

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. J. Werner

**Einfluss von *Steatosis Hepatis* auf das perioperative *Outcome* und  
Langzeitüberleben nach Resektionen von Lebermetastasen anhand eines  
neuen objektiv-quantitativen Verfahrens zur Bestimmung des  
Steatosegrads.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andrea Lindenthaler

aus Hallein

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Thasler

Mitberichterstatterinnen: PD Dr. Marlies Michl  
Prof. Dr. Katja Ott  
Prof. Dr. Julia Mayerle

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Serene Lee

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2019

1	Einleitung.....	6
1.1	<i>Steatosis Hepatis</i> .....	7
1.1.1	Definition und Epidemiologie.....	7
1.1.2	Formen und Einteilung.....	7
1.1.3	Pathophysiologie.....	8
1.1.3.1	<i>Steatosis Hepatis</i> .....	8
1.1.3.2	„Two hit“ Hypothese.....	9
1.1.4	Rolle der <i>Steatosis Hepatis</i> bei der Primärtumorentstehung.....	10
1.1.5	Rolle der <i>Steatosis Hepatis</i> bei der Sekundärtumorentstehung in der Leber.....	11
1.2	Bedeutung der <i>Steatosis Hepatis</i> in der hepatobiliären Chirurgie und Transplantation.....	13
1.2.1	Klinische Relevanz in der hepatobiliären Chirurgie.....	13
1.2.2	Ischämie-Reperfusionsschaden und Ischämietoleranz.....	14
1.2.3	Leberregeneration.....	14
2	Fragestellung.....	16
2.1	Leberresektion von Lebermetastasen.....	16
2.2	Objektiv-bildmorphologisches Verfahren.....	16
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Erfassung von Patientendaten.....	17
3.2	Patientenkollektive.....	19
3.3	MIRAX Scanner.....	21
3.4	<i>Lipid Droplet Count</i> MEVIS.....	21
3.5	Statistische Auswertung.....	22
3.5.1	Gruppenunterschiede.....	22
3.5.2	Korrelation des Verfettungsgrades.....	22
3.5.3	Überlebenszeitanalysen.....	23
4	Ergebnisse.....	24
4.1	Überprüfung und Gruppenvergleich von Steatose- und Kontrollgruppe.....	24
4.1.1	Präoperative Parameter.....	24
4.1.2	Intraoperative Parameter.....	26
4.2	Vergleich des objektiv-quantitativen Steatosegrads nach MEVIS mit dem etablierten Standard der Pathologie.....	28
4.2.1	Histopathologische Evaluation.....	28
4.2.2	Relevanz des quantitativen Steatosegrads nach MEVIS.....	29

4.3	Identifikation von Prädiktoren des Grades einer <i>Steatosis Hepatis</i> .....	29
4.4	Perioperative Komplikationen, Mortalität und Langzeitoutcome .....	31
4.4.1	Intraoperativer Blutverlust und Substitution von Blutprodukten .....	31
4.4.2	Postoperative Komplikationen und Mortalität bei <i>Steatosis Hepatis</i> .....	32
4.4.2.1	Kategorialer Gruppenvergleich.....	32
4.4.2.2	Assoziation von Morbidität und Steatosegrad .....	35
4.4.3	Univariate und multivariate Analyse der Morbidität aller Probanden .....	38
4.4.4	Univariate und multivariate Analyse der Mortalität aller Probanden .....	41
4.4.5	Langzeitüberleben .....	44
4.4.6	Rezidivfreies Überleben .....	48
5	Diskussion .....	50
5.1	Methoden und Material .....	50
5.1.1	Patienten- und Kontrollkollektiv.....	50
5.1.2	Objektiv-quantitative Steatosebestimmung .....	50
5.2	Ergebnisse.....	51
5.2.1	Laborchemische Prädiktoren des Steatosegrads .....	51
5.2.2	Einfluss von <i>Steatosis Hepatis</i> auf Morbidität und Mortalität .....	52
5.2.3	Multivariate Analyse von Morbidität und Mortalität .....	52
5.2.4	Einfluss von <i>Steatosis Hepatis</i> auf Langzeitüberleben und Leberrezidiv .....	53
5.3	Einordnung der Ergebnisse im wissenschaftlichen und klinischen Kontext.....	53
5.3.1	Morbidität .....	53
5.3.1.1	Resektionsausmaß .....	54
5.3.1.2	Steatosegrad .....	54
5.3.1.3	Anteil von Patienten mit <i>Steatosis Hepatis</i> am Gesamtkollektiv .....	55
5.3.1.4	BMI als potentieller <i>Confounder</i> .....	55
5.3.2	Pathophysiologisches Korrelat.....	56
5.3.3	Mortalität und Langzeitüberleben .....	56
5.3.4	Rezidivfreies Überleben .....	57
6	Zusammenfassung .....	59
7	Anhang.....	61
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	61
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	63
8	Literaturverzeichnis .....	65
9	Danksagung .....	75



# 1 Einleitung

In der Leberchirurgie hat sich in den letzten Jahrzehnten ein Paradigmenwechsel vollzogen. Verurteilte das Auftreten von Lebermetastasen früher noch häufig „zum therapeutischen Nihilismus“ (Birth, 2007), so sind Resektionen von Lebermetastasen heutzutage dank der rasanten technischen Entwicklung zu einem Standardeingriff avanciert. Diese Entwicklung spiegelt sich in der Mortalität bei Leberresektionen wider, welche heute unter 5 % liegt (Belghiti et al., 2000; Dan et al., 2012; Virani et al., 2007); auch mit Bezug auf das Langzeitüberleben sollten Leberresektionen aufgrund von Komorbiditäten und hohem Alter nicht kategorisch abgelehnt werden (Schiergens et al., 2016). Grundlage der kurativen Intention bei Lebermalignomen ist eine radikale Resektion, die das postoperativ verbleibende Leberparenchym reduziert. Gesundes Leberparenchym toleriert Resektionen im Ausmaß von bis zu 80 %. Liegt zusätzlich aber eine Lebererkrankung vor, ist die Kompensations- und Regenerationsfähigkeit der Leber deutlich eingeschränkt (Nagasue et al., 1987). *Steatosis Hepatis* (Leberverfettung) ist die häufigste Lebererkrankung in westlichen Ländern und aufgrund der engen Assoziation mit Adipositas wird eine stetig ansteigende Prävalenz prognostiziert. Erste Hinweise für einen relevanten Effekt von *Steatosis Hepatis* als Risikofaktor für die Leberchirurgie fanden sich im Bereich der Lebertransplantation; hier wiesen gering bzw. mäßig verfettete Lebertransplantate ein schlechteres Outcome auf (Marsman et al., 1996; Ploeg et al., 1993; Strasberg et al., 1994). Auch bei Leberresektionen stellt eine *Steatosis Hepatis* einen Risikofaktor sowohl für die perioperative Morbidität als auch Mortalität (Behrns et al., 1998; de Meijer et al., 2010) bzw. nur die perioperative Morbidität (Belghiti et al., 2000; Gomez et al., 2007; McCormack et al., 2007) dar. Grundlage ist eine reduzierte Ischämietoleranz bei *Steatosis Hepatis* und ein damit einhergehender verstärkter Ischämie-Reperfusionsschaden (Tashiro et al., 2013).

Dennoch ist der genaue Einfluss von *Steatosis Hepatis* auf Morbidität und Mortalität bei Leberresektionen nicht ausreichend geklärt; einige Studien ergaben einen protektiven Effekt bezüglich des Langzeitüberlebens (Parkin et al., 2013; Vigano et al., 2013; Wu et al., 2011). Einen besonderen Stellenwert in der Leberchirurgie hat die Resektion von Primär- oder Sekundärmalignomen, da hiermit eine potentiell kurative Behandlung ermöglicht wird. Der häufigste leberchirurgische Eingriff ist mit 50-80 % die Resektion von Metastasen, welche die häufigsten Lebermalignome darstellen (Henne-Bruns, 2012). Klinisch (Hamady et al., 2013) und in Tiermodellen begünstigt eine *Steatosis Hepatis* das Auftreten von Lebermetastasen (Mendonsa et al., 2015; VanSaun et al., 2009), hierfür wird ein durchlässiges Mikromilieu

ursächlich angesehen (VanSaun et al., 2009) welches Tumorinvasion und Angiogenese über Metalloproteinasen erleichtert (Yu and Stamenkovic, 2000). Andere Studien kamen zu konträren Ergebnissen und fanden protektive Effekte (Hayashi et al., 1997; Tamura et al., 1999).

Deshalb soll in dieser Arbeit der Einfluss von *Steatosis Hepatis* auf die postoperative Mortalität und Morbidität sowie das Langzeitüberleben nach Leberresektionen von Lebermetastasen evaluiert werden.

*Steatosis Hepatis* wird histopathologisch standardmäßig nach Kleiner et. al eingeteilt in: keine Steatose (<5%), leichte Steatose (5 bis <33%), mäßige (33 bis <66%) oder schwere Steatose ( $\geq 66\%$ ). Zur exakten Bestimmung des Verfettungsgrades wird in der vorliegenden Arbeit erstmals ein objektiv-quantitatives bildmorphologisches Verfahren mit Hilfe des *Fraunhofer Institute for Medical Image Computing MEVIS* eingesetzt. Vor dem Hintergrund, dass die Bestimmung des Verfettungsgrades noch nicht hinreichend exakt und einheitlich verläuft und damit eine potentielle Fehlerquelle darstellt, ist eine präzise Bestimmung von großer Bedeutung.

Im Folgenden sollen wichtige thematische Grundlagen der Arbeit erläutert werden. Dabei wird insbesondere auf die aktuelle Studienlage eingegangen.

## **1.1 *Steatosis Hepatis***

### **1.1.1 Definition und Epidemiologie**

*Steatosis Hepatis* ist definiert als Fetteinlagerung von mehr als 5 % im Zytoplasma der Hepatozyten, den Parenchymzellen der Leber (Adams et al., 2005; Reddy and Sambasiva Rao, 2006). Die Fetteinlagerungen in Vakuolen der Hepatozyten bestehen aus TAGs (Triacylglyceriden) und können morphologisch mikrovesikulär, makrovesikulär oder als Mischform der beiden Muster auftreten (Sanyal, 2002). Mittels H-NMR-Spektrografie wurde die Prävalenz der *Steatosis Hepatis* in den USA auf 31 % geschätzt (Browning et al., 2004); sie liegt anderen Studien zufolge zwischen 10-24 % (Angulo, 2002) bzw. 20-40 % (Greten et al., 2010) in der Allgemeinbevölkerung von Industrienationen.

### **1.1.2 Formen und Einteilung**

*Steatosis Hepatis* kann als prinzipiell eigene Pathologie angesehen werden, der unterschiedliche Ätiologien zugrunde liegen können. Am Wichtigsten sind dabei AFLD (alcoholic fatty liver

disease) und NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease); aber auch genetische oder toxische Ätiologien spielen eine Rolle (Reddy and Sambasiva Rao, 2006).

AFLD ist eine durch den Konsum von Ethanol verursachte *Steatosis Hepatis*.

Der Begriff NAFLD, bzw. die bereits entzündlich veränderte Variante NASH, wurde 1980 geprägt (Ludwig et al., 1980). NAFLD beschreibt eine *Steatosis Hepatis* nach Ausschluss sekundärer Ursachen. Der bedeutendste Risikofaktor ist das Vorliegen eines Metabolischen Syndroms (Puri and Sanyal, 2012), wobei v.a. eine Assoziation mit Insulinresistenz und Dyslipidämie besteht (Clark et al., 2002). Zur Einteilung der NAFLD wird in der Forschung ein semiquantitativer Score gemäß dem NASH CRN (Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network) verwendet. Der *Score* berücksichtigt die vier Kategorien Steatosegrad, Lobuläre Entzündung, Hepatozelluläre Veränderung und Fibrose (Kleiner et al., 2005; Puri and Sanyal, 2012).

Die Unterscheidung zwischen AFLD und NAFLD ist klinisch oft nicht genau möglich. Darüber hinaus zeigen sie ein nahezu identisches histomorphologisches Bild, das meist durch eine makrovesikuläre Verfettung gekennzeichnet ist (Reddy and Sambasiva Rao, 2006; Völzke, 2012).

### **1.1.3 Pathophysiologie**

#### **1.1.3.1 *Steatosis Hepatis***

Sowohl AFLD als auch NAFLD teilen als pathogenetische Endstrecke eine metabolische Energieverwertungsstörung, bei der die Energieaufnahme den Energieverbrauch übersteigt. Folge des beeinträchtigten Fettstoffwechsels ist eine Akkumulation von TAGs in den Hepatozyten (Reddy and Sambasiva Rao, 2006; Völzke, 2012).

Ein zentraler Mechanismus bei AFLD ist eine verminderte Oxidation von Fettsäuren. Diese folgt einerseits aus einem durch den Ethanolabbau veränderten NADH/NAD<sup>+</sup> Redoxpotential, andererseits aus der Hemmung des Rezeptormoleküls PPAR- $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor) durch Ethanol. PPAR- $\alpha$  steht am Anfang einer Signalkette, welche über Regulierung auf Transkriptionsebene den Transport und die Oxidation von Fettsäuren bewirkt. Darüber hinaus schädigt langfristiger Alkoholkonsum Zellorganellen, wie die Mitochondrien, die für die Oxidation von Fettsäuren essentiell sind. Ein weiterer Mechanismus bei AFLD ist eine Steigerung der hepatischen Lipogenese über den Transkriptionsfaktor SREBP durch Ethanol (sterol regulatory element- binding protein) (Lieber, 2004; Purohit et al., 2009; You and Crabb, 2004).



Bei NAFLD spielt eine übermäßige Zufuhr von Energie in Form von Fetten und Kohlenhydraten eine zentrale Rolle. Die Fettzufuhr übertrifft die Abbaukapazität von Fetten mittels Oxidation über das PPAR- $\alpha$  gesteuerte System in der Leber (Reddy and Sambasiva Rao, 2006; Sass et al., 2005). Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist wahrscheinlich die Insulinresistenz, die u.a. bewirkt, dass in peripheren Adipozyten die Lipolyse die Lipogenese übersteigt und somit ein erhöhtes Angebot freier Fettsäuren für die Hepatozyten schafft (Bradbury, 2006; Cohen et al., 2011). In der Leber bleibt die Lipogenese, die Insulin über SREBP vermittelt, trotz Insulinresistenz unverändert (Brown and Goldstein, 2008; Kohjima et al., 2008). Aufgrund verschiedener Tiermodelle und genetischer Mutationen beim Menschen wird ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und daraus folgender *Steatosis Hepatis* vermutet (Hebbard and George, 2011; Nakamura and Terauchi, 2013).

Die Kombination von verminderter Fettsäureoxidation und gesteigerter Lipogenese bei AFLD bzw. die Kombination von ungenügender Fettsäureoxidation und erhöhtem Angebot freier Fettsäuren bei unveränderter hepatischer Lipogenese bei NAFLD resultiert in beiden Fällen in einer Retention von TAGs.

Aufgrund dieser pathogenetischen Parallelen und der oft unsicheren klinischen Zuordnung werden in dieser Arbeit die Unterformen der *Steatosis Hepatis*, AFLD und NAFLD, nicht unterschieden.

### **1.1.3.2 „Two hit“ Hypothese**

1998 wurde von Day und James die „two hit“-Hypothese aufgestellt, welche die sequentielle Pathogenese von Steatose zur Steatohepatitis beschreibt. Steatose, als „first hit“, sensibilisiert die Leber für eine Entzündungsreaktion. Als „second hit“ fungieren oxidativer Stress und abnorme Zytokinproduktion (Day and James, 1998).

Initial kommt es aufgrund der massiven TAG Einlagerung und Oxidation in den Hepatozyten zu einer Induktion des CYP-450 2E1, was mit einer Produktion von Sauerstoffradikalen einhergeht, andererseits werden durch Nekrose und Apoptose von Hepatozyten die dort akkumulierten TAGs und toxischen Fettsäuren frei. Beides führt, über Lipidperoxide und die durch oxidativen Stress geschädigten Zellstrukturen, zu einer Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) sowie IL-6 (Interleukin 6) und initiiert so eine Entzündungsreaktion (Adams et al., 2005; Cohen et al., 2011; Lieber, 2004; Reddy and Sambasiva Rao, 2006). Diese Entzündungsreaktion stellt einen zentralen Mechanismus für die Entstehung von Fibrose dar (Argo et al., 2009). Eine besondere Rolle dabei spielen hepatische Sternzellen, welche über verschiedenen Zytokine (TGF $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ ) aktiviert werden; für Signalkaskaden ist dabei NF-kappaB essentiell. Die damit verbundene Expression von

Kollagen Typ 1 ist ursächlich für den fibrotischen Umbau der Leber (Hellerbrand, 2013; Hellerbrand et al., 1998; Hellerbrand et al., 1998; Hellerbrand et al., 1999).

#### **1.1.4 Rolle der *Steatosis Hepatis* bei der Primärtumorentstehung**

Auf dem Boden der *Steatosis Hepatis* kann sich über die Sequenz Entzündung, Fibrose und Zirrhose zuallerletzt ein HCC (Hepatozelluläres Karzinom) entwickeln. Das gilt sowohl für die AFLD und die NAFLD, wobei sich das prozentuale Voranschreiten leicht unterscheidet.

Ungefähr 30 % der Patienten mit NAFLD entwickeln eine NASH (*nonalcoholic steatohepatitis*) und von diesen wiederum 20 % eine Leberzirrhose. Der Anteil der Patienten mit Leberzirrhose, bei denen ein Hepatozelluläres Karzinom auftritt, wird auf 0-10 % geschätzt (Levene and Goldin, 2012).

Von Patienten mit AFLD entwickeln 20-40 % eine ASH (*alcoholic steatohepatitis*) und von diesen wiederum 40 % eine Leberzirrhose (Levene and Goldin, 2012). Der Anteil der Patienten mit Leberzirrhose, bei denen innerhalb von fünf Jahren ein HCC entsteht, wird zwischen 1 % (Jepsen et al., 2012) und 8 % (Fattovich et al., 2004) angegeben.

Es bedarf noch der weiteren Klärung, inwiefern das Malignomrisiko bei NAFLD durch das Vorliegen von *Steatosis Hepatis* erhöht ist, oder der damit assoziierten Adipositas, welche einen potentiellen *Confounder* darstellt. Denn Adipositas ist ein wichtiger Risikofaktor für die Karzinomentstehung (Park et al., 2011), auch für das HCC (Starley et al., 2010). Die enge Assoziation von NAFLD und Adipositas erschwert die genaue Ursachenzuordnung. Allerdings existieren Hinweise, dass *Steatosis Hepatis* unabhängig vom BMI das Karzinomrisiko erhöht (Stadlmayr et al., 2011).

Das Stadium einer alleinigen *Steatosis Hepatis*, also die bloße Einlagerung von TAGs in die Hepatozyten, ist prinzipiell reversibel. Der Prozess der Leberverfettung wird als erster Schritt betrachtet und kann in einem zweiten Schritt gemäß der „*two-hit*“ Hypothese in eine Steatohepatitis übergehen (Day and James, 1998).

Für das Voranschreiten vom Stadium der Fibrose bzw. Zirrhose bis zum Auftreten des HCC werden dieselben pathogenetischen Mechanismen, v. a. bedingt durch den Zustand chronischer Entzündung, wie bei der chronisch viral verursachten Hepatitis B und Hepatitis C vermutet. Zusätzlich führt die Entzündungsreaktion in der Leber zu einer Akkumulation von Progenitorzellen (Cuadrado et al., 2005; de Lima et al., 2008; Roskams et al., 2003) und stellt einen Mechanismus für die Entstehung von Fibrose dar (Argo et al., 2009). Es gibt Belege, dass die Interaktion zwischen aktivierten hepatischen Sternzellen und HCC-Zellen die Tumorentwicklung fundamental vorantreibt (Hellerbrand, 2013). Eine Studie am Rattenmodell konnte zeigen, dass freie Fettsäuren Sternzellen zur Ausschüttung von Zytokinen wie TGF- $\beta$

und IL-1 anregen, was wiederum die Migration und Proliferation von HCC-Zellen stimulierte (Mikuriya et al., 2015).

Darüber hinaus scheinen bei NASH noch weitere Trigger der Karzinogenese zu existieren. Das wird dadurch gestützt, dass bei NAFLD auch ein HCC auftritt, ohne dass eine Zirrhose vorliegt (Guzman et al., 2008; Yang et al., 2001). Die bei NAFLD aufgrund der Insulinresistenz bestehende Hyperinsulinämie bewirkt eine vermehrte Ausschüttung von IGF 1 (*insulin-like Growth Factor 1*) und eine Aktivierung von IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*). Beide fördern die Zellproliferation und verhindern die Zellapoptose (Starley et al., 2010) und könnten so die Karzinogenese begünstigen.

### **1.1.5 Rolle der *Steatosis Hepatis* bei der Sekundärtumorentstehung in der Leber**

Bezüglich des Einflusses von *Steatosis Hepatis* auf das Metastasierungsverhalten v. a. von kolorektalen Karzinomen ist die momentane Studienlage uneinheitlich.

Einerseits wird postuliert, dass Steatose in der Leber ein für Metastasen durchlässiges Mikromilieu („*permissive microenvironment*“ (VanSaun et al., 2009)) erzeugt und so die Leber empfindlicher für das Auftreten von Sekundärtumoren wird. Ursache des veränderten Milieus sind die bereits beschriebenen biochemischen Veränderungen auf Stoffwechselebene und pathophysiologischen Auswirkungen der chronischen Entzündung durch Zytokine. So tritt beispielsweise das Zytokin TGF- $\beta$  bei Leberverletzungen gehäuft auf (Kharbanda et al., 2004). Es ist aber auch mit Tumorinvasion und Angiogenese assoziiert (Yu and Stamenkovic, 2000), über die dafür essentiellen Matrix-Metalloproteinasen (Gorden et al., 2007; Wick et al., 2001). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass MMP 13, eine Metalloprotease, in verfetteten Lebern von Mäusen und auch Menschen hochreguliert ist. Interessanterweise fanden sich bei Mäusen vom Typ *Mmp13*<sup>-/-</sup> verglichen mit dem Wildtyp eine deutlich geringere Metastasenlast der Leber nach Okulation von Tumorzellen, der Effekt wird durch eine verminderte Extravasation der Tumorzellen erklärt (Mendonsa et al., 2015). Van Saun et al. wiesen 2009 am Tiermodell in einer Studie nach, dass bereits ein frühes Stadium der *Steatosis Hepatis* für das Auftreten multipler kolorektaler Metastasen prädisponiert; hierfür wurde eine *Steatosis Hepatis* durch fetthaltige Ernährung bei Mäusen induziert und Kolonkarzinomzellen injiziert.

Eine andere Studie konnte am Tiermodell zeigen, dass Mikrometastasen bei *Steatosis Hepatis* nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden häufiger auftreten als bei nicht verfetteter Leber (van der Bilt et al., 2008). Darüber hinaus konnte in einer weiteren Studie belegt werden, dass das alleinige Vorliegen einer *Steatosis Hepatis* unabhängig von BMI und Glukosetoleranz das Risiko kolorektaler primärer Neoplasien erhöht (Stadlmayr et al., 2011). Das alleinige

Vorliegen von *Steatosis Hepatis* stellt einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten von Lokalrezidiven nach Resektion von Lebermetastasen dar (Hamady et al., 2013), ferner fand eine kürzlich durchgeführte Studie eine Häufung von *Steatosis Hepatitis* bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen (Schulz et al., 2015), eine andere bei Patientinnen mit Metastasen bei Mammakarzinom (Ocak Duran et al., 2015).

