukose-6-Phosphatase Catalytic Subunit (G6PC) bei NASH im Vergleich zur gesunden Leber und zur reinen Steatosis hepatis gezeigt werden. Die Expression von PEPCK, jedoch nicht die von G6PC, konnte signifikant mit der Gesamt-Insulinresistenz anhand des Homa-IR-Indexes korreliert werden. Zudem konnte eine 6,3-fach höhere mRNA-Expression des FOXO1-Proteins bei NASH im Vergleich zur gesunden Leber und eine 3,7-fach höhere mRNA-Expression von FOXO1 bei NASH im Vergleich zur reinen Steatosis hepatis nachgewiesen werden. Die mittels Western-Immunoblot ermittelte FOXO1-Proteinkonzentration war bei NAFLD-Patienten, besonders bei solchen mit NASH, im Vergleich zur gesunden Leber signifikant erhöht. Um die subzelluläre Lokalisation einzuschätzen, wurde zusätzlich eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt, wobei FOXO1 vermehrt nukleär bei NASH, jedoch eher zytoplasmatisch bei reiner Steatosis hepatis und nur minimal im Fall von gesundem Lebergewebe nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse von Valenti et al entsprechen somit der These, dass bei Fettleber eine erhöhte nukleäre FOXO1-Aktivität und dadurch eine erhöhte Aktivität der Glukoneogenese-Enzyme PEPCK und G6PC herrschen. Die Korrelation der PEPCK-Aktivität mit dem Homa-IR-Index passt zu dem Modell der insulinresistenz-bedingten ungebremsten FOXO1-Aktivität. Im Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnten Valenti et al also deutlichere Befunde erlangen und die Unterschiede in der FOXO1-Aktivität zwischen NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten aufzeigen. Gründe hierfür mögen sein, dass das Kollektiv der Valenti-Studie mit einer hohen Anzahl an NASH-Patienten deutlich extremere Phänotypen in höherer Fallzahl, sowie insgesamt eine höhere Probandenzahl bietet, was zu eindeutiger nachweisbaren Unterschieden geführt haben mag. Zudem ist die metabolische Situation deutlich homogener in den jeweiligen Subgruppen, d.h. beispielsweise das Metabolische Syndrom oder eine diabetische Stoffwechsellage sind nur in den NAFLD/NASH Subgruppen zu finden, nicht in der Gruppe der Non-NAFLD-Patienten. Demgegenüber ist das Kollektiv der vorliegenden Studie heterogener: auch unter den Non-NAFLD-Patienten finden sich Patienten mit Störungen des Glukose- und Lipidmetabolismus.

Weiterhin ist bei den Ergebnissen von Valenti et al jedoch zu bedenken, dass die Erfassung der FOXO1-Proteine und der mRNA von FOXO1 zwar eine gewisse quantitative Aussage über das



---

Vorhandensein von FOXO1 im Hepatozyten ermöglicht, jedoch keinerlei Schlussfolgerung über die subzelluläre Lokalisation und die entsprechende nukleäre Aktivität von FOXO1 erlaubt. Bei der immunhistochemischen Untersuchung mag FOXO1 scheinbar diffus nukleär bei NASH zu finden sein – dies ist jedoch ein weitgehend subjektiver Befund. Zudem erlaubt die Immunhistochemie immer nur qualitative Aussagen, nämlich, dass FOXO1 nukleär vorhanden ist, jedoch keinerlei Quantifizierung über die subzelluläre Verteilung. Demgegenüber bietet die Methodik der vorliegenden Studie durch Separation von Nuklei und Zytoplasmata und anschließendem Western-Immunoblotting eine grundsätzlich weit validere Quantifizierung der subzellulären Verteilung der Proteine.

### **5.1.2. SREBP-1c**

Wie bei FOXO1, so wären auch bezüglich des die Lipogenese fördernden Transkriptionsfaktors SREBP-1c Unterschiede in der Expression bei NAFLD- gegenüber Non-NAFLD-Patienten zu erwarten gewesen.

In der Zusammenschau der bisherigen, durch tierexperimentelle Studien *in vivo* und *in vitro* erlangten Kenntnisse über den SREBP-1c-Signalweg stellen Foufelle et al folgendes Modell dar<sup>63</sup>: SREBP-1c wird durch Insulin aktiviert, vermutlich ähnlich wie FOXO1, vermittelt durch Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS1), Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3-K) und Protein-Kinase-B (Akt). Dadurch wird mit Hilfe des Transskriptionsfaktors Liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) die Transkription des SREBP-1c-Gens gefördert. Zudem erfolgt eine vermehrte proteolytische Umwandlung des membrangebundenen Vorläuferproteins in die nukleär aktive Form. Letzteres wird vermutlich nicht durch Insulin hervorgerufen, sondern ist ein konstitutiver, nicht-regulierter Vorgang.<sup>63</sup> Weiterhin ist umstritten, ob zusätzlich eine Aktivierung von SREBP-1c direkt durch Hyperglykämie erfolgt.<sup>63,64</sup> SREBP-1c fördert die hepatische Fettsynthese durch die Aktivierung der Gene von Lipogenese-Enzymen wie Acetyl-CoA Carboxylase (ACAC) und Fatty acid synthase (FASN).

Brown et al konnten in einer Studie an Mäusen mit Typ 2 Diabetes mellitus zeigen, dass der Signalweg von SREBP-1c bei diabetischer Stoffwechsellage nicht der Insulinresistenz unterliegt. Während der die Glukoneogenese fördernde FOXO1-Signalweg bei Insulinresistenz defizitär wird, funktioniert der die Lipogenese fördernde Signalweg trotz Insulinresistenz unvermindert. So kann bei Insulinresistenz die Hyperglykämie-bedingte langfristige Hyperinsulinämie sogar verstärkt SREBP-1c aktivieren. Daher beinhaltet die klassische Konstellation bei Patienten mit

---

Typ 2 Diabetes mellitus oder Metabolischem Syndrom außer einer Hyperglykämie und einer Hyperinsulinämie meist auch eine Hypertriglyzeridämie.

Im Gegenzug untersuchten Michael et al die hepatischen Signalwege anhand der sogenannten „LIRKO“ („liver-specific insulin receptor knockout“)-Mäuse. Das Nicht-Vorhandensein des hepatischen Insulinrezeptors in diesen Mäusen führte zu totaler hepatischer Insulinresistenz mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie.<sup>65</sup> Biddinger et al konnten zeigen, dass LIRKO-Mäuse zudem niedrige Triglyzeridspiegel und keine Akkumulation von hepatischen Triglyzeriden aufweisen.<sup>66</sup> Dies steht im Gegensatz zu der bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus oder Metabolischen Syndrom erhaltenen Insulinsensitivität des SREBP-1c-Weges. Der FOXO1- und der SREBP-1c-Signalweg haben beide den gleichen Ausgangspunkt, nämlich das Andocken von Insulin an den Insulinrezeptor, weshalb bei LIRKO-Mäusen beide Signalwege gleichermaßen dysfunktional werden. Das Experiment mit den LIRKO-Mäusen führt somit eindrücklich vor Augen, dass distal des Insulinrezeptors die Signalwege sich an einem gewissen Punkt differenzieren, was bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus oder Metabolischem Syndrom die Insulinresistenz des FOXO1-Weges und zugleich die erhaltene Insulinsensitivität des SREBP-1c Weges begründet.<sup>67</sup>

Dementsprechend müsste man erwarten, dass bei an Fettleber-erkrankten Patienten mit Insulinresistenz typischerweise chronische Hyperinsulinämie zu einer verstärkten SREBP-1c-Aktivität im Nukleus und einer vermehrten *de novo* Lipogenese führen. Selbst im Nüchternzustand wäre daher bei Insulinresistenz eine verstärkte SREBP-1c Aktivität zu erwarten. Die in diesen pathophysiologischen Zusammenhang passenden NAFLD-Patienten dieser Studie wiesen jedoch keine erhöhten nukleären SREBP-1c Konzentrationen auf. Bezüglich der nukleären und zytosolischen SREBP-1c Konzentrationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten.

Auch hier ist darauf hinzuweisen, dass die Interpretation der Ergebnisse durch die geringe Größe des Kollektivs eingeschränkt ist. Analog zu den Ergebnissen für FOXO1 mag es eine Verzerrung und Verfälschung der Zusammenhänge durch einzelne Patienten gegeben haben.

Hervorzuheben ist jedoch, dass bei der Bestimmung der Quotienten der Konzentrationen von FOXO1 und SREBP-1c zu den jeweiligen nukleären und zytosolischen Referenzproteinen die FOXO1-Quotienten sich im Nukleus deutlich höher als im Zytosol erwiesen. Ebenso zeigten sich

---

die SREBP-1c Quotienten im Zytosol deutlich höher als im Nukleus. Unter der Annahme einer konstant hohen Expression der Referenzproteine mögen diese Ergebnisse eine erhöhte FOXO1-Konzentration im Nukleus, sowie eine erhöhte SREBP-1c Konzentration im Zytosol suggerieren. Dies ist kongruent mit der Tatsache, dass sich alle Patienten im Nüchternzustand befanden. Letzterer bedeutet eine katabole Stoffwechsellage mit verstärkter Glukoneogenese und Hemmung anaboler Vorgänge wie der Lipogenese.

Anhand dieser Ergebnisse kann somit die Manifestation des Fastenzustandes auf der Ebene der hepatozellulären Signalwege nachvollzogen werden.

Dem Zusammenhang zwischen der Aktivität von SREBP-1c und der Genese einer Fettleber wurde bereits in weiteren Studien am Menschen nachgegangen. So untersuchten Yasui et al 2009 die Beziehung von Steatosis hepatis und der Expression der lipogenetischer Schlüssel-Transkriptionsfaktoren wie SREBP-1c anhand von Lebergewebsbiopsaten Hepatitis C infizierter Patienten.<sup>68</sup> Ausgangspunkt der Studie war die Erforschung einer Assoziation von Hepatitis C und Steatosis hepatis. Es wurden 100 Hepatitis C-infizierte Patienten ohne metabolische Kofaktoren wie Adipositas oder Diabetes untersucht. 43 dieser Patienten wiesen eine Steatosis hepatis auf. Es konnte kein Unterschied in der m-RNA-Expression von SREBP-1c zwischen den NAFLD-Patienten und den Non-NAFLD-Patienten festgestellt werden. Ebenso konnte in der immunhistochemischen Untersuchung keine Assoziation zwischen dem Vorhandensein des SREBP-1c Proteins und Steatosis hepatis gefunden werden. Die Ergebnisse von Yasui et al stehen insofern in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie, da sie ebenfalls keine unterschiedliche Expression von SREBP-1c zwischen NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten suggerieren. Eine direkte Übertragung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Yasui-Studie zu der vorliegenden Studie ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da Zielsetzung und Hintergrund anders sind. Während Yasui et al ausschließlich Hepatitis C-Patienten untersuchten, um den möglichen Einfluss einer Hepatitis C-Infektion auf die Expression von SREBP-1c zu ergründen, wurden derartige zusätzliche Einflussfaktoren in der vorliegenden Studie bewusst ausgeschlossen. Yasui et al hingegen schlossen tendenziell insulinresistente Patienten mit metabolischen Kofaktoren wie Diabetes, Adipositas oder Metabolisches Syndrom aus. In der vorliegenden Studie jedoch ging es in erster Linie darum, an genau solchen Patienten NAFLD im Rahmen von Insulinresistenz zu erforschen.

---

Zu bedenken ist weiterhin, dass Yasui et al nur eine Analyse der m-RNA-Expression durchführten, was zwar auf die Expression von SREBP-1c schließen lässt, jedoch keine Schlussfolgerung über die tatsächliche nukleäre Aktivität von SREBP-1c ermöglicht. Auch die immunhistochemische Untersuchung zur subzellulären Lokalisation erlaubt lediglich eine qualitative Aussage über die SREBP-1c Lokalisation, jedoch keinerlei Rückschluss über quantitative subzelluläre Verteilung.

Higuchi et al untersuchten 2008 ebenfalls den Zusammenhang von lipogenetischen Transkriptionsfaktoren wie SREBP-1c und der Genese von NAFLD anhand von menschlichen Lebergewebsbiopsaten.<sup>69</sup> Die mRNA-Analyse zur Quantifizierung der Expression u.a. von SREBP-1c und von Liver-X-Rezeptor $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), dem transkriptionalen Aktivator von SREBP-1c, wurde an 22 Patienten mit NAFLD und 10 Patienten ohne NAFLD durchgeführt. Es ergab sich eine 4fach höhere Expression des LXR $\alpha$  bei NAFLD-Patienten im Vergleich zu Non-NAFLD-Patienten. Die erhöhte LXR $\alpha$ -Expression der NAFLD-Patienten korrelierte zudem signifikant mit einer erhöhten Expression von SREBP-1c. Es wurde schlussgefolgert, dass LXR $\alpha$  die Lipogenese durch Aktivierung von SREBP-1c fördert und dies den zentralen Mechanismus in der Genese der NAFLD darstellt. Diese Ergebnisse entsprechen den bisher tierexperimentell erhobenen Vorstellungen über die Genese von NAFLD. Es erfolgte jedoch auch hier lediglich eine mRNA-Analyse und keinerlei subzelluläre Quantifizierung der SREBP-1c-Aktivität. Die Tatsache, dass LXR $\alpha$  und SREBP-1c in NAFLD-Patienten offenbar vermehrt exprimiert werden, kann nicht als direkter Nachweis einer erhöhten nukleären Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren dienen. Die Methodik der vorliegende Studie in Form von Separation der Nuklei und Zytoplasmata mit anschließendem Western-Immunoblotting stellt hingegen eine weit zuverlässigere Technik zur subzellulären Quantifizierung der Aktivität von SREBP-1c dar.

### **5.1.3. Einschränkungen der Studie**

Zu den einschränkenden Faktoren dieser Studie gehört in erster Linie die Tatsache, dass es sich - bezüglich der Erfassung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren - lediglich um eine Querschnittsstudie handelt: es wurden nur zu einem einzigen Zeitpunkt und nicht im zeitlichen Verlauf Daten erhoben. Entsprechend dem klinischen Rahmen einer intraoperativen

---

Probenentnahme war es selbstverständlich unmöglich, weitere Entnahmen zu einem anderen Zeitpunkt durchzuführen.

So war auch ein Vergleich zwischen Fastenzustand und Nüchternzustand nicht möglich. Die postprandiale Stoffwechselsituation bei insulinresistenten Patienten, mit einer möglicherweise übermäßigen FOXO1-Aktivität, konnte nicht untersucht werden, da alle Patienten zum Entnahmezeitpunkt sich Operations-bedingt im Nüchternzustand befanden. Man musste sich den klinischen Gegebenheiten beugen. Eine eventuelle intraoperative Glukose- oder Insulininfusion zu Studienzwecken erscheint ethisch bedenklich. In zukünftigen Studien mag eine Lösung für dieses Problem gefunden werden.

Des Weiteren besteht eine gewisse grundsätzliche Problematik bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Studie mit denen tierexperimentell durchgeführter Studien. Es ist keine Gleichsetzbarkeit, sondern nur Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Studie zu denen tierexperimenteller Studien möglich, nicht nur da es sich um andere Spezies handelt, sondern vor allem auch da in letzteren immer genetisch identische Klone als Versuchsobjekte genutzt werden. Eine derartige genetische Standardisierung konnte diese Studie naturgemäß nicht bieten, da die Probanden gewissermaßen „Wildtypen“, mit vollkommen unterschiedlichen Genomen waren. Diese genetische Heterogenität der Probanden mag möglicherweise zusätzliche, unkontrollierbare Einflussfaktoren bergen. Studien an menschlichen Probanden bringen jedoch immer dieses Problem mit sich.

Hinzu kommt, dass im tierexperimentellen Modell mittels gentechnischer Manipulation meist extreme Phänotypen wie beispielsweise stark adipöse leptinrezeptordefiziente Mäuse oder die erwähnten „LIRKO“ („liver-specific insulin receptor knockout“)-Mäuse, die eine totale hepatische Insulinresistenz aufweisen, angewandt werden. Derart artifizielle, besonders ausgeprägte Eigenschaften sind unter „Wildtypen“ nicht zu finden, was eine Extrapolation von so gewonnenen Erkenntnissen auf den menschlichen Organismus zusätzlich erschwert. Insofern ist die erstmalige Untersuchung der Thematik am Menschen selbst ein großer Vorteil der vorliegenden Studie.

Andererseits ist jedoch zu bedenken, dass es sich in dieser Studie insgesamt um ein relativ heterogenes und zudem kleines Kollektiv handelt, was zu einer Verfälschung der eigentlichen Zusammenhänge in den Ergebnissen geführt haben könnte. Unter den Non-NAFLD-Patienten waren einige Patienten, die nicht perfekt den Charakteristika der Gruppe entsprachen und beispielsweise einen gestörten Stoffwechsel im Rahmen eines Metabolischen Syndroms oder

---

Typ 2 Diabetes mellitus hatten. Ebenso waren die metabolischen Charakteristika der NAFLD-Patienten relativ breit gefächert und es mögen darunter Einzelfälle gewesen sein, die trotz Vorhandensein einer Fettleber einen weitgehend ungestörten Glukose- und Lipidstoffwechsel besaßen. Derartige Einzelfälle mögen in ihrer SREBP-1c- und FOXO1-Expression sich von ihrer jeweiligen Subgruppe differenziert haben und so, aufgrund der insgesamt geringen Fallzahl, die Ergebnisse verzerrt haben. Bei einer größeren Patientenanzahl mögen sich derart verfälschende Effekte eher nivellieren.

Weiterhin wird diese Studie durch die Tatsache eingeschränkt, dass lediglich NAFLD- im Vergleich zu Non-NAFLD-Patienten untersucht wurden. Zusätzlich wäre es interessant und sinnvoll, ein Kollektiv von Diabetikern gegenüber Nicht-Diabetikern oder Patienten mit Metabolischen Syndrom gegenüber Patienten ohne Metabolischem Syndrom zu analysieren. Fraglich ist, ob derartige Patienten mit manifesten Störungen des Glukose- und Lipidstoffwechsels eventuell eindeutiger Ergebnisse in Bezug auf die FOXO1- und SREBP-1c-Expression ergeben hätten. In jedem Fall wäre eine Untersuchung derartiger Kollektive eine sinnvolle Ergänzung der Fragestellung.

Weiterhin mag zu bedenken sein, dass die Patienten dieser Studie sich zum Entnahmezeitpunkt in der gewissermaßen artifiziellen, intraoperativen Situation befanden, was verzerrenden Einflussfaktoren auf die Ergebnisse bergen könnte. So können intraoperativ massive Veränderungen wie Stresshormon-Ausschüttung und Hyperglykämie stattfinden. Dem entgegen steht jedoch, dass wenn hier ein Verzerrungsfaktor bestehen sollte, dieser systematisch bei allen Patienten gleichermaßen vorliegt. Bei allen Patienten erfolgte die Probenentnahme intraoperativ unter den gleichen Umständen, mit der gleichen Standard-Narkose und in einem mindestens 10-stündigen Fastenzustand.

Für die Validität der Ergebnisse spricht, dass die Lebergewebsproben keinerlei hypoxischen Einflüssen ausgesetzt waren: Die Proben wurden stets nur bei weiterhin bestehender Leberperfusion und niemals während oder nach einer Unterbindung der hepatischen Perfusion entnommen. Zudem wurden die Proben alle unmittelbar nach der Entnahme zur Vermeidung von De-/Phosphorylierungsartefakten sofort in eine standardisierte Pufferlösung überführt, sodass die Zellen zu keinem Zeitpunkt hypoxisch wurden.

Bei den durchgeführten Western-Immunoblots zeigte sich anhand der Verteilung der nukleären und zytosolischen Referenzproteine eine gute Trennung von nukleärer und zytosolischer Fraktion der Hepatozyten. Dies spricht für die Validität der Ergebnisse des Trennverfahrens.