Im Gegensatz dazu existieren Belege für einen protektiven Effekt einer *Steatosis Hepatis* hinsichtlich des Auftretens von Lebermetastasen. Augustin et al. postulieren 2013, dass durch das bereits aktivierte Immunsystem effektiv Metastasen beseitigt werden und, dass hohe Konzentrationen an Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen am hepatischen Gefäßendothel die Tumorinvasion behindern. Das seltenere Auftreten von Metastasen bei einer *Steatosis Hepatis* wurde sowohl klinisch (Hayashi et al., 1997) als auch experimentell am Tiermodell (Tamura et al., 1999) bestätigt. Als molekularbiologische Ursache wurde hier eine verminderte Angiogenese postuliert, die mit einer niedrigeren Konzentration an PyNPase (Pyrimidin Nukleosid Phosphorylase), verbunden war (Karube et al., 2000). PyNPase ist identisch mit PD-ECGF (*platelet-derived endothelial cell growth factor*), einem Faktor der Angiogenese, der auch bei anderen Neoplasien eine bedeutende Rolle spielt (Suzuki et al., 2001). Andere klinische Studien konnten die protektive Wirkung von Steatose reproduzieren (Iascone et al., 2005; Murono et al., 2013; Parasca and O'Brien, 2013). Auch größere Metaanalysen, die unterschiedliche chronische Lebererkrankungen inklusive einer *Steatosis Hepatis* betrachteten, konnte das Ergebnis bestätigen (Augustin et al., 2013; Cai et al., 2014).

<b>negative Effekte</b>	<b>Art der Studie</b>	<b>positive Effekte</b>	<b>Art der Studie</b>
van der Bilt et al., 2008	experimentell	Tamura et al., 1999	experimentell
VanSaun et al., 2009	experimentell	Karube et al., 2000	experimentell
Mendonsa et al., 2015	experimentell	Hayashi et al., 1997	klinisch
Hamady et al., 2013	klinisch	Iascone et al., 2005	klinisch
Schulz et al., 2015	klinisch	Murono et al., 2013	klinisch
Ocak Duran et al., 2015	klinisch	Parasca and O'Brien, 2013	klinisch
		Augustin et al., 2013	Metaanalyse
		Cai et al., 2014	Metaanalyse

**Tabelle 1: Gegenüberstellung von Studien bezüglich des Einflusses von *Steatosis Hepatis* auf Lebermetastasen.**

## **1.2 Bedeutung der *Steatosis Hepatis* in der hepatobiliären Chirurgie und Transplantation**

Die *Steatosis Hepatis* stellt einen bedeutenden Risikofaktor für die Leberchirurgie dar. Erste Hinweise diesbezüglich fanden sich in der Lebertransplantation, wo bereits gering bzw. mäßig verfettete Lebertransplantate ein schlechteres *Outcome* aufwiesen (Marsman et al., 1996; Ploeg et al., 1993; Pratschke et al., 2010; Strasberg et al., 1994), u. a. spielt die Ischämie-Reperfusion eine wichtige Rolle (Pratschke et al., 2011).

### **1.2.1 Klinische Relevanz in der hepatobiliären Chirurgie**

Auch in der hepatobiliären Chirurgie spielt *Steatosis Hepatis* eine zentrale Rolle. Dies gilt zum einen für die „*major hepatectomy*“, welche als Resektion von mindestens vier Lebersegmenten definiert wird (Reddy et al., 2011). Eine Studie konnte zeigen, dass eine *Steatosis Hepatis* hier die postoperative Morbidität und Mortalität erhöht (Behrns et al., 1998), was im Rahmen einer Metaanalyse bestätigt wurde (de Meijer et al., 2010). Zwei weitere Studien konnten belegen, dass die *Steatosis Hepatis* einen Risikofaktor für postoperative Komplikationen bei Hepatektomien darstellt (Belghiti et al., 2000; McCormack et al., 2007); eine weitere, dass postoperative Komplikationen bei Hepatektomien zudem positiv mit dem Verfettungsgrad korrelieren (Kooby et al., 2003). Allerdings konnte in allen drei Studien kein Einfluss auf die Mortalität nachgewiesen werden (Belghiti et al., 2000; Kooby et al., 2003; McCormack et al., 2007).

Darüber hinaus scheint die *Steatosis Hepatis* auch bei kleineren Leberresektionen von Metastasen eine relevante Stellung einzunehmen. Auch hier gilt die *Steatosis Hepatis* als ein unabhängiger Risikofaktor für postoperative Morbidität, wohingegen die Mortalität unbeeinflusst ist (Gomez et al., 2007). Bei der Resektion von Lebermetastasen scheint eine Steatose das Langzeitüberleben nicht zu beeinflussen (Parkin et al., 2014; Pathak et al., 2010). Die Datenlage zum Einfluss von Steatose ist nicht komplett einheitlich. Einige Studien konnten nachweisen, dass das Vorliegen von *Steatosis Hepatis* bei Resektionen von HCC (Wu et al., 2011) bzw. Lebermetastasen (Parkin et al., 2013; Vigano et al., 2013) das Langzeitüberleben sogar verbessert.

Einen alternativen Erklärungsansatz, welche die Diskrepanzen zwischen den bereits erschienenen Studien erklären könnte, bietet eine vor kurzem publizierte Studie. Sie konnte zeigen, dass nur die entzündliche veränderte Form, die Steatohepatitis, mit einer erhöhten Morbidität nach Leberresektionen assoziiert ist, nicht jedoch die reine *Steatosis Hepatis* (Reddy et al., 2012). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass PPAR- $\alpha$  mit entzündlichen Prozessen der

Leber und mit einer Verschlechterung des *Overall-Survivals* bei Hepatektomie bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen assoziiert ist (Pang et al., 2015).

### **1.2.2 Ischämie-Reperfusionsschaden und Ischämietoleranz**

Die Steatose erhöht intraoperativ die Anfälligkeit der Leber für einen Ischämie-Reperfusionsschaden (Tashiro et al., 2013). Die erhöhte Vulnerabilität der Leber bei Steatose wird durch Störungen der Mikrozirkulation und der biochemischen Energiehomöostase bedingt (Vetelainen et al., 2007). Experimentelle Studien konnten zeigen, dass die hepatische Mikrozirkulation invers mit dem Verfettungsgrad korreliert (Seifalian et al., 1999). Begründet wird dies u.a. dadurch, dass die durch Fettakkumulation angeschwollenen Hepatozyten den sinusoidalen Blutfluss behindern (Farrell et al., 2008). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Energiehomöostase bei *Steatosis Hepatis* bereits im Normalzustand gestört ist. Durch oxidativen Stress, wie beispielsweise Fasten, kommt es zur Exazerbation dieser Störung. Diese spiegelt sich in der Abnahme der ohnehin niedrigen Konzentration an ATP (Adenosintriphosphat) und der ATP-Synthase in den fettbeladenen Hepatozyten wider (Caraceni et al., 2005; Cortez-Pinto et al., 1999; Morris et al., 2011; Vendemiale et al., 2001); aber auch das antioxidative System, u. a. bestehend aus Glutathion und der Glutathion-S-Transferase, weist deutliche Veränderung gegenüber Gesunden auf (Baltruskeviciene et al., 2016). Diese ausgeprägte Vulnerabilität mitochondrialer Funktionen gegenüber oxidativem Stress und die gestörte Mikrozirkulation können zu Zellnekrosen führen (Vetelainen et al., 2007).

### **1.2.3 Leberregeneration**

Zusätzlich schränkt die *Steatosis Hepatis* auch postoperativ die funktionelle und strukturelle Leberregeneration ein. Die Einschränkungen resultieren aus den bereits beschriebenen Störungen der ATP-Homöostase. Darüber hinaus spielen Beeinträchtigungen des Zellzyklus eine wichtige Rolle. Zum einen scheint die DNS-Replikation verzögert zu sein (Hamano et al., 2014), zum anderen scheinen aber der Übergang von der G1 zur S-Phase (Yang et al., 2001) bzw. in der Mitte der S Phase (Murata et al., 2007) blockiert zu sein. Ferner spielt das Protein ALR (*Augmenter of Liver Regeneration*) eine zentrale Rolle, hinsichtlich Zellüberleben und Regeneration und metabolische Homöostase; interessanterweise ist die Abwesenheit von *ALR* mit Steatose assoziiert (Nalesnik et al., 2017). Auch die Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen in kleinsten Gefäßen ist bedeutend für den Ischämie-Reperfusionsschaden (Khandoga et al., 2003) bzw. die Aktivierung von PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase) und die damit verbundene Expression von Adhäsionsmolekülen, welche für eine Interaktion

zwischen Thrombozyten bzw. Leukozyten und Endothelzellen essentiell sind (Khandoga et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es laut aktueller Studienlage klare Signale hinsichtlich des Zusammenhangs einer *Steatosis Hepatis* und Lebermetastasierung gibt. Dasselbe gilt für die Datenlage zum Einfluss von *Steatosis Hepatis* auf Morbidität, Mortalität und Langzeitüberleben nach Leberresektionen.

## **2 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit war es, mittels eines Patienten- und Kontrollkollektivs den Einfluss von *Steatosis Hepatis* auf perioperative Morbidität, Mortalität und das Langzeitüberleben nach Leberresektionen von Lebermetastasen zu untersuchen. Zur Präzisionserhöhung sollte hier erstmals ein objektiv bildmorphologisches Verfahren zur Bestimmung des histologischen Verfettungsgrads angewandt werden. Dieses sollte mit dem aktuellen histopathologischen *Standard-Score* der Pathologie, nach Kleiner et al. von 2005 (*Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network*) verglichen werden. Zudem sollte der Einfluss von perioperativen Faktoren hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz für Morbidität und Mortalität nach Leberresektionen evaluiert werden.

### **2.1 Leberresektion von Lebermetastasen**

Hauptziel war die Analyse des Einflusses von *Steatosis Hepatis* einerseits auf perioperative Morbidität und Mortalität sowie andererseits auf „tumorfrees Überleben“ (Zeit bis Rezidiv) und *Overall Survival* (Gesamtüberleben) nach Leberresektionen von Lebermetastasen.

Zusätzlich sollten weitere prognostische Faktoren innerhalb des Patientenkollektivs, wie Laborparameter (GOT, GPT, GGT), Resektionsvolumen, Blutverlust etc., bezüglich perioperativer Morbidität und Mortalität identifiziert werden.

Ein Nebenziel war es, zu untersuchen, ob die *Steatosis Hepatis* das Auftreten von Lebermetastasen positiv oder negativ beeinflusst. Vor diesem Hintergrund sollte eine potentielle Assoziation zwischen Metastasenanzahl sowie Metastasenrezidiv der Leber und Verfettungsgrad geprüft werden.

### **2.2 Objektiv-bildmorphologisches Verfahren**

Ziel war die Evaluierung des objektiv bildmorphologischen Verfahrens zur Bestimmung des Verfettungsgrads, v. a. in Hinblick auf Morbidität, Mortalität und Langzeitüberleben. Insbesondere sollte ein Vergleich mit den etablierten Methoden erfolgen. Zusätzlich sollte geprüft werden, inwiefern der objektiv-quantitativ bestimmte Verfettungsgrad mit laborchemischen metabolischen Parametern (TAGs, LDL, HDL, VLDL etc.) und auch klinischen Parametern (BMI) assoziiert war.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Erfassung von Patientendaten

Die Erfassung von Patientendaten erfolgte mit der Datenbanksoftware File Maker Pro 5, FileMaker, Inc. Santa Clara, California. Die Datenbank umfasste die Speicherung patientenbezogener, prä-, intra- und postoperativer Parameter. Als Informationsquelle dienten Erfassungsbögen, Operationsberichte und Arztbriefe, mit deren Hilfe die Daten in die Datenbank eingetragen wurden. Bei Unvollständigkeit wurden Patientenakten und histopathologische Berichte des Pathologischen Instituts der LMU München zur Informationsbeschaffung verwendet. Zur Erfassung von Langzeitverläufen wurden die Patienten bzw. die zuständigen Ärzte der Patienten per Telefon oder Telefax kontaktiert. Die retrospektive nicht verblindete Analyse von klinischen Patientendaten aus dem Behandlungskontext (Patientenakten der Chirurgischen Klinik) wurde bei der Ethikkommission angezeigt. Die pseudonymisierte (doppeltverblindete) Analyse von humanem Gewebe bzw. Serum und korrespondierender Daten im Rahmen der Nachuntersuchung von Gewebeschnitten wurde von der Biobank der Abteilung für Allgemeinchirurgie, Viszeralchirurgie und Transplantationschirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) bereitgestellt. Die Biobank steht unter der Verwaltung der *Human Tissue and Cell Research* (HTCR)-Stiftung. Der wissenschaftliche Rahmen der HTCR Stiftung, der eine schriftliche informierte Einwilligung („*informed consent*“) der Spender beinhaltet und einfordert, wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU (Genehmigungsnummer 025-12) und von der Bayerischen Landesärztekammer (Genehmigungsnummer 11142) genehmigt.

#### Patientenbezogene Parameter

- Alter und Geschlecht
- Nebenerkrankungen (pulmonal, kardial, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie), ASA-Klassifikation, BMI, Hepatitis B oder C
- Präoperative Laborwerte zur Evaluation von Zellintegrität und Syntheseleistung (Bilirubin, GOT, GPT, Alkalische Phosphatase, Gamma GT, Quick, Cholinesterase) und des Fettstoffwechsels (TAGs, VLDL, HDL, LDL, Apo A1, Apo B)

#### Tumorassoziierte Parameter

- Art des Primärtumors und TNM-Klassifikation

- Chronologie der Metastasierung (synchron / metachron) und Zeitraum des „krankheitsfreien“ Intervalls von Primärtumor bis Metastasenauftreten
- Serumkonzentrationen von Tumormarkern (AFP, CA 19-9, CEA)
- Neoadjuvante Chemotherapie

#### Intraoperative Parameter

- Art und Radikalität der Resektion
- Resektatvolumen und Metastasengröße
- Operationsdauer und Blutverlust, Substitution von Erythrozytenkonzentraten
- Entfernung von Lymphknoten
- Begleiteingriffe
- *Pringle*-Manöver und *Pringle*-Zeit

#### Postoperative Parameter

- TNM-Klassifikation und *Grading* der Pathologie
- Zeitdauer des stationären Aufenthaltes und Aufenthalt auf der Intensivstation
- Komplikationen
- Rezidive in der Leber und Fernmetastasen
- Dauer des „tumorfreen“ Intervalls
- Todeszeitpunkt, Todesursache und Überlebenszeit

### 3.2 Patientenselektion

Das objektive, histologisch-bildmorphologische Verfahren wurde bei einem Patientenkollektiv innerhalb des Zeitraums von 2003 bis Juli 2012 am Klinikum Großhadern mit *Steatosis Hepatis* (verblindet ausgewertet von einem Pathologen) und Leberresektionen bei Lebermetastasen (n=177) aus der Gewebekbank i. A. der HTCR-Stiftung (Biobank) und der in einer Datenbank erfassten Patientendaten mittels *Filemaker Pro 5*, einer Software zur Datenbankerstellung und -verwaltung, angewandt. Von n=177 PatientInnen lagen nur für n=112 histologische Schnitte vor. Diese wurden mithilfe des *Mirax Digital Slide Scanners* digitalisiert und anschließend mittels *Lipid Droplet Count* von MEVIS objektiv-quantitativ hinsichtlich ihres Verfettungsgrades ausgewertet. Auf Basis dieser 112 Patienten mit quantifizierter Steatose und Leberresektionen bei Lebermetastasen erfolgte die weitere Analyse. Die histopathologische Beurteilung des Leberparenchyms, insbesondere des Verfettungsgrades, erfolgte durch das Pathologische Institut der LMU München. Diese Patientengruppe mit Steatose und Resektionen bei Lebermetastasen der Größe n=112 wurde für die weitere Analyse verwendet. Zu dieser Gruppe wurde eine bezüglich Alter und Geschlecht gematchte Kontrollgruppe ohne *Steatosis Hepatis* erstellt. Für die Erstellung der Kontrollgruppe wurden aus allen Patienten mit Resektion von Lebermetastasen ohne *Steatosis Hepatis* im Zeitraum von 2003-2012 aus der Gewebekbank i. A. der HTCR-Stiftung (n=160) eine Gruppe von n=29 Patienten ausgewählt (Abbildung 1). Die zufällige Auswahl erfolgte mithilfe der Software R (*R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria) um Selektionsbias zu vermeiden. Auch diese Gruppe wurde digitalisiert und mittels *Lipid Droplet Count* von MEVIS hinsichtlich des Steatosegrads ausgewertet.

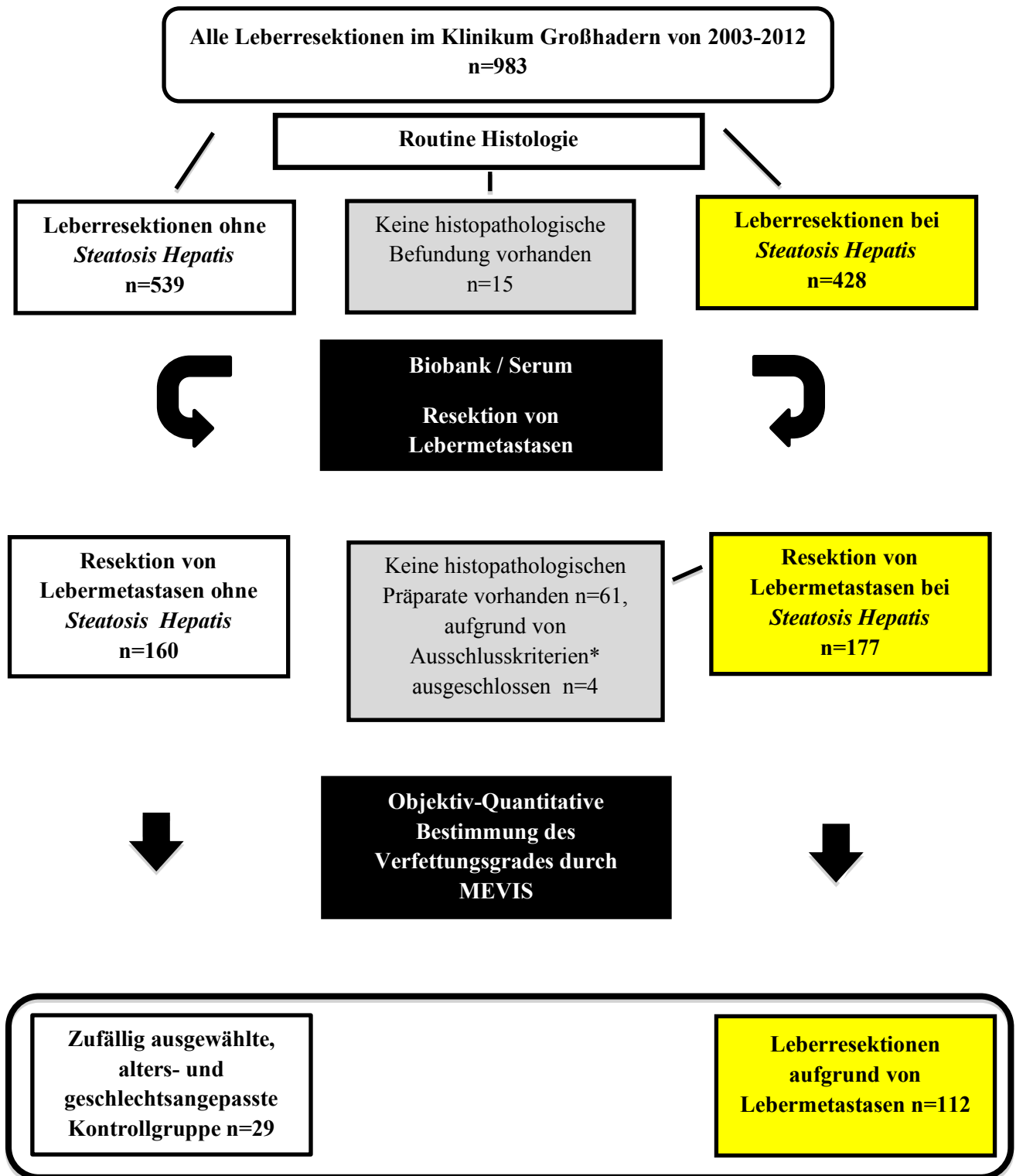


Abbildung 1: Schema der Gruppenselektion. Patienten mit Steatose sind gelb, fehlende Daten sind grau gekennzeichnet. \*Ausschlusskriterien bei der Objektiv-Quantitativen Bestimmung des Verfettungsgrades waren: erhöhter Tumoranteil, erhöhte Gewebedicke und Artefakte.

In einem ersten Schritt wurde die Steatosegruppe hinsichtlich prä-, intra- und postoperativer Parameter insbesondere der perioperativen Morbidität und Mortalität mit der Kontrollgruppe verglichen. Zudem wurde das *Overall-Survival* (Gesamtüberleben) und „tumorfrees Überleben“ (Zeit bis Rezidiv) nach der Resektion von Lebermetastasen zwischen beiden Gruppen verglichen.

In weiteren Schritten wurden statistische Analysen für das komplette Kollektiv gerechnet, u. a. wurde ein multivariates Modell für perioperative Morbidität und Mortalität erstellt.

### **3.3 MIRAX Scanner**

Die mit HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbten Gewebeschnitte des Leberparenchyms der Patienten wurden mithilfe des *MIRAX DIGITAL SLIDE SCANNERS* von ZEISS (1/3 Zoll type Progressive SCAN IT CCD, 1 Pixel: 4,65  $\mu\text{m}$  x 4,65  $\mu\text{m}$ , Pixelauflösung mit 20x-Objektiv von 0,23  $\mu\text{m}$ ), einer Kopplung von Mikroskop und Scanner zur Erzeugung hochaufgelöster digitaler Datensätze, und eines PCs im mrxs Format komplett digitalisiert. Sowohl während des Scanvorgangs als auch danach erfolgte eine visuelle Qualitätskontrolle der gescannten Schnitte mittels *MIRAX Viewer* (Zeiss) / *Pannoramic Viewer* (3DHISTECH Ltd.). Artefakte, Tumoranteile und starke Abweichungen der Gewebedicke wurden notiert, um grobe Störquellen beseitigen zu können. Aufgrund dieser Ausschlusskriterien wurden 4 Patienten von der Analyse ausgeschlossen (hoher Tumoranteil n=2, hohe Gewebedicke n=1 und Artefakte n=1).

### **3.4 Lipid Droplet Count MEVIS**

Die digitalisierten Gewebsschnitte wurden über das Fraunhofer-Institut für Bildgestützte Medizin (MEVIS) mittels software-gestützter Algorithmen hinsichtlich ihres prozentualen Fettgehalts ausgewertet. Dazu wurde ein etabliertes Vorgehen verwendet. Nach Identifizierung lokaler Maxima (weiße Fettvakuolen) wurde auf Basis verschiedener Algorithmen mithilfe eines gesetzten Schwellenwertes der Anteil von Fettvakuolenfläche an der Gesamtfläche bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Pixel als Vorder- oder Hintergrundpixel klassifiziert. Vordergrundpixel repräsentierten helle Gewebsabschnitte, Hintergrundpixel das gefärbte Gewebe. Im zweiten Schritt wurden miteinander verbundene Flächen von Vordergrundpixel („blobs“) als Fettvakuolen, Risse oder Gefäße eingeteilt. Daraus resultierte eine binäre Maske, in der jeder Pixel für Fett oder kein Fett codierte. Der Anteil der Pixel, die Fett repräsentieren, an der gesamten Fläche definierte den Verfettungsgrad, dieser wurde auf ganze Zahlen gerundet (Homeyer et al., 2017).

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS (*Superior Performance Software System 22.0, IBM, Chicago, Illinois*) durchgeführt, die jeweils angewandten statistischen Tests sind in den Unterpunkten aufgeführt.

#### **3.5.1 Gruppenunterschiede**

Um Gruppenunterschiede zwischen zwei Gruppen zu evaluieren, wurde bei nominalen Daten der Chi-Quadrat-Test, bei Fallzahl von  $n > 60$  und erwarteter Anzahl pro Feld  $> 5$ , bzw. bei kleineren Fallzahlen der exakte Test nach *Fisher* durchgeführt. Bei ordinalen Daten wurde der *Mann-Whitney U-Test* angewandt. Bei metrischen Daten wurde zuerst mittels *Kolmogorov-Smirnov-Test* auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft und visuell mittels Histogramm kontrolliert. Bei metrischen, normalverteilten Daten erfolgte ein *T-Test* für unabhängige Stichproben. Bei metrischen, nicht normalverteilten Daten wurde der *Mann-Whitney U-Test* angewandt.

Bezüglich perioperativer Morbidität und Mortalität wurden univariate Analysen mit *Chi-Quadrat-Test* / exaktem Test nach *Fisher* bzw. *Mann-Whitney U-Test* durchgeführt. Anschließend erfolgte eine multivariate Analyse mittels logistischer Regression für die Variablen, die das Signifikanzniveau in der univariaten Analyse erreichten. Vor Beginn der multivariaten Analyse wurden die unabhängigen Variablen auf Multikollinearität getestet. Zu diesem Zweck erfolgten Korrelationen nach *Spearman/Pearson*, sowie Kollinearitätsanalysen mittels eines *General Linear Models* (GLM) und *Variance Inflation Factors* (VIF). Unabhängige Variablen mit  $VIF > 10$  bzw. Toleranz  $< 0,2$  wurden ausgeschlossen, was für keine Variable erforderlich war. Allerdings wurden hoch korrelierende und auch ätiologisch konkurrierende Variablen hinsichtlich höherer Güte des Modells der logistischen Regression selektiert (geringere *-2Log-Likelihood* größeres R-Quadrat nach Cox & Snell bzw. Nagelkerkes).

Das Signifikanzniveau betrug  $\alpha < 0,05$ . Bei multiplen Vergleichen wurde mittels FDR-Korrektur korrigiert (Benjamini and Hochberg, 1995).

#### **3.5.2 Korrelation des Verfettungsgrades**

Zur Evaluierung des Zusammenhangs zwischen objektiv-quantitativ und durch einen verblindeten Pathologen bestimmten Verfettungsgrad wurden Korrelationen nach *Pearson* für metrische Variablen bzw. Korrelationen nach *Spearman* für ordinale Variablen durchgeführt.

### **3.5.3 Überlebenszeitanalysen**

Es wurden univariate Analysen zur potentiellen Identifizierung von Steatose als Prognosefaktor für das *Overall-Survival* bzw. „tumorfrie Überleben“ (Zeit bis Rezidiv) durchgeführt. Dazu dienten Kaplan-Meier-Kurven und ein nachfolgender *Log-Rank-Test*.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gruppenvergleich von Steatose- und Kontrollgruppe

#### 4.1.1 Präoperative Parameter

Klinische Patientencharakteristika	Steatose (n=112)	Kontrollen (n=29)	p-Wert
Alter (Jahre)	63 ± 11	59 ± 12	0,68
Geschlecht (m/f)	65/47 (42%)	17/12 (41%)	0,96
ASA-Klassifikation (I/II/III/IV)	0   35   76   1	0   10   18   1	0,54
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,1 ± 5,1	23,4 ± 2,8	<b>0,0001</b>
Komorbiditäten	41 (37%)	5 (17 %)	0,074
-Kardiale Vorerkrankungen	14	2	0,53
-Pulmonale Vorerkrankungen	4	2	0,60
-Diabetes mellitus	11	2	1,0
-Arterielle Hypertonie	31 (28%)	2 (7%)	<b>0,024</b>
Hepatitis C	1	0	1,0
Alkoholabusus (anamnestisch dokumentiert)	3	0	1,0
<b>Laborchemische Parameter</b>			
TAGs (mg/dl)	152 ± 63	120 ± 55	<b>0,022</b>
VLDL (mg/dl)	21 ± 9	17 ± 8	<b>0,030</b>
LDL (mg/dl)	130 ± 42	134 ± 39	0,64
HDL (mg/dl)	46 ± 15	55 ± 18	<b>0,011</b>
Apo A 1 (mg/dl)	141 ± 36	146 ± 34	0,51
Apo B (mg/dl)	101 ± 28	101 ± 27	0,94
CRP (mg/dl)	0,9 ± 1,5	2,0 ± 3,9	0,47
Alkalische Phosphatase (U/l)	118 ± 79	117 ± 63	0,85
Bilirubin gesamt (mg/dl)	0,9 ± 0,7	0,8 ± 0,3	0,80
GOT (U/l)	63 ± 84	40 ± 38	0,32
GPT (U/l)	64 ± 85	45 ± 63	0,14
GGT (U/l)	128 ± 219	148 ± 252	0,98
Cholinesterase (kU/l)	7,53 ± 2,09	6,73 ± 1,62	<b>0,015</b>
Kreatinin (mg/dl)	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,14
Hämoglobin (g/dl)	13,1 ± 2,7	12,7 ± 2,9	0,24
Quick (%)	92 ± 18,4	95 ± 12,0	0,81

**Tabelle 2: Demographische, klinische und laborchemische Charakteristika von Steatose- und Kontrollgruppe. Stetige Variablen sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Signifikante Werte sind fett dargestellt.**



<b>Onkologische Daten</b>	<b>Steatose (n=112)</b>	<b>Kontrollen (n=29)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Primärtumor (aufgeschlüsselt)</b>			0,50
-Kolorektales Karzinom	77 (69%)	18 (62%)	
-Nierenzell-Ca	8	2	
-Neuroendokriner Tumor	6	3	
-Mamma-Ca	4	2	
-Melanom	4		
-Leiomyosarkom	2	1	
-Endometrium-Ca	2		
-Urothel-Ca	2		
-Plattenepithelkarzinom	1	1	
-GIST	1	1	
-Malignes Teratom	1		
-Bronchial-Ca	1		
-Chorion-Ca	1		
-Pankreas-Ca	1		
-Ovarial-Ca	1		
-Nephroblastom		1	
<b>Neoadjuvante Chemotherapie</b>	69 (62%)	16 (55%)	0,15

**Tabelle 3: Onkologische Daten von Steatose- und Kontrollgruppe. Details zur Art der Chemotherapie s. Anhang.**

Das Patientenkollektiv bestand aus n=112 PatientInnen mit histologisch gesicherter *Steatosis Hepatis* (Steatosegrad verblindet evaluiert durch einen Pathologen >5%, nach aktuellen standardisierten Kriterien gemäß Kleiner et al.) nach Leberresektion bei Lebermetastasen. Das Alter betrug im Mittelwert 63 Jahre (SD 11 Jahre); das Geschlechterverhältnis betrug n=47 Frauen (42%). Es wurden n=29 alters- und geschlechtsangepasste Kontrollen, mittels eines Zufallsgenerators ausgewählt, hier wurde histologisch eine *Steatosis Hepatis* ausgeschlossen; deren Alter betrug 59 Jahre (SD 12 Jahre) mit n=12 Frauen (41%) (siehe Tabelle 2).

Beide Gruppen unterschieden sich nicht bezüglich ihrer demographischen Charakteristika, präoperativer Leber- und Nierenfunktion, Zellintegrität der Leber, Entzündungswerten, ASA-Klassifikation und Komorbiditäten (Diabetes mellitus, kardiale und pulmonale Vorerkrankungen) und waren damit vergleichbar, lediglich eine arterielle Hypertonie war bei den PatientInnen der Gruppe mit *Steatosis Hepatis* häufiger (28 % vs. 7%; p=0,024). Bezüglich

der Häufigkeit und Substanzauswahl einer neoadjuvanten Chemotherapie und der Art des Primärtumors waren beide Gruppen ebenfalls vergleichbar (Tabelle 2 und 3).

Wie erwartet bestätigte sich ein erhöhter BMI der PatientInnen; er betrug im Mittel 27,1 kg/m<sup>2</sup> (SD 5,1), derjenige der Kontrollen 23,4 kg/m<sup>2</sup> (SD 2.8); der Unterschied war hochsignifikant (p=0,0001). Laborchemisch waren als metabolische Marker nur TAG-, VLDL- und CHE-Konzentration der SteatosepatientInnen signifikant erhöht (TAG: 152 vs. 120 mg/dl; p=0,022. VLDL: 21 vs. 17 mg/dl; p=0,030. Cholinesterase 152 vs. 120 mg/dl; p=0,015), die HDL-Konzentration (p=0,011) war signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe. Weitere metabolische Marker unterschieden sich nicht signifikant (LDL, Apo A1, Apo B) (Tabelle 2).

Interessanterweise war über beide Gruppen hinweg die arterielle Hypertonie mit einem höheren BMI assoziiert, was mit der klinischen Erfahrung korreliert. Der BMI der Gruppe mit arterieller Hypertonie betrug 28,0 kg/m<sup>2</sup> (SD 5,0 kg/m<sup>2</sup>), derjenige der Gruppe ohne arterielle Hypertonie 25,8 kg/m<sup>2</sup> (SD 5,0 kg/m<sup>2</sup>) (p=0,009).

#### 4.1.2 Intraoperative Parameter

Intraoperative Parameter zwischen beiden Gruppen wurden verglichen, um potentielle *Confounder* zu identifizieren.

<b>Intraoperative Parameter</b>	<b>Steatose (n=112)</b>	<b>Kontrollen (n=29)</b>	<b>p-Wert</b>
Lobektomie und mehr	44 (39%)	12 (41%)	0,84
Hemihepatektomie und mehr	35 (31%)	11 (38%)	0,49
Zentrale Resektionen	5	2	0,63
R0/R1/R2	106/5/1	25/2/2	0,11
Pringle-Manöver	27	6	0,70
Pringle-Zeit (min)	20 ± 10 (n=25)	19 ± 8	0,78
Blutverlust (ml)	760 ± 1120 (n=109)	640 ± 650 (n=28)	0,84
Substitution von EKs	33 (n=111)	6	0,52
Substitution von FFPs	15	5	0,56
Mittlere Anzahl der EKs	0,7 ± 1,4	0,8 ± 2,1	0,53
Mittlere Anzahl der FFPs	0,9 ± 2,4	1,1 ± 2,8	0,89
Mittlere Anzahl der EKs im Substitutionsfall	2,4 ± 1,7	3,7 ± 3,3	0,27
Mittlere Anzahl der FFPs im Substitutionsfall	6,2 ± 2,4	7,3 ± 3,1	0,30
Blutverlust bei EK-Substit. (ml)	1630 ± 1680 (n=30)	1050 ± 890 (n=6)	0,73

Resektatvolumen (ml)	339 ± 347	365 ± 322	0,58
OP-Dauer (min.)	177 ± 59	176 ± 78	0,76
Metastasenanzahl (intraop.)	2 ± 1	2 ± 1	0,91
Zusätzlicher Eingriff	105 (94%)	105 (83%)	0,07

**Tabelle 4: Intraoperative Parameter von Steatose- und Kontrollgruppe. Stetige Variablen sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.**

	Steatose (n=112)	Kontrollen (n=29)	p-Wert
<b>Resektionsarten</b>			0,14
Gruppe 1: Probeexzisionen, atypische Resektion und Resektion eines ganzen Segments	49 (44%)	12 (41%)	
Gruppe 2: Bisegmentomien, Lobektomien	18 (16%)	1 (3%)	
Gruppe 3 Resektion von 3 und mehr vollständigen Segmenten, Hemihepatektomien rechts und links sowie erweiterte Hemihepatektomie, Zentrale Resektionen	40 (43%)	16 (55 %)	

**Tabelle 5: Resektionsarten gruppiert nach Resektionsausmaß.**

Die Gruppen waren bezüglich aller intraoperativen Parameter und damit hinsichtlich der chirurgischen Strategie insbesondere der Ischämiezeit vergleichbar (Resektionsart, Resektionsausmaß, Resektionsvolumen, Blutverlust, Substitution von Blutprodukten, Operationsdauer, Metastasenanzahl, Pringle-Manöver, Pringle-Zeit, etc.) (Tabelle 4).

Bei einer Kombination mehrerer Verfahren wurde die Resektion mit dem größten Ausmaß genannt (siehe Tabelle 5). Zusätzlich erfolgt eine Einteilung in 3 Resektionsgruppen, die bezüglich Ausdehnung der Resektion und technische Schwierigkeit vergleichbar waren, auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,14$ ). Zusammengefasst wurden in Gruppe 1: Probeexzisionen, atypische Resektion und Resektion eines ganzen Segments; in Gruppe 2: Bisegmentomien, Lobektomien, in Gruppe 3: Hemihepatektomien rechts und links sowie erweiterte Hemihepatektomien und Zentrale Resektionen (Stielow, 2011).

## 4.2 Vergleich des objektiv-quantitativen Steatosegrads nach MEVIS mit dem etablierten Standard der Pathologie

### 4.2.1 Histopathologische Evaluation

Zur Bewertung der Güte des nach MEVIS ermittelten Steatosegrads und zum Gruppenvergleich erfolgte eine verblindete Evaluation aller gescannten Schnitte durch einen geschulten Pathologen hinsichtlich unterschiedlicher histopathologischer Parameter gemäß Kleiner et. al.: Steatoseform: makrovesikulär (1), mikrovesikulär (2) und *mixed* (3); Steatosegrad gruppiert < 5% (0), 5 - 33% (1), 33 - 66% (2), > 66% (3); Steatosegrad in Prozent; Steatoselokalisation: perizentral (1), periportal (2), diffus (3); Fibrose (Desmet et al., 1994) keine (0), portal (1), septal (2), Architekturverzerrung (3), Zirrhose (4); Entzündung lobulär: keine (0), < 2 Foci (1) 2 - 4 Foci (2) > 4 Foci (3); Entzündung lobulär nein (0), ja (1); Ballonierung: keine (0), rund und wenig (1), vergrößert und zahlreich (2).

Ein Schnitt und damit Fall wurde aufgrund schlechter Qualität ausgeschlossen; Mallory-Bodies waren in keinem der Schnitte zu detektieren.

Histopathologische Analyse (n=140)	Steatose	Kontrollen	p-Wert
Steatoseform (0/1/2/3)	14/66/1/30	15/11/1/2	<b>0,0001</b>
Steatosegrad gruppiert (0/1/2/3)	52/45/10/4	27/2/0/0	<b>0,0002</b>
Steatosegrad in Prozent	13,2 ± 17,9	1,8 ± 3,9	<b>0,0001</b>
Steatose Lokalisation (0/1/2/3)	15/29/3/64	15/5/0/9	<b>0,0001</b>
Fibrose (0/1/2/3)	93/15/2/1	23/5/1/0	0,84
Entzündung lobulär (0/1/2)	103/5/1/2	29/0/0/0	0,53
Entzündung portal (0/1)	97/14	24/5	0,55
Ballonierung (0/1/2)	97/13/1	28/1/0	0,36

**Tabelle 6: Histopathologische Evaluation. Signifikante Unterschiede sind fett dargestellt.**

Wie erwartet, unterschieden sich die Steatose- und Kontrollgruppe hochsignifikant hinsichtlich Steatoseform, Steatosegrad (gruppiert und prozentual) sowie Steatoselokalisation. Es fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Entzündungen (portal und lobulär), Fibrose oder Ballonierung (Tabelle 6).

Bedeutenderweise korrelierte der mittels MEVIS bestimmte Steatosegrad hochsignifikant mit dem standardisiert ermittelten prozentualen Steatosegrad laut Pathologie (n=140; r=0,90; p=0,00000001).

#### 4.2.2 Relevanz des quantitativen Steatosegrads nach MEVIS

Der mittels *Lipid-Droplet-Count* nach MEVIS objektiv ermittelte Verfettungsgrad der PatientInnen mit Steatose betrug 2,4 % (SD=3,5%). Der der Kontrollen betrug 0,3 % (SD=0,4%). Der Unterschied war hochsignifikant  $p=0,00000002$ .

#### 4.3 Identifikation von Prädiktoren des Grades einer *Steatosis Hepatis*

Zur Identifikation prädiktiver Faktoren bezüglich des Grades einer *Steatosis Hepatis* erfolgte eine Korrelation des Steatosegrads nach MEVIS aller Probanden mit klinischen (BMI) und präoperativen laborchemischen Parametern, bei dichotomen Variablen (neoadjuvante Chemotherapie und Diabetes mellitus) wurde eine univariate Analyse durchgeführt. Es wurde eine FDR-Korrektur (für 20 Korrelationen) im Anschluss ergänzt.

Als signifikante positive Prädiktoren fanden sich der BMI ( $n=141$ ;  $r=0,43$ ;  $p=0,00000008$ ) und die Konzentration der CHE ( $n=128$ ;  $r=0,302$ ;  $p=0,001$ ), als negativer Prädiktor die HDL Konzentration ( $n=98$ ;  $r=-0,34$ ;  $p=0,001$ ), zudem war der prozentuale Steatosegrad der Pathologie (s. o.) signifikant positiv korreliert (Abbildungen 2-4).

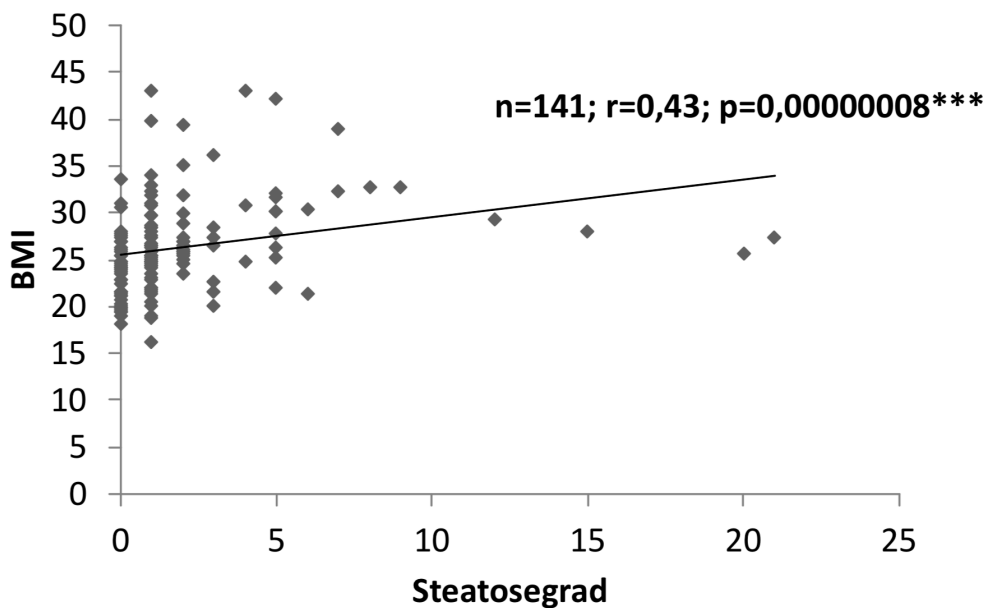


Abbildung 2: Korrelation des Steatosegrads nach MEVIS mit dem BMI.

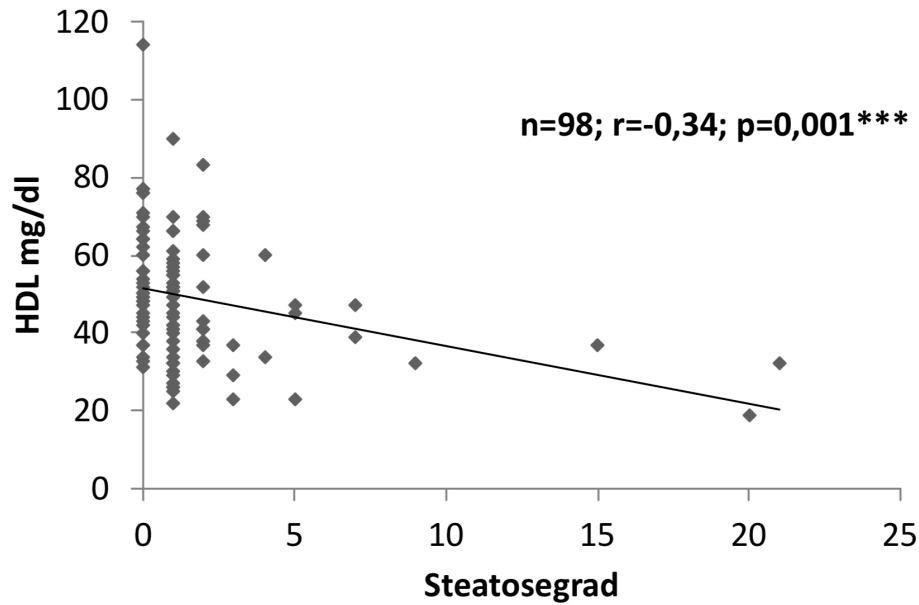


Abbildung 3: Korrelation des Steatosegrads nach MEVIS mit der HDL-Konzentration.

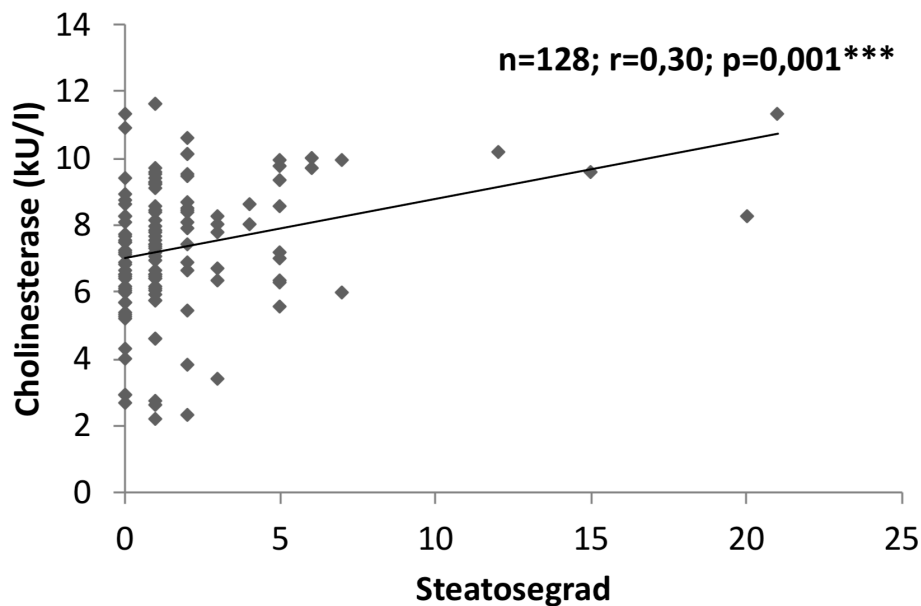


Abbildung 4: Korrelation des Steatosegrads nach MEVIS mit der CHE-Konzentration

Weitere klinische Faktoren wie Diabetes mellitus oder eine neoadjuvante Chemotherapie waren keine signifikanten Prädiktoren. Weitere signifikante laborchemische Prädiktoren (GPT, TAGs, VLDL, Cholesterin, LDL, Apo A1, Apo B, CRP) fanden sich nach FDR-Korrektur nicht (Tabelle 7).