---

## **5.2. Leberregeneration, Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose im perioperativen Verlauf**

### **5.2.1. Postoperative Leberregeneration bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen fast völlig übereinstimmenden postoperativen Verlauf der Leberregeneration anhand des LiMAX-Tests bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern. Lediglich am dritten postoperativen Tag liegen die LiMAX-Werte der Diabetiker minimal über denen der Nicht-Diabetiker. Im weiteren postoperativen Verlauf sind die LiMAX-Werte von Diabetikern und Nicht-Diabetikern nahezu identisch und steigen gleichermaßen stetig bis zum 14. postoperativen Tag an. Bei den Ergebnissen der ICG-Tests zeigt sich eine leicht höhere Leberfunktionsleistung und eine minimal schnellere Leberregeneration bei Nicht-Diabetikern gegenüber Diabetikern. Während die ICG-Leberfunktion der Nicht-Diabetiker postoperativ stetig steigt, zeigt sich bei den Diabetikern eine transitorische Abnahme der Leberfunktion am 5. bis 10. postoperativen Tag. Die ICG-Werte weisen an den Tagen 3 bis 10 einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf. Allerdings erreichen die beiden Gruppen an Tag 14 den nahezu gleichen, maximalen ICG-Wert und es besteht kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Werten. Insofern besteht eine gewisse Diskrepanz zwischen den Ergebnissen: Während die LiMAX-Werte keinen Unterschied in der Leberregeneration zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern aufweisen, sind die ICG-Ergebnisse eher uneindeutig und zeigen eventuell eine minimal höhere unmittelbar postoperative Funktionsregenerationskapazität der Nicht-Diabetiker. Wichtig ist jedoch zu bedenken, dass bei den Diabetikern lediglich innerhalb der hier untersuchten Zeitspanne von 14 postoperativen Tagen die ICG-Leberfunktion minimal geringer bei Diabetikern erscheint und bereits am 14. postoperativen Tag Diabetiker und Nicht-Diabetiker den gleichen ICG-Leberfunktionswert aufweisen. Dies könnte insofern eventuell als eine transitorische, unmittelbar postoperative Verzögerung der Leberregeneration bei Diabetikern interpretiert werden, dies sich bereits am 14. postoperativen Tag normalisiert. Entscheidend ist, dass bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass der LiMAX-Test dem ICG-Test an Sensitivität überlegen ist.<sup>31</sup> Es ist also hier davon auszugehen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit der tatsächlich reelle Zusammenhang eher den Ergebnissen des LiMAX-Tests entspricht und somit Diabetiker keine schlechtere Leberfunktionsregeneration als die Nicht-Diabetiker aufweisen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse mag generell eventuell zu bedenken sein, dass in dieser Studie lediglich 5 Patienten Diabetes mellitus aufwiesen, und diese hier mit dem Rest des



---

Kollektivs, weiteren 17 Patienten ohne Diabetes mellitus, verglichen wurden. Die ungleiche Anzahl der beiden Gruppen, sowie die insgesamt relativ geringe Stichprobe an Patienten könnten die Aussagekraft der Ergebnisse möglicherweise einschränken. Ein eventuell bestehender Unterschied in der Leberregeneration zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern mag hier nicht gezeigt werden können, da die Patientenzahl zu gering war. Falls Ausreißer vorhanden sind, d.h. beispielsweise Patienten, die eventuell trotz Vorhandensein eines Diabetes mellitus eine relativ gute Leberregeneration aufweisen, kann dies die Ergebnisse insgesamt bedeutend verfälschen. Bei größeren Probandenzahlen können sich derartige verzerrende Effekte leichter ausgleichen. Hinzu kommt, dass allein aufgrund der Tatsache, dass die Gruppe der Diabetiker nur 5 Patienten aufwies, es rein statistisch a priori schwierig ist, eine Signifikanz bezüglich eines möglichen Unterschieds zwischen den Gruppen zu eruieren.

Ein weiterer einschränkender Faktor in der Aussagekraft der Ergebnisse könnte eventuell sein, dass es sich notgedrungen um ein selektiertes Kollektiv von Patienten, die alle recht unterschiedliche OP-Indikationen, wie kolorektale Lebermetastasen, hepatozelluläre Karzinome oder auch hepatische Hämangiome aufwiesen, handelte. Eine zufällig ungleichmäßige Verteilung der OP-Diagnosen könnte sich eventuell auf die Ergebnisse der Leberregeneration der Gruppen im Vergleich auswirken.

Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die postoperativen Leberregeneration nach Leberteileresektion ist bereits vielfach untersucht worden, bleibt jedoch bislang unklar, da viele Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind. So wird zum Teil postuliert, dass Diabetes mellitus mit Veränderungen im Lebermetabolismus verbunden ist, die, wie tierexperimentelle Modelle nahelegen, die Regenerationsfähigkeit des Lebergewebes einschränken. Die Regeneration der Leber durch Teilungsvorgänge der Hepatozyten bedeutet einen hohen metabolischen Aufwand, und aufgrund von verändertem Glukose-Metabolismus mag das Lebergewebe bei Diabetikern unfähig sein, ausreichend Energie für den unmittelbar postoperativen Regenerationsprozess zu liefern.

In einer tierexperimentellen Studie an Ratten mit und ohne Alloxan-induziertem Diabetes führten Barra et al 1977 Leberteileresektionen durch, und konnten anhand sukzessiver, postoperativer Lebergewebsentnahmen zeigen, dass Diabetes die Leberregeneration nicht verhindert, jedoch verzögern kann.<sup>70</sup> So konnte die Verzögerung der Regeneration anhand eines Mangels an



---

Mitose-Vorgängen nach 24 Stunden, sowie einer verminderten RNA-, DNA- und Protein-Synthese am ersten postoperativen Tag gezeigt werden. Die Syntheseparameter normalisierten sich weniger schnell als bei den nicht-diabetischen Ratten. Zudem wiesen die diabetischen Ratten im Vergleich zu den nicht-diabetischen Ratten länger eine Verminderung der Gesamt-Proteine im Blut auf. Offenbar lag bei den diabetischen Ratten eine Verzögerung der Leberregeneration und eine Verlängerung des Erholungsprozesses vor. Dieses Konzept steht den Ergebnissen der LiMAX-Tests der vorliegenden Studie entgegen.

Die direkte postoperative Leberfunktionstestung bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern nach Leberteileresektion wurde in dieser Studie erstmals unternommen. Studien in der Vergangenheit hingegen untersuchten in erster Linie das postoperative Outcome, die Morbidität, die Mortalität und Komplikationen bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern nach Leberteileresektion. Da vorangegangene Studienergebnisse von Stockmann et al bereits zeigen konnten, dass der postoperative LiMAX ein guter Surrogatparameter für das Outcome darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass eine verlangsamte Regeneration auch ein höheres Risiko für Komplikationen und Morbidität bedeutet.<sup>31</sup> Anhand dieses Zusammenhangs kann aus den vielfachen vorangegangenen klinischen Studien, die eine vermehrte Morbidität, Mortalität und Komplikationen bei Diabetikern nach Leberteileresektion zeigten, auf eine möglicherweise eingeschränkte postoperative Leberregeneration nach Leberteileresektion bei Diabetikern geschlossen werden. Andererseits sind jedoch oftmals auch Ergebnisse erhoben worden, die keinen Unterschied in der postoperativen Regeneration für Diabetiker nahelegten.

Yanaga et al evaluierten 1993 209 Patienten, die leberteilereseziert wurden, unter denen 49 Diabetiker waren.<sup>71</sup> Die postoperative Morbidität erwies sich als höher bei den Diabetikern, vor allem aufgrund des gehäuften Vorkommens von hepatischer Dekompensation und intraperitonealer Infektionen. Die perioperative Mortalität, der mittlere Krankenhausaufenthalt und das Langzeitüberleben zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu den Nicht-Diabetikern. Schlussgefolgert wurde, dass Diabetiker ein erhöhtes Risiko für postoperative Morbidität, nicht jedoch für die postoperative Mortalität aufweisen. Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Daten der vorliegenden Studie ist nur eingeschränkt möglich. Die vermehrte postoperative Morbidität aufgrund von Leberfunktionsinsuffizienz könnte jedoch für eine verminderte hepatische Funktionsregeneration bei Diabetikern sprechen. Dies würde nicht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie stehen, die, insbesondere bei den LiMAX-

---

Testergebnissen, eher keinen Unterschied in der Regenerationsfähigkeit zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern aufzeigen.

An 342 Patienten, die aufgrund eines hepatozellulären Karzinoms leberteilreseziert wurden und unter denen 87 Diabetiker waren, konnten Ikeda et al 1998 eine erhöhte postoperative Morbidität, ein vermindertes postoperatives Überleben, sowie insbesondere eine Minderung des Tumor-freien Überlebens bei Diabetikern feststellen.<sup>72</sup> Diabetes erwies sich als unabhängiger Risikofaktor für die Prognose nach Leberteilresektion. Inwiefern Diabetes das Langzeitüberleben oder die Entwicklung eines Tumors beeinflusst, ist in der vorliegenden Studie allerdings nicht nachgegangen worden. Eine erhöhte postoperative Morbidität könnte durch eine geringere hepatische Funktionsregeneration bei Diabetikern bedingt sein – dies stände im Widerspruch mit den Ergebnissen dieser Studie, die, besonders bezüglich der LiMAX-Werte, eher keinen Unterschied der Leberregeneration zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern andeuten. Shimada et al analysierten 1994 retrospektiv Risikofaktoren für Leberteilresektionen, die an 209 Patienten durchgeführt wurden und kamen zu dem Ergebnis, dass Diabetes mellitus einen unabhängigen und signifikanten Vorhersagefaktor für größere postoperative Komplikationen darstellt. Zu den Komplikationen zählten neben Aszites-/Pleurergüssen und intraperitonealen Infektionen unter anderem vor allem auch Leberinsuffizienz. Dies wiederum könnte die These stützen, dass Diabetiker möglicherweise eine gestörte postoperative Leberregeneration aufweisen.