Klinische und laborchemische Parameter	Gruppe mit	Gruppe ohne	r-Wert	p-Wert
BMI			0,43	<b>&lt;0,001</b>
Diabetes mellitus	2,3 %	1,9 %		0,32
Neoadjuvante Chemotherapie	2,0 %	2,0 %		0,77
GPT				0,037
Cholinesterase			0,30	<b>0,001</b>
TAGs				0,034
VLDL				0,014
HDL			-0,34	<b>0,001</b>
Cholesterin				0,21
LDL				0,26
Apo A1				0,15
Apo B				0,82
CRP				0,25
Standardisierter Steatosegrad der Pathologie			0,90	<b>&lt;0,001</b>

**Tabelle 7: Prädiktoren des Steatosegrads nach MEVIS. p-Werte sind vor FDR-Korrektur angegeben. Signifikante Korrelationen nach FDR-Korrektur sind fett dargestellt.**

#### 4.4 Perioperative Komplikationen, Mortalität und Langzeitoutcome

##### 4.4.1 Intraoperativer Blutverlust und Substitution von Blutprodukten

Intraoperativer Blutverlust und Substitution von Blutprodukten, EKs und FFPs, unterschieden sich zwischen der Gruppe mit und ohne Steatose nicht signifikant (Tabelle 4). Dies ist insofern von Bedeutung, da ein erhöhter Blutverlust mit deutlich erhöhter Morbidität und reduziertem Überleben assoziiert ist (Schiergens et al., 2014), zudem ist ein Erhalt von EKs mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs verbunden (Schiergens et al., 2015). Somit sind hier beide Gruppen gut vergleichbar hinsichtlich Morbidität, Mortalität und Tumorrezidiv.

## 4.4.2 Postoperative Komplikationen und Mortalität bei *Steatosis Hepatis*

### 4.4.2.1 Kategorialer Gruppenvergleich

Beide Gruppen wurden hinsichtlich postoperativer Komplikationen verglichen, inklusive postoperativer Komplikationsraten und Aufenthaltsdauer sowie mittels Aufschlüsselung der Komplikationen nach Clavien (Dindo et al., 2004) und nach Organsystemen.

Postoperative Komplikationsrate	Steatose (n=112)	Kontrollen (n=29)	p-Wert
Komplikationsrate	49 (44%)	14 (48%)	0,67
Komplikationsrate nach Clavien III-V	19 (17%)	7 (24%)	0,38
Mortalität	5 (4%)	3 (10%)	0,36
Dauer d. postop. komplikationsassoziierten Intensivaufenthalts (d)	36 ± 17	4 ± 3	0,08
Dauer d. postoperativen Aufenthalts (d)	15 ± 21	12 ± 4	0,52
Dauer d. gesamten Aufenthalts (d)	20 ± 21	16 ± 6	0,94
Dauer d. postop. Intensivaufenthalts (d)	8 ± 12	5 ± 6	0,89
Dauer d. postop. IMC-Aufenthalts (d)	2 ± 1	1 ± 0	0,26

**Tabelle 8: Postoperative Komplikationsrate beider Gruppen.**



<b>Komplikationen nach Clavien</b>	<b>Steatose (n=112)</b> wenn nicht anders klassifiziert n=1	<b>Kontrollen (n=29)</b>
I	26 (Subileus (n=6), Pleuraerguss (n=5), Hypotonie (n=3), Biliom (n=2), Aszites, Atelektasen, AV-Block, Diarrhoe, Fieber, Galleleck, Harnwegsinfekt, Leberischämie Ödeme, Wundheilungsstörung.)	7 (Harnwegsinfekt (n=3), Diarrhoe, Fazialisparese, Subileus, Wundheilungsstörung)
II	4 Substitution von Blutprodukten (n=4)	0
IIIa	6 (Ileus (n=3), Pleuraerguss (n=2), Nachblutung, Wundheilungsstörung)	0
IIIb	6 (Wundheilungsstörung (n=3), Nachblutung, Pneumothorax, Sepsis)	1 Wundheilungsstörung
IV	2 (Peritonitis, Sepsis)	3 (Herz-Kreislauf-Versagen, Myokardinfarkt, Nachblutung)
V	5 (Leberversagen, Lungenembolie Pfortaderthrombose, Sepsis (n=2))	3 (Multiorganversagen, Myokardinfarkt, Sepsis)
<b>p-Wert</b>	0.14	

**Tabelle 9: Aufschlüsselung der Komplikationen nach Clavien.**

<b>Systematische Aufschlüsselung</b>	<b>Steatose (n=112)</b>	<b>Kontrollen (n=29)</b>	<b>p-Wert</b>
wundassoziiert (Infektion, Hernie, Wundheilungsstörung)	8	4	0,27
hepatisch/biliär (Galleleck, Biliom, Leberischämie, Nachblutung, Leberversagen, Hepatorenales Syndrom, perihepatische Flüssigkeitsansammlung und Abszess)	21	3	0,41
gastrointestinal (Subileus, Ileus, Diarrhoe, Fistel)	14	4	0,77
urologisch / renal (Harnwegsinfekte, Hepatorenales Syndrom)	3	3	0,10
kardiovaskulär (ACS, Pfortaderthrombose, AV-Block)	8	3	0,70
pulmonal (Atelektasen, Pneumothorax, Pneumonie)	6	2	0,69
infektiös (Harnwegsinfekte, Pneumonie)	7	4	0,24
sonstige (verzögerter Kostaufbau, Ödeme, Pleuraergüsse, Transfusion von EKs bzw. FFPs)	23	1	<b>0,028</b>
Summe	90	24	1,0

**Tabelle 10: Systematische Aufschlüsselung der Komplikationen und Gruppenvergleich. Signifikante Unterschiede sind fett dargestellt. Mehrfachlistung ist möglich.**

Die Gesamtrate an postoperativen Komplikationen unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant (44% Steatosegruppe vs. 48% Kontrollgruppe;  $p=0,67$ ), ebenfalls unterschieden sich spezifische Komplikationen nicht signifikant zwischen beiden Gruppen. Allerdings traten „sonstige“ Komplikationen signifikant gehäuft bei der Steatosegruppe auf ( $p=0,028$ ), dabei ausschlaggebend war die Gabe von Blutprodukten ( $n=4$  vs.  $n=0$ ) bzw. das Auftreten von Pleuraergüssen ( $n=11$  vs.  $n=0$ ), verzögerter Kostaufbau ( $n=6$  vs.  $n=0$ ) bzw. Ödemen ( $n=2$  vs.  $n=1$ ) (Tabelle 8 und 10). Wichtigerweise unterschied sich der BMI als potentieller *Confounder* nicht signifikant zwischen der Gruppe mit (26,9; SD 5,5) und der ohne „sonstige“ Komplikationen (26,2; SD 4,9) ( $p=0,66$ ).

Tendenziell fand sich eine Häufung schwerer Komplikationen nach Clavien (Dindo et al., 2004) in der Kontrollgruppe (Clavien III-V: 17% Steatosegruppe vs. 24% Kontrollgruppe;  $p=0,38$

und damit auch tendenziell eine höhere Mortalitätsrate der Kontrollen (3% Steatosegruppe vs. 10% Kontrollgruppe;  $p=0,36$ ) (Tabelle 8 und 9). Tendenzuell war der mittlere postoperative bzw. gesamte stationäre Aufenthalt in der Steatosegruppe verlängert (15 vs. 12 Tage;  $p=0,52$  bzw. 20 vs. 16 Tage  $p=0,94$ ), ebenso tendenziell die mittlere Aufenthaltsdauer der Steatosegruppe auf einer *ICU (Intensive Care Unit)* und *IMC (Intermediate Care)*, (8 vs. 5 Tage;  $p=0,89$  bzw. 5 vs. 1 Tag;  $p=0,26$ ); der Unterscheid war nicht signifikant. Auch der komplikationsassoziierte Intensivaufenthalt war tendenziell bei der Steatosegruppe verlängert ( $p=0,08$ ) (Tabelle 7).

#### 4.4.2.2 Assoziation von Morbidität und Steatosegrad

Zusätzlich zum kategorialen Gruppenvergleich wurde ein Zusammenhang zwischen perioperativen Komplikationen und standardisiertem histopathologischem Steatosegrad bzw. Steatosegrad nach MEVIS untersucht.

Univariate Analyse der Morbidität (n=141)	Gruppe mit	Gruppe ohne	p-Wert
Standardisierter Steatosegrad	10,8 ±17,5	10,9 ±16,0	0,98
Steatosegrad nach MEVIS	2,2 ±3,8	1,8 ±2,6	0,78

Tabelle 11: Univariate Analyse der Gesamtmorbidität.

Subgruppen nach Kleiner et al,	<5%	5-33%	33-66%	>66%	p-Wert
Rate an Gesamtkomplikationen	41%	53%	30%	50%	0,40
Rate hepatischer/biliärer Komplikationen	9%	15%	0%	50%	<b>0,041</b>
Rate infektiöser Komplikationen	9%	4%	25%	33%	0,20
Komplikationen nach Clavien I/II/IIIa/IIIb/IV/V					0,93
Komplikationen nach Clavien I/II/III/IV/V					0,84
Blutverlust in ml					0,70
Blutverlust ja/nein	74%	79%	70%	75%	0,91
Rate an Substitution von Blutprodukten	24%	37%	50%	50%	0,18
Rate an Substitution von EKs	22%	33%	50%	50%	0,14
Dauer gesamter Aufenthalt (d)					0,21
Dauer postoperativer Aufenthalt (d)					0,95

Tabelle 12: Analyse der spezifischen Morbidität nach Subgruppen gemäß Kleiner et al.. Signifikante Unterschiede sind fett dargestellt.

Univariate Analyse des Steatosegrads nach MEVIS (n=141)	Gruppe mit	Gruppe ohne	r-Wert	p-Wert
Hepatische / Biliäre Komplikationen	4,1 ± 6,6	1,7 ± 2,4		0,097
Infektiöse Komplikationen	3,2 ± 5,9	1,9 ± 2,8		0,63
Komplikationen nach Clavien I/II/IIIa/IIIb/IV/V			0,06	0,47
Komplikationen nach Clavien I/II/III/IV/V			0,06	0,45
Blutverlust in ml			0,09	0,33
Blutverlust ja/nein	2,0 ± 3,4	1,9 ± 2,6		0,86
Substitution von Blutprodukten	2,4 ± 3,8	1,8 ± 3,0		0,12
Substitution von EKs	2,6 ± 3,9	1,7 ± 2,9		0,06
Dauer d. gesamten Aufenthalts (d)			0,04	0,65
Dauer d. postoperativen Aufenthalts (d)			0,05	0,54

**Tabelle 13: Analyse der spezifischen Morbidität anhand des Steatosegrads nach MEVIS.**

Hinsichtlich der Gesamtmorbidität fand sich kein signifikanter Unterschied des standardisierten Steatosegrads bzw. des Steatosegrads nach MEVIS mittels univariater Analyse (Tabelle 11).

Zu möglichst exakten Analysezielen erfolgte eine Einteilung der gesamten Gruppe auf Basis des standardisierten, histopathologischen Verfettungsgrades in vier Subgruppen nach Kleiner et al. : <5% (n=79, keine Verfettung), 5 - 33% (n=47, leichte Verfettung), 33 - 66% (n=10, mäßige Verfettung), > 66% (n=4, starke Verfettung); hier zeigten sich Morbiditätsraten von 41%, 53%, 30% und 50% (p=0,4).

Hinsichtlich hepatischer/biliärer Komplikationen ergab sich eine signifikant höhere Komplikationsrate bei höherem standardisierten Verfettungsgrad nach Kleiner et al.; es zeigte sich eine Rate an hepatischen bzw. biliären Komplikationen von 9%, 15%, 0% und 50% (p=0,041). Der BMI, ein potentieller *Confounder*, unterschied sich wichtigerweise nicht signifikant zwischen der Gruppe mit (26,2; SD 4) und ohne hepatische/biliäre Komplikationen (26,3; SD 5) (p=0,8). Hinsichtlich infektiöser Komplikationen ergab sich eine tendenziell höhere Komplikationsrate bei höherem Verfettungsgrad nach Kleiner et al.; es zeigte sich eine Rate an infektiösen Komplikationen von 9%, 4%, 25 % und 33% (p=0,2).

Auch bezüglich der Substitution von Blutprodukten bzw. Substitution von EKs ergab sich eine tendenziell höhere Rate bei höherem Verfettungsgrad nach Kleiner et al.; es zeigte sich eine

Substitutionsrate von Blutprodukten 24%, 37%, 50% und 50% ( $p=0,18$ ) bzw. EKs von Blutprodukten 22%, 33%, 50% und 50% ( $p=0,14$ ) (Tabelle 12).

Die Ergebnisse der standardisierten Einteilung nach Kleiner et al. bestätigten sich anhand des Steatosegrads nach MEVIS; hier war bei der Gruppe mit biliären/hepatischen Komplikationen bzw. infektiösen Komplikationen der Steatosegrad tendenziell höher (4,1% (SD 6,6), vs. 1,7% (SD 2,4);  $p=0,097$ ) bzw. (3,2% (SD 5,9), vs. 1,9% (SD 2,8);  $p=0,63$ ); der Unterschied war nicht signifikant.

Auch bezüglich des Erhalts von Blutprodukten ergab sich tendenziell eine Assoziation mit einem höheren Steatosegrad nach MEVIS (2,4%; (SD 3,8) vs. 1,8% (SD 2,9);  $p=0,12$ ); insbesondere bei der Gruppe, die EKs erhielt (2,6%, (SD 3,9) vs. 1,7% (SD 2,9) ( $p=0,056$ )) (Tabelle 13).

Zur besseren Differenzierung erfolgte eine weitere Subgruppenanalyse der Gruppe mit perioperativen Komplikationen ( $n=63$ ); hier zeigte eine Aufschlüsselung der Komplikationen gemäß Clavien-Klassifikation (I/II/III/IV/V) eine positive Korrelation (nach *Spearman*) mit dem Steatosegrad nach MEVIS innerhalb der Gruppe mit Komplikationen ( $n=63$ ;  $r=0,21$ ;  $p=0,097$ ) die knapp das Signifikanzniveau verfehlte. Eine Korrelation mit dem standardisierten Verfettungsgrad nach Kleiner et al. ergab keine signifikante Korrelation ( $p=0,8$ ).

Hinsichtlich weiterer Parameter (Blutverlust, Dauer des Krankenhausaufenthaltes) ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem Steatosegrad.

#### 4.4.3 Univariate und multivariate Analyse der Morbidität aller Probanden

Zur Identifikation relevanter Faktoren bezüglich der perioperativen Morbidität wurden univariate Analysen durchgeführt. Grundlage war der komplette Pool mit n=141 Probanden; die Gruppe mit Komplikationen (n=63) wurde mit der Gruppe ohne Komplikationen (n=78) verglichen.

<b>Komplikationen aller Probanden</b>	<b>Univariate Analyse (p-Wert)</b>	<b>Multivariate Analyse (p-Wert)</b>	<b>Odds Ratio mit 95%-Konfidenzintervall</b>
Alter	0,94	-	-
Geschlecht	0,68	-	-
BMI	0,67	-	-
Adipositas (BMI>30)	0,83	-	-
Präadipositas (BMI>25)	0,85	-	-
Kardiale Vorerkrankungen	0,32	-	-
Pulmonale Vorerkrankungen	0,69	-	-
Komorbidität	0,36	-	-
Alkalische Phosphatase	0,72	-	-
Bilirubin gesamt	0,17	-	-
GOT –Konzentration	<b>0,006</b>	0,21	1,004 (0,998-1,009)
GOT (erhöht/normal)	0,088	-	-
GPT –Konzentration	0,06	-	-
GGT –Konzentration	<b>0,008</b>	C	C
GGT (erhöht/normal)	<b>0,003</b>	<b>0,044</b>	<b>2,198 (1,023-4,723)</b>
Cholinesterase	0,38	-	-
Kreatinin	0,83	-	-
Hämoglobin	0,11	-	-
Quick	0,18	-	-
Blutverlust in ml	0,28	-	-
Blutverlust ja/nein	0,61	-	-
Substitution von Blutprodukten	0,07	-	-
Substitution von EKs	0,26	-	-
Substitution von FFPs	0,44	-	-
Anzahl der EKs	0,21	-	-
Anzahl der FFPs	0,15	-	-
Resektionsvolumen	0,15	-	-
Lobektomie und mehr	0,17	-	-

Hemihepatektomie und mehr	<b>0,049</b>	0,51	1,315 (0,586-2,954)
Resektionsart nach Gruppierungen	0,13	-	-
OP-Dauer	<b>0,004</b>	<b>0,017</b>	<b>1,008 (1,001-1,015)</b>
Zusätzlicher Eingriff	0,83	-	-
Steatosegrad nach MEVIS	0,78	-	-
Steatose (ja/nein)	0,68	-	-
Steatoseform (0/1/2/3)	0,55	-	-
Steatosegrad gruppiert (0/1/2/3)	0,42	-	-
Steatosegrad in Prozent	0,98	-	-
Steatose Lokalisation (0/1/2/3)	0,97	-	-
Fibrose (0/1/2/3)	0,59	-	-
Entzündung lob (0/1/2)	0,28	-	-
Entzündung portal (0/1)	0,77	-	-
Ballonierung (0/1/2)	0,47	-	-

**Tabelle 14: Uni- und multivariate Analyse der postoperativen Komplikationen. Nur signifikante Variablen der univariaten Analyse ( $p < 0,05$ ) wurden in die multivariate Analyse eingeschlossen. Nahezu identische Variablen wurden hinsichtlich ihrer Güte (R-Quadrat) selektiert und als potentielle *Confounder* ausgeschlossen (C); hier ausschließlich GGT.**

Die OP-Dauer war als signifikanter Risikofaktor ( $p=0,004$ ) für das Auftreten von Komplikationen zu detektieren (196 min (SD 67 min) vs. 161 min (SD 55 min)). Laborchemisch stellten eine erhöhte GOT-Konzentration (75 U/l (SD 95 U/l) vs. 45 U/l (SD 55 U/l),  $p=0,006$ ) und eine erhöhte GGT (157 U/l (SD 239 U/l) vs. 112 U/l (SD 214 U/l),  $p=0,008$ ) signifikante Risikofaktoren dar. Auch die kategoriale Zuordnung in Gruppen mit normwertiger bzw. erhöhter GGT stellte einen signifikanten Risikofaktor dar, (42 (69%), vs. 33 (43%);  $p=0,003$ ). Eine kategoriale Zuordnung in normwertige/erhöhte GOT-Gruppen stellte keinen signifikanten Risikofaktor dar ( $p=0,088$ ).

Zudem war eine Hemihepatektomie oder mehr als signifikanter Risikofaktor einzustufen (26 (41%) vs. 20 (26%);  $p=0,049$ ). Das Resektionsvolumen verfehlte als Risikofaktor das Signifikanzniveau (391 ml (SD 373 ml) vs. 306 (SD 310 ml);  $p=0,15$ ) ebenso die Variable Anzahl der Lobektomien und mehr (29 (46%) vs. 27 (35%);  $p=0,17$ ).

Alter, Geschlecht, BMI, Adipositas, Präadipositas, kardiale/pulmonale Vorerkrankungen, Komorbidität, Blutverlust, Substitution von Blutprodukten, Resektionsvolumen, Lobektomie

oder mehr, sowie weitere laborchemische Parameter (AP, Bilirubin, GPT, Cholesterinesterase, Kreatinin, Quick, Hb) und histopathologische Parameter (Steatose kategorial, Steatose nach MEVIS und nach Standard: Steatoseform, Steatosegrad gruppiert/in Prozent, Steatose Lokalisation, Fibrose, Entzündung lobulär/portal, Ballonierung) stellten keine signifikanten Risikofaktoren dar (Tabelle 14).

Es wurde eine multivariate Analyse durchgeführt; lediglich für die Faktoren die in der univariaten Analyse signifikant waren; die OP-Dauer, die Konzentrationen von GOT, der Faktor GGT (normal/erhöht) und Hemihepatektomie. Sowohl die OP-Dauer (OR 1,004 (95% KI:1,001-1,015; p=0,017)) als auch abnorme GGT-Werte OR 2,198 (95% KI:1,023-4,723; p=0,044) konnten in der multivariaten Analyse als signifikanter Risikofaktoren identifiziert werden, die weiteren Variablen stellten keine signifikanten Risikofaktor dar.

Es wurde die kategoriale Variable GGT-Erhöhung (ja/nein) verwendet, bei höherer Güte des Modells der logistischen Regression (größeres R-Quadrat bzw. geringere *-2Log-Likelihood*) und etabliertem Parameter in der Literatur (kategorial: 163 bzw. 0,138 bzw. 0,184 vs. metrisch: 166 bzw. 0,112 bzw. 0,150). Die vier Faktoren zeigten keine Multikollinearität (*VIF*<5 und Toleranz>0,2), es bestand lediglich eine mäßige Korrelation (nach *Spearman*) zwischen dem Faktor GGT und der GOT-Konzentration ( $r=0,49$ ;  $p=0,00001$ ). Selbst mit der zusätzlichen Verwendung der Variable Konzentration der GGT stellten die OP-Dauer ( $p=0,016$ ) und abnorme GGT-Werte ( $p=0,046$ ) weiterhin signifikante Risikofaktoren dar.



#### 4.4.4 Univariate und multivariate Analyse der Mortalität aller Probanden

Zur Identifikation relevanter Faktoren bezüglich der perioperativen Mortalität wurden univariate Analysen durchgeführt. Grundlage war der komplette Pool mit n=141 Probanden; die Gruppe verstorbener Patienten (n=8) wurde mit der Gruppe der nicht verstorbenen Patienten (n=133) verglichen.

Mortalität aller Probanden	Univariate Analyse (p-Wert)	Multivariate Analyse (p-Wert)	Odds Ratio mit 95%-Konfidenzintervall
Alter	0,072	-	
Geschlecht	0,77	-	
BMI	0,92	-	
Adipositas (BMI>30)	0,66	-	
Präadipositas (BMI>25)	0,47	-	
Kardiale Vorerkrankungen	0,23	-	
Pulmonale Vorerkrankungen	1,0	-	
Komorbidität	0,76	-	
Alkalische Phosphatase	0,24	-	
Bilirubin gesamt	0,07	-	
GOT	<b>0,003</b>	0,88	0,999 (0,988-1,010)
GOT (erhöht/normal)	0,06	-	
GPT	0,31	-	
GGT	0,06	-	
GGT (erhöht/normal)	0,13	-	
Cholinesterase	<b>0,027</b>	0,69	0,890 (0,504-1,573)
Kreatinin	0,52	-	
Hämoglobin	<b>0,014</b>	0,48	0,882 (0,625-1,244)
Quick	<b>0,022</b>	0,10	0,940 (0,874-1,012)
Blutverlust in ml	<b>0,022</b>	C	
Blutverlust ja/nein	0,70	-	
Substitution von Blutprodukten	0,26	-	
Substitution von EKs	0,23	-	
Substitution von FFPs	0,088	-	
Anzahl der EKs	<b>0,047</b>	<b>0,050</b>	<b>1,599 (1,001-2,556)</b>
Anzahl der FFPs	<b>0,033</b>	C	
Resektatvolumen	<b>0,013</b>	<b>0,034</b>	<b>1,003 (1,000-1,006)</b>
Lappen und mehr	0,06	-	

Hemihepatektomie und mehr	<b>0,015</b>	C	
Resektionsarten nach Gruppen	0,15	-	
OP-Dauer	0,35	-	
Zusätzlicher Eingriff	1,0	-	
Steatosegrad nach MEVIS	0,99	-	
Steatose (ja/nein)	0,36	-	
Steatoseform (0/1/2/3)	0,92	-	
Steatosegrad gruppiert (0/1/2/3)	0,84	-	
Steatosegrad in Prozent	0,67	-	
Steatose Lokalisation (0/1/2/3)	0,61	-	
Fibrose (0/1/2/3)	0,14	-	
Entzündung lob. (0/1/2)	0,92	-	
Entzündung portal (0/1)	0,30	-	
Ballonierung (0/1/2)	0,94	-	

**Tabelle 15: Univariate und multivariate Analyse der Mortalität. Nur signifikante Variablen der univariaten Analyse ( $p < 0,05$ ) wurden in die multivariate Analyse eingeschlossen; potentielle *Confounder* wurden ausgeschlossen (C).**

Hemihepatektomien und mehr (6 (75%) vs. 40 (30%);  $p=0,015$ ), die Größe des Resektionsvolumens (772 ml (SD 600ml) vs. 319 ml (SD 304 ml);  $p=0,013$ ) stellten signifikante Risikofaktoren für die Mortalität in der univariaten Analyse dar, Lobektomien und mehr verfehlten knapp das Signifikanzniveau ( $p=0,06$ ).

Zudem konnten Blutverlust (1860 ml (SD 2020 ml) vs. 670 (SD 920);  $p=0,022$ ) sowie die Anzahl der verabreichten EKs (2,8 (SD 3,7) vs. 0,6 (SD 1,3);  $p=0,047$ ) und die Anzahl der verabreichten FFPs (3,5 (SD 5,1) vs. 0,8 (SD 2,2);  $p=0,033$ ) als signifikante Risikofaktoren in der univariaten Analyse identifiziert werden; eine alleinige Substitutionspflicht von Blutprodukten, EKs oder FFPs, verfehlte das Signifikanzniveau (Tabelle 15).

Laborchemisch ließen sich erhöhte GOT-Konzentration (157 U/l (SD 176 U/l), vs. 52 U/l (SD 63 U/l);  $p=0,003$ ), erniedrigte Werte von Cholinesterase-Konzentrationen (5,72 kU/l (SD 1,58 kU/l) vs. 7,44 kU/l (SD 2,01 kU/l);  $p=0,027$ ), ein erniedrigter Hb-Wert (10,8 g/dl (SD 2,7 g/dl) vs. 13,1g/dl (SD 2,5 g/dl);  $p=0,014$ ), und erniedrigter Quick-Wert (80% (SD 14%) vs. 94% (SD 17%);  $p=0,022$ ) in der univariaten Analyse als signifikante Risikofaktoren identifizieren.

Alter, Geschlecht, BMI, Adipositas, Präadipositas, kardiale/pulmonale Vorerkrankungen, Komorbidität, Blutverlust, Substitution von Blutprodukten, Resektionsvolumen, Lobektomie

oder mehr, sowie weitere laborchemische Parameter (AP, Bilirubin, GPT, GGT, Kreatinin) und histopathologische Parameter (Steatose kategorial, Steatose nach MEVIS und nach Standard: Steatoseform, Steatosegrad gruppiert/in Prozent, Steatose Lokalisation, Fibrose, Entzündung lobulär/portal, Ballonierung) stellten keine signifikanten Risikofaktoren dar (Tabelle 15).

Es erfolgte eine multivariate Analyse mit den Faktoren GOT, Cholinesterase, Quick, Hb, Anzahl der EKs und Resektionsvolumen. Hier konnte sowohl das Resektionsvolumen (OR 1,004 (95% KI:1,000-1,006);  $p=0,034$ ) als auch die Anzahl der EK-Gaben (OR 1,599 (95% KI:1,001-2,556);  $p=0,04966$ ) als signifikanter Risikofaktor identifiziert werden.

Zuvor wurde eine Kollinearitätsanalyse durchgeführt, alle Faktoren unterschritten hierbei eine *VIF* von 5 und eine Toleranz von 0,2. Allerdings bestand eine hohe Korrelation mehrerer unabhängiger Variablen. Es bestand eine hohe Korrelation der unabhängigen Variablen Blutverlust und Anzahl der EK-Gaben bzw. FFP-Gaben ( $r=0,67$ ;  $p=0,00001$  bzw.  $r=0,58$ ;  $p=0,00001$ ), bzw. Anzahl EK-Gaben und Anzahl FFP-Gaben ( $r=0,71$ ;  $p=0,000001$ ). Aufgrund der konkurrierenden Mechanismen (alle Variablen reflektieren (substitutionswürdigen) Blutverlust) wurde die Variable mit der höchsten Modellgüte verwendet, die Anzahl der EKs (Anzahl EKs: 32,8 bzw. 0,161 bzw. 0,446 vs. Anzahl FFPs: 35,8 bzw. 0,136 bzw. 0,378 vs. Blutverlust: 35,3 bzw. 0,157 bzw. 0,438). Ein erniedrigter Hb-Wert korrelierte nur gering mit der Anzahl der EKs ( $r=-0,33$ ;  $p=0,0001$ ). Der Faktor Hemihepatektomie korrelierte ebenfalls hoch mit dem Resektionsvolumen ( $r=0,70$ ;  $p=0,00001$ ), bei höherer Modellgüte der multivariaten Analyse (bei Vergleich Resektionsvolumen mit Hemihepatektomie (Resektionsvolumen: 35,3 bzw. 0,140 bzw. 0,390 vs. Hemihepatektomie: 36,3 bzw. 0,133 bzw. 0,370).) wurde nur das Resektionsvolumen in die multivariate Analyse aufgenommen. Eine erhöhte GOT korrelierte nur leicht mit einem erniedrigten Quick ( $r=-0,25$ ;  $p=0,004$ ).

#### 4.4.5 Langzeitüberleben

Das mediane Follow-Up aller 141 Patienten betrug 22 Monate (von 0 bis 90 Monate). Das mediane Überleben der gesamten Gruppe betrug 69 Monate, das der Steatosegruppe 66 Monate (95% Konfidenzintervall (KI) 48-84 Monate), das der Kontrolle konnte nicht berechnet werden, da der Kaplan-Meier-Schätzer im Beobachtungszeitraum über 50% lag. Das 5-Jahres-Überleben der Steatosegruppe betrug 52 % (SF 7%), das der Kontrollgruppe 63% (SF 10%). Der Unterschied der Überlebenskurven war statistisch nicht signifikant ( $p=0,36$ ) (Abbildung 5).

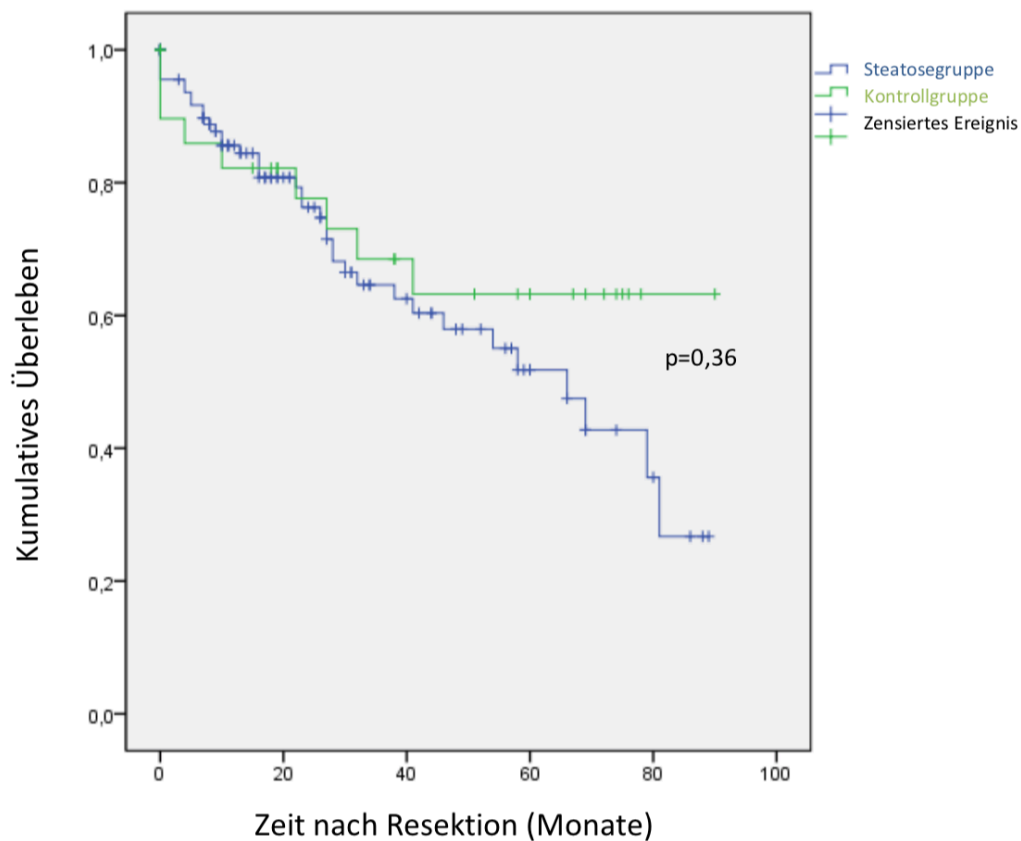


Abbildung 5: Überlebenskurven beider Gruppen.

Ferner wurde das Langzeitüberleben in Abhängigkeit vom Steatosegrad nach MEVIS analysiert. Da hier keine valide Voreinteilung existiert, wurden folgende Gruppen definiert: 0% (n=42, keine Verfettung), 1-4% (n=80, leichte Verfettung) und 5-21% (n=19, starke Verfettung). Das mediane Überleben der Gruppe ohne Verfettung betrug 81 Monate (95% KI 32-130 Monate), das der Gruppe mit leichter Verfettung betrug 69 Monate (95% KI 57-81 Monate), das der Gruppe mit starker Verfettung 30 Monate (95% KI 19-41 Monate). Das 5-Jahres-Überleben der Gruppe ohne Verfettung betrug 54 % (SF 9%), das der Gruppe mit leichter Verfettung 70% (SF 6%) und das der Gruppe mit starker Verfettung 25 % (SF 14 %). Der Unterschied der Überlebenskurven war statistisch nicht signifikant ( $p=0,21$ ) (Abbildung 6).

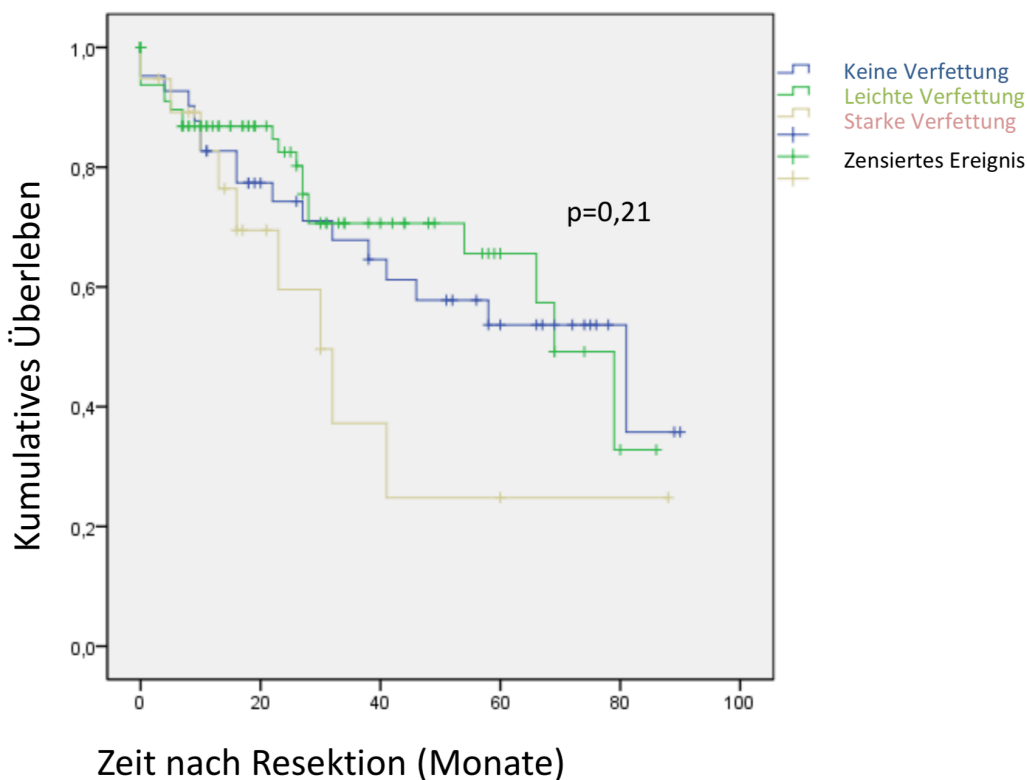
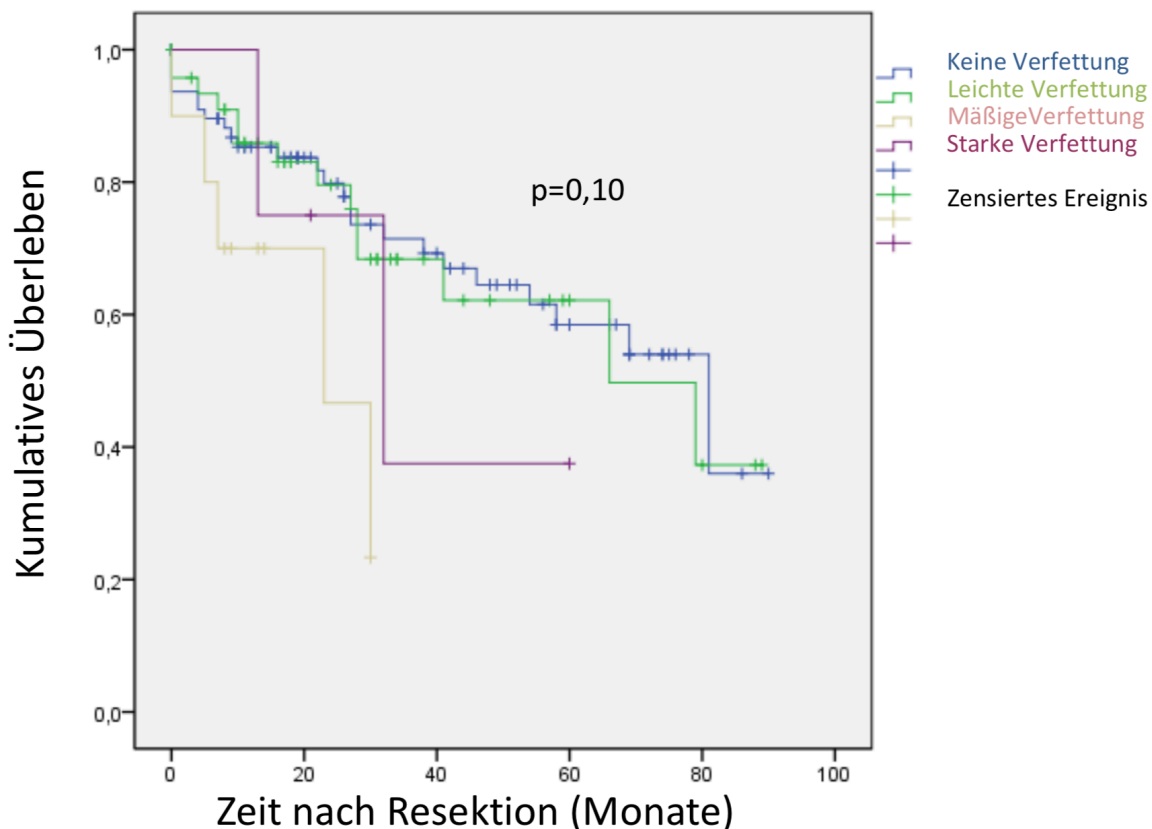


Abbildung 6: Überlebenskurven aufgeschlüsselt nach Steatosegrad nach MEVIS.

Zudem wurde das Langzeitüberleben in Abhängigkeit des standardisierten Steatosegrads nach Kleiner et al. in folgenden Gruppen untersucht: <5% (I: n=79, keine Verfettung), 5 - 33% (II: n=47, leichte Verfettung), 33 - 66% (III: n=10, mäßige Verfettung), > 66% (IV: n=4, starke Verfettung). Das mediane Überleben der Gruppe I betrug 81 Monate (95% KI 50-112 Monate), das der Gruppe II 66 Monate (95% KI 26-106 Monate), das der Gruppe III 23 Monate (95% KI 2-43 Monate), das der Gruppe IV 32 Monate (95% KI 4-60 Monate). Das 5-Jahres-Überleben der Gruppe I betrug 59% (SF 7%), das der Gruppe II 62% (SF 10%), das der Gruppe IV 38 % (SF 29 %). Das 5-Jahres-Überleben der Gruppe III war bei *Loss to Follow-Up* nicht zu erheben. Der Unterschied der Überlebenskurven war statistisch nicht signifikant ( $p=0,10$ ) (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Überlebenskurven aufgeschlüsselt nach standardisiertem Steatosegrad.**

Damit fand sich tendenziell eine Assoziation zwischen erhöhtem Steatosegrad bzw. dem Faktor Steatose und verringertem Langzeitüberleben; interessanterweise auch nach unterschiedlichen Gruppierungsansätzen.

Aufgrund der hohen Korrelation des Steatosegrads mit dem BMI und eines in Studien diskutierten Einflusses von Adipositas auf die Mortalität (Lenz et al., 2009) wurden weitere Analysen ergänzt. Adipositas hatte hier keinen Einfluss auf das Langzeitüberleben ( $p=0,98$ ) (Abbildung 8), auch die zusätzliche Berücksichtigung von Präadipositas ergab keinen Einfluss auf das Langzeitüberleben ( $p=0,89$ ) (Abbildung 9).

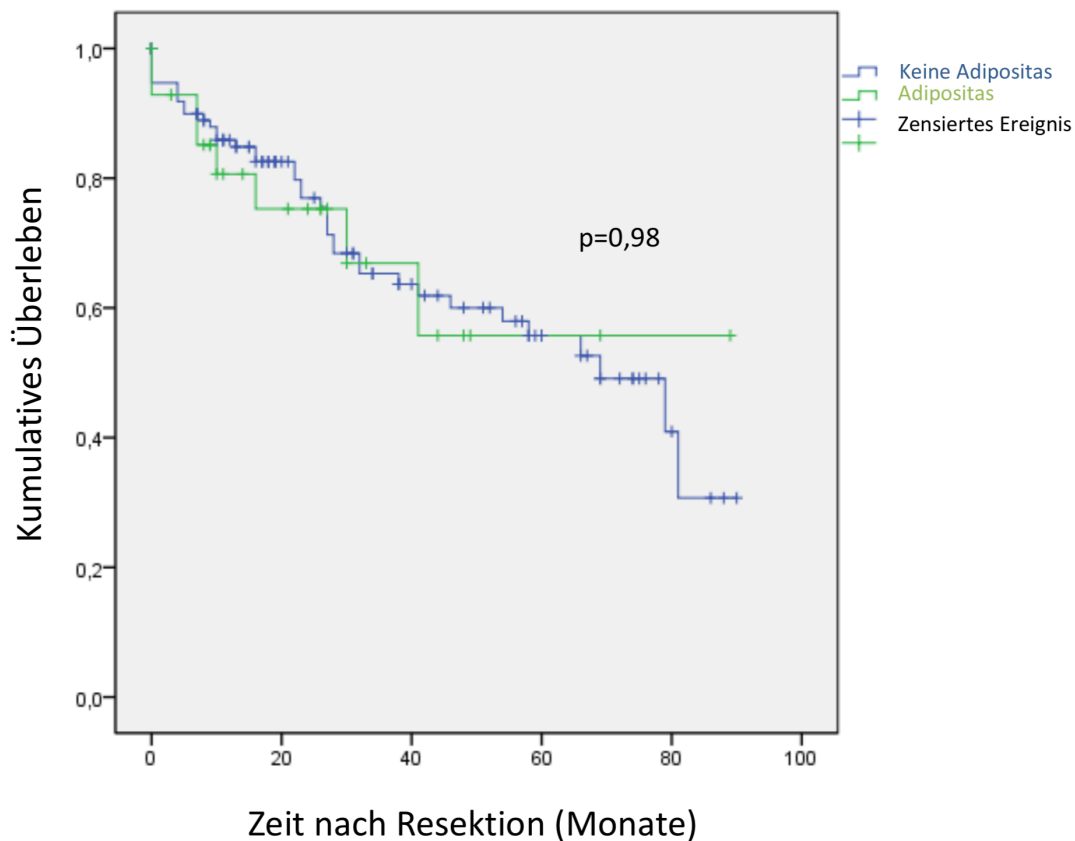


Abbildung 8: Überlebenskurven mit und ohne Adipositas.