Shirabe et al verglichen 1999 bei Patienten, die aufgrund eines hepatozellulären Karzinoms leberteilreseziert wurden, 7 Patienten, die innerhalb von 6 Monaten aufgrund von Leberversagen starben, mit einer Vergleichsgruppe von 47 weitere Patienten, bei denen keine Todesfälle auftraten.<sup>73</sup> Volumetrische CT-Untersuchungen zeigten einen signifikant geringeres residuelles Lebervolumen bei den aufgrund von Leberversagen verstorbenen Patienten. Weniger als 250 ml/m<sup>2</sup> residuelles Lebervolumen wurde mit einer hohen Inzidenz an Leberversagen assoziiert. Diabetes mellitus erwies sich als signifikanter Risikofaktor für Leberversagen bei Patienten mit einem residuellen Lebervolumen von weniger als 250 ml/m<sup>2</sup>. Schlussgefolgert wurde, dass besonders bei Patienten mit Diabetes mellitus und einem zu erwartenden residuellen Lebervolumen von weniger als 250 ml/m<sup>2</sup> größere Leberteilresektionen vermieden werden sollten. Hier scheint also die Kombination von Diabetes mit einem geringen Lebervolumen ausschlaggebend für ein hohes postoperatives Risiko einer eingeschränkten Leberregeneration zu sein.

---

2002 untersuchten Little et al den Effekt von Diabetes mellitus auf das Outcome bei Leberresektionen an 727 Patienten, von denen 61 einen Diabetes mellitus aufwiesen.<sup>38</sup> Die postoperativen Komplikationsraten sowie das Langzeitüberleben wiesen keine Unterschiede zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern auf. Die perioperative Mortalität jedoch war deutlich höher bei der Diabetes-Gruppe, besonders bei den Patienten, die zusätzlich eine Steatosis hepatis aufwiesen und Leberteileresektionen von mindestens einem Lobus hatten. Es ergab sich zudem eine höhere Inzidenz an postoperativer hepatischer Dekompensation bei den Diabetikern. Unter den Diabetes-Patienten waren insgesamt fünf perioperative Todesfälle, von denen vier Leberinsuffizienz-bedingt nach einer größeren Leberteileresektion, d.h. von mindestens einem Lobus, vorfielen. Die Ergebnisse der Studie von Little et al zeigen ein erhöhtes Risiko für eine unzureichende postoperative Leberregeneration bei Diabetikern und stehen somit nicht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Hervorzuheben ist jedoch, dass bei allen fünf Todesfällen der Studie von Little et al nicht nur Diabetes, sondern auch eine Steatosis hepatis, sowie eine Leberteileresektion größeren Ausmaßes vorlag. So konnten Little et al insbesondere bei Patienten mit Diabetes und zugleich Steatosis hepatis ein erhöhtes Risiko für postoperativ unzureichende Leberregeneration befunden. Besonders risikoreich, so Little et al, erwies sich diesbezüglich auch eine präoperative Chemotherapie, die eine Steatosis hepatis mit sich ziehen kann.

Dementgegen konnten Poon et al 2002 in einer Studie an Leberteileresektionen eines hepatozellulären Karzinoms bei 62 Diabetikern und 463 Nicht-Diabetikern zeigen, dass die Komplikationsrate, die perioperative Morbidität und Mortalität, sowie das Langzeit-Überleben keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufwiesen.<sup>74</sup> Poon et al führten präoperativ einen 15-minütigen ICG-Test durch, der sich generell als signifikanter Vorhersagewert für das Überleben erwies. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Poon et al mit dieser Studie ist auch hier eingeschränkt, da die Erfassung der Leberfunktion nur präoperativ und nicht postoperativ erfolgte. Die Tatsache jedoch, dass sich in den Ergebnissen von Poon et al kein Unterschied bezüglich Morbidität und Mortalität zwischen den Gruppen zeigte, steht im Sinne eines uneingeschränkten Verlaufs der postoperativen Leberregeneration bei Diabetikern im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

Guckelberger et al untersuchten 2006 in einer Studie 633 Patienten, die leberteilereseziert wurden und von denen 75 Diabetiker waren.<sup>75</sup> Als unabhängige Einflussfaktoren auf die perioperative Mortalität stellten sich lediglich das Alter, Albumin, Zirrhose, sowie Ausmaß des Eingriffes,

---

nicht aber Diabetes heraus. Komplikationen und Krankenhausaufenthalt waren bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern gleich häufig. Insgesamt stützen die Daten von Guckelberg et al die Ergebnisse der LiMAX-Tests dieser Studie, indem sie zeigen, dass bei Diabetes keine erhöhte postoperative Morbidität und Mortalität vorliegt, und insofern nahelegen, dass Diabetes kein erhöhtes Risiko für eine unzureichende Leberregeneration bedeutet.

Cruse et al konnten 1973 in einem enormen Kollektiv von 20 000 Patienten eine signifikant höhere Rate an Wundinfektionen bei Patienten mit gestörter Glukose-Toleranz finden.<sup>76</sup> Es konnte jedoch ebenfalls keine Leberinsuffizienz-bedingte erhöhte postoperative Morbidität oder Mortalität ausgemacht werden.

Insgesamt besteht eine Kontroverse bezüglich einer möglicherweise postoperativ eingeschränkten Leberregeneration bei Diabetes, da Studien oftmals zu konträren Ergebnissen gekommen sind. Eine direkte Erfassung der postoperativen Leberregeneration bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern anhand von Leberfunktionstests, wie es in dieser Studie durchgeführt wurde, war bislang noch nie unternommen worden, sodass in jedem Fall eine direkte Vergleichbarkeit mit anderen Studien nur eingeschränkt möglich ist. Außerdem ist hervorzuheben, dass in den Studien, in denen Diabetes als Risikofaktor erkannt wurde, oftmals zusätzliche Einflussfaktoren wie z.B. ein geringes residuelles Lebervolumen, Chemotherapie oder eine zugrundeliegende Komorbidität wie Steatosis hepatis vorlagen. Diabetes mag also eventuell erst in Kombination mit anderen Risikofaktoren die Leberregeneration einschränken. Insgesamt zeigt die große Mehrheit der Studien, dass es bei Diabetikern generell zu einer erhöhten postoperativen Morbidität kommen kann, die aber zumeist Diabetiker-typische Komplikationen wie zum Beispiel Infektionen beinhaltet, und nicht jedoch durch eine gestörte Leberregeneration bedingt ist. Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

### **5.2.2. Postoperative Leberregeneration bei NAFLD und Non-NAFLD-Patienten**

Die Ergebnisse der LiMAX-Tests bei NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten im postoperativen Verlauf weisen deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Insgesamt zeigt sich bei den Patienten ohne NAFLD eine bessere Erholung der Leberfunktion mit stärker und schneller ansteigenden LiMAX-Werten an den postoperativen Tagen 3-14. Die Non-NAFLD-Patienten

---

erreichen an Tag 14 einen LiMAX-Wert von 120 % gegenüber dem Ausgangswert von Tag 1, während die NAFLD-Patienten an Tag 14 lediglich einen Wert von knapp 50 % über dem Ausgangswert aufweisen. Ebenso konnten die Ergebnisse der postoperativen ICG-Tests zeigen, dass die Patienten ohne NAFLD im gesamten postoperativen Verlauf höhere Leberfunktionswerte aufweisen als die NAFLD-Patienten und die Leberregeneration weist einen schneller ansteigenden Verlauf auf. An Tag 14 jedoch liegt der maximale ICG-Leberfunktionswert der NAFLD-Patienten nur knapp unter dem Wert der Non-NAFLD-Patienten. Insgesamt sind auch hier die ICG-Daten etwas weniger eindeutig als die Ergebnisse der LiMAX-Funktionswerte, wo sich ein noch größerer, eindeutigerer Unterschied zwischen den Gruppen zeigt. Auch hier ist aufgrund der schon in früheren Studien nachgewiesenen höheren Exaktheit der Messergebnisse des LiMAX-Tests im Vergleich zum ICG-Test davon auszugehen, dass die LiMAX-Werte die valideren Ergebnisse darstellen.<sup>31</sup>

Ein möglicherweise einschränkender Faktor in der Aussagekraft der Ergebnisse könnte sein, dass es sich gezwungenermaßen um ein selektiertes Kollektiv handelt. Die NAFLD-Patienten weisen nicht nur eine Steatosis hepatis, sondern auch eine, die OP-Indikation bedingende, hepatische Läsion auf. Ebenso handelt es sich verständlicherweise auch bei den Non-NAFLD-Patienten nicht um vollkommen hepatisch Gesunde, sondern auch sie wurden aufgrund einer hepatischen Läsion operiert. Ob das Vorhandensein multipler, kolorektaler Lebermetastasen oder eines singulären Hämangioms, sowie die willkürliche Verteilung derartiger Operations-Indikationen in den Gruppen möglicherweise die Ergebnisse des Vergleichs der postoperativen Leberregeneration bei NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten beeinflussen könnte, ist fraglich.

Hinzu kommt, dass, wie in der Patientencharakterisierung ersichtlich wurde, die Gruppe der NAFLD-Patienten deutliche Unterschiede bezüglich diverser Basischarakteristika aufweist. So sind die NAFLD-Patienten höheren Alters, weisen einen höheren BMI, Taillenumfang und Körperfettgehalt, sowie bereits präoperativ erhöhte Leberenzyme im Vergleich zu den Non-NAFLD-Patienten auf. Fraglich ist, inwieweit diese Konstellation die Ergebnisse bezüglich der Leberregenerationskapazität beeinflussen und einen gewissen Selektions-Bias darstellen könnten. Es ist allerdings naturgemäß unumgänglich, dass NAFLD-Patienten meist die im Zusammenhang der Steatosis hepatis stehenden metabolischen Abnormalitäten und eine grundsätzlich höhere Morbidität aufweisen.

---

Im Ganzen zeigen die Ergebnisse beider Leberfunktionstests eindeutig eine geringere postoperative Leberregenerationsfähigkeit bei den NAFLD-Patienten. Insbesondere bei den LiMAx-Tests weisen die NAFLD-Patienten eine drastisch geringere postoperative Erholung der Leberfunktion auf. Ursache mag eine verminderte Regenerationskapazität des steatotisch veränderten Lebergewebes sein. Die Regenerationskapazität ist bekanntlich nicht nur von der Quantität des residuellen Lebergewebes, sondern vor allem auch von dessen Qualität abhängig.<sup>32</sup>

Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass steatotisches Leberparenchym nach Leberteilsresektion eine defizitäre Regeneration aufweist. Selzner et al konnten 2000 in einer Studie an adipösen Ratten mit Fettleber und normalgewichtigen Ratten nach 70%iger Leberteilsresektion eine deutlich geringere Leberregeneration bei den adipösen NAFLD-Ratten nachweisen.<sup>77</sup> Die NAFLD-Ratten wiesen zudem eine Leberinsuffizienz-bedingte signifikant höhere Mortalität als die normalgewichtigen Ratten auf. Die zugrundeliegende Ursache der hepatischen Regenerationsstörung bei Steatosis hepatis ist bislang unklar<sup>78</sup> – es werden verschiedene Mechanismen angenommen: Selzner et al konnten eine Unfähigkeit der steatotischen Hepatozyten, die Proteine des Polymerase-Komplexes für die DNA-Synthese zu produzieren, sowie eine Störung des Übergangs der Hepatozyten in die S-Phase des Zellzyklus zeigen. Weiterhin zeigen die Daten von Selzner et al, dass am vierten postoperativen Tag, zum Zeitpunkt des Todes der meisten NAFLD-Ratten, das Lebergewebe zudem vermehrt Zellanschwellungen und parenchymale Desorganisation aufwies.<sup>77</sup>

In weiteren Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass es in steatotischem Lebergewebe zu einer gestörten Mikrozirkulation<sup>79,80</sup> und zu einer herabgesetzten Toleranz gegenüber Ischämien mit verstärkten Ischämie-bedingten Reperfusionsschäden kommen kann.<sup>81-83</sup> Die vermehrte Lipideinlagerung in den Hepatozyten führt zu einem veränderten Zellmetabolismus, einer erhöhten Produktion von freien Radikalen („Reactive Oxygen Species“, ROS), was eine vermehrte Lipidperoxidation und eine Verstärkung des oxidativen Stresses mit einer Störung der mitochondrialen ATP-Produktion zur Folge hat.<sup>82-85</sup> Dies kann dazu führen, dass die Hepatozyten den erforderlichen erhöhten Energiebedarf für metabolische und synthetische Aufgaben, sowie zugleich für die Proliferation zur Leberregeneration nicht aufbringen können. Die Akkumulation von freien Radikalen kann zu einer Aktivierung von hepatischen Makrophagen, z.B. den Kupffer Zellen, führen, die proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 produzieren, was zusätzlich zum hepatozellulären Untergang beiträgt. Man geht davon aus, dass die Steatosis hepatis durch all diese Faktoren postoperativ zu einer stärkeren

---

inflammatorischen hepatozellulären Schädigung und einer verminderten hepatischen Regenerationsfähigkeit führen kann.<sup>86</sup> So konnten Veteläinen et al 2007 in einer tierexperimentellen Studie nachweisen, dass Ratten mit schwerer Steatosis hepatis im Vergleich zu Ratten mit milder oder keiner Steatose nach Leberteileresektion eine geringere Leberregeneration, einen vermehrten hepatozellulären Zelluntergang in Form von Nekrose, sowie stärkere, durch Kupffer-Zellen vermittelte inflammatorische Vorgänge aufwiesen.<sup>86</sup>

Inwiefern die tierexperimentell erworbenen Kenntnisse auf den Menschen und damit auf die Ergebnisse dieser Studie übertragen werden können, ist fraglich. Dennoch bieten die tierexperimentellen Studien ein pathophysiologisches Modell, das im Sinne einer eingeschränkten Regenerationskapazität bei Steatosis hepatis mit den Ergebnissen dieser Studie in Einklang steht.

Beim Menschen gilt steatotisch verändertes Lebergewebe generell als bedeutender Risikofaktor sowohl für Leberteileresektionen<sup>26, 87-89</sup> als auch im Falle einer Leberspende. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass steatotisch verändertes Lebergewebe häufig zu einer primären Dysfunktion der Spenderleber führen kann.<sup>90-92</sup> Beispielsweise Ploeg et al konnten zeigen, dass Steatosis hepatis bei Leberspenden einen unabhängigen Vorhersagewert für Transplantat-Dysfunktion bedeutet.<sup>92</sup>

Dass die Fettlebererkrankung eine höhere postoperative Morbidität und Mortalität nach Leberteileresektion bedeutet, konnte bereits in vielen Studien berichtet werden. Wie in vorangegangenen Studienergebnissen von Stockmann et al bereits gezeigt wurde, steht eine verminderte Leberregenerationskapazität in engem Zusammenhang mit postoperativ eingeschränkten Outcome, einer erhöhten Morbidität und Mortalität.<sup>31</sup> Daher ist anzunehmen, dass die in vielen Studien erfasste höhere Morbidität und Mortalität bei Steatosis hepatis in Zusammenhang mit einer insuffizienten postoperativen Leberfunktionsregeneration stehen.

So konnten im Rahmen einer Metaanalyse von vier Studien und einer zusätzlichen Evaluation zweier weiterer Studien De Meijer et al 2010 aufzeigen, dass Patienten mit Steatosis hepatis ein zweifach erhöhtes Risiko für postoperative Komplikationen nach Leberteileresektion haben und dass schwere Steatosis hepatis sogar ein dreifach erhöhtes Risiko für postoperative Mortalität bedeutet.<sup>34</sup> Im Sinne einer bei Steatosis hepatis postoperativ eingeschränkten Leberregeneration,



---

die eine erhöhte Morbidität und Mortalität mit sich zieht, stützt dies die Ergebnisse der vorliegenden Studie.

Kooby et al konnten 2003 in einer Studie an Leberteileresektionen bei 325 NAFLD-Patienten und 160 Kontrollpatienten mit gesunder Leber, belegen, dass die Steatosis hepatis einen unabhängigen Vorhersagefaktor für postoperative Komplikationen darstellt.<sup>35</sup> Die postoperativen Komplikationen insgesamt, sowie insbesondere infektiöse Komplikationen, konnten signifikant mit dem Schweregrad der Steatosis hepatis korreliert werden. Es gab häufiger Wundinfektionen, perihepatische Abszesse und postoperative intestinale Dysmotilität bei den NAFLD-Patienten als bei den Non-NAFLD-Patienten. Es mag sein, dass die eindeutige Häufung infektiöser Komplikationen bei Patienten mit Steatosis hepatis in den Daten von Kooby et al indirekt auf eine mangelnde postoperative Leberfunktion zurückzuführen ist. So könnte die akute postoperative Dysfunktion der hepatischen Proteinsynthese möglicherweise in einer höheren Infektanfälligkeit und einer mangelnden Wundheilungskapazität resultieren. Kooby et al konnten zudem zeigen, dass in der Gruppe der Patienten mit moderater bis schwerer Steatosis hepatis, bei Leberresektionen mit einem Umfang von mindestens einem Leberlappen, deutlich stärkere Erhöhungen der Bilirubin- und INR (International Normalized Ratio)-Spiegel aufzufinden waren als in den Gruppen der milden Steatosis hepatis oder bei den Kontrollpatienten. Bilirubin- und INR-Spiegel wurden zwar in der vorliegenden Studie nicht untersucht, doch kann eine Störung dieser Werte als eine postoperative hepatische Dysfunktion bzw. als ein Mangel an postoperativer Leberregeneration aufgrund von Steatosis hepatis gedeutet werden. Ein Ikterus und eine Blutgerinnungsstörung stellen die typischen Zeichen einer Insuffizienz der Leberfunktion dar. Dies würde sich insofern mit den Ergebnissen dieser Studie decken.

Kooby et al zeigten außerdem, dass die unmittelbare postoperative Mortalität am höchsten in der Gruppe mit moderater bis schwerer Steatosis hepatis waren. Hervorzuheben ist, dass in der Studie von Kooby et al die postoperativen Todesfälle in der Gruppe der Steatosis hepatis-Patienten alle auf eine postoperative Leberinsuffizienz zurückgeführt wurden, während es in der Kontrollgruppe keine Todesfälle gab. Dies mag ein weiterer Hinweis auf eine Fettleber-bedingte postoperative Leberregenerationsstörung sein.

Auch Behrns et al konnten 1998 in einer Studie an 135 Patienten mit Leberteileresektionen, wobei 56 Patienten milde Steatose und 7 moderate bis schwere Steatose aufwiesen, zeigen, dass bei moderater bis schwerer Steatose eine erhöhte Morbidität sowie eine höhere postoperative Mortalität bestanden.<sup>93</sup> Auch hier mag die unzureichende Regenerationskapazität bei Steatosis hepatis ursächlich für die erhöhte postoperative Morbidität und Mortalität sein. Hinzu kommt,



---

dass in den Ergebnissen von Behrns et al die Patienten mit moderater bis schwerer Steatose zudem höhere postoperative Bilirubin-Spiegel gegenüber den anderen Subgruppen aufwiesen, was in direktem Zusammenhang mit einer gestörten postoperativen Leberfunktion stehen kann.

Dementgegen konnten Pathak et al 2010 in einer Studie an 57 Patienten mit NAFLD und 27 Patienten ohne NAFLD, die alle aufgrund von kolorektalen Lebermetastasen leberteilreseziert wurden, keinen Einfluss von Steatosis hepatis auf das Langzeit-Überleben finden.<sup>94</sup> Die Gruppe der NAFLD-Patienten wies einen signifikant höheren BMI als die der Non-NAFLD-Patienten auf und stellte insofern ein ähnliches Kollektiv wie das der NAFLD-Patienten der vorliegenden Studie dar. Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse besteht jedoch nicht, da in der vorliegenden Studie nicht das Langzeit-Überleben, sondern die unmittelbar postoperative Evolution der Leberfunktion untersucht wurde. Wenn, wie die Daten dieser Studie suggerieren, eine postoperative Störung der Leberregeneration besteht, so scheint diese, nach den Daten von Pathak et al, sich nicht auf das Langzeitüberleben auszuwirken.

Mc Cormack et al untersuchten 2007 in einer Studie 58 steatotische Patienten und 58 Patienten mit gesunder Leber, an denen allen Leberteilresektionen durchgeführt wurden.<sup>36</sup> Die postoperativen Komplikationen insgesamt waren signifikant häufiger bei den NAFLD-Patienten als bei den Non-NAFLD-Patienten. Bei den NAFLD-Patienten bestanden im Vergleich zu den Non-NAFLD-Patienten postoperativ signifikant höhere Transaminasen- und Bilirubin-Spiegel, sowie eine geringere Prothrombinzeit. Dies zeigt, dass bei den NAFLD-Patienten im Vergleich zu den Non-NAFLD-Patienten postoperativ ein vermehrter hepatozellulärer Untergang, sowie eine geringere Leberfunktion vorlag. Diese Daten untermauern insofern die Ergebnisse dieser Studie.

Cho et al untersuchten 45 Patienten, darunter 36 Patienten mit < 5 % makrovesikuläre Steatose, d.h. ohne NAFLD, und mit 18 Patienten mit 5 %-30 %iger Steatose, d.h. mit NAFLD.<sup>95</sup> Die NAFLD-Gruppe wies einen signifikant höheren BMI auf. Präoperativ konnte ein signifikant höherer ALT-Spiegel bei den NAFLD-Patienten im Vergleich zu den Non-NAFLD-Patienten gefunden werden. Dies steht im Einklang mit dem Kollektiv der NAFLD-Patienten dieser Studie, die ebenfalls einen präoperativ höheren ALT-Spiegel als die Non-NAFLD-Patienten, sowie einen höheren BMI als die Non-NAFLD-Patienten aufwiesen. Die Ergebnisse von Cho et al konnten keine Unterschiede bezüglich der postoperativen AST-, ALT- und Bilirubin-Spiegel, sowie bezüglich der postoperativen Morbidität zwischen den Gruppen aufzeigen. Volumetrische Messungen anhand von CT-Untersuchungen zeigten am 10. postoperativen Tag keinen Unterschied bezüglich der Lebervolumina bzw. der hepatischen Regeneration zwischen den

---

Gruppen. Im dritten postoperativen Monat jedoch konnten größere Lebervolumina in der Gruppe der Non-NAFLD-Patienten gefunden werden. Ein Jahr nach der Operation hingegen zeigte sich diesbezüglich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Insgesamt kann in den Daten von Cho et al also kein bedeutender Unterschied bezüglich postoperativer Leberwerte, postoperativer Morbidität und CT-Untersuchung der postoperativen Leberregeneration zwischen NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten nachgewiesen werden. Allerdings besteht ein entscheidender Unterschied in der Tatsache, dass die NAFLD-Patienten der Studie von Cho et al nur eine maximal 30 %ige Leberverfettung, und somit eine lediglich milde Steatose, aufwiesen, während in der vorliegenden Studie diesbezüglich keine obere Grenze gesetzt wurde. Insofern mag es sein, dass milde NAFLD sich kaum auf die postoperative Leberregeneration auswirken mag, während bei Miteinschließen von NAFLD-Patienten mit > 30%iger Verfettung, wie in der vorliegenden Studie, es zu deutlicheren Unterschieden kommt.

Gomez et al konnten durch die Analyse von 386 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen, die leberteilreseziert wurden und unter denen 194 Patienten eine Fettleber aufwiesen, nachweisen, dass bei NAFLD-Patienten eine höhere postoperative Morbidität, mehr infektiöse Komplikationen und stärkere Erhöhungen der Bilirubin- und ALT-Spiegel im Vergleich zu Non-NAFLD-Patienten vorlagen.<sup>96</sup> Diese Ergebnisse können die These der postoperativen Leberfunktionsregenerationsstörung bei NAFLD unterstützen, was sich indirekt in erhöhter Morbidität und gestörten hepatischen Laborwerten manifestieren kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vielfach erhobenen Daten bezüglich der Rolle der Steatosis hepatis bei Leberteilresektionen in der großen Mehrheit auf eine höhere Morbidität, eine Häufung von Komplikationen und eine Erhöhung der Leberwerte im Vergleich zur gesunden Leber hinweisen, was die Hypothese einer postoperativ eingeschränkten Leberregeneration bei Steatosis hepatis stützt. In der vorliegenden Studie galt das zentrale Interesse konkret der postoperativen Leberfunktion und deren Evaluierung im Verlauf anhand von Leberfunktionstests. Die Auswirkung von Steatosis hepatis auf die postoperative Leberfunktion anhand von direkten Messungen der Leistungsfähigkeit des Lebermetabolismus durch Leberfunktionstests ist in dieser Studie zum ersten Mal unternommen worden. Mit diesen Ergebnissen konnte der direkte Einfluss von NAFLD auf die postoperative Leberregeneration gezeigt werden: Die Fettleber steht eindeutig in Assoziation mit einer Beeinträchtigung der postoperativen Leberregeneration. Auch der Einfluss von Diabetes auf die Leberregeneration

---

anhand von Leberfunktionstestung nach Leberteilresektion wurde in dieser Studie erstmals unternommen. Hier konnte jedoch kein Einfluss von Diabetes auf die postoperative Leberregeneration nachgewiesen werden.

### **5.2.3. Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose im perioperativen Verlauf bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern, NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen im perioperativen Verlauf insgesamt höhere Homa-IR-Index-Werte und damit eine höhere Gesamt-Insulinresistenz bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern. Zwischen dem Operationszeitpunkt und dem ersten postoperativen Tag steigt die Insulin-Resistenz in beiden Gruppen stark an. Während sich bei den Nicht-Diabetikern die Insulin-Resistenz jedoch schnell, ab dem dritten postoperativen Tag, bereits wieder auf präoperative Werte normalisiert, zeigt sich bei den Diabetikern ein weiterer starker Anstieg der Insulinresistenz am dritten Tag und eine verzögerte Normalisierung der Werte. Insgesamt kann eine erwartungsgemäß höhere Insulinresistenz im ganzen Verlauf bei Diabetikern, sowie ein höherer und länger andauernder Anstieg der Insulinresistenz unmittelbar postoperativ bei Diabetikern festgestellt werden.

Auch die NAFLD-Patienten wiesen im ganzen perioperativen Verlauf einen weit größere Gesamt-Insulinresistenz als die Non-NAFLD-Patienten auf. Bereits präoperativ zeigt sich eine höhere Insulinresistenz bei NAFLD-Patienten im Vergleich zu Non-NAFLD-Patienten. Wie bereits eingehend in dieser Arbeit ausgeführt, steht die Fettleber als hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms in enger Assoziation mit hepatischer Insulinresistenz. Dieses Konzept wird durch die schon präoperativ erhöhte Insulinresistenz bei den NAFLD-Patienten bestätigt. Ferner konnte gezeigt werden, dass zwischen dem Operationszeitpunkt und dem ersten postoperativen Tag die Insulinresistenz in beiden Gruppen stark ansteigt. Während sich bei den Non-NAFLD-Patienten die Werte ab dem ersten postoperativen Tag rasch wieder normalisieren, steigt die Insulinresistenz bei den NAFLD-Patienten bis zum dritten postoperativen Tag weiter an und normalisiert sich erst dann. Es kann eine bedeutend höhere Gesamt-Insulinresistenz anhand des Homa-IR-Indexes im gesamten perioperativen Verlauf gezeigt werden. Sowohl bei Fettleber als auch ohne führt die Leberteilresektion unmittelbar postoperativ, an den postoperativen Tagen 1 und 3, zu einer starken Erhöhung der Insulinresistenz, von der sich die Non-NAFLD-Patienten jedoch schneller erholen.

---

Diese Ergebnisse zeigen insgesamt, dass das Operationstrauma zu einer Stressreaktion des Körpers mit Ausschüttung von Stresshormonen wie Katecholaminen und Kortikosteroiden führt, was eine vermehrte Störung der Insulinsensitivität mit sich zieht. Eine akute Insulinresistenz im Rahmen der Stressreaktion ist generell postoperativ sehr häufig.<sup>97-99</sup> Eine bereits präoperativ vorhandene Insulinresistenz wie bei Diabetikern oder Patienten mit Fettleber führt zu einer noch stärkeren perioperativen Insulinresistenz.

Der Befund einer perioperativ erhöhten Insulinresistenz steht in Einklang mit den Ergebnissen der Nüchtern-Glukose-Werte im perioperativen Verlauf: Den Erwartungen entsprechend weisen die Diabetiker weitaus höhere Nüchtern-Glukose-Werte als die Nicht-Diabetiker auf. In beiden Gruppen zeigt sich eine kurzfristige, starke Zunahme der Glukose-Spiegel unmittelbar postoperativ. Während bei den Nicht-Diabetikern die Glukose-Werte jedoch ab dem ersten postoperativen Tag wieder fallen und sich normalisieren, steigen die Werte der Diabetiker bis zum dritten postoperativen Tag weiter an und fangen dann erst an, sich langsam zu normalisieren.

Ferner zeigen sich auch bei den NAFLD- und den Non-NAFLD-Patienten eine starke Erhöhung der Nüchtern-Glukose, besonders am ersten postoperativen Tag. In beiden Gruppen fallen die Werte zwischen Tag 1 und Tag 3 stark ab und normalisieren sich bis zum fünften postoperativen Tag. Insgesamt weisen die NAFLD-Patienten leicht höhere Glukose-Werte als die Non-NAFLD-Patienten im gesamten postoperativen Verlauf auf. Die erhöhte perioperative Insulinresistenz manifestiert sich also auch hier in einer Hyperglykämie.

Insgesamt ist jedoch wichtig, festzuhalten, dass die Diabetiker im Vergleich zu den Nicht-Diabetikern weit stärker erhöhte Werte von Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose aufweisen, als NAFLD-Patienten im Vergleich zu Non-NAFLD-Patienten. Da Diabetiker eine manifeste Stoffwechselstörung mit Insulinresistenz aufweisen, ist es nachvollziehbar, dass hier größere Unterschiede auftreten als bei NAFLD-Patienten, die tendenziell insulinresistent sind, jedoch je nach Grad der Leberverfettung dies nicht zwingend sein müssen.

Es ist bekannt, dass eine akute perioperative Insulinresistenz bedeutend zur Hyperglykämie beiträgt. Die erhöhten Nüchtern-Glukose-Spiegel können somit als direkte Manifestation der gezeigten, erhöhten Insulinresistenz gesehen werden. Der Anstieg von Insulinresistenz mit gleichzeitigen Hyperglykämien stellt einen weithin bekannten Effekt bei Operationen dar.<sup>97,100,101</sup> Generell sind perioperative Hyperglykämien ein vielfach in Studien aufgezeigtes

---

Phänomen.<sup>97,98,102,103</sup> In der Stresssituation des operativen Eingriffs kommt es physiologischerweise zu einer Aktivierung der hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Achse und des sympathischen Nervensystems mit Ausschüttung von Stresshormonen wie Katecholaminen und Kortikosteroiden, die zu einer vermehrten Hyperglykämie führen. Generell reagiert der Organismus auf Verletzung mit lokalen und systemischen Reaktionen, die im Grunde ein Überleben ermöglichen sollen. Im Rahmen des Postaggressionssyndroms nach einem operativen Eingriff stellen neben hämodynamischen Veränderungen und einer transitorischen Immunsuppression vor allem extreme Hyperglykämien besonders bei diabetischen Patienten ein bedeutendes Problem im postoperativen Management dar.

Tamai et al führten 2006 in ihrer Arbeit über das operative Management von Diabetikern aus, dass chirurgische Eingriffe bei Diabetikern immer ein vermehrtes Risiko darstellen: die Stresssituation des Körpers, der Stopp der Nahrungsaufnahme, sowie veränderte hämodynamische Faktoren können zu schwierig kontrollierbaren Veränderungen der Glukose-Spiegel führen.<sup>98,100</sup> Dabei müssen eine extreme Hyperglykämie oder auch eine iatrogene Hypoglykämie verhindert werden. Gefahr ist, dass eine extreme Hyperglykämie, wenn sie nicht korrigiert wird, zu osmotischer Diurese mit Glukosurie, einem hohem Verlust an extrazellulärer Flüssigkeit, möglicherweise sogar lebensbedrohlicher Azidose führen kann.<sup>101</sup> Besonders postoperativ ist eine engmaschige und konsequente Kontrolle des Blutglukose wichtig, da dann die allgemeine Stresssituation des Körpers sich noch verstärkt.<sup>100</sup>

Da es sich bei den Operationen der Patienten der vorliegenden Studie um Leberteilresektionen handelt, müssen die perioperativen Glukose-Werte noch unter einem weiteren, wichtigen Gesichtspunkt evaluiert werden: Zu bedenken ist, dass bei Leberresektionen ein Teil der Leber - dem zentral den Glukose-Haushalt regulierenden Organs - wegfällt, weshalb man im Sinne einer relativen Leberinsuffizienz mit einer Verstärkung der hepatischen Insulinresistenz mit konsekutiven Hyperglykämien rechnen könnte. In der Tat liegen in allen Patientengruppen perioperative Hyperglykämien vor. Hinzu kommen die Stressreaktion des Körpers, sowie die in vielen Fällen infundierten Glukose-Lösungen, die die Hyperglykämie verstärkt haben mögen.

Insgesamt konnten diese pathophysiologischen Zusammenhänge anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt werden.

---

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie ist anhand eines Kollektiv von 22 Patienten, die leberteilreseziert wurden, verschiedenen Fragestellungen nachgegangen worden: Zunächst konnte erstmals am Menschen die Aktivität hepatozellulärer Transkriptionsfaktoren bei Patienten mit und ohne Fettlebererkrankung untersucht werden. Entgegen der sich auf tierexperimentelle Modelle stützenden Hypothese, dass bei Vorhandensein von NAFLD im Rahmen eines Metabolischen Syndroms aufgrund einer höheren Insulinresistenz eine höhere nukleäre Aktivität der Transskriptionsfaktoren FOXO1 und SREBP-1c zu finden sein müsste, zeigten sich diesbezüglich hier keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Aufgrund der relativen Heterogenität des Kollektivs, der geringen Patientenzahl, sowie der Tatsache, dass alle Patienten lediglich im Nüchternzustand untersucht werden konnten, sind mögliche Unterschiede in der Aktivität der Transskriptionsfaktoren nicht nachweisbar gewesen.

Ausgehend von der umfassenden metabolischen Charakterisierung des Kollektivs wurde einer weiteren Fragestellung nachgegangen, nämlich inwiefern sich das Vorhandensein von Diabetes mellitus oder einer Fettleber jeweils auf den perioperativen Verlauf nach Leberteilresektion auswirken kann. Hier ist erstmals am Menschen die hepatische Funktionsregeneration nach Leberteilresektion anhand der Leberfunktionstests LiMAX- und ICG-Test im Hinblick auf diese Kriterien evaluiert worden. Im Einklang mit den Ergebnissen bisher durchgeführter tierexperimenteller Studien konnte hier gezeigt werden, dass Steatosis hepatis die Leberregeneration beeinträchtigt und zu einer deutlichen Verzögerung der postoperativen Leberregeneration führen kann. Eine Einschränkung der Leberregeneration durch Diabetes konnte hingegen nicht gefunden werden, da kaum Unterschiede in den Ergebnissen von Diabetikern und Nicht-Diabetikern bestanden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass alle Patienten im Rahmen der operations-bedingten Stressreaktion des Körpers, sowie der relativen Leberinsuffizienz nach Leberteilresektion einen deutlichen Anstieg von Insulinresistenz und Nüchtern-Glukose postoperativ aufwiesen. Dieser Effekt war stärker bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern und ebenfalls stärker bei NAFLD-Patienten als bei Non-NAFLD-Patienten, wobei zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern ein größerer Unterschied als zwischen NAFLD- und Non-NAFLD-Patienten bestand. Es ist somit offenbar, dass besonders Diabetes, aber auch NAFLD, d.h. Konstitutionen, die primär zu insulinresistenten Stoffwechsellagen neigen, zu starken perioperativen Hyperglykämien und Störungen der Insulinsensitivität nach Leberteilresektion führen können.

---

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, et al. Metabolic syndrome: epidemiology and more extensive phenotypic description. Cross-sectional data from the Bruneck Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(10):1283-9.
2. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2008; 29(7):777-822.
3. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 2001; 285(19):2486-97.
4. Ford ES, Schulze MB, Pischon T, et al. Metabolic syndrome and risk of incident diabetes: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study. *Cardiovasc Diabetol* 2008; 7:35.
5. Ogawa W, Kasuga M. Cell signaling. Fat stress and liver resistance. *Science* 2008; 322(5907):1483-4.
6. Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5):1047-53.
7. Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 2006; 44(3):521-6.
8. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41(6):1313-21.
9. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009; 49(1):306-17.
10. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008; 14(2):193-9.
11. Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(2):285-300.
12. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; 44(4):865-73.
13. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116(6):1413-9.
14. Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13(26):3540-53.
15. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 2007; 18(3):184-95.
16. Marques-Lopes I, Ansorena D, Astiasaran I, et al. Postprandial de novo lipogenesis and metabolic changes induced by a high-carbohydrate, low-fat meal in lean and overweight men. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2):253-61.
17. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1343-51.
18. Weickert MO, Pfeiffer AF. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 2006; 49(8):1732-41.
19. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 15):2479-87.



- 
20. Ilan Y. Review article: the assessment of liver function using breath tests. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26(10):1293-302.
  21. Schneider A, Caspary WF, Saich R, et al. 13C-methacetin breath test shortened: 2-point-measurements after 15 minutes reliably indicate the presence of liver cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41(1):33-7.
  22. Lara Baraque S, Razquin M, Jimenez I, et al. 13C-phenylalanine and 13C-methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. *Dig Liver Dis* 2000; 32(3):226-32.
  23. Festi D, Capodicasa S, Sandri L, et al. Measurement of hepatic functional mass by means of 13C-methacetin and 13C-phenylalanine breath tests in chronic liver disease: comparison with Child-Pugh score and serum bile acid levels. *World J Gastroenterol* 2005; 11(1):142-8.
  24. Adamek RJ, Goetze O, Boedeker C, et al. 13C-methacetin breath test: isotope-selective nondispersive infrared spectrometry in comparison to isotope ratio mass spectrometry in volunteers and patients with liver cirrhosis. *Z Gastroenterol* 1999; 37(12):1139-43.
  25. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127(5 Suppl 1):S5-S16.
  26. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 2007; 356(15):1545-59.
  27. Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, et al. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* 2000; 191(1):38-46.
  28. Iwatsuki S, Todo S, Marsh JW, et al. Treatment of hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumors) with hepatic resection or transplantation. *J Am Coll Surg* 1998; 187(4):358-64.
  29. Bismuth H, Adam R, Levi F, et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 1996; 224(4):509-20; discussion 520-2.
  30. Lang BH, Poon RT, Fan ST, Wong J. Perioperative and long-term outcome of major hepatic resection for small solitary hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Arch Surg* 2003; 138(11):1207-13.
  31. Stockmann M, Lock JF, Riecke B, et al. Prediction of postoperative outcome after hepatectomy with a new bedside test for maximal liver function capacity. *Ann Surg* 2009; 250(1):119-25.
  32. van den Broek MA, Olde Damink SW, Dejong CH, et al. Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. *Liver Int* 2008; 28(6):767-80.
  33. Schneider PD. Preoperative assessment of liver function. *Surg Clin North Am* 2004; 84(2):355-73.
  34. de Meijer VE, Kalish BT, Puder M, Ijzermans JN. Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection. *Br J Surg*.
  35. Kooby DA, Fong Y, Suriawinata A, et al. Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 2003; 7(8):1034-44.
  36. McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, et al. Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* 2007; 245(6):923-30.
  37. Nakamuta M, Morizono S, Soejima Y, et al. Short-term intensive treatment for donors with hepatic steatosis in living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2005; 80(5):608-12.
-



- 
38. Little SA, Jarnagin WR, DeMatteo RP, et al. Diabetes is associated with increased perioperative mortality but equivalent long-term outcome after hepatic resection for colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 2002; 6(1):88-94.
  39. Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974; 32(1):77-97.
  40. Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, et al. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(2):362-5.
  41. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1):76-85.
  42. Pfaffenbach B, Gotze O, Szymanski C, et al. [The <sup>13</sup>C-methacetin breath test for quantitative noninvasive liver function analysis with an isotope-specific nondispersive infrared spectrometer in liver cirrhosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 1998; 123(49):1467-71.
  43. Braden B, Haisch M, Duan LP, et al. Clinically feasible stable isotope technique at a reasonable price: analysis of <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-abundance in breath samples with a new isotope selective-nondispersive infrared spectrometer. *Z Gastroenterol* 1994; 32(12):675-8.
  44. Swart GR, van den Berg JW. <sup>13</sup>C breath test in gastroenterological practice. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998; 225:13-8.
  45. Schoeller DA, Schneider JF, Solomons NW, et al. Clinical diagnosis with the stable isotope <sup>13</sup>C in CO<sub>2</sub> breath tests: methodology and fundamental considerations. *J Lab Clin Med* 1977; 90(3):412-21.
  46. Klatt S, Taut C, Mayer D, et al. Evaluation of the <sup>13</sup>C-methacetin breath test for quantitative liver function testing. *Z Gastroenterol* 1997; 35(8):609-14.
  47. Fox IJ, Brooker LG, Heseltine DW, et al. A tricarbo-cyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1957; 32(18):478-84.
  48. Wheeler HO, Cranston WI, Meltzer JJ. Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958; 99(1):11-4.
  49. Caesar J, Shaldon S, Chiandussi L, et al. The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clin Sci* 1961; 21:43-57.
  50. Baker KJ. Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha-1 lipoproteins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 122(4):957-63.
  51. Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest* 1960; 39:592-600.
  52. Benya R, Quintana J, Brundage B. Adverse reactions to indocyanine green: a case report and a review of the literature. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1989; 17(4):231-3.
  53. Hunton DB, Bollman JL, Hoffman HN. Studies of hepatic function with indocyanine green. *Gastroenterology* 1960; 39:713-24.
  54. Paumgartner G. The handling of indocyanine green by the liver. *Schweiz Med Wochenschr* 1975; 105(17 Suppl):1-30.
  55. Licha K, Riefke B, Ntziachristos V, et al. Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photophysical properties and spectroscopic in vivo characterization. *Photochem Photobiol* 2000; 72(3):392-8.
  56. Gathje J, Steuer RR, Nicholes KR. Stability studies on indocyanine green dye. *J Appl Physiol* 1970; 29(2):181-5.
-

- 
57. Owen VM. Estimation of indocyanine green concentrations. *Clin Biochem* 1973; 6(2):132-5.
  58. Angulo P. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2002; 1(1):12-9.
  59. Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2004; 40(2):475-83.
  60. Marchesini G, Moscatiello S, Di Domizio S, Forlani G. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(11 Suppl 1):S74-80.
  61. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008; 118(3):829-38.
  62. Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes* 2008; 57(5):1355-62.
  63. Fougere F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 2002; 366(Pt 2):377-91.
  64. Hastay AH, Shimano H, Yahagi N, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *J Biol Chem* 2000; 275(40):31069-77.
  65. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 2000; 6(1):87-97.
  66. Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, et al. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab* 2008; 7(2):125-34.
  67. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008; 7(2):95-6.
  68. Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, et al. Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol*; 45(1):95-104.
  69. Higuchi N, Kato M, Shundo Y, et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2008; 38(11):1122-9.
  70. Barra R, Hall JC. Liver regeneration in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Exp Zool* 1977; 201(1):93-9.
  71. Yanaga K, Matsumata T, Hayashi H, et al. Effect of diabetes mellitus on hepatic resection. *Arch Surg* 1993; 128(4):445-8.
  72. Ikeda Y, Shimada M, Hasegawa H, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma with diabetes mellitus after hepatic resection. *Hepatology* 1998; 27(6):1567-71.
  73. Shirabe K, Shimada M, Gion T, et al. Postoperative liver failure after major hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the modern era with special reference to remnant liver volume. *J Am Coll Surg* 1999; 188(3):304-9.
  74. Poon RT, Fan ST, Wong J. Does diabetes mellitus influence the perioperative outcome or long term prognosis after resection of hepatocellular carcinoma? *Am J Gastroenterol* 2002; 97(6):1480-8.
  75. Guckelberger O, Thelen A, Benckert C, et al. Diabetes mellitus is no independent risk factor for perioperative mortality following hepatic resection. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114(5):257-61.
  76. Cruse PJ, Foord R. A five-year prospective study of 23,649 surgical wounds. *Arch Surg* 1973; 107(2):206-10.
-

- 
77. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 2000; 31(1):35-42.
  78. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213(2):286-300.
  79. Seifalian AM, Piasecki C, Agarwal A, Davidson BR. The effect of graded steatosis on flow in the hepatic parenchymal microcirculation. *Transplantation* 1999; 68(6):780-4.
  80. Ohhara K. [Study of microcirculatory changes in experimental dietary fatty liver]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1989; 64(2):177-85.
  81. Hakamada K, Sasaki M, Takahashi K, et al. Sinusoidal flow block after warm ischemia in rats with diet-induced fatty liver. *J Surg Res* 1997; 70(1):12-20.
  82. Koneru B, Reddy MC, dela Torre AN, et al. Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation* 1995; 59(7):942-6.
  83. Hui AM, Kawasaki S, Makuuchi M, et al. Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology* 1994; 20(5):1287-93.
  84. Fromenty B, Pessayre D. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J Hepatol* 1997; 26 Suppl 2:43-53.
  85. Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, et al. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* 2002; 161(2):587-601.
  86. Vetelainen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg* 2007; 245(1):44-50.
  87. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346(16):1221-31.
  88. Vetelainen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM. Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg* 2007; 245(1):20-30.
  89. McCormack L, Capitanich P, Quinonez E. Liver surgery in the presence of cirrhosis or steatosis: Is morbidity increased? *Patient Saf Surg* 2008; 2:8.
  90. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12(4):523-34.
  91. Adam R, Hoti E. Liver transplantation: the current situation. *Semin Liver Dis* 2009; 29(1):3-18.
  92. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55(4):807-13.
  93. Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, et al. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 1998; 2(3):292-8.
  94. Pathak S, Tang JM, Terlizzo M, et al. Hepatic steatosis, body mass index and long term outcome in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol*; 36(1):52-7.
  95. Cho JY, Suh KS, Kwon CH, et al. Mild hepatic steatosis is not a major risk factor for hepatectomy and regenerative power is not impaired. *Surgery* 2006; 139(4):508-15.
  96. Gomez D, Malik HZ, Bonney GK, et al. Steatosis predicts postoperative morbidity following hepatic resection for colorectal metastasis. *Br J Surg* 2007; 94(11):1395-402.
  97. Akhtar S, Barash PG, Inzucchi SE. Scientific principles and clinical implications of perioperative glucose regulation and control. *Anesth Analg*; 110(2):478-97.
  98. Ljungqvist O, Nygren J, Soop M, Thorell A. Metabolic perioperative management: novel concepts. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11(4):295-9.
  99. Rapp-Kesek D, Stridsberg M, Andersson LG, et al. Insulin resistance after cardiopulmonary bypass in the elderly patient. *Scand Cardiovasc J* 2007; 41(2):102-8.
  100. Tamai D, Awad AA, Chaudhry HJ, Shelley KH. Optimizing the medical management of diabetic patients undergoing surgery. *Conn Med* 2006; 70(10):621-30.
-

- 
101. Gusberg RJ, Moley J. Diabetes and abdominal surgery: the mutual risks. *Yale J Biol Med* 1983; 56(4):285-91.
  102. Aronsen KF, Ericsson B, Pihl B. Metabolic changes following major hepatic resection. *Ann Surg* 1969; 169(1):102-10.
  103. Korusic A, Hauptman A, Brundula A, et al. Perioperative management with glucose solution and insulin. *Coll Antropol* 2009; 33(2):653-7.

---

## 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Progression von NAFLD über NASH zu Zirrhose und HCC.....	8
Abbildung 2:	Schema der bei Insulinresistenz zu hepatischer Fettakkumulation führenden Signalwege.....	13
Abbildung 3:	Lange Skinfold Caliper.....	26
Abbildung 4:	Potter-Gerät.....	30
Abbildung 5:	Prinzip des Atemtests.....	38
Abbildung 6:	Umwandlung von Methacetin in Paracetamol und <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> .....	38
Abbildung 7:	Methacetin-System.....	40
Abbildung 8:	NDIRS FANci 2db16. – Messgerät.....	42
Abbildung 9:	Summenformel Indocyaningrün (ICG).....	44
Abbildung 10:	Absorptionsspektrum von Indocyaningrün im Serum.....	45
Abbildung 11:	ICG-System.....	46
Abbildung 12:	Nihon Koden Gerät.....	47
Abbildung 13:	Nachweis der subzellulären Hepatocyten-Fraktionierung anhand der Konzentration geeigneter Referenzproteine in repräsentativen Western-Immunoblots	53
Abbildung 14:	Mittels Western-Immunoblot ermittelte und auf Tubulin bezogene Konzentration von FOXO1 innerhalb der zytosolischen hepatozellulären Fraktion.....	54
Abbildung 15:	Mittels Western-Immunoblot ermittelte, auf Lamin bezogene Konzentration von FOXO1 innerhalb der nukleären hepatozellulären Fraktion.....	55
Abbildung 16:	Mittels Western-Immunoblot ermittelte, auf Tubulin bezogene Konzentration von SREBP-1c innerhalb der zytosolischen hepatozellulären Fraktion.....	56
Abbildung 17:	Mittels Western-Immunoblot ermittelte, auf Lamin bezogene Konzentration von SREBP-1c innerhalb der nukleären hepatozellulären Fraktion.....	57
Abbildung 18:	Leberregeneration anhand des LiMax-Tests bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern.....	59
Abbildung 19:	Leberregeneration anhand des ICG-Tests bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern.....	60
Abbildung 20:	Leberregeneration anhand des LiMax-Tests bei NAFLD und Non-NAFLD..	61
Abbildung 21:	Leberregeneration anhand des ICG-Tests bei NAFLD und Non-NAFLD.....	62
Abbildung 22:	HOMA-IR-Index als Maßstab der Gesamt-Insulinresistenz an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern...	63
Abbildung 23:	Nüchtern-Glukose an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern.....	64
Abbildung 24:	HOMA-IR-Index als Maßstab der Gesamt-Insulinresistenz an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 bei NAFLD und Non-NAFLD.....	65

---

Abbildung 25:	Nüchtern-Glukose an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 10 und 14 bei NAFLD und Non-NAFLD .....	66
Abbildung 26:	Signalwege von FOXO1 .....	69

---

## 9. ANHANG

### 9.1. Selbstständigkeitserklärung

Ich, Sophie Caroline Ringe, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Verlauf von Leberregeneration und metabolischen Parametern nach Leberteilresektion: Bezug zu metabolischer Ausgangslage und anthropometrischen Charakteristika“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Leverkusen, den 14.9.2011

.....

Sophie Caroline Ringe

---

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