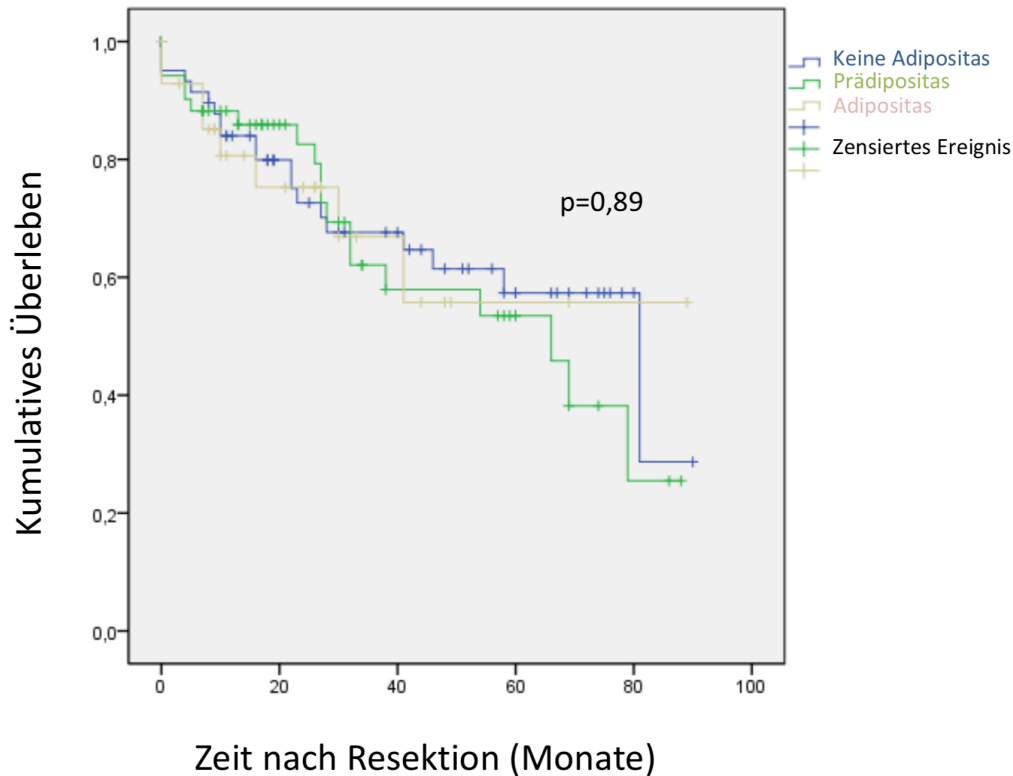


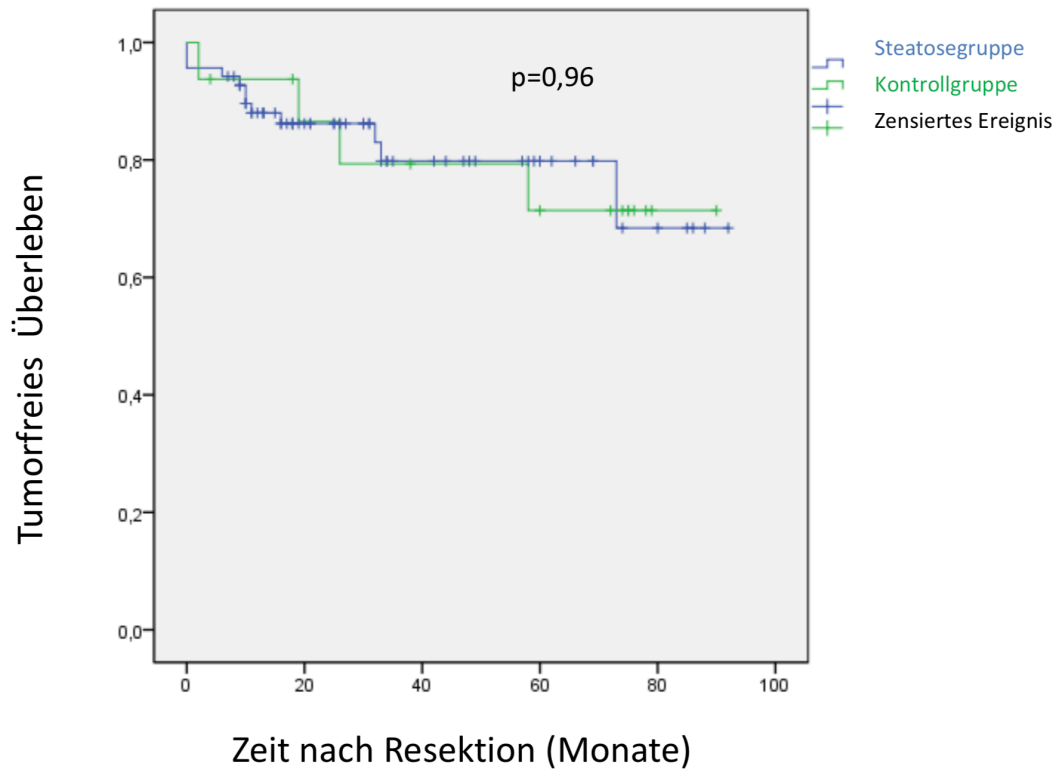
Abbildung 9: Überlebenskurven aufgeschlüsselt nach Prädipositas und Adipositas.

#### 4.4.6 Rezidivfreies Überleben

In der Gruppe mit Steatose kam es bei 35 von 94 (37%) Patienten zu einem Rezidiv der Leber, in der Kontrollgruppe kam es bei 10 von 23 (43%) zu einem Rezidiv; der Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p=0,58$ ). Der Verfettungsgrad nach MEVIS unterschied sich innerhalb der Gruppe mit Rezidiv (1,9% SD 3,5) nicht signifikant von der Gruppe ohne Rezidiv (2,1% SD 3,4) ( $p=0,24$ ).

Die Zeit bis zum Rezidiv (tumorfreies Überleben mittels Kaplan-Meier-Kurven) unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen ( $p=0,96$ ). Die mediane Zeit bis zum Rezidiv konnte nicht berechnet werden, da der Kaplan-Meier-Schätzer bei beiden Gruppen im Beobachtungszeitraum über 50% lag. Das 5-Jahres-Tumorfremie-Überleben der Steatosegruppe betrug 80 % (SF 6%), das der Kontrollgruppe 71% (SF 12%) (Abbildung 10).





**Abbildung 10: Leberrezidivkurven (tumorfreies Überleben) beider Gruppen.**

Zudem erfolgte eine Korrelation des Steatosegrads (nach MEVIS) mit der Metastasenanzahl; es ließ sich kein Zusammenhang detektieren ( $n=133$ ;  $r=0,05$ ;  $p=0,57$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Methoden und Material

#### 5.1.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

Zwischen Kontroll- und Steatosegruppe unterschied sich nur der BMI signifikant, zudem war eine arterielle Hypertonie bei der Steatosegruppe signifikant häufiger. Interessanterweise war eine arterielle Hypertonie über das gesamte Kollektiv mit einem erhöhten BMI assoziiert. Diese Befunde stehen im Einklang mit bestehenden Studien. Dort besaß die Steatosegruppe einen höheren BMI (Gomez et al., 2007; Kooby et al., 2003; McCormack et al., 2007; Pathak et al., 2010), in einer einzigen Studie war der BMI nicht signifikant erhöht (Reddy et al., 2012). Die Häufigkeit einer arteriellen Hypertonie wurde nicht verglichen (Gomez et al., 2007; Kooby et al., 2003; McCormack et al., 2007). Es existieren zahlreiche Studien, die eine Assoziation zwischen erhöhtem BMI und arterieller Hypertonie belegen (Brown et al., 2000; Dua et al., 2014; Roka et al., 2015). Diese Beobachtung spiegelt sich auch in den Laborwerten des Fettstoffwechsels wider. Zudem waren TAGs und VLDL der Steatosegruppe erhöht, HDL war erniedrigt. Das steht im Einklang mit zahlreichen Studien, bei denen im Rahmen einer NAFLD TAGs erhöht sowie HDL erniedrigt waren (Adams et al., 2005; Clark et al., 2002; Marchesini et al., 2001; Vuppalanchi and Chalasani, 2009) bzw. VLDL erhöht (Paschos and Paletas, 2009). Pathophysiologisches Korrelat ist eine metabolische Energieverwertungsstörung, bei der die Energieaufnahme den Energieverbrauch übersteigt; womit eine deutliche Überschneidung mit einem metabolischen Syndrom besteht (Sutherland et al., 2004). Die Akkumulation von TAGs in den Hepatozyten als Folge eines beeinträchtigten Fettstoffwechsels wird auch von anderen Autoren als zentraler Mechanismus einer *Steatosis Hepatis* angeführt (Reddy and Sambasiva Rao, 2006; Völzke, 2012). Zudem war auch die Cholinesterase signifikant bei der Steatosegruppe erhöht, das deckt sich mit anderen Studien, die ebenfalls erhöhte Werte bei *Steatosis Hepatis* berichten (Nomura et al., 1986). GOT und GPT unterschieden sich hier nicht zwischen beiden Gruppen. Auch das passt zu den Ergebnissen anderer Studien; eine fand hinsichtlich GOT und GPT keinen Gruppenunterschied (Reddy et al., 2012), eine andere fand hinsichtlich GPT keinen Gruppenunterschied (Gomez et al., 2007).

#### 5.1.2 Objektiv-quantitative Steatosebestimmung

In dieser Arbeit fand zum ersten Mal eine objektiv-quantitative Steatosebestimmung der histologischen Leberpräparate ihre Anwendung. Bedeutenderweise fand sich eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen dem standardisiert ermittelten prozentualen

Steatosegrad und dem nach MEVIS ermittelten Steatosegrad. Das belegt die Relevanz und Validität der Methode nach MEVIS, insbesondere vor dem Hintergrund der Fehleranfälligkeit der vorläufigen Einteilung in die Datenbank (s.o.). Der Steatosegrad nach MEVIS korrelierte zudem hochsignifikant positiv mit dem BMI. Auch andere Studien (Behrns et al., 1998; Gomez et al., 2007; Kooby et al., 2003; Pathak et al., 2010; Wanless and Lentz, 1990) konnten einen Zusammenhang zwischen standardisiertem Steatosegrad und BMI aufzeigen, wiederum andere Studien fanden keinen signifikanten Zusammenhang (McCormack et al., 2007).

Insgesamt fiel auf, dass die ursprünglich durch einen Pathologen erstellte Gruppe (Steatose/Kontrollgruppe) Überschneidung besaß, was die Notwendigkeit einer objektiven, automatisierten Methode verdeutlicht. Auch vor dem Hintergrund einer wechselnden Einteilung in Gruppen (mild, moderat, schwer) an unterschiedlichen Grenzen nach D'Alessandro (<30; 30-60 >60) (D'Alessandro et al., 1991) bzw. nach Kleiner et al. (<5; 5-33, 33-66; >66) (Kleiner et al., 2005) sowie einer potentiellen subjektiven Verfälschung besteht die Notwendigkeit, ein objektiv-quantitatives Verfahren zu etablieren.

Einschränkend muss hier festgehalten werden, dass keine Aufschlüsselung der Ätiologie der Steatose erfolgte und die Analyse über Resektionen unterschiedlicher Indikationen (v. a. Metastasen unterschiedlicher Entitäten) erfolgte und auch das Ausmaß der Resektion variierte.

## **5.2 Ergebnisse**

### **5.2.1 Laborchemische Prädiktoren des Steatosegrads**

Der Steatosegrad nach MEVIS korrelierte signifikant negativ mit laborchemischen Parametern des Fettstoffwechsels, hier HDL. Vor dem Hintergrund der hohen Korrelation von *Steatosis Hepatis* und BMI (s.o.) sowie der inversen Assoziation von BMI und HDL (Pietrobelli et al., 1999; Shamai et al., 2011) erfolgte eine partielle Korrelation zwischen der HDL-Konzentration und dem Steatosegrad, der BMI wurde hier als *Confounder* verwendet. Bedeutenderweise blieb die negative Korrelation zwischen HDL und Steatosegrad signifikant (n=98, r=-0.26, p=0.01) und verweist auf einen vom BMI unabhängigen Zusammenhang zwischen *Steatosis Hepatis* und HDL-Konzentration. Interessanterweise waren weitere Parameter des Fettstoffwechsels wie TAGs und VLDL tendenziell positiv mit dem Steatosegrad nach MEVIS assoziiert. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie von Parkin et al. fand eine Korrelation zwischen dem intrahepatischen Verfettungsgrad und Markern für Insulinresistenz, insbesondere *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR)* und Adiponectin (Parkin et al., 2015), was

den Zusammenhang zwischen Steatosegrad der Leber und metabolischen Parametern unterstreicht.

### **5.2.2 Einfluss von *Steatosis Hepatis* auf Morbidität und Mortalität**

Hier konnte bei einer *Steatosis Hepatis* unter Berücksichtigung des standardisierten Steatosegrads und Einteilung gemäß Kleiner et al. eine signifikant höhere Rate an biliären/hepatischen Komplikationen bei höherer Verfettungsgruppierung nachgewiesen werden. Ebenso fand sich eine tendenziell höhere Rate an infektiösen Komplikationen bei höherer Verfettungsgruppierung. Die Gruppe „sonstige“ Komplikationen war bei der Steatosegruppe signifikant häufiger, die Dauer des komplikationsassoziierten Intensivaufenthaltes war zudem tendenziell bei der Steatosegruppe verlängert. Tendenzuell erhielten Patienten mit höherem Steatosegrad nach MEVIS eine höhere Anzahl an Erythrozytenkonzentraten und wiesen tendenziell eine erhöhte Rate an hepatischen/biliären Komplikationen auf. Ferner war in einer Subgruppenanalyse der Patienten mit Komplikationen, ein höherer Steatosegrad nach MEVIS tendenziell mit einer höheren Komplikationsschwere nach Clavien assoziiert. Hinsichtlich der perioperativen Morbidität (Gesamtkomplikationen) und Mortalität stellte eine *Steatosis Hepatis* hier keinen signifikanten Risikofaktor dar, sowohl im kategorialen Gruppenvergleich gematchter Patienten- und Kontrollgruppe, als auch metrisch über den objektiv bestimmten Steatosegrad nach MEVIS über alle Probanden hinweg. Auch weitere histopathologische Veränderungen Fibrose und entzündliche Veränderungen stellten keine Risikofaktoren bezüglich Morbidität und Mortalität dar, im Kontrast zu einer Studie, bei der Steatohepatitis mit erhöhter Morbidität verbunden war (Reddy et al., 2012). Ein erhöhter BMI, insbesondere Adipositas wird in einigen Studien als Risikofaktor für perioperative Morbidität beschrieben, v. a. hinsichtlich infektiöser Komplikationen und Wundheilungsstörungen, (Al-Mulhim et al., 2014; Bamgbade et al., 2007), in einer anderen ist ein erhöhter BMI jedoch nicht mit einer erhöhten Komplikationsrate assoziiert (Dindo et al., 2003). Deshalb wurde hier aufgrund der hohen Korrelation mit einer *Steatosis Hepatis* (s. o.) ein erhöhter BMI als potentieller *Confounder* berücksichtigt; sowohl bei hepatischen/biliären als auch bei „sonstigen“ Komplikationen war hier ein erhöhter BMI nicht als signifikanter Risikofaktor zu identifizieren.

### **5.2.3 Multivariate Analyse von Morbidität und Mortalität**

In der vorliegenden Studie konnten uni- und nachfolgend multivariate Analysen der Morbidität des gesamten Kollektivs lediglich die OP-Dauer und kategorial abnorme GGT-Werte im Sinne einer Cholestase als signifikante Risikofaktoren identifizieren. In anderen Studien war die OP-

Dauer kein signifikanter Risikofaktor (Kooby et al., 2003), Cholestase konnte in einer anderen Studie als Risikofaktor bezüglich der Mortalität identifiziert werden (McCormack et al., 2007). Eine verlängerte OP-Dauer ist als Ausdruck von intraoperativen Komplikationen zu werten und nicht als kausaler Risikofaktor für Komplikationen. Hinsichtlich der Mortalität konnten mittels uni- und multivariater Analyse des gesamten Kollektivs das Resektionsvolumen und die Anzahl von Erythrozytenkonzentraten als signifikante Risikofaktoren identifiziert werden. Das steht im Einklang mit anderen Studien, wo Blutverlust (Kooby et al., 2003) bzw. die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten (McCormack et al., 2007) als relevanten Risikofaktor identifiziert werden konnte. Auch die Anzahl der resezierten Segmente stellte in einer Studie einen signifikanten Risikofaktor dar (Gomez et al., 2007).

#### **5.2.4 Einfluss von *Steatosis Hepatis* auf Langzeitüberleben und Leberrezidiv**

Eine Analyse in der vorliegenden Studie bezüglich des Einflusses von *Steatosis Hepatis* auf das Langzeitüberleben zeigte tendenziell ein verkürztes Langzeitüberleben bei höherem Steatosegrad; wichtigerweise zeigte sich bezüglich des BMIs, eines potentiellen *Confounders*, kein ähnlicher Effekt. Analysen bezüglich des Rezidivs von Metastasen („tumorfremem Überleben“) konnten keine signifikante Assoziation mit Steatose detektieren. Auch fand sich kein Zusammenhang zwischen Verfettungsgrad und Metastasenanzahl.

### **5.3 Einordnung der Ergebnisse im wissenschaftlichen und klinischen Kontext**

Der Effekt von *Steatosis Hepatis* auf das perioperative *Outcome*, also perioperative Morbidität und Mortalität sowie Langzeitüberleben ist in zahlreichen Studien untersucht worden, wobei sich ein wenig einheitliches Bild ergibt.

#### **5.3.1 Morbidität**

Mehrere Studien und eine Metaanalyse (Behrns et al., 1998; Belghiti et al., 2000; de Meijer et al., 2010; Gomez et al., 2007; Kooby et al., 2003; McCormack et al., 2007) liefern Hinweise, dass die *Steatosis Hepatis* einen Risikofaktor für postoperative Komplikationen darstellt. Allerdings existieren auch Studien, in denen die Steatose keinen Risikofaktor für Morbidität ausmacht (Jarnagin et al., 2002; Little et al., 2002; Reddy et al., 2012). In einer Studie war die Rate an Gesamtkomplikationen, insbesondere Wundinfektionen und hepatischen Komplikationen bei *Steatosis Hepatis* erhöht, zudem fand sich ein Zusammenhang zwischen Verfettungsgrad und Komplikationsrate (Kooby et al., 2003). Auch in einer weiteren Studie war die Rate an Gesamtkomplikationen bei *Steatosis Hepatis* erhöht, v. a. schwerwiegende Komplikationen (Grad III-V), zudem war der Intensivaufenthalt der Patienten mit einer Steatose verlängert. Patienten mit milder (10-30%) und mäßiger/schwerer Steatose (>30%)

besaßen dieselbe Komplikationsrate (McCormack et al., 2007). Eine weitere Studie konnte belegen, dass ein höherer Verfettungsgrad mit einer höheren postoperativen Komplikationsrate assoziiert ist (Gomez et al., 2007), insbesondere infektiöse Komplikationen. Interessanterweise fand eine Studie eine erhöhte Transfusionswahrscheinlichkeit bei Steatose (moderat bis schwer >30%) (Behrns et al., 1998). In einer anderen Studie (McCormack et al., 2007) wurden in der Gruppe mit *Steatosis Hepatis* mehr Erythrozytenkonzentrate transfundiert. Eine andere Studie konnte keine erhöhte Komplikationsrate bei *Steatosis Hepatis* nachweisen, sowohl hinsichtlich aller Komplikationen als auch leberspezifischer Komplikationen (Reddy et al., 2012). Somit konnte in der vorliegenden Arbeit die erhöhte Rate an biliären/hepatischen Komplikationen bei einer *Steatosis Hepatis* bestätigt werden, eine signifikant erhöhte Rate an Gesamtkomplikationen, infektiösen Komplikationen oder Transfusionsbedürftigkeit fand sich hier nicht; es ließ sich jedoch eine Tendenz zu höheren Komplikationsrate bei einer *Steatosis Hepatis* feststellen.

#### **5.3.1.1 Resektionsausmaß**

Allerdings waren Studien mit Nachweis eines Effekts von einer *Steatosis Hepatis* auf die Morbidität bei Leberresektionen größeren Ausmaßes durchgeführt worden, zum einen ausschließlich bei „major hepatectomy“ ( $\geq 3$  Segmente (McCormack et al., 2007), der Anteil an Segmenten oder mehr Resektionen betrug in einer anderen Studie 69 bzw. 63 % (Kooby et al., 2003) und in einer anderen betrug der Anteil von  $\geq 3$  Segmente 68% (263/386) (Gomez et al., 2007). Bei der Studie ohne Effekt einer *Steatosis Hepatis* betrug der Anteil an „major hepatectomy“ 51% (37/72) (Reddy et al., 2012). Im Gegensatz betrug in der hier durchgeführten Studie der Anteil von Lobektomien lediglich 59 und 56% bzw. der Anteil an „major hepatectomy“ ( $\geq 3$  Segmente) 43 bzw. 55% und war damit deutlich geringer. Passend ergab eine zusätzliche, nur auf Hemihepatektomie beschränkte Analyse in der vorliegenden Studie bei allerdings geringer Probandenzahl von  $n=46$  und davon nur  $n=14$  Patienten mit einer *Steatosis Hepatis*, einen Trend mit höherer Morbiditätsrate bei höherer Steatosegruppierung (Einteilung nach Standard (Kleiner et al.); ohne Verfettung ( $n=32$ ,  $< 5\%$ ) leichte Verfettung ( $n=9$ ,  $5 - 33\%$ ), mäßige Verfettung ( $n=3$ ,  $> 33$  und  $<66\%$ ) und starke Verfettung ( $n=2$ ,  $> 66\%$ ); Morbiditätsrate von 53%, 67%, 33 % und 100% ( $p=0.4$ )).

#### **5.3.1.2 Steatosegrad**

Zudem war der Steatosegrad der Vergleichsstudien höher. So war nur eine Studie diesbezüglich in etwa vergleichbar, dort betrug der Anteil von milder Steatose 76% (44/58) (10-30%), der von mäßiger 17% (10/58) (30-60%) und der von schwerer Steatose 7% (4/58) ( $>60\%$ )

(McCormack et al., 2007); in einer anderen betrug der Anteil von milder Steatose 67% (223/331) (<30%), mäßiger Steatose 19% (64/331) (30-60%) und schwerer Steatose 11% (38/331) (>60%) (Kooby et al., 2003) und in einer anderen milde Steatose 63% (122/194) (<30%), mäßige Steatose 31 % (60/194) (30-60%) und 6% (12/194) (>60%) (Gomez et al., 2007). In der Studie ohne Effekt waren nur Patienten mit Steatosegrad >33 % vertreten (Reddy et al., 2012). In der hier vorliegenden Studie bestand bei 77% (47/61) eine milde Steatose (5-33%), bei 16% (10/61) eine moderate (33-66%) und bei 7% (4/61) eine schwere Steatose (>66%). Auch der untere *Cutoff* (5%) gemäß aktueller Kriterien nach Kleiner et al. muss berücksichtigt werden. Somit lagen in der vorliegenden Studie im Vergleich zu anderen Studien wenig Patienten mit einem mäßigen oder schweren Steatosegrad vor, jedoch verhältnismäßig mehr mit einem niedrigen Steatosegrad.

### **5.3.1.3 Anteil von Patienten mit *Steatosis Hepatis* am Gesamtkollektiv**

Ferner wiesen die Studien, die einen Effekt einer *Steatosis Hepatis* auf die perioperative Morbidität nachweisen konnten, meistens einen hohen prozentualen Anteil an Patienten mit *Steatosis Hepatis* auf: 46 % (Behrns et al., 1998) bzw. 67% (Kooby et al., 2003) bis auf Belghiti et al. mit 8%. Bei den Studien ohne Effekt war der Anteil meist geringer; 31% (Little et al., 2002) bzw. 29% (Jarnagin et al., 2002). In der vorliegenden Studie war der Anteil von Pat. mit histologisch gesicherter *Steatosis Hepatis* 43%. Zudem waren laut Datenbank 52 Patienten der Steatosegruppe zugeordnet worden, die nach erneuter standardisierter Evaluation durch die Pathologie einen Verfettungsgrad von <5% aufwiesen bzw. 2 Patienten in die Kontrollgruppe, die nach erneuter Evaluation durch die Pathologie einen Verfettungsgrad von >5% aufwiesen; was deutlich auf die Fehleranfälligkeit der Einteilung hinweist. Es kommt folglich auf die Eingruppierung und Methode der Steatosebestimmung an.

### **5.3.1.4 BMI als potentieller *Confounder***

In einer Studie bezüglich des Einflusses von *Steatosis Hepatis* auf die Morbidität war ein erhöhter BMI kein signifikanter Risikofaktor für Morbidität in der multivariaten Analyse (Kooby et al., 2003), in anderen Studien wurde der BMI nicht in die Analyse einbezogen bzw. wurde er nicht ausdrücklich erwähnt (de Meijer et al., 2010; Gomez et al., 2007; McCormack et al., 2007). Interessanterweise fanden Langella et al., dass Adipositas alleine mit einer erhöhten postoperativen Morbidität bei Hepatektomie bei kolorektalen Metastasen verbunden ist (Langella et al., 2015). Somit konnten in der vorliegenden Arbeit ein erhöhter BMI bzw. Adipositas als *Confounder* ausgeschlossen werden und ein relevanter Effekt des BMI widerlegt werden.

### 5.3.2 Pathophysiologisches Korrelat

Der Effekt von Steatose auf Morbidität bei Leberresektionen wird pathophysiologisch durch mehrere Veränderungen erklärt. Die erhöhte Vulnerabilität der Leber bei Steatose wird durch Störungen der Mikrozirkulation und der biochemischen Energiehomöostase bedingt (Vetelainen et al., 2007). Experimentelle Studien konnten zeigen, dass die hepatische Mikrozirkulation invers mit dem Verfettungsgrad korreliert (Seifalian et al., 1999). Eine Erklärung ist, dass die durch Fettakkumulation angeschwollenen Hepatozyten den sinusoidalen Blutfluss behindern (Farrell et al., 2008). Die Energiehomöostase ist bei einer *Steatosis Hepatis* bereits im Normalzustand gestört; durch oxidativen Stress kann es zur Exazerbation dieser Störung kommen. Korrelat ist eine weitere Abnahme einer bereits erniedrigten Konzentration an ATP (Adenosintriphosphat) und ATP-Synthase in den fettbeladenen Hepatozyten (Caraceni et al., 2005; Cortez-Pinto et al., 1999; Morris et al., 2011; Vendemiale et al., 2001). Zudem sind aber auch Veränderungen des antioxidativen Systems (u. a. Glutathion und Glutathion-S-Transferase) beschrieben (Baltruskeviciene et al., 2016). Die Kombination aus ausgeprägter Vulnerabilität mitochondrialer Funktionen gegenüber oxidativem Stress und aus gestörter Mikrozirkulation kann zu Zellnekrosen führen (Vetelainen et al., 2007). Zum anderen schränkt eine *Steatosis Hepatis* auch postoperativ die Leberregeneration ein; als Resultat der bereits beschriebenen Störungen der ATP-Homöostase und eines gestörten Zellzyklus. Das betrifft sowohl die DNS-Replikation (Hamano et al., 2014), als auch den Übergang von der G1 zur S Phase (Yang et al., 2001) bzw. die Mitte der S Phase (Murata et al., 2007). Somit sind die Störungen auf molekularer Ebene Korrelat einer erhöhten klinischen Vulnerabilität, was sich in einer höheren Morbidität widerspiegelt.

### 5.3.3 Mortalität und Langzeitüberleben

Der Einfluss einer *Steatosis Hepatis* auf die Mortalität ist insgesamt ebenfalls wenig einheitlich. Ein signifikanter Effekt auf die Mortalität konnte in einigen Studien und einer Metaanalyse belegt werden (Behrns et al., 1998; de Meijer et al., 2010). In einzelnen Studien konnte kein Effekt auf die Mortalität nachgewiesen werden (Belghiti et al., 2000; Kooby et al., 2003; McCormack et al., 2007). Bestätigt wird die besondere Relevanz der Resektionsgröße (insbesondere Hemihepatektomie) und eines hohen Verfettungsgrades von einer Metaanalyse (de Meijer et al., 2010) der oben genannten Studien (Behrns et al., 1998; Gomez et al., 2007; Kooby et al., 2003; McCormack et al., 2007). Es wurden nur Resektionen bei Hemihepatektomien untersucht; ferner betrug der Anteil an Patienten mit mildem Verfettungsgrad (<30%) 41% (408/1000) und moderatem/starkem Verfettungsgrad (>30%) 17% (174/1000). In dieser Metaanalyse konnte milde und moderate/schwere Steatose jeweils



als leichter bzw. ausgeprägter Risikofaktor für postoperative Komplikationen, moderate/schwere Steatose sogar zudem als Risikofaktor für Mortalität identifiziert werden (de Meijer et al., 2010). Somit konnte in der vorliegenden Arbeit ein relevanter Effekt der *Steatosis Hepatis* auf die Mortalität widerlegt werden.

Bezüglich des Langzeitüberlebens existieren wenige Vergleichsstudien, in einer zeigte weder der BMI noch eine *Steatosis Hepatis* einen Effekt auf das Langzeitüberleben (Pathak et al., 2010); in einer anderen hatte eine *Steatosis Hepatis* keinen Effekt aufs Langzeitüberleben (Kooby et al., 2003; Parkin et al., 2014), in einigen besaß das Vorliegen einer *Steatosis Hepatis* sogar einen protektiven Effekt (Parkin et al., 2013; Vigano et al., 2013).

#### **5.3.4 Rezidivfreies Überleben**

Das alleinige Vorliegen einer *Steatosis Hepatis* stellt einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten von Lokalrezidiven nach Resektion von Lebermetastasen dar (Hamady et al., 2013), ferner fand eine kürzlich durchgeführte Studie eine Häufung von *Steatosis Hepatis* bei PatientInnen mit kolorektalen Lebermetastasen (Schulz et al., 2015) eine andere bei Patientinnen mit Metastasen bei Mammakarzinom (Ocak Duran et al., 2015). Pathophysiologisch wird postuliert, dass die Steatose in der Leber ein für Metastasen durchlässiges Mikromilieu („*permissive microenvironment*“ (VanSaun et al., 2009)) begünstigt, woraufhin die Leber empfindlicher für das Auftreten von Sekundärtumoren wird. Ursächlich werden Veränderungen im Rahmen chronischer Entzündung mit Veränderungen von Zytokinen angesehen; z.B. TGF- $\beta$ , welches bei Leberverletzungen gehäuft auftritt (Kharbanda et al., 2004), aber auch mit Tumorerkrankung und Angiogenese assoziiert ist (Yu and Stamenkovic, 2000), über die dafür essentiellen Matrix-Metalloproteinasen (Gorden et al., 2007; Wick et al., 2001). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass MMP 13, eine Metalloproteinase, in verfetteten Lebern von Mäusen und auch Menschen hochreguliert ist. Interessanterweise fanden sich bei Mäusen vom Typ *Mmp13*<sup>-/-</sup> verglichen mit dem Wildtyp eine deutlich geringere Metastasenlast der Leber nach Okulation von Tumorzellen, der Effekt wird durch eine verminderte Extravasation der Tumorzellen erklärt (Mendonsa et al., 2015). Van Saun et al. wiesen am Tiermodell in einer Studie nach, dass bereits ein frühes Stadium der *Steatosis Hepatis* für das Auftreten multipler kolorektaler Metastasen prädisponiert (VanSaun et al., 2009). Ein weiterer Beleg existiert am Tiermodell, wo Mikrometastasen bei einer *Steatosis Hepatis* nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden häufiger auftreten als bei nicht verfetteter Leber (van der Bilt et al., 2008). Andererseits existieren Belege für einen protektiven Effekt einer *Steatosis Hepatis* hinsichtlich des Auftretens von Lebermetastasen. Das seltene Auftreten

von Metastasen bei einer *Steatosis Hepatis* wurde klinisch (Hayashi et al., 1997) bestätigt. Es fand sich bei der Steatose eine geringere Anzahl synchroner Metastasen (Iascone et al., 2005), zudem war die Inzidenz von Lebermetastasen erniedrigt (Muroño et al., 2013; Parasca and O'Brien, 2013). Auch größere Metaanalysen, die unterschiedliche chronische Lebererkrankungen inklusive der *Steatosis Hepatis* betrachteten, konnten das Ergebnis bestätigen (Augustin et al., 2013; Cai et al., 2014). Es fand sich eine Entsprechung am Tiermodell (Tamura et al., 1999). Pathophysiologisch wird angenommen, dass das bereits aktivierte Immunsystem effektiv Metastasen beseitigen kann und dass eine hohe Konzentrationen an Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen die Tumordinvasion behindern könnte (Augustin et al., 2013). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezeigt werden.

## 6 Zusammenfassung

Leberresektionen zur kurativen Entfernung von gut- und bösartigen Tumoren sind heutzutage zu einem Standardeingriff in der fortgeschrittenen Viszeralchirurgie geworden. Bei Erkrankungen des Leberparenchyms ist die Kompensations- und Regenerationsfähigkeit der Leber jedoch deutlich eingeschränkt, wobei der *Steatosis Hepatis* eine zunehmende Bedeutung aufgrund steigender Prävalenz zukommt und diese schon jetzt die häufigste chronische Lebererkrankung der westlichen Welt darstellt. Der genaue Einfluss der *Steatosis Hepatis* bei Leberresektionen ist jedoch als Risikofaktor für perioperative Morbidität, Mortalität und Langzeitüberleben bisher wenig verstanden, weshalb das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der *Steatosis Hepatis* genauer mittels eines objektiv-quantitativen bildmorphologischen Verfahrens zu definieren und in einer retrospektiven Analyse hinsichtlich ihrer Morbidität zu evaluieren.

In dieser Studie wurden n=112 PatientInnen, die innerhalb des Zeitraums von 2003-2012 am Klinikum Großhadern mit histologisch gesicherter *Steatosis Hepatis* an Lebermetastasen reseziert wurden, mit einer zufällig ausgewählten und bezüglich Alter und Geschlecht adjustierten Kontrollgruppe von n=29 PatientInnen ohne *Steatosis Hepatis* verglichen. Alle histologischen Leberschnitte wurden digitalisiert und mittels *Lipid Droplet Count* über MEVIS der Steatosegrad objektiv ausgewertet. Nach Ausschluss von *Confoundern* wurde der Einfluss der Steatose auf perioperative Morbidität, Mortalität, Langzeitüberleben und tumorfreies Überleben untersucht. Zudem wurden laborchemische und klinische Prädiktoren des Steatosegrads identifiziert und ein multivariates Modell für die perioperative Morbidität und Mortalität erstellt.

Eine *Steatosis Hepatis* stellte einen signifikanten perioperativen Risikofaktor für die Entwicklung von v. a. biliären und hepatischen Komplikationen dar. Tendenziell war eine *Steatosis Hepatis* zudem ein Risikofaktor für weitere Komplikationen wie eine höhere Transfusionsbedürftigkeit von Erythrozytenkonzentraten, eine erhöhte Rate an infektiösen Komplikationen und eine verlängerte Dauer des komplikationsassoziierten Intensivaufenthaltes. Tendenziell fand sich ein verringertes Langzeitüberleben bei höherem Steatosegrad sowie in der Subgruppenanalyse der Patienten mit Komplikationen eine positive Assoziation des Steatosegrads mit der Komplikationsschwere nach Dindo-Clavien. Methodisch konnte eine sehr hohe Korrelation des quantitativ-objektiven Verfahrens mit dem etablierten histopathologischen Standard sowie klinischen (BMI) und laborchemischen Parametern (CHE und HDL im Serum) eines gestörten Fettstoffwechsels nachgewiesen werden. Signifikante Risikofaktoren für die perioperative Morbidität stellten die OP-Dauer und erhöhte GGT-Werte

im Sinne einer Cholestase dar; signifikante Risikofaktoren für die Mortalität waren das Resektionsvolumen und die Anzahl von transfundierten Erythrozytenkonzentraten. Ein Effekt von *Steatosis Hepatis* auf die perioperativen Gesamtkomplikationen und die Mortalität konnte nicht nachgewiesen werden. Die *Steatosis Hepatis* hatte aber auch keinen positiven oder negativen Einfluss auf Metastasenanzahl bzw. Rezidive von Lebermetastasen im Sinne des veränderten Mikromilieus der Leber.

Schwachpunkt in dem vorliegenden Patientenkollektiv war im Vergleich zu anderen publizierten Untersuchungen ein geringerer Anteil an großen Leberresektionen sowie ein verhältnismäßig geringer Steatosegrad des Patientenguts. Eine mögliche Erklärung dafür ist ein intuitiver Selektions-Bias im Rahmen der Indikationsstellung durch den Chirurgen, mit dem Ziel, Komplikationen und perioperative Mortalität zu vermeiden. Die verlängerte OP-Dauer ist als Ausdruck von intraoperativen Komplikationen zu werten, nicht als kausaler Faktor.

Die Steatose stellte in der vorliegenden retrospektiven Untersuchung einen relevanten Risikofaktor für die Leberchirurgie dar. Somit spielt die Identifikation und objektivierbare Einschätzung (histologisch) von Steatose für die Selektion eines geeigneten Patientenguts bei Resektionen von Lebermetastasen eine zentrale Rolle; dies bis hin zur präoperativen Leberbiopsie zur histopathologischen Untersuchung.

Weitere unabhängige Risikofaktoren wie eine präoperative Cholestase (GGT bei Frauen  $\geq 40$  U/l bzw. bei Männern  $\geq 60$  U/l) können einer besseren Einschätzung der Operabilität dienen. Intraoperativ sollte vermehrt auf einen geringen Blutverlust und damit einer Reduktion der Anzahl transfundierter Erythrozytenkonzentrate geachtet werden und das Resektionsvolumen auf Grund der verringerten Regenerationskapazität geringer als beim Lebergesunden geplant werden. Das in der vorliegenden Studie verwendete quantitativ-objektive Verfahren zur Bestimmung des Steatosegrads ergab eine sehr hohe Korrelation mit dem etablierten Standard und stellt damit ein valides und sehr vielversprechendes Verfahren für zukünftige, objektive Messungen dar. Auf Basis dieses Verfahrens könnte eine Risikostratifizierung erfolgen und die Selektion von geeigneten PatientInnen verbessert werden, um negative Therapieeffekte für die PatientInnen zu vermeiden.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

5-FU= 5-Fluoruracil

AFP=Alpha-Fetoprotein

AFLD=*Alcoholic Fatty Liver Disease*

ALR=*Augmenter of Liver Regeneration*

AP=Alkalische Phosphatase

ASH=*Alcoholic Steatohepatitis*

ATP=Adenosintriphosphat

Apo A 1=Apolipoprotein A 1

Apo B=Apolipoprotein B

ASA=*American Society of Anesthesiologists*

BMI=Body-Mass-Index

CA 19-9=Carbohydrate-Antigen 19-9

CEA=Carcinoembryonales Antigen

CHE=Cholinesterase

CRP=C-reaktives Protein

CYP-450=cytochrom p-450 abhängiges Enzym

DNS=Desoxyribonukleinsäure

EK=Erythrozytenkonzentrat

FA=Folsäure

FDR=False Discovery Rate

FFP=*Fresh Frozen Plasma*

GGT=Gamma-Glutamyl-Transferase

GLM=*General Linear Model*

GOT=Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT=Glutamat-Pyruvat-Transaminase

HCC=Hepatocelluläres Carcinom

HDL=High Density Lipoprotein

HE=Hämatoxylin Eosin  
H-NMR-Spektroskopie=Kernspinresonanzspektroskopie  
HOMA-IR=*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*  
HTCR=*Human Tissue and Cell Research*  
ICU=*Intensive Care Unit*  
IGF 1=*Insulin-like Growth Factor 1*  
IL-1=Interleukin 1  
IL-6=Interleukin 6  
IMC=*Intermediate Care*  
IRS 1=*Insulin Receptor Substrate 1*  
KI=Konfidenzintervall  
LDL=Low Density Lipoprotein  
LMU=Ludwig-Maximilians-Universität  
MEVIS=Fraunhofer-Institut für Bildgestützte Medizin MEVIS  
MMP 13=Matrix Metalloproteinase 13  
NAD=Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)  
NADH=Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)  
NAFLD=*Nonalcoholic Fatty Liver Disease*  
NASH=*Nonalcoholic Steatohepatitis*  
NASH CRN =*Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network*  
NF-kappaB=*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B-Cells*  
OR=*Odds Ratio*  
PC=*Personal Computer*  
PD-ECGF=*Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor*  
PPAR=*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*  
PyNPase=Pyrimidin Nukleosid Phosphorylase  
SD=*Standard Deviation*  
SF=Standardfehler  
SPSS= *Superior Performance Software System*

SREBP=*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*

TAG=*Triacylglycerid*

TGF- $\beta$ =*Transforming Growth Factor  $\beta$*

TNF- $\alpha$ =*Tumornekrosefaktor  $\alpha$*

USA=*United States of America*

VIF=*Variance Inflation Factor*

VLDL=*Very Low Density Lipoprotein*

## **7.2 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schema der Gruppenselektion. ....	20
Abbildung 2: Korrelation des Steatosegrads nach MEVIS mit dem BMI. ....	29
Abbildung 3: Korrelation des Steatosegrads nach MEVIS mit der HDL-Konzentration. ....	30
Abbildung 4: Korrelation des Steatosegrads nach MEVIS mit der CHE-Konzentration. ....	30
Abbildung 5: Überlebenskurven beider Gruppen. ....	44
Abbildung 6: Überlebenskurven aufgeschlüsselt nach Steatosegrad nach MEVIS. ....	45
Abbildung 7: Überlebenskurven aufgeschlüsselt nach standardisiertem Steatosegrad. ....	46
Abbildung 8: Überlebenskurven mit und ohne Adipositas. ....	47
Abbildung 9: Überlebenskurven aufgeschlüsselt nach Präadipositas und Adipositas. ....	48
Abbildung 10: Leberrezidivkurven (tumorfrees Überleben) beider Gruppen. ....	49

### 7.3 Art der Chemotherapie

	Steatose (n=112)	Kontrollen (n=29)
<b>Neoadjuvante Chemotherapie (aufgeschlüsselt)</b>	69 (62%)	16 (55%)
-FOLFOX 4 (Oxaliplatin, FA, 5-FU)	20	4
-FOLFOX 6 (Oxaliplatin, FA, 5-FU)	2	
-FOLFOX 6 (Oxaliplatin, FA, 5-FU)+ Bevacizumab		1
-FOLFOX 4 (Oxaliplatin, FA, 5-FU) + Bevacizumab	4	
-5-FU, FA	5	
-FOLFIRI (FA, 5-FU, Irinotecan)	2	
-FOLFIRI (FA, 5-FU, Irinotecan) + Bevacizumab	4	
-FOLFIRI (FA, 5-FU, Irinotecan) + Cetuximab	1	
-XELOX (Oxaliplatin, Capecitabin)	1	
-XELOX (Oxaliplatin, Capecitabin) + Bevacizumab	1	2
-XELOX (Oxaliplatin, Capecitabin) + Cetuximab	1	
-XELIRI (Capecitabin, Irinotecan)	1	
-EC (Epirubicin, Cyclophosphamid)	1	
-FEC (5-FU, Epirubicin, Cyclophosphamid)	1	1
-Docetaxel		1
-Doxorubicin	1	
-Cisplatin+Vinorelbin	1	
-PEB (Cisplatin, Etoposid, Bleomycin)	1	
-Gemcitabin, Oxaliplatin	1	
-Gemcitabin, Irinocetan, Cetuximab		1
-Carboplatin	2	
-Pemetrexed, Cisplatin	1	
-Dactinomycin, Vincristin		1
-retrospektiv nicht eruierbar	18	5



## 8 Literaturverzeichnis

- Adams, L.A., Angulo, P., and Lindor, K.D. *Nonalcoholic fatty liver disease*. *Cmaj*, 173 (2005) 735-8
- Al-Mulhim, A.S., Al-Hussaini, H.A., Al-Jalal, B.A., Al-Moagal, R.O., and Al-Najjar, S.A. *Obesity Disease and Surgery*. *International Journal of Chronic Diseases*, 2014 (2014) 652341
- Angulo, P. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *New England Journal of Medicine*, 346 (2002) 1221-1231
- Argo, C.K., Northup, P.G., Al-Osaimi, A.M.S., and Caldwell, S.H. *Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis*. *Journal of Hepatology*, 51 (2009) 371-379
- Augustin, G., Bruketa, T., Korolija, D., and Milosevic, M. *Lower incidence of hepatic metastases of colorectal cancer in patients with chronic liver diseases: meta-analysis*. *Hepatogastroenterology*, 60 (2013) 1164-8
- Baltruskeviciene, E., Kazbariene, B., Badaras, R., Bagdonaite, L., Krikstaponiene, A., Zdanavicius, L., Aleknavicius, E., and Didziapetriene, J. *Glutathione and glutathione S-transferase levels in patients with liver metastases of colorectal cancer and other hepatic disorders*. *Turk J Gastroenterol*, 27 (2016) 336-41
- Bamgbade, O.A., Rutter, T.W., Nafiu, O.O., and Dorje, P. *Postoperative complications in obese and nonobese patients*. *World J Surg*, 31 (2007) 556-60; discussion 561
- Behrns, K.E., Tsiotos, G.G., DeSouza, N.F., Krishna, M.K., Ludwig, J., and Nagorney, D.M. *Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection*. *J Gastrointest Surg*, 2 (1998) 292-8
- Belghiti, J., Hiramatsu, K., Benoist, S., Massault, P., Sauvanet, A., and Farges, O. *Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection*. *J Am Coll Surg*, 191 (2000) 38-46
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. *Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57 (1995) 289-300
- Birth, M., In: *Lebermetastasen*. UNI-MED-Verlag, Bremen, 2007, 1. Auflage
- Bradbury, M.W. *Lipid Metabolism and Liver Inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis*. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290 (2006) G194-G198
- Brown, C.D., Higgins, M., Donato, K.A., Rohde, F.C., Garrison, R., Obarzanek, E., Ernst, N.D., and Horan, M. *Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia*. *Obes Res*, 8 (2000) 605-19
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. *Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox*. *Cell Metab*, 7 (2008) 95-6

- Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M., and Hobbs, H.H. *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. *Hepatology*, 40 (2004) 1387-95
- Cai, B., Liao, K., Song, X.Q., Wei, W.Y., Zhuang, Y., and Zhang, S. *Patients with chronically diseased livers have lower incidence of colorectal liver metastases: a meta-analysis*. *PLoS One*, 9 (2014) e108618
- Caraceni, P., Domenicali, M., Vendemiale, G., Grattagliano, I., Pertosa, A., Nardo, B., Morselli-Labate, A.M., Trevisani, F., Palasciano, G., Altomare, E., and Bernardi, M. *The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury*. *J Surg Res*, 124 (2005) 160-8
- Clark, J.M., Brancati, F.L., and Diehl, A.M. *Nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 122 (2002) 1649-1657
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. *Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights*. *Science*, 332 (2011) 1519-1523
- Cortez-Pinto, H., Chatham, J., Chacko, V.P., Arnold, C., Rashid, A., and Diehl, A.M. *Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study*. *Jama*, 282 (1999) 1659-64
- Cuadrado, A., Orive, A., Garcia-Suarez, C., Dominguez, A., Fernandez-Escalante, J.C., Crespo, J., and Pons-Romero, F. *Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma*. *Obes Surg*, 15 (2005) 442-6
- D'Alessandro, A.M., Kalayoglu, M., Sollinger, H.W., Hoffmann, R.M., Reed, A., Knechtle, S.J., Pirsch, J.D., Hafez, G.R., Lorentzen, D., and Belzer, F.O. *The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation*. *Transplantation*, 51 (1991) 157-63
- Dan, R.G., Cretu, O.M., Mazilu, O., Sima, L.V., Iliescu, D., Blidisel, A., Tirziu, R., Istodor, A., and Hut, E.F. *Postoperative morbidity and mortality after liver resection. Retrospective study on 133 patients*. *Chirurgia (Bucur)*, 107 (2012) 737-41
- Day, C.P. and James, O.F. *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* *Gastroenterology*, 114 (1998) 842-5
- de Lima, V.M.R., Oliveira, C.P.M.S., Alves, V.A.F., Chammas, M.C., Oliveira, E.P., Stefano, J.T., de Mello, E.S., Cerri, G.G., Carrilho, F.J., and Caldwell, S.H. *A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma*. *Journal of Hepatology*, 49 (2008) 1055-1061
- de Meijer, V.E., Kalish, B.T., Puder, M., and Ijzermans, J.N. *Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection*. *Br J Surg*, 97 (2010) 1331-9
- Desmet, V.J., Gerber, M., Hoofnagle, J.H., Manns, M., and Scheuer, P.J. *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. *Hepatology*, 19 (1994) 1513-20

- Dindo, D., Demartines, N., and Clavien, P.A. *Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey*. *Ann Surg*, 240 (2004) 205-13
- Dindo, D., Muller, M.K., Weber, M., and Clavien, P.A. *Obesity in general elective surgery*. *Lancet*, 361 (2003) 2032-5
- Dua, S., Bhuker, M., Sharma, P., Dhall, M., and Kapoor, S. *Body Mass Index Relates to Blood Pressure Among Adults*. *North American Journal of Medical Sciences*, 6 (2014) 89-95
- Farrell, G.C., Teoh, N.C., and McCuskey, R.S. *Hepatic microcirculation in fatty liver disease*. *Anat Rec (Hoboken)*, 291 (2008) 684-92
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., and Donato, F. *Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors*. *Gastroenterology*, 127 (2004) S35-50
- Gomez, D., Malik, H.Z., Bonney, G.K., Wong, V., Toogood, G.J., Lodge, J.P.A., and Prasad, K.R. *Steatosis predicts postoperative morbidity following hepatic resection for colorectal metastasis*. *British Journal of Surgery*, 94 (2007) 1395-1402
- Gorden, D.L., Fingleton, B., Crawford, H.C., Jansen, D.E., Lepage, M., and Matrisian, L.M. *Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment*. *Int J Cancer*, 121 (2007) 495-500
- Greten, H., Rinninger, F., and Greten, T., In: *Innere Medizin. Nicht Alkoholische Fettlebererkrankung* Thieme, 2010, 834
- Guzman, G., Brunt, E.M., Petrovic, L.M., Chejfec, G., Layden, T.J., and Cotler, S.J. *Does nonalcoholic fatty liver disease predispose patients to hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis?* *Arch Pathol Lab Med*, 132 (2008) 1761-6
- Hamady, Z.Z., Rees, M., Welsh, F.K., Toogood, G.J., Prasad, K.R., John, T.K., and Lodge, J.P. *Fatty liver disease as a predictor of local recurrence following resection of colorectal liver metastases*. *Br J Surg*, 100 (2013) 820-6
- Hamano, M., Ezaki, H., Kiso, S., Furuta, K., Egawa, M., Kizu, T., Chatani, N., Kamada, Y., Yoshida, Y., and Takehara, T. *Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis*. *Journal of Gastroenterology*, 49 (2014) 305-316
- Hayashi, S., Masuda, H., and Shigematsu, M. *Liver metastasis rare in colorectal cancer patients with fatty liver*. *Hepatogastroenterology*, 44 (1997) 1069-75
- Hebbard, L. and George, J. *Animal models of nonalcoholic fatty liver disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8 (2011) 35-44
- Hellerbrand, C. *Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver*. *Pflugers Arch*, 465 (2013) 775-8

- Hellerbrand, C., Jobin, C., Iimuro, Y., Licato, L., Sartor, R.B., and Brenner, D.A. *Inhibition of NFkappaB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor.* Hepatology, 27 (1998) 1285-95
- Hellerbrand, C., Jobin, C., Licato, L.L., Sartor, R.B., and Brenner, D.A. *Cytokines induce NF-kappaB in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells.* Am J Physiol, 275 (1998) G269-78
- Hellerbrand, C., Stefanovic, B., Giordano, F., Burchardt, E.R., and Brenner, D.A. *The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo.* J Hepatol, 30 (1999) 77-87
- Henne-Bruns, D., In: *Duale Reihe Chirurgie.* Thieme, 2012, 476
- Homeyer, A., Nasr, P., Engel, C., Kechagias, S., Lundberg, P., Ekstedt, M., Kost, H., Weiss, N., Palmer, T., Hahn, H.K., Treanor, D., and Lundström, C. *Automated quantification of steatosis: agreement with stereological point counting.* Diagnostic Pathology, 12 (2017) 80
- Iascone, C., Ruperto, M., and Barillari, P. *[Occurrence of synchronous colorectal cancer metastasis in the cirrhotic or fatty liver].* Minerva Chir, 60 (2005) 185-90
- Jarnagin, W.R., Gonen, M., Fong, Y., DeMatteo, R.P., Ben-Porat, L., Little, S., Corvera, C., Weber, S., and Blumgart, L.H. *Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade.* Ann Surg, 236 (2002) 397-406; discussion 406-7
- Jepsen, P., Ott, P., Andersen, P.K., Sorensen, H.T., and Vilstrup, H. *Risk for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis: a Danish nationwide cohort study.* Ann Intern Med, 156 (2012) 841-7, w295
- Karube, H., Masuda, H., Hayashi, S., Ishii, Y., and Nemoto, N. *Fatty liver suppressed the angiogenesis in liver metastatic lesions.* Hepatogastroenterology, 47 (2000) 1541-5
- Khandoga, A., Biberthaler, P., Messmer, K., and Krombach, F. *Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis.* Microvascular Research, 65 (2003) 71-77
- Khandoga, A., Enders, G., Biberthaler, P., and Krombach, F. *Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 283 (2002) G553-60
- Kharbanda, K.K., Rogers, D.D., 2nd, Wyatt, T.A., Sorrell, M.F., and Tuma, D.J. *Transforming growth factor-beta induces contraction of activated hepatic stellate cells.* J Hepatol, 41 (2004) 60-6
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A.J., and Sanyal, A.J. *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.* Hepatology, 41 (2005) 1313-21

- Kohjima, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Enjoji, M., Takayanagi, R., and Nakamuta, M. *SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease*. *Int J Mol Med*, 21 (2008) 507-11
- Kooby, D.A., Fong, Y., Suriawinata, A., Gonen, M., Allen, P.J., Klimstra, D.S., DeMatteo, R.P., D'Angelica, M., Blumgart, L.H., and Jarnagin, W.R. *Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection*. *J Gastrointest Surg*, 7 (2003) 1034-44
- Langella, S., Russolillo, N., Forchino, F., Lo Tesoriere, R., D'Eletto, M., and Ferrero, A. *Impact of obesity on postoperative outcome of hepatic resection for colorectal metastases*. *Surgery*, 158 (2015) 1521-9
- Lenz, M., Richter, T., and Muhlhauser, I. *The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review*. *Dtsch Arztebl Int*, 106 (2009) 641-8
- Levene, A.P. and Goldin, R.D. *The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease*. *Histopathology*, 61 (2012) 141-52
- Lieber, C.S. *Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis*. *Alcohol*, 34 (2004) 9-19
- Little, S.A., Jarnagin, W.R., DeMatteo, R.P., Blumgart, L.H., and Fong, Y. *Diabetes is associated with increased perioperative mortality but equivalent long-term outcome after hepatic resection for colorectal cancer*. *J Gastrointest Surg*, 6 (2002) 88-94
- Ludwig, J., Viggiano, T.R., McGill, D.B., and Oh, B.J. *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. *Mayo Clin Proc*, 55 (1980) 434-8
- Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A.J., Natale, S., Forlani, G., and Melchionda, N. *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. *Diabetes*, 50 (2001) 1844-50
- Marsman, W.A., Wiesner, R.H., Rodriguez, L., Batts, K.P., Porayko, M.K., Hay, J.E., Gores, G.J., and Krom, R.A. *Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival*. *Transplantation*, 62 (1996) 1246-51
- McCormack, L., Petrowsky, H., Jochum, W., Furrer, K., and Clavien, P.A. *Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study*. *Ann Surg*, 245 (2007) 923-30
- Mendonça, A.M., VanSaun, M.N., Ustione, A., Piston, D.W., Fingleton, B.M., and Gorden, D.L. *Host and tumor derived MMP13 regulate extravasation and establishment of colorectal metastases in the liver*. *Mol Cancer*, 14 (2015) 49
- Mikuriya, Y., Tashiro, H., Kuroda, S., Nambu, J., Kobayashi, T., Amano, H., Tanaka, Y., and Ohdan, H. *Fatty liver creates a pro-metastatic microenvironment for hepatocellular carcinoma through activation of hepatic stellate cells*. *International Journal of Cancer*, 136 (2015) E3-E13

- Morris, E.M., Rector, R.S., Thyfault, J.P., and Ibdah, J.A. *Mitochondria and redox signaling in steatohepatitis*. *Antioxid Redox Signal*, 15 (2011) 485-504
- Murata, H., Yagi, T., Iwagaki, H., Ogino, T., Sadamori, H., Matsukawa, H., Umeda, Y., Haga, S., Takaka, N., and Ozaki, M. *Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model*. *J Gastroenterol Hepatol*, 22 (2007) 2173-80
- Murono, K., Kitayama, J., Tsuno, N., Nozawa, H., Kawai, K., Sunami, E., Akahane, M., and Watanabe, T. *Hepatic steatosis is associated with lower incidence of liver metastasis from colorectal cancer*. *International Journal of Colorectal Disease*, 28 (2013) 1065-1072
- Nagasue, N., Yukaya, H., Ogawa, Y., Kohno, H., and Nakamura, T. *Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis*. *Ann Surg*, 206 (1987) 30-9
- Nakamura, A. and Terauchi, Y. *Lessons from Mouse Models of High-Fat Diet-Induced NAFLD*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (2013) 21240-21257
- Nalesnik, M.A., Gandhi, C.R., and Starzl, T.E. *Augmenter of Liver Regeneration: A Fundamental Life Protein*. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 66 (2017) 266-270
- Nomura, F., Ohnishi, K., Koen, H., Hiyama, Y., Nakayama, T., Itoh, Y., Shirai, K., Saitoh, Y., and Okuda, K. *Serum cholinesterase in patients with fatty liver*. *J Clin Gastroenterol*, 8 (1986) 599-602
- Ocak Duran, A., Yildirim, A., Inanc, M., Karaca, H., Berk, V., Bozkurt, O., Ozaslan, E., Ucar, M., and Ozkan, M. *Hepatic steatosis is associated with higher incidence of liver metastasis in patients with metastatic breast cancer; an observational clinical study*. *J buon*, 20 (2015) 963-9
- Pang, T., Kaufman, A., Choi, J., Gill, A., Drummond, M., Hugh, T., and Samra, J. *Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha staining is associated with worse outcome in colorectal liver metastases*. *Mol Clin Oncol*, 3 (2015) 308-316
- Parasca, A.D. and O'Brien, T.E. *Association of radiologically defined hepatosteatosis and colorectal cancer liver metastases*. *ASCO Meeting Abstracts*, 31 (2013) 367
- Park, J., Euhus, D.M., and Scherer, P.E. *Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression*. *Endocrine Reviews*, 32 (2011) 550-570
- Parkin, E., O'Reilly, D.A., Adam, R., Kaiser, G.M., Laurent, C., Elias, D., Capussotti, L., and Renehan, A.G. *The effect of hepatic steatosis on survival following resection of colorectal liver metastases in patients without preoperative chemotherapy*. *HPB (Oxford)*, 15 (2013) 463-72
- Parkin, E., O'Reilly, D.A., Adam, R., Kaiser, G.M., Laurent, C., Elias, D., Capussotti, L., and Renehan, A.G. *Equivalent survival in patients with and without steatosis undergoing resection for colorectal liver metastases following pre-operative chemotherapy*. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 40 (2014) 1436-1444

- Parkin, E., O'Reilly, D.A., Adam, R., Kaiser, G.M., Laurent, C., Elias, D., Capussotti, L., and Renehan, A.G. *Equivalent survival in patients with and without steatosis undergoing resection for colorectal liver metastases following pre-operative chemotherapy.* Eur J Surg Oncol, (2014)
- Parkin, E., O'Reilly, D.A., Plumb, A.A., Manoharan, P., Rao, M., Coe, P., Frystyk, J., Ammori, B., de Liguori Carino, N., Deshpande, R., Sherlock, D.J., and Renehan, A.G. *Digital histology quantification of intra-hepatic fat in patients undergoing liver resection.* European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 41 (2015) 1020-1027
- Paschos, P. and Paletas, K. *Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome.* Hippokratia, 13 (2009) 9-19
- Pathak, S., Tang, J.M., Terlizzo, M., Poston, G.J., and Malik, H.Z. *Hepatic steatosis, body mass index and long term outcome in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases.* Eur J Surg Oncol, 36 (2010) 52-7
- Pathak, S., Tang, J.M.F., Terlizzo, M., Poston, G.J., and Malik, H.Z. *Hepatic steatosis, body mass index and long term outcome in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases.* European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 36 (2010) 52-57
- Pietrobelli, A., Lee, R.C., Capristo, E., Deckelbaum, R.J., and Heymsfield, S.B. *An independent, inverse association of high-density-lipoprotein-cholesterol concentration with nonadipose body mass.* Am J Clin Nutr, 69 (1999) 614-20
- Ploeg, R.J., D'Alessandro, A.M., Knechtle, S.J., Stegall, M.D., Pirsch, J.D., Hoffmann, R.M., Sasaki, T., Sollinger, H.W., Belzer, F.O., and Kalayoglu, M. *Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis.* Transplantation, 55 (1993) 807-13
- Pratschke, S., Angele, M.K., Grutzner, U., Tufman, A., Bilzer, M., Loehe, F., Jauch, K.W., and Schauer, R.J. *GSH attenuates organ injury and improves function after transplantation of fatty livers.* Eur Surg Res, 45 (2010) 13-9
- Pratschke, S., Meimarakis, G., Mayr, S., Graeb, C., Rentsch, M., Zachoval, R., Bruns, C.J., Kleespies, A., Jauch, K.W., Loehe, F., and Angele, M.K. *Arterial blood flow predicts graft survival in liver transplant patients.* Liver Transpl, 17 (2011) 436-45
- Puri, P. and Sanyal, A.J. *Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup.* Clinical Liver Disease, 1 (2012) 98-102
- Purohit, V., Gao, B., and Song, B.J. *Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver.* Alcohol Clin Exp Res, 33 (2009) 191-205
- Reddy, J.K. and Sambasiva Rao, M. *Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation.* American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 290 (2006) G852-G858
- Reddy, S.K., Barbas, A.S., Turley, R.S., Steel, J.L., Tsung, A., Marsh, J.W., Geller, D.A., and Clary, B.M. *A standard definition of major hepatectomy: resection of four or more liver segments.* HPB (Oxford), 13 (2011) 494-502

- Reddy, S.K., Marsh, J.W., Varley, P.R., Mock, B.K., Chopra, K.B., Geller, D.A., and Tsung, A. *Underlying steatohepatitis, but not simple hepatic steatosis, increases morbidity after liver resection: A case-control study*. *Hepatology*, 56 (2012) 2221-2230
- Roka, R., Michimi, A., and Macy, G. *Associations Between Hypertension and Body Mass Index and Waist Circumference in U.S. Adults: A Comparative Analysis by Gender*. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 22 (2015) 265-73
- Roskams, T., Yang, S.Q., Koteish, A., Durnez, A., DeVos, R., Huang, X.W., Achten, R., Verslype, C., and Diehl, A.M. *Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease*. *American Journal of Pathology*, 163 (2003) 1301-1311
- Sanyal, A.J. *AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 123 (2002) 1705-1725
- Sass, D., Chang, P., and Chopra, K. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Review*. *Digestive Diseases and Sciences*, 50 (2005) 171-180
- Schiergens, T.S., Lindenthaler, A., Thomas, M.N., Rentsch, M., Mittermeier, L., Brand, K., Kuchenhoff, H., Lee, S., Guba, M., Werner, J., and Thasler, W.E. *Time-dependent impact of age and comorbidities on long-term overall survival after liver resection*. *Liver Int*, 36 (2016) 1340-50
- Schiergens, T.S., Rentsch, M., Kasparek, M.S., Frenes, K., Jauch, K.W., and Thasler, W.E. *Impact of perioperative allogeneic red blood cell transfusion on recurrence and overall survival after resection of colorectal liver metastases*. *Dis Colon Rectum*, 58 (2015) 74-82
- Schiergens, T.S., Stielow, C., Schreiber, S., Hornuss, C., Jauch, K.W., Rentsch, M., and Thasler, W.E. *Liver resection in the elderly: significance of comorbidities and blood loss*. *J Gastrointest Surg*, 18 (2014) 1161-70
- Schulz, P.O., Ferreira, F.G., Nascimento Mde, F., Vieira, A., Ribeiro, M.A., David, A.I., and Szutan, L.A. *Association of nonalcoholic fatty liver disease and liver cancer*. *World J Gastroenterol*, 21 (2015) 913-8
- Seifalian, A.M., Piasecki, C., Agarwal, A., and Davidson, B.R. *The effect of graded steatosis on flow in the hepatic parenchymal microcirculation*. *Transplantation*, 68 (1999) 780-4
- Shamai, L., Lurix, E., Shen, M., Novaro, G.M., Szomstein, S., Rosenthal, R., Hernandez, A.V., and Asher, C.R. *Association of body mass index and lipid profiles: evaluation of a broad spectrum of body mass index patients including the morbidly obese*. *Obes Surg*, 21 (2011) 42-7
- Stadlmayr, A., Aigner, E., Steger, B., Scharinger, L., Lederer, D., Mayr, A., Strasser, M., Brunner, E., Heuberger, A., Hohla, F., Steinwendner, J., Patsch, W., and Datz, C. *Nonalcoholic fatty liver disease: an independent risk factor for colorectal neoplasia*. *J Intern Med*, 270 (2011) 41-9
- Starley, B.Q., Calcagno, C.J., and Harrison, S.A. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma: A Weighty Connection*. *Hepatology*, 51 (2010) 1820-1832



- Stielow, C., *Aufbau und Etablierung einer Datenbank für chirurgische Leberresektionen am Klinikums Großhadern zum Zweck der Leistungserfassung für ein klinikinternes Qualitätsmanagement und zur wissenschaftlichen Datenanalyse am Beispiel der morbiden Adipositas*, in *Chirurgische Klinik und Poliklinik der medizinischen Fakultät der Ludwig- Maximilians Universität zu München Klinikum Großhadern*. 2011, Ludwig- Maximilians Universität zu München: München.
- Strasberg, S.M., Howard, T.K., Molmenti, E.P., and Hertl, M. *Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation*. *Hepatology*, 20 (1994) 829-838
- Sutherland, J.P., McKinley, B., and Eckel, R.H. *The metabolic syndrome and inflammation*. *Metab Syndr Relat Disord*, 2 (2004) 82-104
- Suzuki, M., Usui, N., Furugen, Y., and Mitsuhasi, N. *Pyrimidine nucleoside phosphorylase activity in normal tissues of the uterus and ovary and in benign and malignant lesions of these organs*. *Int J Clin Oncol*, 6 (2001) 19-24
- Tamura, R., Masuda, H., Ishii, Y., and Nemoto, N. *Relationship between fatty liver and liver metastasis in rats given injection of rat colon cancer cell line*. *Hepatogastroenterology*, 46 (1999) 167-71
- Tashiro, H., Kuroda, S., Mikuriya, Y., and Ohdan, H., In: *Ischemia-reperfusion injury in patients with fatty liver and the clinical impact of steatotic liver on hepatic surgery*. Vol 44. 2013
- van der Bilt, J.D., Kranenburg, O., Borren, A., van Hillegersberg, R., and Borel Rinkes, I.H. *Ageing and hepatic steatosis exacerbate ischemia/reperfusion-accelerated outgrowth of colorectal micrometastases*. *Ann Surg Oncol*, 15 (2008) 1392-8
- VanSaun, M.N., Lee, I.K., Washington, M.K., Matrisian, L., and Gorden, D.L. *High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model*. *Am J Pathol*, 175 (2009) 355-64
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caraceni, P., Caraccio, G., Domenicali, M., Dall'Agata, M., Trevisani, F., Guerrieri, F., Bernardi, M., and Altomare, E. *Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status*. *Hepatology*, 33 (2001) 808-15
- Vetelainen, R., van Vliet, A., Gouma, D.J., and van Gulik, T.M. *Steatosis as a risk factor in liver surgery*. *Ann Surg*, 245 (2007) 20-30
- Vigano, L., Capussotti, L., De Rosa, G., De Saussure, W.O., Mentha, G., and Rubbia-Brandt, L. *Liver resection for colorectal metastases after chemotherapy: impact of chemotherapy-related liver injuries, pathological tumor response, and micrometastases on long-term survival*. *Ann Surg*, 258 (2013) 731-40; discussion 741-2
- Virani, S., Michaelson, J.S., Hutter, M.M., Lancaster, R.T., Warshaw, A.L., Henderson, W.G., Khuri, S.F., and Tanabe, K.K. *Morbidity and mortality after liver resection: results of the patient safety in surgery study*. *J Am Coll Surg*, 204 (2007) 1284-92
- Völzke, H. *Multicausality in fatty liver disease: is there a rationale to distinguish between alcoholic and non-alcoholic origin?* *World J Gastroenterol*, 18 (2012) 3492-501

- Vuppalanchi, R. and Chalasani, N. *Non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management*. Hepatology (Baltimore, Md.), 49 (2009) 306-317
- Wanless, I.R. and Lentz, J.S. *Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors*. Hepatology, 12 (1990) 1106-10
- Wick, W., Platten, M., and Weller, M. *Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta*. J Neurooncol, 53 (2001) 177-85
- Wu, T.H., Yu, M.C., Chan, K.M., Lee, C.F., Chen, T.C., Chang, H.C., Chou, H.S., Wu, T.J., Eldeen, F.Z., Chen, M.F., and Lee, W.C. *Prognostic effect of steatosis on hepatocellular carcinoma patients after liver resection*. Eur J Surg Oncol, 37 (2011) 618-22
- Yang, S., Lin, H.Z., Hwang, J., Chacko, V.P., and Diehl, A.M. *Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition?* Cancer Res, 61 (2001) 5016-23
- Yang, S.Q., Lin, H.Z., Mandal, A.K., Huang, J., and Diehl, A.M. *Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology*. Hepatology, 34 (2001) 694-706
- You, M. and Crabb, D.W. *Recent Advances in Alcoholic Liver Disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 287 (2004) G1-G6
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes Dev, 14 (2000) 163-76

## 9 Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei:

- Prof. Dr. med. Wolfgang Thasler für die sehr gute Unterstützung, für das große Engagement und für die anregenden Diskussionen und Gespräche
- Prof. Dr. med. K.-W. Jauch für die Möglichkeit der Promotion
- Prof. Dr. med. J. Werner für die Möglichkeit der Fertigstellung der Promotion
- Dr. Serene Lee und dem Forschungsteam der Chirurgie für die Einarbeitung in die Datenbank und Hilfsbereitschaft
- PD Dr. med Tobias Schiergens für die enorme Hilfsbereitschaft und schnelle Kommunikation
- Fraunhofer-Institut für Bildgestützte Medizin MEVIS für die Auswertung der Daten und hilfsbereite Kooperation
- Dipl.-Biol. Maresa Demmel für die sehr genaue und kollegiale Zusammenarbeit
- Prof. Kirchner und den Kollegen des Pathologischen Instituts der LMU für die exakte Auswertung
- der HTCR-Stiftung, die diese Studie unterstützte. Die HTCR-Stiftung ist eine nicht gewinnorientierte Stiftung, die nach deutschem Gesetz reguliert wird. Sie ermöglicht Forschung an menschlichem Gewebe, indem ein ethischer und juristischer Rahmen für prospektive und retrospektive Sammlung von Serum- und Gewebeproben zur Verfügung gestellt wird.
- meinem Freund für sehr viel Geduld, Unterstützung und viele gute Inputs
- meinen Eltern für die finanzielle und motivierende Unterstützung
- allen PatientInnen für die Teilnahme an der Studie

## Eidesstattliche Versicherung

Lindenthaler, Andrea

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss von *Steatosis Hepatis* auf das perioperative *Outcome* und Langzeitüberleben nach Resektionen von Lebermetastasen anhand eines neuen objektiv-quantitativen Verfahrens zur Bestimmung des Steatosegrads.

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hallein, 01.09.2018

---

Ort, Datum

Andrea Lindenthaler

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand