

**Diplomarbeit**

**Evaluierung des Controlled Attenuation Parameter  
(CAP) bei nichtalkoholischer Fettlebererkrankung  
(NAFLD)**

eingereicht von

**Clemens Scheucher**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin,**

**Klinische Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie**

und am

**Diagnostik & Forschungsinstitut für Pathologie**

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr. med. univ. Rudolf Stauber**

und

**Univ.-Prof.<sup>in</sup> Dr<sup>in</sup>. med. univ. Karoline Lackner**

Graz, 31.07.2020

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 31.07.2020*

*Clemens Scheucher eh*

## Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. univ. Rudolf Stauber und Frau Univ.-Prof.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> med. univ. Karoline Lackner für die Bereitstellung der Diplomarbeit und die gute Betreuung während der Ausarbeitung bedanken. Sie hatten stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen.

Weiters gilt ein besonderer Dank Dr. med. univ. Lukas Binder und Dr. med. univ. Patrick Käferböck für die freundliche Bereitstellung ihrer Solutions für die digitalen Bildanalysen. Ohne das Know-how von Patrick wäre es nicht möglich gewesen, die Morphometrie in diese Arbeit zu integrieren.

Ein „großes Danke!“ gebührt meiner Schwester Judith, die meine Arbeit kritisch und mit viel Akribie Korrektur gelesen und wertvollen Input gegeben hat. Auch wenn ich es viel zu selten sage – ich bin stolz, dich als Schwester zu haben.

Mit dem Verfassen der Diplomarbeit ist es auch an der Zeit zurückzublicken auf eine intensive und unvergessliche Studienzeit. Auf diesem Wege möchte ich mich bei meinen Freunden und Kommilitonen für all die guten Erinnerungen an diese schöne Zeit bedanken. Ich hoffe, wir schaffen es, uns auch nach unserer Studienlaufbahn hin und wieder zu sehen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Danke für alles, was ihr mir ermöglicht und für den Rückhalt, den ihr mir stets gegeben habt. Ihr werdet mir immer ein großes Vorbild sein, menschlich wie beruflich.

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist eine mit metabolischen Risikofaktoren assoziierte und potentiell fortschreitende Lebererkrankung. Mehr als ein Viertel der Weltbevölkerung ist davon betroffen und die Prävalenz nimmt weiter zu. Genaue nichtinvasive Methoden zur Diagnose und Bewertung der Schwere der Erkrankung sind daher von großer Bedeutung. Die vibrationskontrollierte transiente Elastographie (VCTE) bietet die Möglichkeit des nichtinvasiven Steatose- und Fibrose-Assessments durch Messung des Controlled Attenuation Parameter (CAP) und der Lebersteifigkeit (LS). Ziel dieser Arbeit ist es, die Korrelation zwischen dem CAP und dem tatsächlichen Leberfettgehalt sowie dessen diagnostische Performance zu evaluieren.

**Methoden:** Die Daten von 80 PatientInnen mit suspizierter NAFLD, die sich zwischen 2008 und 2018 fortlaufend einer Leberbiopsie und gleichzeitigen VCTE-Untersuchung unterzogen hatten, wurden retrospektiv untersucht. Alle Biopsien wurden von einer erfahrenen Pathologin beurteilt. Zusätzlich wurden digitale Bildanalysen (computergestützte Morphometrie) durchgeführt, um Fett- (FPA) und Fibroseanteil (CPA) zu quantifizieren.

**Ergebnisse:** 37 CAP- und 56 LS-Werte wurden in die statistische Auswertung eingeschlossen. Der CAP korrelierte schwach ( $\rho = 0,36$ ) mit dem morphometrisch bestimmten Fettgehalt, jedoch nicht mit den histologischen Steatosegraden. Die Flächen unter der Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (AUROC) für die Detektion einer FPA  $\geq 5\%$  bzw.  $\geq 10\%$  betragen 0,74 (optimaler Schwellenwert: 289 dB/m) und 0,73 (optimaler Schwellenwert: 302 dB/m). Bei Personen mit hohem Body Mass Index ( $> 30\text{ kg/m}^2$ ), großer Skin-Liver Capsule Distance ( $> 22\text{ mm}$ ), hohem Alter ( $> 52\text{ Jahre}$ ) oder signifikanter Fibrose ( $F \geq 2$ ) bzw. erhöhter LS ( $\geq 8,2\text{ kPa}$ ) waren das Korrelationsausmaß und die diagnostische Trennschärfe des CAP jeweils maßgeblich beeinträchtigt. Die LS korrelierte moderat mit dem perizellulären Fibrosegehalt ( $\rho = 0,61$ ) und stark mit dem Fibroestadium ( $\rho = 0,76$ ). Eine fortgeschrittene Fibrose oder Zirrhose konnte mit ausgezeichneter Genauigkeit detektiert werden (AUROC = 0,98; optimaler Schwellenwert: 15,6 kPa).

**Diskussion:** CAP-Werte müssen bei Vorliegen von metabolischen Risikofaktoren stets vorsichtig interpretiert werden, da sie in ihrer Genauigkeit durch dickes subkutanes Fettgewebe und andere patientInnenbezogene Faktoren beeinflusst werden und es zu einer deutlichen Überschätzung des tatsächlichen Leberfettgehalts kommen kann. Ein möglicher direkter Einfluss der Fibrose auf den CAP sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

## Abstract

**Background:** Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a potentially progressive liver disease and associated with several metabolic risk factors. More than one quarter of the world's population is affected by it and its prevalence is still increasing. Therefore, accurate noninvasive methods for diagnosis and evaluation of disease severity are of utmost importance. Vibration-controlled transient elastography (VCTE) by Fibroscan<sup>®</sup> offers the possibility to assess steatosis and fibrosis, by measuring the controlled attenuation parameter (CAP) and liver stiffness (LS). This work investigates the correlation between CAP and the actual hepatic fat content and its diagnostic accuracy.

**Methods:** Data of 80 patients with suspected NAFLD, who had consecutively undergone liver biopsy and contemporaneous VCTE examination between 2008 and 2018, were investigated retrospectively. Biopsy specimens were scored by an expert pathologist. Additionally, digital image analysis (computerized morphometry) was performed in order to quantify the amount of fat (fat proportionate area, FPA) and fibrous tissue (collagen proportionate area, CPA).

**Results:** 37 CAP and 56 LS values were used for statistical analysis. CAP correlated weakly with FPA ( $\rho = 0.36$ ) but not with histological steatosis grade. The area under receiver operating characteristic curve for  $FPA \geq 5\%$  was 0.74 (optimal cut-off: 289 dB/m) and for  $FPA \geq 10\%$  was 0.73 (optimal cut-off: 302 dB/m). Both, size of correlation and diagnostic accuracy, were impaired noticeably in patients with high body mass index ( $> 30 \text{ kg/m}^2$ ), large skin-liver capsule distance ( $> 22 \text{ mm}$ ), old age ( $> 52 \text{ years}$ ), significant fibrosis ( $F \geq 2$ ) or elevated liver stiffness ( $\geq 8.2 \text{ kPa}$ ). LS correlated moderately with pericellular CPA ( $\rho = 0.61$ ) and strongly with fibrosis stage ( $\rho = 0.76$ ). Advanced fibrosis or cirrhosis was detected with excellent accuracy (AUROC = 0.98; optimal cut-off: 15.6 kPa).

**Discussion:** CAP values obtained in persons with metabolic risk factors should always be interpreted carefully as their accuracy might have been influenced by thick subcutaneous tissue and other patient-related factors, which could result in drastic overestimation of the actual hepatic fat content. The potential influence of fibrosis on CAP requires further investigation.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagungen .....	ii
Zusammenfassung.....	iii
Abstract .....	iv
Inhaltsverzeichnis.....	v
Glossar und Abkürzungen .....	vii
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis.....	x
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Definition.....	3
1.1.2 Histologische Merkmale.....	4
1.1.3 Epidemiologie.....	7
1.1.4 Risikofaktoren und Pathogenese .....	9
1.1.5 Klinik und Krankheitsverlauf.....	10
1.1.6 Diagnostische Methoden .....	11
1.1.7 Therapie .....	17
<b>1.2 Transiente Elastographie.....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Technischer Hintergrund.....	19
1.2.2 Untersuchungsvorgang .....	21
1.2.3 Controlled Attenuation Parameter bei NAFLD.....	21
1.2.4 Lebersteifigkeitsmessung bei NAFLD .....	24
1.2.5 Einfluss- und Störfaktoren.....	25
1.2.6 Sondengröße .....	27
1.2.7 Zuverlässigkeitskriterien und Qualitätsmerkmale .....	27
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.1 Studienpopulation.....	29
2.2 Klinisches Assessment und Labortests.....	30
2.3 Vibrationskontrollierte transiente Elastographie .....	31
2.4 Leberbiopsie und histologische Beurteilung.....	31
2.5 Morphometrische Messungen.....	33
2.6 Statistische Analysen.....	36
<b>3 Ergebnisse – Resultate .....</b>	<b>38</b>
3.1 Ablauf und Studienpopulation .....	38
3.2 Klinische und laborchemische Daten .....	39
3.3 Nichtinvasive leberspezifische Tests.....	40

3.4	Leberhistologie.....	41
3.5	Morphometrische Messungen.....	43
3.5.1	Steatose.....	43
3.5.2	Fibrose.....	45
3.6	Controlled Attenuation Parameter .....	47
3.6.1	Korrelation mit dem Leberfettgehalt .....	47
3.6.2	Diagnostische Performance und Schwellenwerte .....	51
3.6.3	Assoziation des CAP mit weiteren Merkmalen .....	54
3.7	Fatty Liver Index.....	56
3.8	Lebersteifigkeitsmessung und nichtinvasive Fibrosemarker .....	58
3.8.1	Korrelation mit den Fibrorestadien und dem Fibrosegehalt .....	58
3.8.2	Diagnostische Performance und Schwellenwerte .....	59
3.8.3	Einflüsse auf die Lebersteifigkeitsmessung.....	61
3.8.4	Assoziation der Lebersteifigkeit mit anderen Merkmalen.....	61
4	Diskussion.....	63
4.1	Diskussion der Ergebnisse .....	63
4.2	Stärken und Limitationen.....	68
4.3	Ausblick .....	70
4.4	Conclusio .....	72
5	Literaturverzeichnis.....	73
	Anhang – A .....	86
	Anhang – B .....	87
	Anhang – C .....	88

# Glossar und Abkürzungen

AASLD	Amerikanische Lebergesellschaft (American Association for the Study of Liver Diseases)
AHA	Amerikanische Herzgesellschaft (American Heart Association)
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUROC	Fläche unter der ROC-Kurve (Area under the Receiver Operating Characteristic curve)
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAP	Controlled Attenuation Parameter
CRN	Clinical Research Network
CPA	Collagen Proportionate Area (relativer Anteil der Kollagenfläche an der Präparatfläche)
DM II	Diabetes Mellitus Typ II
EASL	Europäische Lebergesellschaft (European Association for the Study of the Liver)
ELF	Enhanced Liver Fibrosis (ELF™) Test
EPoS	Elucidating Pathways of Steatohepatitis
et al.	et alii (AutorInnen)
F	Fibrosestadium (nach CRN)
FIB-4	Fibrosis-4-Index
FLI	Fatty Liver Index
FPA	Fat Proportionate Area (relativer Anteil der Steatosefläche an der Parenchymfläche)
FS	Fibroscan®
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma)
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HOMA-IR	HOMA-Index (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance)
HSI	Hepatic Steatosis Index
IR	Insulinresistenz
INR	International Normalized Ratio
IQR	Interquartilsabstand (interquartile range)
IQR/Med	IQR-Median-Ratio
k. A.	keine Angabe
KI	Konfidenzintervall
LR-	negative Likelihood-Ratio
LR+	positive Likelihood-Ratio
LS	Lebersteifigkeit
LSM	Lebersteifigkeitsmessung

LP	Leberpunktion
M	„medium“ (Sondengröße)
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume)
MRE	Magnetresonanz-Elastographie
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRI	Magnetresonanzbildgebung (magnetic resonance imaging)
N, n	Anzahl; Stichprobengröße
NAFL	nichtalkoholische Fettleber (nonalcoholic fatty liver)
NAFLD	nichtalkoholische Fettlebererkrankung (nonalcoholic fatty liver disease)
NAFLD-LFS	NAFLD Liver Fat Score
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis (nonalcoholic steatohepatitis)
NFS	NAFLD-Fibrose-Score
NHLB	National Heart, Lung, and Blood Institute (USA)
NPV	negativer Vorhersagewert (negative predictive value)
overall CPA	Gesamtfibroseanteil
PDFF	Protonendichte-Fett-Fraktion (proton density fat fraction)
PIINP	N-terminales Propeptid des Prokollagens Typ III
PPV	positiver Vorhersagewert (positive predictive value)
PZ	Prothrombinzeit (Quick-Wert)
Q <sub>1</sub>	unteres Quartil
Q <sub>3</sub>	oberes Quartil
ROC	Receiver Operating Characteristic
S	Steatosegrad (CRN); „small“ (Sondengröße)
SR	Siriusrot
s.	siehe
SCD	Skin-Liver Capsule Distance (Abstand zwischen Haut und Leberkapsel)
St. p.	status post (Zustand nach)
TE	transiente Elastographie (transient elastography)
TIMP-1	Gewebeinhibitor der Metalloproteinase-1
u.	und
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VCTE	vibrationskontrollierte transiente Elastographie (vibration-controlled transient elastography)
vs.	versus
XL	„extra large“ (Sondengröße)
z. B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Makrovesikuläre Steatose bei nichtalkoholischer Fettleber .....	5
Abbildung 2. Ballooning und lobuläre Entzündungsfoci bei NASH .....	6
Abbildung 3. Perizelluläre Fibrose („Maschendrahtfibrose“) bei NASH .....	7
Abbildung 4. Makronoduläre Zirrhose bei NASH .....	7
Abbildung 5. Schematische Darstellung des „multiple-hit“-Modells .....	10
Abbildung 6. Ultraschallsignale bei der Lebersteifigkeitsmessung mit dem Fibroscan® ...	20
Abbildung 7. Digitale Bildanalyse: Fibrose .....	34
Abbildung 8. Digitale Bildanalyse: Steatose .....	36
Abbildung 9. Studienablauf .....	38
Abbildung 10. Box-Whisker-Plot: FPA vs. histologische Steatosegrade. ....	44
Abbildung 11. Streudiagramm: FPA vs. histologisch geschätzten Steatoseanteil .....	44
Abbildung 12. Box-Whisker-Plot: overall CPA vs. CRN-Fibrosestadien .....	46
Abbildung 13. Box-Whisker-Plot: overall CPA vs. EPoS-Fibrosestadien.....	46
Abbildung 14. Box-Whisker-Plot: Verteilung des CAP über die Steatosegrade .....	47
Abbildung 15. Streudiagramm: CAP vs. FPA.....	48
Abbildung 16. Streudiagramme: CAP vs. FPA in verschiedenen Subgruppen.....	50
Abbildung 17. Gruppierte Box-Whisker-Plots: CAP .....	51
Abbildung 18. ROC-Kurven des CAP für $S \geq 1$ und $S \geq 2$ .....	52
Abbildung 19. ROC-Kurven des CAP für $\geq 5\%$ , $\geq 10\%$ und $\geq 20\%$ FPA.....	54
Abbildung 20. Box-Whisker-Plot: CAP und metabolisches Syndrom. ....	55
Abbildung 21. Box-Whisker-Plots: FLI bei metabolischem Syndrom und DM II .....	56
Abbildung 22. Box-Whisker-Plots des FLI: S0 vs. S123 und NAFL vs. NASH.....	56
Abbildung 23. ROC-Kurven des FLI für die Detektion von NAFLD und NASH.....	57
Abbildung 24. Box-Whisker-Plots: Lebersteifigkeit vs. Fibrosestadien.....	58
Abbildung 25. Streudiagramme: Lebersteifigkeit vs. Fibrosegehalt.....	58
Abbildung 26. Vergleich der ROC-Kurven der nichtinvasiven Fibrose-Tests .....	59
Abbildung 27. Gruppierte Box-Whisker-Plots: Lebersteifigkeit .....	61
Abbildung 28. Box-Whisker-Plots: Lebersteifigkeit in den BMI-Klassen.....	62

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Sekundäre Ursachen der Leberzellverfettung.....	4
Tabelle 2. Auswahl an Studien zur diagnostischen Performance des CAP bei NAFLD ....	23
Tabelle 3. NASH Clinical Research Network Scoring System.....	32
Tabelle 4. PatientInnencharakteristik .....	39
Tabelle 5. Nichtinvasive leberspezifische Tests.....	41
Tabelle 6. Histopathologische Auswertung.....	42
Tabelle 7. Digitale Bildanalysen .....	43
Tabelle 8. Korrelationsanalysen des CAP mit dem Steatosegrad und der FPA .....	49
Tabelle 9. ROC-Analysen des CAP für die Diagnose der Steatosegrade .....	52
Tabelle 10. Schwellenwerte und diagnostische Güte des CAP .....	53
Tabelle 11. ROC-Analysen für die Detektion bestimmter FPAs mittels CAP.....	54
Tabelle 12. Ergebnisse der nichtinvasiven Fibrose-Tests nach Fibrorestadium .....	59
Tabelle 13. ROC-Analysen der nichtinvasiven Fibrose-Tests .....	60
Tabelle 14. Schwellenwerte und diagnostische Güte der nichtinvasiven Fibrose-Tests.....	60
Tabelle 15. EPoS (Elucidating Pathways of Steatohepatitis) Staging System .....	86
Tabelle 16. NAFL vs. NASH .....	87
Tabelle 17. Korrelationsanalysen der LS mit dem Fibrorestadium und der CPA.....	88
Tabelle 18. ROC-Analysen der Lebersteifigkeitsmessung in Subgruppen .....	88

# 1 Einleitung

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) betrifft rund ein Viertel der Weltbevölkerung und ist damit die häufigste chronische Lebererkrankung. Ihre Prävalenz hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen und die potentiellen individuellen und gesundheitsökonomischen Belastungen sind enorm (1-3). Die Erkrankung ist häufig mit Fettleibigkeit, Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 (DM II), Dyslipidämie und arteriellem Bluthochdruck assoziiert und kann als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms betrachtet werden (1, 4). Neben den metabolischen Risikofaktoren und einem ungesunden Lebensstil mit wenig Bewegung und hochkalorischer Ernährung spielt die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle (3, 5, 6). Das breite Spektrum der NAFLD reicht von der harmloseren nichtalkoholischen Fettleber (NAFL) mit vermehrter Ansammlung von Fettvakuolen im Leberparenchym über die komplikationsträchtigere nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) mit entzündlicher Aktivität und Zeichen der Zellschädigung bis hin zur Fibrosebildung und Entwicklung einer Zirrhose mit der Gefahr der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) (7, 8). Insbesondere das Fibroestadium ist ein negativer prädiktiver Faktor für das Langzeitüberleben und die leberbezogene Morbidität und Mortalität (9, 10). Die NASH birgt dabei ein relativ höheres Risiko für eine fortschreitende Fibrosierung in sich als die einfache NAFL (11). In den USA ist sie bereits die zweithäufigste Indikation für eine Lebertransplantation bei Erwachsenen (12) und die Zahl an HCCs, die durch eine NASH verursacht werden, ist im Steigen begriffen (13, 14). Die führende Todesursache bei NAFLD stellen kardiovaskuläre Erkrankungen dar, gefolgt von Krebserkrankungen und hepatischen Komplikationen (2, 7, 8).

Der diagnostische Goldstandard ist die Leberbiopsie, da die Definitionskriterien der NASH auf histologische Merkmale zurückzuführen sind (7, 8, 15). Aufgrund der hohen Prävalenz der Erkrankung und der Invasivität der Leberpunktion, welche nicht nur ein gewisses Komplikationsrisiko und hohe Kosten mit sich bringt, sondern in ihrer Aussagekraft auch durch „sampling errors“ sowie die Erfahrung der befundenden PathologInnen beeinflusst wird (16, 17), gewinnen nichtinvasive Methoden in der Diagnostik der NAFLD sowohl als Screeningmethode als auch in der Verlaufskontrolle zunehmend an Bedeutung (18). Von großem Interesse ist es, vor allem jene Personen rechtzeitig zu erkennen, die ein hohes Progressionsrisiko haben. Eine Reihe von Tests wurde bisher in der Literatur beschrieben, basierend entweder auf Laborparametern oder bildgebenden Verfahren (18, 19).

Die vorliegende Arbeit legt den Fokus auf die Diagnostik mit dem Fibroscan® (FS). Dabei handelt es sich um eine ultraschallbasierte Methode, mit der in einem Untersuchungsvorgang mittels transienter Elastographie (TE) die Lebersteifigkeit (LS) zur Detektion und Quantifizierung einer Leberfibrose sowie der Controlled Attenuation Parameter (CAP) als Maß für die Abschwächung von Ultraschallwellen auf ihrem Weg durch die Leber zur Abschätzung des Leberfettgehalts ermittelt werden können (20, 21). Ziel der Arbeit ist es, die Wertigkeit des CAP bei NAFLD an einer Studienkohorte an der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Universitätsklinik für Innere Medizin in Graz zu evaluieren. In einer retrospektiven Analyse werden die Korrelationen des CAP und der LS mit dem tatsächlichen Leberfett- bzw. Fibrosegehalt in der Leberbiopsie untersucht und die diagnostische Genauigkeit sowie möglichst optimale Cut-off-Werte dieser nichtinvasiven Tests in Receiver-Operating-Characteristic-(ROC-)Analysen ermittelt. Zum Vergleich werden dieselben Analysen mit den auf Laborparametern basierenden Scores Fatty Liver Index (FLI), Fibrosis-4-Index (FIB-4) und Enhanced Liver Fibrosis Test (ELF) durchgeführt. Da es sich bei CAP und LS um quantitative Messwerte handelt, die die histopathologische Beurteilung von Steatose und Fibrose jedoch auf subjektiver Einschätzung durch den/die BefunderIn und darauf basierenden semiquantitativen Scoring-Systemen beruht, werden zusätzlich digitale Bildanalysen zur genaueren Quantifizierung der beiden histologischen Merkmale (computergestützte Morphometrie) durchgeführt und als alternative Referenzmethode verwendet. Dabei soll die Hypothese überprüft werden, dass mit den morphometrisch bestimmten Steatose- und Fibroseanteilen eine stärkere Korrelation erreicht werden kann. Weiters werden mögliche Einflussfaktoren auf die TE und deren diagnostische Aussagekraft untersucht.

Es folgt zunächst ein einführender Überblick über die NAFLD sowie die Messung von LS und CAP mit dem FS. Im Anschluss daran werden die Durchführung und Ergebnisse der Studie genau beschrieben und mit der bereits vorhandenen Literatur zu diesem Thema in Verbindung gesetzt.

## **1.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung**

### **1.1.1 Definition**

Die Diagnosestellung der NAFLD erfordert den Nachweis einer Fettakkumulation im Lebergewebe (Steatosis hepatis) in der Bildgebung oder histologisch mittels Leberbiopsie bei gleichzeitigem Ausschluss eines übermäßigen Alkoholkonsums und anderer sekundärer Ursachen einer Leberverfettung (7, 8). Die gemeinsamen Leitlinien der europäischen Fachgesellschaften für Leber-, Diabetes- und Adipositas-Forschung (EASL, EASD, EASO) zum klinischen Management der NAFLD definieren als Grenze einen Mindestanteil von fünf Prozent steatotischen Hepatozyten in der Leberhistologie oder eine Protonendichte-Fett-Fraktion (PDFF) von mehr als 5,6 Prozent in der Magnetresonanztomographie (MRS) oder der quantitativen Fett-/Wasser-selektiven MR-Bildgebung (MRI) (7). In Abgrenzung zur alkoholischen Fettleber (AFL) legte man die durchschnittlichen Tageshöchstwerte für den Alkoholkonsum bei 20 Gramm<sup>1</sup> für Frauen und bei 30 Gramm für Männer fest (7). Die amerikanische Lebergesellschaft (AASLD) und ein Konsensuspapier zur Erstellung klinischer Studien bei NASH sprechen von einem signifikanten Alkoholkonsum, wenn mehr als 21 (bei Männern) bzw. 14 (bei Frauen) „standard drinks“ zu je 14 Gramm Alkohol pro Woche konsumiert werden (8, 15). Neben regelmäßigem Alkoholmissbrauch sind eine Hepatitis-C-Virusinfektion sowie der Gebrauch von Steatose-induzierenden Medikamenten häufige sekundäre Ursachen für eine Leberverfettung (7). Es existiert eine Reihe weiterer Erkrankungen, die klinisch oder gegebenenfalls histopathologisch ausgeschlossen werden müssen, um die Definitionskriterien der NAFLD zu erfüllen. Tabelle 1 fasst die Differentialdiagnosen der hepatischen Steatose zusammen. Beachtet werden muss, dass die NAFLD auch als Komorbidität bei anderen chronischen Lebererkrankungen wie z.B. Hepatitis B auftreten kann und deren Erkrankungsverlauf mitunter beeinflusst (22).

### **Einteilung in NAFL und NASH**

Man teilt die NAFLD in zwei Krankheitsentitäten ein, die sich in ihrer Prognose unterscheiden. Auf der einen Seite kennt man die harmlosere NAFL und auf der anderen Seite die aggressivere NASH, bei der von einem höheren Risiko für eine fortschreitende Fibrosierung und damit einhergehende Komplikationen auszugehen ist (7, 8, 11). Die Diagnose der NASH kann bis dato nur histologisch zuverlässig gestellt werden. Sie ist definiert durch das gleichzeitige Vorliegen von lobulären Entzündungsinfiltraten und sogenannten ballonierten Leberzellen in Verbindung mit Steatose (7, 8, 15).

---

<sup>1</sup> entspricht 500 ml Bier mit 5 Volumenprozent Alkohol (spezifisches Gewicht = 0,8 g/ml)

**Tabelle 1. Sekundäre Ursachen der Leberzellverfettung**, zusammengefasst nach (7, 8, 22)

---

Exzessiver Alkoholkonsum (alkoholische Fettlebererkrankung)
Hepatitis C (v.a. Genotyp 3)
Stoffwechselstörungen
Morbus Wilson
Hämochromatose
Familiäre Hyperlipidämie
A-/Hypo-betalipoproteinämie
Lipodystrophie
Lecithin-Cholesterin-Acyltransferasemangel*
Cholesterolesterspeichererkrankung*
Wolman-Krankheit*
Zöliakie
Glykogenosen
Hereditäre Fruktoseintoleranz
ernährungsbedingte Ursachen
Hungern, Mangelernährung, Kurzdarmsyndrom
Totale parenterale Ernährung
Medikamente
<i>Makrovesikuläre Steatose:</i>
Amiodaron, Kortikosteroide, Methotrexat, Tamoxifen, Lomitapid, Mipomersen, verschiedene antiretrovirale Therapeutika
<i>Mikrovesikuläre Steatose:</i>
Tetrazykline, Valproinsäure, Nukleosidanaloga und retrovirale Therapeutika (z. B. Didanosin, Stavudin), Acetylsalicylsäure, MDMA und Amphetamine
Reye-Syndrom*
Schwangerschaft
Akute Schwangerschaftsfettleber*
HELLP-Syndrom*
Endokrine Erkrankungen
Hypopituitarismus
Hypothyreoidismus
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Weber-Christian-Syndrom
Metalle: z. B. Kupfer, Antimon, Bariumsalze, Borate, Chromate

---

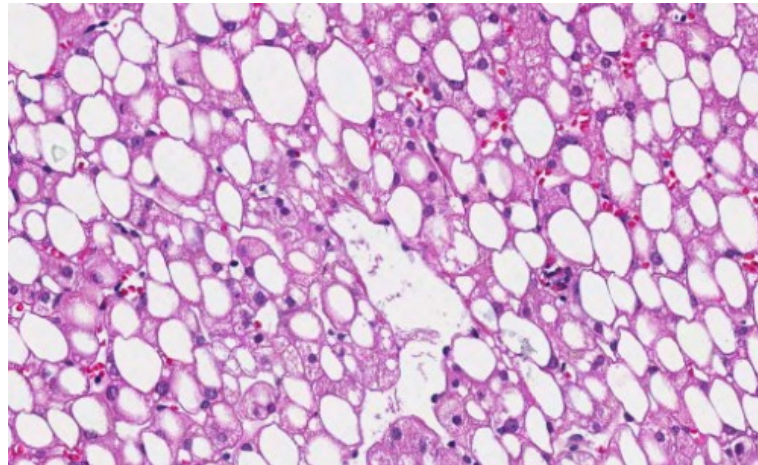
Bei den mit \* gekennzeichneten Ursachen tritt vorwiegend eine mikrovesikuläre Steatose auf.

### 1.1.2 Histologische Merkmale

#### Steatose

Namensgebendes und definierendes Hauptmerkmal der NAFLD ist die Ansammlung von Triglyceriden in Form von Fetttröpfchen in den Hepatozyten (23). Es muss jedoch betont werden, dass die Steatose per se kein spezifisches Merkmal für eine Erkrankung ist, sondern in Leberbiopsien aufgrund verschiedenster Ursachen (s. Differentialdiagnosen in Tabelle 1) gefunden werden kann (24). Für gewöhnlich zeigt sich bei der NAFLD vorwiegend eine

makrovesikuläre Steatose (Abbildung 1) mit einem oder mehreren großen Lipidtropfen im Zytoplasma, wodurch der Zellkern in die Peripherie der Zelle gedrängt wird. Zusätzlich können manchmal Bereiche von Hepatozyten mit vielen winzigen Fetttröpfchen und zentralem Zellkern beobachtet werden (23, 25). Im Erwachsenenalter tritt die Leberzellverfettung zu Beginn der Erkrankung typischerweise perivenulär in der Azinuszone 3 (läppchenzentral) auf. Mit steigendem Schweregrad kann sie sich auf den gesamten Leberazinus (panazinäre Steatose) ausbreiten (23, 24). Bei der pädiatrischen NAFLD ist die Steatose dagegen bevorzugt in Zone 1 lokalisiert (23, 25). Nach dem Anteil der betroffenen Hepatozyten wird das Steatoseausmaß in die Grade „mild“ (5 – 33 %), „moderat“ (34 – 66 %) und „schwer“ (> 66 %) eingeteilt (26). Bei fortgeschrittener Fibrose oder Zirrhose kann es zu einem teilweisen oder vollständigen Verschwinden der Steatose kommen (23, 25).



**Abbildung 1. Makrovesikuläre Steatose bei nichtalkoholischer Fettleber**  
(Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100-fache Vergrößerung).

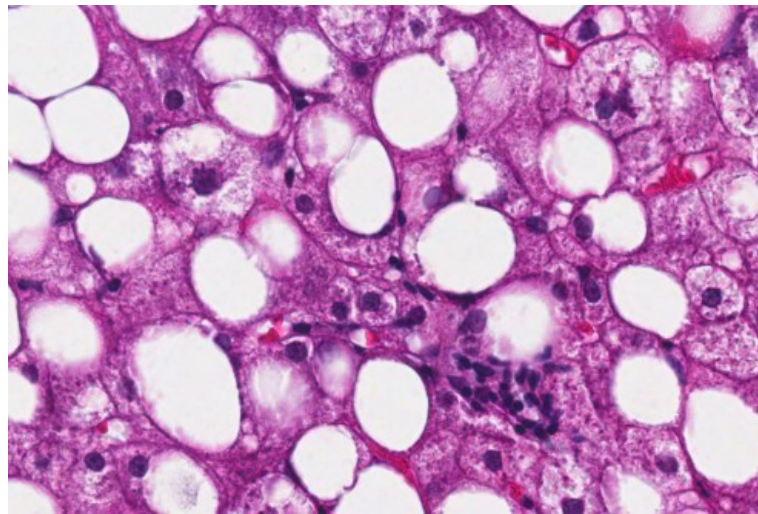
### **Lobuläre Entzündung**

Das Ausmaß der lobulären Inflammation bei NAFLD ist meist mild. Die kleinen, gemischten Zellinfiltrate bestehen vorwiegend aus Lymphozyten und Makrophagen (aktivierte Kupffer-Zellen), gelegentlich mit wenigen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (23, 25). Die Gradeinteilung der Entzündungsaktivität erfolgt nach der Dichte der Inflammationsherde (26).

### **Ballonierte Leberzellen**

Das Auftreten von Ballooning (Abbildung 2) als Zeichen der Zellschädigung ist ein wichtiges Merkmal der NASH. Ballonierte Leberzellen erscheinen geschwollen und mitunter vergrößert, sie haben ein blasses, rarefiziertes Zellplasma mit flockigen, optisch klaren Arealen (23-25). Der Zellkern ist eher groß und stark gefärbt, mit prominentem

Nucleolus (23). In den ballonierten Hepatozyten können auch sogenannte Mallory-Denk-Körper, das sind kleine eosinophile zytoplasmatische Einschlüsse, gefunden werden (24). Sie sind jedoch nicht konstant vorhanden und keine Voraussetzung (25). Das Ballooning tritt anfangs typischerweise in der Azinuszone 3 in der Nähe steatotischer Leberzellen und zwischen perisinusoidalen Kollagenfasern auf (25, 27). Bei der Detektion von ballonierten Hepatozyten mittels immunhistochemischer Färbung macht man sich zunutze, dass es in diesen Zellen zu einem Verlust bzw. einer signifikanten Reduktion der im Zytoskelett von normalen Leberzellen exprimierten Zytokeratine 8 und 18 kommt (28).

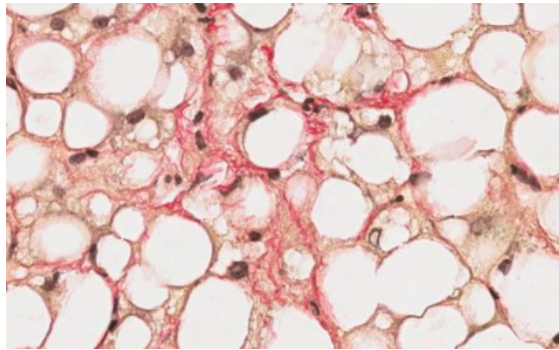


**Abbildung 2. Ballooning und lobuläre Entzündungsfoci bei NASH**  
(Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 200-fache Vergrößerung).

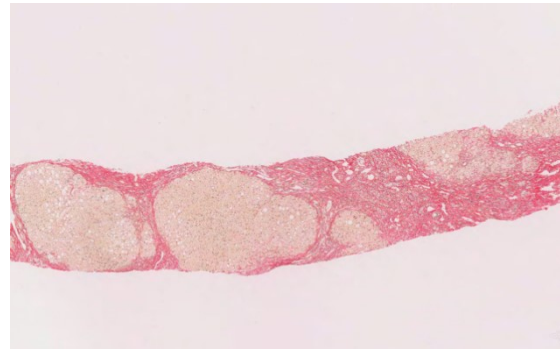
## **Fibrose**

Im Verlauf der NAFLD kann es zu einer fortschreitenden Fibrosierung kommen, welche maßgeblich für die erhöhte leberbezogene Mortalität und Gesamtsterblichkeit verantwortlich ist (9, 10). Vor allem die NASH geht meist mit Fibrose einher, jedoch können alle Fibrosestadien auch bei NAFL ohne NASH-definierende Merkmale auftreten (11, 25). Die Fibrosierung beginnt bei Erwachsenen normalerweise perivenulär in der Azinuszone 3 (23, 25). Es kommt zur Kollagenablagerung entlang der Sinusoide (perisinusoidal) und um die Hepatozyten herum (perizellulär), wodurch ein charakteristisches Muster entsteht, das auch als „Maschendrahtfibrose“ (englisch „chicken wire“, Abbildung 3) bezeichnet wird (23). Meist entwickelt sich im Verlauf auch portale und periportale Fibrose, die sich ins umgebende Parenchym ausdehnt (24, 25). Im fortgeschrittenen Stadium bilden sich Septen zwischen benachbarten vaskulären Strukturen aus (brückenbildende Fibrose). Im Endstadium kommt es schließlich zum zirrhotischen Umbau (Abbildung 4) der Leber (24). Nach dem Clinical Research Network (CRN) Scoring

System erfolgt eine Einteilung in vier Fibrosestadien (s. Tabelle 3 in Kapitel 2.4) (26). Bei Adipösen und bei pädiatrischer NASH wird mitunter eine isolierte portale Fibrose gefunden (23). Es kann vorkommen, dass in einer zirrhotischen Leber keine histologischen Merkmale einer aktiven Steatohepatitis mehr nachgewiesen werden können („ausgebrannte NASH“) oder Hinweise auf die Ätiologie der Erkrankung gänzlich fehlen (kryptogene Zirrhose) (23, 27, 29).



**Abbildung 3. Perizelluläre Fibrose („Maschendrahtfibrose“) bei NASH**  
(Siriusrot-Färbung, 200-fache Vergrößerung)



**Abbildung 4. Makronoduläre Zirrhose bei NASH**  
(Siriusrot-Färbung, 15-fache Vergrößerung)

### Weitere Merkmale

Nicht selten findet man bei NASH eine milde, chronische portale Entzündung, bestehend aus mononukleären Zellinfiltraten. Eine prominente portale Inflammation ist mit einem höheren Schweregrad der Erkrankung und Fibrose assoziiert (23, 25). Als Zeichen des programmierten Zelltods werden bei NASH gelegentlich azidophile Apoptosekörperchen beobachtet. Vereinzelt kommen lobuläre Mikrogranulome (Ansammlungen von Kupferzellen) und Lipogranulome vor. Weitere fakultative Läsionen sind Megamitochondrien, glykogenierte Kerne und Eisenablagerungen (23).

### 1.1.3 Epidemiologie

Man geht davon aus, dass heute mehr als ein Viertel der Menschen Zeichen der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung aufweist (2). In einer großen Metaanalyse aus dem Jahr 2016 wird die Gesamtprävalenz der NAFLD global betrachtet mit 25,24 % (95%-Konfidenzintervall [KI]: 22,10 – 28,65) zusammengefasst, wobei sich diese Zahl auf mittels Bildgebung diagnostizierte Fälle bezieht (1). Auffallend sind regionale und ethnische Unterschiede. Am höchsten ist die Prävalenz im Nahen und Mittleren Osten (31,8 %, KI: 13,5 – 58,2) und in Südamerika (30,5 %, KI: 22,7 – 39,4), die niedrigsten Erkrankungszahlen wurden in Afrika gefunden (13,5 %, KI: 5,7 – 28,7). In Europa sind etwa 23,7 % der Bevölkerung betroffen (KI: 16,1 – 33,5), ähnlich verhält es sich in Nordamerika

(24,1 %, KI: 19,7 – 29,2), während der Wert in Asien etwas höher zu liegen scheint (27,4 %, KI: 23,3 – 31,9) (1). Hispanics entwickeln besonders häufig eine NAFLD, gefolgt von Weißen nicht-hispanischer Herkunft. Die niedrigsten Erkrankungsraten werden bei AfroamerikanerInnen und indigenen Völkern Nordamerikas und Alaskas beschrieben (3, 30). Verlässliche Zahlen für die Prävalenz der NASH in der Gesamtbevölkerung sind schwierig zu eruieren, da ihre Diagnose nur durch eine Biopsie gestellt werden kann, was in breiten Populationsstudien nicht möglich ist. In der Metaanalyse von Younossi et al. lag die Prävalenz der NASH unter allen biopsierten NAFLD-Fällen bei 59,1 % (KI: 47,6 – 69,7), für Personen mit nichtalkoholischer Fettleber ohne Biopsieindikation wurde sie auf 6,8 bis 29,9 % geschätzt (1). Untersuchungen zur Inzidenz der Erkrankung sind ebenfalls eher rar und nur für wenige Regionen vorhanden. So wird beispielsweise die Inzidenz für Asien auf 52,3 pro 1000 EinwohnerInnen pro Jahr und für Israel auf 28,0 pro 1000 EinwohnerInnen pro Jahr geschätzt (1).

Generell nimmt die Prävalenz der NAFLD mit dem Alter zu und das Geschlechterverhältnis zwischen Männern und Frauen scheint ungefähr zwei zu eins zu betragen (8, 30). Es besteht eine eindeutige, gegenseitige Assoziation der NAFLD mit Komponenten des metabolischen Syndroms (Fettleibigkeit, Insulinresistenz bzw. DM II, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie), welche als anerkannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFLD gelten (1, 4, 7, 8). Es wird geschätzt, dass über 50 % der Personen mit NAFLD und über 80 % der Personen mit NASH unter Fettleibigkeit leiden (1) und bei rund einem Drittel der Adipösen eine NAFLD nachgewiesen werden kann (30). Die Diabetes-Prävalenz bei NAFLD bzw. NASH beträgt über 20 % bzw. über 40 % (1) und bis zu zwei Drittel der PatientInnen mit DM II haben eine NAFLD (8). Hohe Triglycerid- und niedrige High-Density-Lipoprotein-(HDL-)Spiegel kommen bei NAFLD häufig vor, die Prävalenz einer Dyslipidämie bei NAFLD liegt bei ca. 70 % (1, 8). Der Anteil an PatientInnen mit arterieller Hypertonie wird bei NAFLD bzw. NASH mit knapp 40 % bzw. knapp 70 % angegeben (1). Obwohl der Großteil der NAFLD-PatientInnen zumindest einen metabolischen Risikofaktor aufweist, kommt die nichtalkoholische Fettlebererkrankung jedoch auch bei etwa 7 % der schlanken Bevölkerung ohne offensichtliche Hinweise auf ein metabolisches Syndrom vor (7, 31). Interessanterweise ist der Anteil dieser im Englischen „lean NAFLD“ genannten Form der Erkrankung vor allem in der asiatischen Bevölkerung deutlich erhöht (2).

### 1.1.4 Risikofaktoren und Pathogenese

Wie bereits erwähnt, sind die stärksten etablierten Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFLD als auch für die Manifestation als NASH die Komponenten des metabolischen Syndroms, nämlich Fettleibigkeit, Hyperglykämie bzw. DM II, Dyslipidämie und arterielle Hypertonie. Der Zusammenhang ist hierbei bidirektional, eine NAFLD erhöht also wiederum die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten anderer metabolischer Erkrankungen (3, 6, 8). Ein ungesunder, „westlicher“ Lebensstil, bestehend aus hochkalorischer Ernährung mit übermäßigem Anteil an gesättigten Fettsäuren, verarbeiteten Kohlehydraten und gezuckerten, fruktosehaltigen Softdrinks und einem Mangel an Bewegung, ist sowohl mit Fettleibigkeit als auch mit NAFLD assoziiert und stellt unbestritten einen wichtigen beeinflussbaren Risikofaktor dar (5, 7, 32, 33). Daneben wurden diverse mit NAFLD assoziierte Genvarianten identifiziert, von denen beispielsweise die Missense-Mutation I148M im PNPLA3-Gen (patatin-like phospholipase 3; reguliert die Lipolyse von Fetttröpfchen in den Hepatozyten) und Varianten des Gens TM6SF2 (transmembrane 6 superfamily member 2; modifiziert die hepatische Lipidsekretion) gut charakterisiert und mit einem höheren Leberfettgehalt sowie erhöhten NASH-Risiko assoziiert sind (3, 5-7).

Die genauen molekularen Entstehungsmechanismen der NAFLD und die Einflüsse auf den individuellen Verlauf sind komplex und multifaktoriell. Man geht heute von einer sogenannten „multiple-hit“-Pathogenese aus (Abbildung 5), bei der mehrere krankheitsfördernde Einflüsse (u. a. genetische Prädisposition, epigenetische Faktoren, ungesunde Ernährung, ungesunder Lebensstil, verändertes Darmmikrobiom, Insulinresistenz, Überproduktion von proinflammatorischen Adipozytokinen bei dysfunktionalem Fettgewebe, oxidativer Stress) zusammenwirken und zur Entstehung einer Fettleber führen und mitunter eine Steatohepatitis auslösen (5, 34). Eine wichtige pathophysiologische Rolle kommt der Insulinresistenz (IR) zu, die einen gestörten Glucosemetabolismus, eine verminderte Hemmung der Lipolyse in den Adipozyten mit vermehrter Freisetzung von freien Fettsäuren ins Blut sowie eine gesteigerte de-novo-Lipogenese in der Leber bewirkt, was schließlich in vermehrter hepatischer Fettakkumulation resultiert (6, 34, 35). Der erhöhte Anfall freier Fettsäuren in der Leber trägt bei einer Überlastung der beiden physiologischen Mechanismen Beta-Oxidation und Triglyceridbildung zur Bildung von lipotoxischen Produkten bei, wodurch es zu oxidativem Stress und inflammatorischer Aktivität mit potentieller Schädigung der Hepatozyten kommt (6, 34). Als Reaktion darauf kann über Signale von gestressten Leberzellen und

aktivierten Makrophagen die Umwandlung von hepatischen Sternzellen in Myofibroblasten und somit die Fibrogenese induziert werden (6).

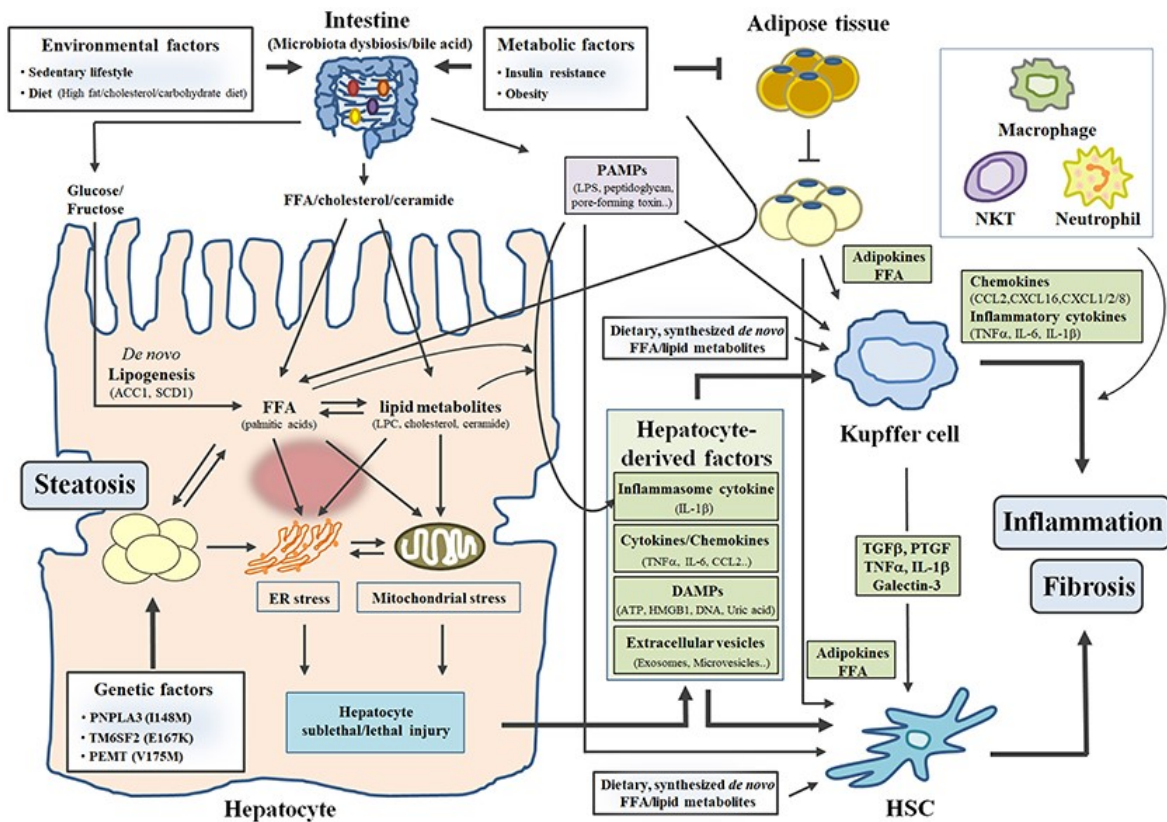


Abbildung 5. Schematische Darstellung des „multiple-hit“-Modells zur Pathogenese der nichtalkoholischen Steatohepatitis, übernommen aus (36). © 2018 Kim and Lee.

Insgesamt ist eine Vielzahl von Botenstoffen, Rezeptoren und Enzymen in die pathophysiologischen Abläufe involviert und deren Funktion und Rolle als möglicher therapeutischer Angriffspunkt Gegenstand intensiver Forschung (6).

### 1.1.5 Klinik und Krankheitsverlauf

Personen mit NAFLD sind in der Regel asymptomatisch, sofern keine schwere Leberfunktionsstörung vorliegt. Manchmal wird über unspezifische Symptome wie leichtes Unwohlsein, vermehrte Müdigkeit oder abdominale Beschwerden berichtet (37). Erhöhte Leberenzyme (ALT, AST, GGT) können vorliegen, häufig sind die Aminotransferasen bei NAFLD jedoch im Normbereich oder nur geringfügig verändert (37, 38). Oft werden Zeichen einer Fettleber erst als Zufallsbefund im Rahmen einer aus einem anderen Grund durchgeführten bildgebenden Untersuchung (z.B. Ultraschall) gefunden (5, 37).

Es handelt sich bei der NAFLD um eine potentiell fortschreitende Lebererkrankung, auch wenn dies in den meisten Fällen nur langsam erfolgt (7, 39). In mehreren Studien wurde im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung bei NAFLD-Kohorten eine erhöhte Gesamt- und

insbesondere leberbezogene Mortalität festgestellt (9, 39, 40). Die häufigsten Todesursachen sind wie in der Allgemeinbevölkerung kardiovaskuläre Erkrankungen, gefolgt von extrahepatischen malignen Tumoren. Bereits an dritter Stelle stehen jedoch leberbezogene Komplikationen und Erkrankungen wie Zirrhose und HCC (7-9, 39). Die wichtigsten klinischen Prädiktoren für ein negatives Outcome sind ein erhöhtes Alter und das Vorliegen eines DM II (39). Als stärkster und womöglich einziger unabhängiger histologischer Mortalitätsprädiktor gilt die Fibrose, wobei das Risiko mit höherem Fibrorestadium ansteigt (9, 10, 41, 42). Sowohl bei NAFL als auch bei NASH kann sich eine hepatische Fibrose entwickeln. In einer Metaanalyse von Singh et al. wurde die Progressionsrate bei NAFL mit 0,07 Fibrorestadien pro Jahr (95%-KI: 0,02 – 0,11) und bei NASH mit 0,14 Fibrorestadien pro Jahr (KI: 0,07 - 0,21) angegeben, was einem Zeitraum von 14,3 Jahren (KI: 9,1 – 50,0) bzw. 7,1 Jahren (KI: 4,8 – 14,3) für das Fortschreiten um ein Stadium entspricht (11). Bemerkenswerterweise gab es in beiden Gruppen sogenannte „rapid progressors“, die im Beobachtungszeitraum (mittlerer Beobachtungszeitraum in den untersuchten Studien: 2,4 bis 13,8 Jahre) vom Fibrorestadium 0 ausgehend das Stadium 3 (brückenbildende Fibrose) oder 4 (Zirrhose) erreichten und somit besonders schnell eine ernste Lebererkrankung entwickelten (11). Das HCC-Risiko ist bei Personen mit NAFLD (Hazard Ratio 3,51) und insbesondere NASH (Hazard Ratio 7,75) im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöht (43) und die Inzidenz der durch eine NAFLD verursachten HCCs ist im Steigen begriffen (13, 14). Wenngleich lange umstritten, verdichtet sich die Studienlage, dass NAFLD-PatientInnen auch unabhängig von metabolischen Komorbiditäten und Risikofaktoren ein höheres Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und Todesfällen haben als Personen ohne Fettleber (44, 45). Außerdem wurden in letzter Zeit zunehmend Assoziationen mit vielen weiteren Erkrankungen gefunden, die gemeinsam mit NAFLD auftreten können, darunter beispielsweise chronische Niereninsuffizienz, obstruktive Schlafapnoe, Gallensteinerkrankungen, Atherosklerose, Osteoporose, Psoriasis, kolorektales Karzinom und Endokrinopathien wie das polyzystische Ovarialsyndrom oder Schilddrüsendysfunktion (5, 46).

### **1.1.6 Diagnostische Methoden**

#### **Leberbiopsie**

Der Goldstandard in der Diagnostik der NAFLD ist die Leberbiopsie, da ihre Definition und Einteilung auf histologischen Kriterien beruht. Sie ist die einzige Möglichkeit, um eine NAFL zuverlässig von einer NASH zu unterscheiden (7, 8). Eine Leberbiopsie sollte

erwogen werden, wenn Anamnese (multiple metabolische Risikofaktoren) und Befunde nichtinvasiver Tests auf ein erhöhtes Risiko für das Vorliegen einer NASH und/oder fortgeschrittenen Fibrose hindeuten oder andere Lebererkrankungen und Ursachen für eine Steatose nicht ausgeschlossen werden können (8). Als invasive Methode gehen mit der Punktion Risiken für Komplikationen und hohe Kosten einher (8, 16). Insgesamt sind Komplikationen nach perkutaner Leberbiopsie zwar selten, immerhin ein Viertel der PatientInnen berichtet aber über postpunktionelle Schmerzen und etwa ein bis drei Prozent müssen wegen aufgetretener Komplikationen (vorwiegend Schmerzen und Hypotonie) hospitalisiert werden (47). Die schwerste Komplikation stellt eine intraperitoneale Blutung dar. Die Mortalität nach perkutaner Leberpunktion wird mit etwa 1:10000 bis 1:12000 beschrieben, wobei fortgeschrittene Lebererkrankungen und maligne Läsionen Risikofaktoren darstellen (47). Weitere Limitationen liegen in der Abhängigkeit der korrekten Diagnose von der Erfahrung und subjektiven Interpretation der befundenden Person (Intra- und Interobserver-Variabilität) sowie der Repräsentativität der Gewebprobe (16). Bei einer Leberbiopsie wird etwa 1/50.000 der gesamten Lebermasse gewonnen (47). Wie bei vielen Lebererkrankungen sind bei der NAFLD die histologischen Läsionen jedoch nicht einheitlich über das Leberparenchym verteilt und „sampling errors“ können mitunter zu Fehldiagnosen und Missklassifikationen des Krankheitsstadiums führen (17). In einer Studie mit 52 NAFLD-ProbandInnen, die jeweils zweimal hintereinander durch denselben Rippenzwischenraum im rechten Leberlappen punktiert wurden, wurde für die meisten histologischen Merkmale nur eine moderate Übereinstimmung ( $\kappa < 0,6$ ) zwischen erster und zweiter Gewebprobe gefunden. Von den Personen mit brückenbildender Fibrose wiesen beispielsweise 35 Prozent in einer der beiden Biopsien nur eine milde Fibrose auf (17).

### **Nichtinvasive Methoden**

Neben einem Zufallsbefund in der Bildgebung sind unklar erhöhte Leberfunktionsparameter und/oder das Vorliegen von multiplen metabolischen Risikofaktoren häufige Gründe zur Abklärung einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (37). Aufgrund der oben erwähnten Limitationen eignet sich die Leberbiopsie nicht für die breite Anwendung zum Screening oder zur engmaschigen Verlaufskontrolle, sondern sollte jenen PatientInnen mit hohem Risiko für eine fortschreitende Erkrankung vorbehalten bleiben, die einen potentiellen Nutzen aus der diagnostischen und prognostischen Information durch die Leberbiopsie haben (8). Es besteht daher die Notwendigkeit von effizienten und kosteneffektiven nichtinvasiven Methoden, die in der Diagnostik und zur

Risikostratifizierung eingesetzt werden können und wegen der hohen Prävalenz der NAFLD zunehmend an Bedeutung gewinnen (18).

### ***Steatose-Assessment***

Die Sonographie gilt aufgrund der weit verbreiteten Verfügbarkeit und geringen Kosten als bevorzugte erste bildgebende Methode bei Verdacht auf eine (nichtalkoholische) Fettlebererkrankung und kann wertvolle diagnostische Informationen liefern (7). Sonographische Merkmale der Fettleber sind ein im Vergleich zur rechten Niere hyperechogenes Parenchym (vermehrte Streuung und Reflexion der Ultraschallwellen durch die Fetttropfen) und eine Schallabschwächung, was zu einem diffusen Erscheinungsbild von Strukturen in der Leber führt (18, 48). Eine moderate bis schwere Verfettung der Leber kann mittels abdomineller Ultraschalluntersuchung relativ zuverlässig nachgewiesen werden. Sensitivität und Spezifität für die Detektion von mindestens 20- bis 30%iger Steatose in der Histologie mittels Sonographie wurden in einer Metaanalyse mit 84,4 % (95%-KI: 79,5 – 88,9) bzw. 93,6 % (KI: 87,2 – 97,0) beziffert (49). Bei einem Leberfettgehalt unter 20 bis 30 % nimmt die Sensitivität allerdings deutlich ab, sodass PatientInnen mit milder Steatose nicht zuverlässig erfasst werden (7, 18). Die Methode ist untersucherabhängig und die Schallqualität wird durch patientInnenbezogene Faktoren wie Fettleibigkeit beeinflusst. Eine präzise Quantifizierung der Fettmenge mittels konventionellem Ultraschall ist nicht möglich und es kann außerdem nicht zuverlässig zwischen Steatose und Fibrose, welche ebenfalls ein hyperechogenes Bild erzeugt, unterschieden werden (48).

Eine vielversprechende, rasche und anwenderfreundliche Methode zur Quantifizierung des Leberfettgehalts stellt die ultraschallbasierte Messung des Controlled Attenuation Parameter dar, der gleichzeitig mit der Lebersteifigkeit mit dem Fibroscan<sup>®</sup> erhoben werden kann (18, 21). Die Evaluation des Stellenwertes des CAP und die Ermittlung von Einfluss- bzw. Qualitätsfaktoren sowie zuverlässigen Cut-off-Werten und deren Validierung sind Gegenstand dieser Arbeit sowie vieler rezenter und laufender Studien. Ein Überblick über den theoretischen Hintergrund und die aktuelle Studienlage zum CAP wird in Kapitel 1.2 gegeben. Der Vollständigkeit halber soll erwähnt werden, dass es noch weitere quantitative Ultraschalltechniken wie z.B die Messung des „Speed of Sound“ oder des „Backscatter Coefficient“ mit potentieller Einsatzmöglichkeit in der Fettleber-Diagnostik gibt (50), auf die an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen wird.

Als nichtinvasiver Goldstandard im Assessment von hepatischer Steatose kann die MR-basierte Messung der PDFF mittels Spektroskopie (MRS) oder Fett-/Wasser-selektiver Bildgebung (MRI) bezeichnet werden. MRS-PDFF und MRI-PDFF sind gleichwertig, zeigen eine ausgezeichnete Performance in der Quantifizierung des Leberfettgehaltes und sind dem CAP überlegen. Darüber hinaus können Veränderungen im Fettgehalt mittels PDFF besser detektiert werden als mittels Leberbiopsie, sodass sie sich besonders gut für den Einsatz in klinischen Studien eignet (7, 8, 18, 48, 51-55). Limitiert wird die routinemäßige klinische Anwendung durch die Verfügbarkeit von MR-Geräten und hohen Kosten (7, 48).

Daneben existieren auf Laborparametern basierende Steatose-Scores wie der SteatoTest<sup>TM</sup>, der Fatty Liver Index (FLI), der NAFLD Liver Fat Score (NAFLD-LFS), das Lipid Accumulation Product und der Hepatic Steatosis Index (HSI), wobei in deren Entwicklung zum Teil unterschiedliche Referenzmethoden zur Anwendung kamen, was einen Vergleich schwierig macht (18). In einer Kohorte von 324 PatientInnen mit Verdacht auf NAFLD konnten der FLI, der NAFLD-LFS und der HSI eine Fettleber ( $\geq 5\%$  Steatose in der Biopsie) ähnlich gut mit adäquater Genauigkeit (Flächen unter der ROC-Kurve [AUROCs] von 0,80 bis 0,83) und hohen positiven Vorhersagewerten diagnostizieren und korrelierten weiters positiv mit der Insulinresistenz (56). Die Scores sind jedoch nicht zur Quantifizierung der Steatose geeignet und werden außerdem durch Fibrosestadium und Inflammationsgrad beeinflusst (56). Der in dieser Arbeit miterhobene FLI wurde von Bedogni et al. zur Vorhersage einer Fettleber in der Allgemeinbevölkerung entwickelt. Er reicht von 0 bis 100 und beinhaltet die Parameter Body Mass Index (BMI), Bauchumfang, Triglyceride und GGT (s. Formel in Kapitel 2.2). Unter Verwendung der Sonographie als Referenzmethode schloss in der Originalstudie ein  $FLI < 30$  eine Fettleber mit einer Sensitivität von 87 % aus und ein  $FLI \geq 60$  eine Fettleber mit einer Spezifität von 86 % ein (57). Für den FLI konnte in einer Populationsstudie nach 15-jährigem Follow-up auch eine unabhängige Assoziation mit der leberbezogenen Mortalität nachgewiesen werden (58).

### ***Fibrose-Assessment***

Da die Fibrose den wichtigsten prognostischen Faktor im Verlauf der NAFLD und vieler anderer Lebererkrankungen darstellt, besteht hier ein besonders großes Interesse an möglichst zuverlässigen diagnostischen Methoden. NAFLD-PatientInnen (insbesondere jene mit metabolischem Syndrom oder DM II) sollen auf das Vorliegen einer Leberfibrose

gescreent werden. Serumbiomarker oder die transiente Elastographie gelten als nichtinvasive Methoden der ersten Wahl (7, 59).

Bisher wurde bereits eine Vielzahl an nichtkommerziellen und kommerziellen Fibrose-Tests entwickelt, die entweder Vorhersagemodelle bzw. Scores aus indirekten, mit Fibrose assoziierten laborchemischen und klinischen Variablen bilden (z.B. AST/ALT-Ratio, BARD-Score, NAFLD-Fibrose-Score, Fibrosis-4-Index, FibroMeter™) oder direkte Biomarker der Fibrose im Blut messen (z.B. ELF™-Test, PIIINP, Pro-C3) (19, 60). Die meisten Tests sind sehr sensitiv und können am besten zum Ausschluss einer schweren Fibrose und Zirrhose mit hohen negativen Vorhersagewerten verwendet werden (18, 19, 61). Für die Sicherstellung der Diagnose sind sie allerdings oft unzureichend und im Falle eines positiven Tests sollten weitere Abklärungen durchgeführt werden (7, 18).

Unter den einfachen Fibrose-Tests scheinen der NAFLD-Fibrose-Score (NFS) sowie der Fibrosis-4-Index (FIB-4) die beste diagnostische Performance zu haben (53, 62). Als günstige und einfach durchzuführende Screening-Tools können sie in der klinischen Praxis routinemäßig eingesetzt werden und haben Eingang in die EASL-Leitlinien und Empfehlungen der AASL gefunden (7, 8, 18, 19). Während der NFS (zusammengesetzt aus den Parametern Alter, BMI, erhöhter Nüchtern-glucosewert bzw. DM, AST/ALT-Ratio, Thrombozytenzahl und Albumin) speziell für die Anwendung bei NAFLD entwickelt wurde (63), wurde der FIB-4-Index (beinhaltet Alter, AST, ALT und Thrombozytenzahl; s. Formel in Kapitel 2.2) ursprünglich in einer Kohorte von HIV/HCV-Koinfizierten ermittelt (64) und später auch für den Gebrauch bei NAFLD validiert (65). Mittels zweier Schwellenwerte erfolgt eine Risikostratifizierung: Ist der ermittelte Wert kleiner als der untere Cut-off (FIB-4 < 1,30 oder NFS < -1,45), kann eine schwere Fibrosierung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden („low risk“), überschreitet er den oberen Cut-off (FIB-4 > 2,67 oder NFS > 0,67), besteht der Verdacht auf ein höheres Fibrorestadium („high risk“) und eine Leberbiopsie zur Diagnosesicherung sollte erwogen werden (19, 63, 65). Ein Wert im grauen Bereich zwischen den beiden Schwellenwerten („intermediate risk“) erfordert eine weiterführende Abklärung mittels alternativen Fibrosemarkern oder bildgebenden Verfahren (19). Für über 65-Jährige wurden in einer Studie altersadaptierte höhere untere Cut-off-Werte vorgeschlagen (FIB < 2,0, NFS < 0,12), außerdem sollen die Tests bei unter 35-Jährigen inakkurat sein (66). Auch eine prognostische Relevanz der einfachen nichtinvasiven Fibrose-Tests wurde beschrieben. In einer repräsentativen Bevölkerungsstudie in den USA (medianes Follow-up: 14,5 Jahre) hatten unter den ProbandInnen mit im Ultraschall diagnostizierter NAFLD jene eine erhöhte Mortalität,

bei welchen die Werte von FIB-4, NFS oder ARPI auf eine fortgeschrittene Fibrose hinwiesen (67).

Die kommerziellen Tests wie ELF<sup>TM</sup>-Test und FibroMeter<sup>TM</sup> übertreffen die einfachen Scores in der Identifizierung von PatientInnen mit signifikanter ( $F \geq 2$ ) und fortgeschrittener ( $F \geq 3$ ) Fibrose, sind jedoch teurer (19). Der Algorithmus des ELF basiert auf der Bestimmung von Hyaluronsäure, N-terminalem Propeptid des Prokollagens Typ III (PIIINP) und Gewebeinhibitor der Metalloproteinase-1 (TIMP-1) im Serum und erreichte in der ersten Validationsstudie bei NAFLD eine AUROC von 0,90 (95%-KI: 0,84 – 0,96) bzw. 0,93 (95%-KI: 0,8 – 0,98) für die Detektion von signifikanter bzw. fortgeschrittener Fibrose (68). Die gute Performance des ELF konnte in mehreren Studien bestätigt werden (69, 70). Als Cut-off-Werte wurden 7,7 zum Ausschluss einer relevanten Fibrosierung, 9,8 zur Detektion von fortgeschrittener Fibrose und 11,3 für den Verdacht auf Zirrhose publiziert (69, 71).

Eine adäquate Darstellung der Fibrose in der konventionellen Bildgebung ist nicht möglich. Die meisten radiologischen Methoden für die Detektion von Fibrose beruhen auf der Messung der Lebersteifigkeit (Elastographie) als indirekten Parameter (60). Neben der Magnetresonanz-Elastographie (MRE) stehen ultraschallbasierte Methoden wie die transiente Elastographie (TE), die Punkt-Scherwellenelastographie (pSWE, Acoustic Radiation Force Impulse Elastometrie, ARFI) und die 2D-Scherwellenelastographie zur Verfügung<sup>2</sup>, wobei die TE die am weitesten verbreitete Technik in der klinischen Anwendung ist (18, 59). Deren Funktion und Anwendung bei NAFLD-PatientInnen wird in Kapitel 1.2 ausführlich beschrieben. Im Allgemeinen handelt es sich bei der TE um eine mittlerweile bei mehreren chronischen Lebererkrankungen gut validierte Methode zur nichtinvasiven Detektion von Fibrose. In den aktuellen Leitlinien wird sie bei NAFLD, gegebenenfalls in Kombination mit Serumbiomarkern, als nützliche Methode zur Identifizierung von PatientInnen mit niedrigem Risiko für ein fortgeschrittenes Fibrorestadium oder Zirrhose empfohlen. Bei hohen negativen Vorhersagewerten eignet sie sich am besten zum Ausschluss einer Zirrhose, während sie für eine sichere Diagnosestellung nicht ausreichend ist und mitunter eine Biopsie zur Bestätigung erforderlich ist (7, 8, 59, 72).

---

<sup>2</sup> Anmerkung: im Unterschied zur TE können ARFI (pSWE) und 2D-SWE auf herkömmlichen Ultraschallgeräten implementiert werden.

Die MRE zeichnet sich wie die TE durch eine hohe diagnostische Genauigkeit für die Detektion einer Zirrhose aus (59) und scheint der TE in der Klassifikation der Fibrorestadien bei NAFLD sogar überlegen (53, 55). Ein weiterer Vorteil der MRE ist, dass damit die gesamte Leber untersucht werden kann. Nachteile in der routinemäßigen Anwendung sind ihre vergleichsweise hohen Kosten, der Zeitaufwand und die Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von MR-Geräten (59).

### **1.1.7 Therapie**

Der Lebensstil von Personen mit nichtalkoholischer Fettlebererkrankung zeichnet sich häufig durch überwiegend sitzende Tätigkeiten, mangelnde körperliche Aktivität und ungesunde Ernährung aus. Eine Änderung dieser Gewohnheiten („lifestyle modification“) gilt als grundlegende und evidenzbasierte Therapie bei NAFL und NASH. Eine Reduzierung des Körpergewichts vermindert das kardiovaskuläre sowie das Diabetes-Risiko und kann zu einer Rückbildung der Lebererkrankung führen (73). Deutliche histologisch nachweisbare Verbesserungen bis hin zur Auflösung einer NASH und Fibroseregression sind möglich und mit dem Ausmaß der Gewichtsreduktion assoziiert (74). Bei übergewichtigen NAFLD-PatientInnen wird von den europäischen Leitlinien als Ziel eine Gewichtsabnahme von 7 bis 10 % empfohlen (7). Zur Kalorienrestriktion kommt jede gesunde Diät mit niedrigem Kohlenhydrat- oder Fettanteil infrage. Am häufigsten wird eine mediterrane Kost empfohlen, die sogar ohne Gewichtsabnahme zu einer Reduktion der hepatischen Steatose führen kann (73). Industriell verarbeitete Lebensmittel und stark fruktosehaltige Speisen und Getränke, die im Verdacht stehen, die Entstehung einer NAFLD zu fördern, sollten vermieden werden (7, 74). Durch regelmäßige Bewegung und körperliches Training werden neben einer geringen Besserung des intrahepatischen Fettgehalts vor allem positive Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System erzielt (73). Sowohl aerobes Ausdauertraining als auch Krafttraining haben einen positiven metabolischen Effekt (7).

PatientInnen mit nachgewiesener NASH und fortgeschrittener Fibrosierung bzw. hohem Progressionsrisiko weisen gemäß Leitlinien eine Indikation für eine potentielle medikamentöse Therapie auf (7, 8). Trotz reger Forschungstätigkeit gibt es bisher jedoch noch keine zugelassene spezifische Pharmakotherapie bei NASH (75, 76) und ein Einsatz von Substanzen ist somit nur „off-label“ oder im Rahmen von klinischen Studien möglich. Häufige Angriffspunkte von untersuchten Wirkstoffen sind anti-inflammatorische, -fibrotische und -apoptotische Faktoren, metabolische Regulationsmechanismen und antioxidative Signalpfade (76). Beispiele für Substanzen, die sich derzeit in Phase-III-

Studien befinden, sind der PPAR<sup>3</sup>- $\alpha/\delta$ -Agonist Elafibranor, der Farnesoid-X-Rezeptor-Agonist Obeticholsäure, der Chemokinrezeptor-Antagonist Cenicriviroc, der Stearoyl-Coenzym-A-Desaturase-1-Inhibitor Aramchol und der Thyroid-Rezeptor- $\beta$ -Agonist Resmetirom (75, 76). Das antioxidativ wirksame Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) und der Insulin-Sensitizer Pioglitazon führten in Studien zur Verbesserung von histologischen Merkmalen der Steatohepatitis und können unter Abwägung von Nutzen und Nebenwirkungsrisiko in der Behandlung von PatientInnen mit nachgewiesener NASH (Vitamin E bei nichtzirrhotischer, nichtdiabetischer NASH; Pioglitazon bevorzugt bei gleichzeitigem DM Typ II, da hierfür zugelassen) verwendet werden (7, 8, 75). Selbstverständlich müssen auch mit der Erkrankung einhergehende Komorbiditäten wie DM II, arterielle Hypertonie und Hyperlipidämie entsprechend therapiert werden (8).

---

<sup>3</sup> Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor

## 1.2 Transiente Elastographie

Bei der TE handelt es sich um ein nichtinvasives Verfahren zur Quantifizierung der Gewebselastizität, das von der Firma Echosens zur sogenannten vibrationskontrollierten transienten Elastographie (VCTE) weiterentwickelt wurde und unter dem Namen Fibroscan<sup>®</sup> angeboten wird. Damit wird die ultraschallbasierte Messung der Lebersteifigkeit ermöglicht. Diese wird durch Bindegewebsablagerungen maßgeblich erhöht und dient somit als Surrogatparameter für das Ausmaß einer Leberfibrose (20, 77-80). Zusätzlich ist heute die gleichzeitige VCTE-gesteuerte Messung des Controlled Attenuation Parameter in den Fibroscan<sup>®</sup> integriert, der ein Maß für die Abschwächung der Ultraschallwellen bei ihrer Ausbreitung durch das Lebergewebe darstellt und mit dem Ziel implementiert wurde, hepatische Steatose detektieren und quantifizieren zu können (21, 81).

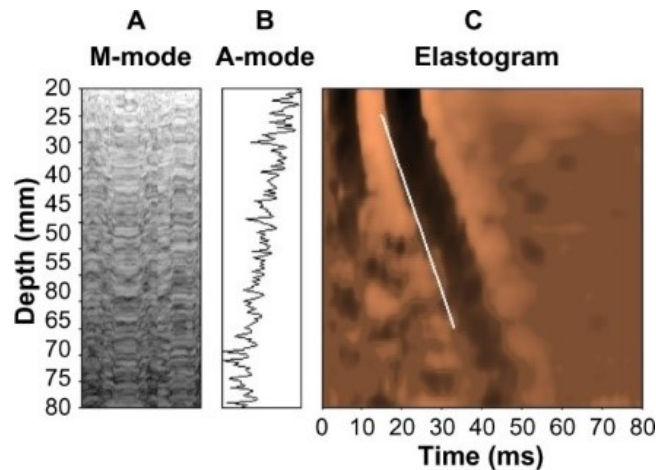
### 1.2.1 Technischer Hintergrund

Das Prinzip der Steifigkeitsmessung mittels TE beruht auf der Ermittlung der Scherwellengeschwindigkeit in einem durch einen vorübergehenden (transienten) Impuls in Schwingung versetzten Gewebe und der Tatsache, dass diese mit höherer Steifigkeit steigt. Für ein nicht-visköses, isotropes, weiches elastisches Medium (gilt näherungsweise für die Leber) ist der Elastizitätsmodul  $E$  bei einer gegebenen Frequenz  $f$  direkt proportional zur Massendichte  $\rho$  (wird annähernd als konstant angenommen) und zum Quadrat der Scherwellengeschwindigkeit  $V_s$  (20, 77, 79):

$$E(f) = 3 * \rho * V_s(f)^2.$$

Die Messsonde (verfügbare Größen: S, M, XL) des FS besteht aus einem Ultraschallwandler an der Spitze, welcher mit einem Vibrationsgenerator verbunden ist. Dieser Rüttler überträgt bei der Untersuchung kurzzeitige, niederfrequente Vibrationen (Mittelfrequenz: 50 Hz) mit kleiner Amplitude (Spitze-Tal-Werte für S-, M- bzw. XL-Sonde: 1 mm, 2 mm bzw. 3 mm) über die Ultraschallsonde auf die Haut. Durch den mechanischen Impuls wird eine Scherwelle generiert, die sich im darunterliegenden weichen Gewebe langsam fortpflanzt (etwa 1 m/s in der normalen Leber). Deren Ausbreitung wird mittels Puls-Echo-Verfahren durch die Ultraschallsonde (S: 5 MHz, M: 3,5 MHz, XL: 2,5 MHz) erfasst, indem die longitudinalen Scherverschiebungen im Lebergewebe in einem festgelegten Tiefenbereich unter der Hautoberfläche (S: 15 – 50 mm, M: 25 – 65 mm, XL: 35 – 75 mm) von den viel schnelleren Ultraschallwellen (etwa 1500 m/s) detektiert werden. Diese durch die Scherwelle verursachte Dehnung des Gewebes („strain“) entlang der Ultraschallachse kann als Funktion der Tiefe zur Zeit dargestellt werden, wodurch man ein Elastogramm

(Abbildung 6) erhält. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Scherwelle wird ermittelt und unter Einbeziehung obenstehender Formel die Steifigkeit  $E$  abgeleitet und vom Gerät in der Einheit kPa ausgegeben (20, 77-80, 82). Die messbaren Werte reichen von 1,5 bis 75 kPa (80) und es wird ein Lebervolumen von ca. 3 cm<sup>3</sup> untersucht (82). Bei Gesunden liegt die LS im Schnitt bei etwa  $5,5 \pm 1,6$  kPa (83).



**Abbildung 6. Ultraschallsignale bei der Lebersteifigkeitsmessung mit dem Fibroscan<sup>®</sup>,** übernommen aus (80). © 2010 Mueller and Sandrin. *A, B:* M- und A-Mode zum Lokalisieren der Leber. *C:* Die durch die Ausbreitung der Scherwelle verursachte Dehnung des Lebergewebes wird als Funktion der Tiefe und Zeit in einem Elastogramm dargestellt (80). Die Neigung des Wellenmusters (weiße Linie) repräsentiert die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Scherwelle, welche mit zunehmender Lebersteifigkeit steigt (20).

Die Quantifizierung von Steatose mittels Controlled Attenuation Parameter basiert auf der Tatsache, dass Fett die Ausbreitung von Ultraschallwellen beeinflusst und diese in einer Fettleber stärker abgeschwächt werden als in der normalen Leber (21). Auf dem Weg durch ein Medium kommt es stets zu einem Energieverlust der Schallwellen. Die Anfangsintensität  $I_0$  nimmt exponentiell mit der Tiefe  $z$  und dem Abschwächungskoeffizienten  $\alpha$  ab (81):

$$I_z = I_0 e^{-\alpha(f)z}$$

Die Schallabschwächung ist dabei von der Frequenz und den physikalischen Eigenschaften des Mediums abhängig. Der CAP stellt den Abschwächungskoeffizienten bei 3,5 MHz dar (entspricht der Mittenfrequenz der M-Sonde; bei Anwendung der XL-Sonde erfolgt eine automatische, näherungsweise Skalierung) und wird in dB/m angegeben (21, 84). Die Messung des CAP ist auf dieselben Messtiefenbereiche wie bei der Lebersteifigkeitsmessung genormt und erfolgt basierend auf obenstehender Formel über einen geräteeigenen Algorithmus simultan anhand der dabei detektierten Ultraschallsignale. Die CAP-Werte bewegen sich im Bereich zwischen 100 und 400 dB/m (21, 81, 84).

## 1.2.2 Untersuchungsvorgang

Die Untersuchung mit dem FS erfolgt in flacher Rückenlage, der rechte Arm wird möglichst abduziert und unter dem Kopf platziert. Gemessen wird im rechten Leberlappen durch einen Zwischenrippenraum in der mittleren Axillarlinie, in etwa auf Höhe des Processus xiphoideus. Nach Gelapplikation wird unter Kontrolle von Echtzeit-Ultraschallsignalen (M-Mode und A-Mode) die Sonde so adjustiert, dass man homogenes Lebergewebe ohne größere vaskuläre Strukturen lokalisiert (78). Ein sogenanntes „Liver Targeting Tool“ unterstützt den oder die UntersucherIn bei der korrekten Positionierung, indem es die für die Leber typischen Ultraschallsignale automatisch detektiert und diese bei passender Einstellung kennzeichnet. Ebenso wird der korrekte Sondendruck auf die Haut signalisiert (85). Schließlich löst man durch Drücken des Knopfes an der Sonde eine Messung aus. Die Software ist mit einem Algorithmus ausgestattet, der ungültige Messungen (beispielsweise bei inkorrektem Vibrationsmuster) automatisch erkennt und in einem solchen Fall kein Messergebnis ausgibt. Pro PatientIn sollten mindestens 10 Messungen an der gleichen Stelle durchgeführt werden, aus welchen der FS die mediane LS in kPa und den medianen CAP in dB/m ermittelt. Dieser mediane Wert entspricht dem Untersuchungsergebnis. Zusätzlich wird der Interquartilsabstand (IQR) der einzelnen Messungen angegeben (78). Um zu garantieren, dass für die Berechnung des CAP nur sinnvolle Signale verarbeitet werden, wird ein CAP-Wert vom FS nur dann ermittelt, wenn auch eine erfolgreiche Lebersteifigkeitsmessung durchgeführt werden konnte („VCTE-guided“) (81). Während der Messungen muss die Sonde stets normal zur Hautoberfläche gehalten werden, da ansonsten eine Überschätzung der LS oder eine ungültige Messung möglich sind (85). Die Untersuchung ist für die PatientInnen völlig schmerzfrei (man spürt lediglich einen leichten Vibrationsimpuls auf der Haut) und für eingeschultes Personal nach einer kurzen Trainingsphase einfach und zuverlässig durchführbar (78, 85). Die Auswahl der Sonde erfolgt gemäß Herstellerangaben nach der sogenannten Skin-Liver Capsule Distance (SCD; entspricht dem Abstand zwischen Haut und Leberkapsel), wobei mittlerweile ein in die Software integriertes automatisches „Probe Selection Tool“ zur Auswahl der richtigen Sonde zur Verfügung gestellt wird. Die M-Sonde wird für Personen mit einer SCD unter 25 mm empfohlen, darüber soll die XL-Sonde zur Anwendung kommen (85).

## 1.2.3 Controlled Attenuation Parameter bei NAFLD

Sasso et al. beschrieben 2010 den CAP als neu in den FS implementierte Methode zur Evaluierung einer Leberverfettung. An Ultraschallsimulationsprogrammen und Gewebeimitierenden Phantomen wurde der CAP als gültiges Schätzungsmaß für die Abschwächung

der Ultraschallwellen bei 3,5 MHz validiert und seine Anwendung in vivo an einer ersten Kohorte von 115 PatientInnen mit diversen chronischen Lebererkrankungen getestet. Dabei wurde eine starke Korrelation mit den histologischen Steatosegraden (Spearman's  $\rho = 0,81$ ,  $p < 10^{-16}$ ) und eine sehr gute Genauigkeit für die Diagnose einer milden<sup>4</sup> (AUROC<sub>S $\geq$ 1</sub> = 0,91), moderaten (AUROC<sub>S $\geq$ 2</sub> = 0,95) bzw. schweren Steatose (AUROC<sub>S $\geq$ 3</sub> = 0,89) festgestellt (21).

In der Folge wurde die Anwendung bei Kohorten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie (86-94) sowie NAFLD (53, 55, 95-101) in mehreren biopsiekontrollierten Studien untersucht und der CAP als vielversprechender nichtinvasiver Steatose-Test bestätigt. Allerdings bestehen zum Teil große Unterschiede in der gefundenen Stärke der Assoziation mit den Steatosegraden sowie in der berichteten diagnostischen Güte, was sich auch in der Streuung der publizierten Cut-off-Werte zur Detektion der einzelnen Steatosegrade widerspiegelt. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse einiger größerer Diagnosestudien bei NAFLD zusammen. Oft bestand eine erhebliche Überschneidung der CAP-Werte zwischen den einzelnen Steatosegraden, sodass der CAP in den Arbeiten häufig zwar eine hepatische Steatose zufriedenstellend detektieren konnte, sich für die Differenzierung zwischen den verschiedenen Steatosegraden jedoch als weniger nützlich erwies.

In der bisher umfangreichsten Metaanalyse (102) zur diagnostischen Genauigkeit des CAP (nur Messungen mit der M-Sonde) wurden individuelle Daten von 2735 PatientInnen mit Lebererkrankungen verschiedener Ätiologie (19,6 % NAFLD) aus 19 biopsiekontrollierten Studien analysiert und folgende optimale Cut-off-Werte für das nichtinvasive Steatose-Grading ( $> S_0$ ,  $> S_1$  und  $> S_2$ ) ermittelt: 248 dB/m (Sensitivität 69 %, Spezifität 82 %), 268 dB/m (Sensitivität 77 %, Spezifität 81 %) und 280 dB/m (Sensitivität 88%, Spezifität 78%). Die Flächen unter der ROC-Kurve betragen 0,82 ( $> S_0$ ), 0,87 ( $> S_1$ ) bzw. 0,88 ( $> S_2$ ). Neben der Steatose hatten der BMI, ein DM II und die Ätiologie NAFLD einen relevanten Einfluss auf die Höhe des CAP. Um diese Faktoren auszugleichen, schlagen die AutorInnen vor, vom gemessenen Wert für das Vorliegen einer NAFLD und/oder eines DM II jeweils 10 dB/m abzuziehen sowie pro BMI-Einheit über bzw. unter 25 kg/m<sup>2</sup> innerhalb des Bereichs von 20 bis 30 kg/m<sup>2</sup> 4,4 dB/m abzuziehen bzw. zu addieren (102).

---

<sup>4</sup> in dieser Studie definiert als  $> 10$  % steatotische Hepatozyten

**Tabelle 2. Auswahl an Studien zur diagnostischen Performance des CAP bei NAFLD**

	Chan et al., 2014 (95)	Ledinghen et al., 2016 (96)	Imajo et al., 2016 (53)	Lee et al., 2016 (97)	Park et al., 2017 (55)	Naveau et al., 2017 (98)*	Siddiqui et al., 2019 (99)	Eddowes et al., 2019 (100)	Somda et al., 2019 (101)*	
N	101	261	142	183	104	194 <sup>a</sup>	123 <sup>b</sup>	393	249	
Sonde	M	M	M	M	M/XL	XL	XL	M/XL	XL	
Ø BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29,4	30,2	28,1	27,9	30,4	44	44	34,4	43,8	
<b>S ≥ 1</b>										
AUROC	0,97	<i>nicht durchgeführt</i>	0,88	0,95	0,85	0,73	0,84	0,76	0,87	0,86
<b>Cut-off (dB/m)</b>	<b>263</b>		<b>236</b>	<b>247</b>	<b>261</b>	<b>308</b>	<b>298</b>	<b>285</b>	<b>302</b>	<b>255</b>
Sensitivität (%)	92		82	88	72	68	78	80	80	88
Spezifität (%)	94		91	100	86	69	83	77	83	76
PPV (%)	96		99	100	98	93	95	99	97	95
NPV (%)	88		67	63	23	27	46	16	37	54
<b>S ≥ 2</b>										
AUROC	0,86	0,80	0,73	0,86	0,70	0,77	0,83	0,70	0,77	0,83
<b>Cut-off (dB/m)</b>	<b>263</b>	<b>310</b>	<b>270</b>	<b>280</b>	<b>305</b>	<b>335</b>	<b>303</b>	<b>311</b>	<b>331</b>	<b>288</b>
Sensitivität (%)	97	79	78	85	63	65	90	77	70	81
Spezifität (%)	68	71	81	80	69	79	69	57	76	73
PPV (%)	67	86	73	83	56	81	80	70	84	81
NPV (%)	97	59	75	82	75	61	84	66	58	74
<b>S = 3</b>										
AUROC	0,75	0,66	0,70	0,73	0,73	0,79	0,84	0,58	0,70	0,79
<b>Cut-off (dB/m)</b>	<b>281</b>	<b>311</b>	<b>302</b>	<b>300</b>	<b>312</b>	<b>341</b>	<b>326</b>	<b>306</b>	<b>337</b>	<b>297</b>
Sensitivität (%)	100	87	64	73	64	74	83	80	72	80
Spezifität (%)	53	47	74	61	70	74	71	40	63	66
PPV (%)	17	43	76	29	26	64	90	32	52	59
NPV (%)	100	88	94	91	92	81	78	85	80	84

PPV, positiver Vorhersagewert; NPV, negativer Vorhersagewert. Mit \* gekennzeichnete Studien untersuchten die Anwendung des CAP bei schwer adipösen PatientInnen mit Indikation für eine bariatrische Operation, wobei Somda et al. bei Personen mit sehr dicker subkutaner Fettschicht (SCD > 35 mm) eigens auf einen größeren Messtiefenbereich adaptierte CAP-Werte berechneten. Naveau et al. verwendeten für ihre Studie eine retrospektive Evaluierungs- (a) und eine prospektive Validierungskohorte (b).

2018 wurde von Caussy et al. die erste Studie veröffentlicht, in welcher die MRI-PDFF als Goldstandard verwendet wurde, und die optimalen CAP-Werte zur Detektion einer PDFF  $\geq 5\%$  bzw.  $\geq 10\%$  bei NAFLD-PatientInnen mit 288 dB/m (Sensitivität 75 %, Spezifität 77 %, PPV 89%, NPV 56 %) und 306 dB/m (Sensitivität 79 %, Spezifität 83 %, PPV 80 % NPV 81 %) angegeben. Die AUROCs betragen 0,80 bzw. 0,87 (103).

#### **1.2.4 Lebersteifigkeitsmessung bei NAFLD**

Die Anwendung der Lebersteifigkeitsmessung (LSM) mit dem FS bei NAFLD wurde im Laufe des letzten Jahrzehnts in einer Vielzahl von biopsiekontrollierten Studien evaluiert (53, 55, 97, 99, 100, 104-109). Dabei konnte die TE im Grunde durchwegs mit guter bis sehr guter Genauigkeit zwischen fortgeschrittenen und frühen Fibrorestadien unterscheiden und mit sehr guter Genauigkeit eine Zirrhose detektieren. Die mittleren Flächen unter der ROC-Kurve für die Diagnose von signifikanter ( $F \geq 2$ ) und fortgeschrittener Fibrose ( $F \geq 3$ ) sowie Zirrhose (F4) betragen in einer Metaanalyse aus dem Jahr 2017 für die M-Sonde 0,83, 0,87 bzw. 0,92 und für die XL-Sonde 0,82, 0,86 bzw. 0,94 (62). Welche die besten Schwellenwerte sind, die allgemeingültig verwendet werden könnten, ist nicht eindeutig geklärt. Wong et al. fanden 7,0 kPa, 8,7 kPa und 10,3 kPa (M-Sonde) bzw. 6,2 kPa, 7,2 kPa und 7,9 kPa (XL-Sonde) als optimale Cut-offs für  $F \geq 2$ ,  $F \geq 3$  und F4 (104, 110). Von Eddowes et al. wurden 2019 in einer prospektiven und multizentrischen Studie, bei der die Auswahl der Sondengröße nach dem automatischen „Probe Selection Tool“ erfolgte, 8,2 kPa, 9,7 kPa und 13,6 kPa als optimale Cut-offs für  $F \geq 2$ ,  $F \geq 3$ , und F4 ermittelt (100).

#### **Prognostische Relevanz**

Für die LSM mittels TE wurde bereits in mehreren Studien ein prognostischer Wert nachgewiesen. Laut einer Metaanalyse, die Daten aus 17 Studien zusammenfasste, die vorwiegend PatientInnenkohorten mit viralen Lebererkrankungen enthielten, war der Ausgangs-Lebersteifigkeitsgrad bei chronischen Lebererkrankungen signifikant mit dem Risiko für eine dekompensierte Zirrhose und der Entwicklung eines Leberzellkarzinoms sowie mit der Mortalität im Beobachtungszeitraum der Studien assoziiert (111). Boursier et al. zeigten in einer longitudinalen Kohortenstudie, dass die LSM auch bei NAFLD zur Risikostratifizierung bezüglich der Mortalität eingesetzt werden kann. Dazu klassifizierten sie die PatientInnen nach den Lebersteifigkeitswerten vereinfacht in 4 Subgruppen (Grenzwerte: 8,8 kPa, 12,0 kPa und 38,6 kPa), die sich signifikant in ihrem Langzeitüberleben unterschieden, wobei eine höhere Lebersteifigkeitsklasse erwartungsgemäß eine schlechtere Prognose bedeutete und sich das Risiko sowohl auf die

leberbezogene Mortalität als auch auf Todesfälle durch extrahepatische Ursachen bezog (106). Da die Lebersteifigkeit außerdem mit dem Lebervenenverschlussdruck korreliert, wird sie bei fortgeschrittenen chronischen Lebererkrankungen auch zur Abschätzung des Risikos für einen signifikanten Pfortaderhochdruck eingesetzt (112). Nach den Empfehlungen der erweiterten Baveno-VI-Kriterien können bei einer LS unter 20 kPa und Thrombozytenzahl über 150 G/l behandlungsbedürftige ösophago-gastrale Varizen ausgeschlossen und jährliche Verlaufskontrollen mittels TE durchgeführt werden (113).

### **1.2.5 Einfluss- und Störfaktoren**

Man muss beachten, dass die Messergebnisse bei der TE durch verschiedenste Faktoren beeinflusst und verfälscht werden können. Aktive Entzündung (akute Hepatitis, Transaminasenanstiege bei chronischer Hepatitis), extrahepatische Cholestase, Stauungsleber bei Herzinsuffizienz (erhöhter Venendruck), Nahrungsaufnahme vor der Untersuchung und hepatische Infiltrationen (z. B. Tumor, Amyloidose) erhöhen die Lebersteifigkeit und können zu falsch positiven Diagnosen einer fortgeschrittenen Fibrosierung oder gar Zirrhose führen (18, 72, 80). Studien, in denen ProbandInnen jeweils sowohl im nüchternen als auch im postprandialen Zustand untersucht wurden, zeigten, dass eine vorangegangene Nahrungsaufnahme die gemessenen Lebersteifigkeitswerte 30 bis 60 Minuten nach der Mahlzeit im Vergleich zum Nüchternwert signifikant erhöht. Die Ursache wird im postprandial erhöhten Blutfluss in Leber und Pfortader vermutet (114, 115). Für den CAP wurde in einer kleinen Studie interessanterweise ein gegenteiliger Effekt (Abnahme um durchschnittlich 18,1 dB/m) gefunden (116). Um Lebersteifigkeitsmessungen standardisiert vergleichen zu können, sollte die Messung am besten im Nüchternzustand erfolgen. Ein Mindestabstand von zwei Stunden zur letzten Nahrungsaufnahme wird empfohlen (72). Ein akuter Transaminasenanstieg ist mit einer beträchtlich erhöhten LS assoziiert, wobei Werte wie bei fortgeschrittener Zirrhose erreicht werden können (117, 118). Ein Rückgang der Entzündungsaktivität führt in der Verlaufsbeobachtung wieder zu einer Abnahme bzw. Normalisierung der LS. Es ist daher nicht sinnvoll, bei akutem Leberschaden eine Steifigkeitsmessung zur Abschätzung einer Fibrose durchzuführen. Erklärt wird der Steifigkeitsanstieg durch einen erhöhten Druck, der durch das Anschwellen der Hepatozyten im Rahmen der Entzündung entsteht (80).

Ein wesentlicher anthropometrischer Einflussfaktor auf die TE ist der BMI der untersuchten Person. In mehreren Studien führten höhere BMI-Werte unabhängig vom Steatosegrad zu höheren CAP-Werten (84, 88-90, 92, 94-96, 99, 101, 102) und zumindest bei NAFLD-

PatientInnen war ein höherer BMI in einigen Arbeiten auch unabhängig vom Fibrosestadium mit einer höheren LS assoziiert (99, 109, 119). Formal wird dies mit einer bei adipösen Personen dickeren subkutanen Fettschicht begründet, welche die Ultraschallsignale beeinflusst und gegebenenfalls zu einer Verfälschung (Überschätzung) der Ergebnisse führen kann. In der Tat waren in einer Studie, die den Einfluss der SCD (als Maß für die Subkutisdicke) untersuchte, die diagnostische Genauigkeit von CAP und LS (letztere nur bei NAFLD) beeinträchtigt und die Cut-off-Werte des CAP um ca. 60 bis 70 dB/m erhöht, wenn die SCD  $\geq 25$  mm betrug (120). Zwar scheint die diagnostische Performance des CAP durch unterschiedliche Ätiologien nicht wesentlich beeinträchtigt zu werden (121), allerdings werden bei NAFLD im Vergleich zu anderen Ätiologien auch unabhängig von der Steatosemenge höhere CAP-Werte gemessen (94, 102), was die relativ hohen publizierten optimalen Cut-off-Werte bei reinen NAFLD-Kohorten (s. Tabelle 2) erklärt. Generell besteht auch eine starke Assoziation des CAP mit Komponenten des metabolischen Syndroms und DM II (89, 102).

Der Einfluss von Steatose auf die LS ist aufgrund widersprüchlicher Studienlage umstritten (18, 72). In Arbeiten von Petta et al. waren eine hochgradige Leberverfettung bzw. hohe CAP-Werte bei NAFLD jedoch mit einer Überschätzung des Fibroseausmaßes durch die LSM assoziiert (108, 122). Nicht eindeutig geklärt ist ebenso, ob Fibrose und Zirrhose einen Einfluss auf die Messung des CAP haben. Die Mehrzahl der Arbeiten fand in multivariaten Analysen keinen Zusammenhang zwischen der Höhe des CAP und dem Fibrosestadium (53, 86-88, 90, 98, 121). Myers et al. berichten allerdings über eine signifikant bessere diagnostische Genauigkeit des CAP bei Individuen mit Fibrosestadien F0 bis F1 im Vergleich zu jenen mit F2 bis F4 (87) und Petta et al. beobachteten bei niedrigen Steatosegraden signifikant höhere CAP-Werte, wenn die LS über 10,1 kPa betrug (108).

Gründe für eine erfolglose Untersuchung ohne gültige Messungen („failure“) können das Vorliegen eines ausgeprägten Aszites (da sich elastische Scherwellen in Flüssigkeiten nicht ausbreiten können), eine starke Adipositas (hoher BMI, dicke subkutane Fettschicht) oder enge Zwischenrippenräume sein (80). Faktoren, die in Studien mit einer erhöhten Rate an erfolglosen Messungen assoziiert waren, sind neben dem bereits erwähnten hohen BMI ( $> 30$  kg/m<sup>2</sup>) mangelnde Erfahrung der UntersucherInnen (weniger als 500 durchgeführte Untersuchungen), ein metabolisches Syndrom, höheres Alter sowie weibliches Geschlecht (89, 123).

### 1.2.6 Sondengröße

Die insbesondere bei Übergewichtigen hohe Misserfolgsrate der VCTE (keine gültige LSM nach 10 Versuchen) konnte durch die Einführung der XL-Sonde deutlich reduziert und die Zuverlässigkeit der Messergebnisse erhöht werden (123, 124). Mittlerweile ist auch die Messung des CAP mit der XL-Sonde möglich (84). Im direkten Vergleich der beiden Sonden werden mit der XL-Sonde insgesamt signifikant niedrigere (ca. 1,0 bis 1,8 kPa) LS-Werte als mit der M-Sonde gemessen (57, 109, 124). Bei richtigem Einsatz der Sondengröße – entweder gemäß Herstellerangaben bzw. automatischem „Probe Selection Tool“ nach der SCD (M: unter 25 mm, XL: ab 25 mm) oder pragmatisch nach dem BMI (M:  $< 30 \text{ kg/m}^2$ , XL:  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) – unterscheiden sich die Messergebnisse der beiden Sonden innerhalb der einzelnen Fibrosestadien jedoch nicht mehr wesentlich, sodass dieselben Cut-off-Werte zur Interpretation der LS für M- und XL-Sonde mit ähnlicher diagnostischer Genauigkeit verwendet werden können (109, 125). Umgekehrt verhält es sich beim CAP, bei dem die mit der XL-Sonde gemessenen Werte im direkten Vergleich mit der M-Sonde in den meisten Studien insgesamt signifikant höher (ca. 12 bis 23 dB/m) waren (126-128). Die diagnostische Genauigkeit beider Sonden ist ähnlich, allerdings gibt es widersprüchliche Studienergebnisse, ob dieselben Cut-off-Werte des CAP für das Steatose-Grading mit der M- und XL-Sonde angewendet werden können (100, 127, 129) oder nicht (126, 128).

### 1.2.7 Zuverlässigkeitskriterien und Qualitätsmerkmale

Als wichtigstes Qualitätskriterium für eine zuverlässige LSM gilt gemäß Hersteller und Leitlinien eine IQR-Median-Ratio (IQR/Med) von maximal 30 % aus mindestens 10 Messungen an derselben Stelle (59, 72). Boursier et al. schlugen eine von der medianen LS abhängige verfeinerte Einteilung in die drei Kategorien „sehr zuverlässig“ ( $\text{IQR/Med} \leq 10$ ), „zuverlässig“ ( $10 \% < \text{IQR/Med} \leq 30 \%$  oder  $\text{IQR/Med} > 30 \%$  bei  $\text{LS} < 7,1 \text{ kPa}$ ) und „unzureichend zuverlässig“ ( $\text{IQR/Med} > 30 \%$  bei  $\text{LS} \geq 7,1 \text{ kPa}$ ) vor (130).

Für den CAP kann bisher noch keine definitive Empfehlung für Qualitätskriterien formuliert werden (112). Es gibt jedoch Hinweise, dass die IQR der einzelnen Messungen einen Einfluss auf die Reliabilität des CAP haben könnte. Wong et al. fanden in einer großen biopsiekontrollierten Studie eine schlechtere diagnostische Performance, wenn die IQR der einzelnen Messungen mehr als 40 dB/m betrug (131), und Caussy et al. (verwendeten MR-PDF als Referenz) berichteten über eine Abnahme der Genauigkeit bei einer IQR über 30 dB/m (103).

Bei korrekter Auswahl der Sonde nach den Empfehlungen des automatischen „Probe Selection Tool“ ist die Misserfolgsrate der VCTE bei NAFLD insgesamt gering (3,2 %) und die Reproduzierbarkeit der gemessenen LS- und CAP-Werte bei Wiederholung durch dieselbe oder eine andere Person relativ hoch (LS: Intraoperator-Korrelation  $r = 0,90$ ; Interoperator-Korrelation  $r = 0,84$ ; mittlere Differenz zwischen erster und zweiter Messung  $= 0,0 \pm 5,5$  kPa; CAP: Intraoperator-Korrelation  $r = 0,82$ ; Interoperator-Korrelation  $r = 0,70$ ; mittlere Differenz  $= 2 \pm 36$  dB/m). Eine zuverlässige LSM (IQR/Median  $< 30$  %) ist in über 95 Prozent der Fälle möglich, wobei Unerfahrenheit in der Anwendung und Fettleibigkeit mit unzuverlässigen Messungen assoziiert sind (132).

## **2 Material und Methoden**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit führte ich eine retrospektive Auswertung anhand der NAFLD-Datenbasis der Leberambulanz der Klinischen Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Universitätsklinik für Innere Medizin in Graz durch. Bei der Studienpopulation handelt es sich um eine Kohorte der laufenden prospektiven Studie „Evaluierung nichtinvasiver Fibrosemarker bei chronischen Lebererkrankungen“. Deren Durchführung wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt und erfolgte im Einklang mit den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki nach Einwilligungserklärung der teilnehmenden PatientInnen.

### **2.1 Studienpopulation**

Im Zeitraum von Oktober 2008 bis Mai 2018 wurden fortlaufend 80 Personen mit klinischem Verdacht auf eine NAFLD (z.B. Zeichen der Leberverfettung in der Sonographie, erhöhte Leberwerte, Vorliegen von metabolischen Risikofaktoren und/oder DM II) in die Studie eingeschlossen, bei welchen eine Leberpunktion (LP) zur histopathologischen Befundung durchgeführt wurde. Dies geschah entweder zur Evaluation, ob eine NASH vorliegt, zum Fibrose-Staging oder zum Ausschluss anderer differentialdiagnostisch relevanter Lebererkrankungen. Gemäß Studienprotokoll wurde am Tag der Leberbiopsie eine VCTE-basierte Messung der Lebersteifigkeit sowie des ab Juni 2012 zusätzlich verfügbaren Controlled Attenuation Parameter mit dem Fibroscan® durchgeführt. Weiters wurden Blutproben zur Ermittlung von Laborwerten und verschiedener Scores entnommen und von den PatientInnen demographische, anthropometrische und klinische Daten erhoben. Alle Messungen und Labortests erfolgten im nüchternen Zustand (letzte erlaubte Nahrungsaufnahme am Vortag).

Einschlusskriterien für die NAFLD-Kohorte waren ein Mindestalter von 18 Jahren, eine negative Alkoholanamnese bzw. ein angegebener Alkoholkonsum unter den von der EASL empfohlenen Grenzwerten von durchschnittlich 20 g pro Tag für Frauen und 30 g pro Tag für Männer (7) sowie der Ausschluss anderer Lebererkrankungen wie virale Hepatitis, Morbus Wilson, Hämochromatose, Autoimmunhepatitis und medikamentös-toxischer Leberschaden. PatientInnen mit Diabetes Mellitus Typ I wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Bei grenzwertigem Alkoholkonsum musste der CDT-Wert (CDT = Carbohydrate Deficient Transferrin) im Normbereich sein. Eine maximale Zeitdifferenz von drei Monaten zwischen LP und FS bzw. Blutentnahme wurde festgelegt, um auch jene

PatientInnen in die Auswertung mit einschließen zu können, bei denen die Durchführung der VCTE oder die Bestimmung einzelner Laborwerte am Biopsie-Tag nicht möglich war.

## 2.2 Klinisches Assessment und Labortests

Anamnestisch wurden Alkohol- und Tabakkonsum sowie das Bestehen von DM II und arterieller Hypertonie erhoben und die Daten für die Auswertung gegebenenfalls unter Zuhilfenahme des Krankenhausinformationssystems vervollständigt. Ein metabolisches Syndrom wurde retrospektiv diagnostiziert, wenn mindestens drei der folgenden Kriterien erfüllt waren (Definition nach AHA/NHLB): (i) Bauchumfang  $\geq 102$  cm (Männer) bzw.  $\geq 88$  cm (Frauen); (ii) Triglyceride im Serum  $\geq 150$  mg/dl oder medikamentöse Therapie der Hypertriglyceridämie; (iii) HDL  $< 40$  mg/dl (Männer) bzw.  $< 50$  mg/dl (Frauen) oder bestehende Pharmakotherapie; (iv) arterieller Blutdruck systolisch  $\geq 130$  mmHg oder diastolisch  $\geq 85$  mmHg oder antihypertensive Therapie; (v) Nüchternblutzucker  $> 100$  mg/dl oder medikamentöse Therapie der Hyperglykämie (133). Neben dem Bauchumfang (in cm) wurden Körpergewicht und Körperlänge gemessen und der BMI (Körpergewicht/Körperlänge<sup>2</sup>, Einheit: kg/m<sup>2</sup>) ermittelt. Im Rahmen einer orientierenden sonographischen Beurteilung der Leber wurde die Distanz zwischen Haut und Leberkapsel (SCD; in mm) als Maß für die Subkutisdicke ausgemessen.

Aus einer venösen Blutprobe wurden Routine- und leberspezifische Laborparameter (Glucose, Triglyceride, Cholesterin, HDL, ALT, AST, GGT, AP, gesamtes und direktes Bilirubin, Cholinesterase, Albumin, PZ, INR, MCV, Leukozyten- und Thrombozytenzahl sowie Kreatinin) bestimmt. Zusätzlich wurde der Insulingehalt im Blut und der ELF<sup>TM</sup>-Test (68), ein auf den Biomarkern Hyaluronsäure, PIIINP und TIMP-1 basierender kommerzieller Fibrose-Test, ermittelt. Nach den in der Literatur beschriebenen Originalformeln wurden aus den vorhandenen Daten der HOMA-Index<sup>5</sup> (134), der Fatty Liver Index (57) und der FIB-4-Index (64) berechnet:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Insulin } (\mu\text{U/ml}) * \text{Glucose (mmol/l)}}{22,5} = \frac{\text{Insulin } (\mu\text{U/ml}) * \text{Glucose (mg/dl)}}{405}$$

$$\text{FLI} = \frac{e^{0,953 * \ln(\text{Triglyceride in mg/dl}) + 0,139 * \text{BMI (kg/m}^2) + 0,718 * \ln(\text{GGT in U/l}) + \text{Bauchumfang (cm)} - 15,745}}{1 + e^{0,953 * \ln(\text{Triglyceride in mg/dl}) + 0,139 * \text{BMI (kg/m}^2) + 0,718 * \ln(\text{GGT in U/l}) + \text{Bauchumfang (cm)} - 15,745}} * 100$$

$$\text{FIB-4-Index} = \frac{\text{Alter (Jahre)} * \text{AST (U/l)}}{\text{Thrombozytenzahl (G/l)} * \sqrt{\text{ALT (U/L)}}}$$

<sup>5</sup> ein Modell zur nichtinvasiven Abschätzung der Insulinresistenz und Beta-Zellfunktion (134)

### **2.3 Vibrationskontrollierte transiente Elastographie**

Die Messungen von LS und CAP (letzterer seit Juni 2012) wurden mit dem Fibroscan<sup>®</sup> 502 Touch (Echosens, Paris) von in der korrekten Anwendung geschultem und erfahrenem ärztlichen Personal durchgeführt. Die Auswahl der Sondengröße erfolgte in Abhängigkeit der Verfügbarkeit – eine XL Sonde war seit 2011 vorhanden – möglichst nach der SCD (< 25 mm: M, ≥ 25 mm: XL), welche zuvor sonographisch ausgemessen wurde. Der technische Hintergrund und die genaue Anwendung der VCTE wurden bereits in Kapitel 1.2 beschrieben. Die Messung erfolgte im rechten Leberlappen durch einen Zwischenrippenraum. Pro Person wurden mindestens zehn Messungen an einer Stelle durchgeführt, woraus von der Software der mediane Wert als Messergebnis (LS in kPa, CAP in dB/m) und die IQR als Streuungsmaß der einzelnen Messungen kalkuliert wurde. Nach den Boursier-Kriterien wurde eine LSM als unzuverlässig („unreliable“) definiert, wenn bei einer Steifigkeit > 7,0 kPa die IQR/Med > 30 % betrug (130). Nur zuverlässige Messungen wurden in der Auswertung berücksichtigt.

### **2.4 Leberbiopsie und histologische Beurteilung**

Die PatientInnen wurden einer sonographisch kontrollierten, perkutanen Punktion des rechten Leberlappens mit der Menghini-Nadel unterzogen. Der Zugang erfolgte in Lokalanästhesie von interkostal. Nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung der gewonnenen Biopsate wurden zur Befundung jeweils histologische Schnitte in Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung und Siriusrot-(SR-)Färbung angefertigt.

Alle Präparate wurden für diese Studie von einer erfahrenen, auf Leberpathologie spezialisierten Pathologin reevaluiert, um ein einheitliches Beurteilungsschema zu gewährleisten und Interobserver-Variabilitäten aus den ursprünglichen Befunden auszuschalten. Die Pathologin war für die Resultate der FS-Messungen und Steatose- bzw. Fibrose-Scores verblindet und erhielt lediglich für die Differentialdiagnostik der NAFLD relevante klinische Informationen. Als Mindestmaß der Biopsiezylinder wurde eine Länge von 10 mm festgelegt. Kürzere Präparate wurden ausgeschlossen, da eine verlässliche Befundung in diesem Fall nicht möglich gewesen wäre. Die Beurteilung der Gewebeproben erfolgte unter dem Lichtmikroskop (LM) nach dem von Kleiner et al. beschriebenen semiquantitativen Scoring-System des Clinical Research Network (CRN) in Nonalcoholic Steatohepatitis (Tabelle 3), das für die Verwendung in klinischen Studien zur nichtalkoholischen Fettlebererkrankung entwickelt wurde und verbreitet zur Anwendung kommt (26).

**Tabelle 3. NASH Clinical Research Network Scoring System**, in Anlehnung an Kleiner et al. (26)

Merkmal	Score	Definition
<b>Makrovesikuläre Steatose</b>	<i>Gradeinteilung nach Anteil der betroffenen Hepatozyten</i>	
	S0	< 5 %
	S1	5 – 33 %
	S2	34 – 66 %
	S3	> 66 %
<b>Lobuläre Inflammation</b>	<i>Gradeinteilung nach Dichte der Entzündungsherde</i>	
	I0	kein Focus
	I1	< 2 Foci pro LM-Feld (200x)
	I2	2 – 4 Foci pro LM-Feld (200x)
	I3	> 4 Foci pro LM-Feld (200x)
<b>Portale Inflammation</b>	<i>Gradeinteilung nach Ausprägung</i>	
	0	keine, minimal
	1	vorhanden, stärker als minimal
<b>Ballonierung</b>	<i>Gradeinteilung nach Ausprägung</i>	
	B0	kein Ballooning
	B1	wenige ballonierete Zellen
	B2	viele ballonierete Zellen/prominentes Ballooning
<b>Fibrose</b>	<i>Staging nach Fibrosemuster</i>	
	F0	keine Fibrosierung
	F1	perisinusoidal oder periportal
	F1a	mild, azinäre Zone 3, perisinusoidal
	F1b	moderat, azinäre Zone 3, perisinusoidal
	F1c	portal/periportal
	F2	perisinusoidal und portal/periportal
	F3	brückenbildende Fibrose
	F4	Zirrhose

Das Grading von Steatose, Entzündungsaktivität und Ballonierung wurde an HE-gefärbten und das Fibrose-Staging an SR-gefärbten Schnitten durchgeführt. Um das Steatoseausmaß zu bestimmen, wurde in übersichtlicher Vergrößerung der Anteil makrovesikulär verfetteter Leberzellen auf fünf Prozent genau geschätzt. Entsprechend dieser Schätzung erfolgte die Einteilung in die Steatosegrade 0 bis 3 nach CRN. Zusätzlich wurde von der Pathologin eine auf die Präparatfläche bezogene quantitative Schätzung des Fettanteils erhoben. Zur Beurteilung der lobulären Entzündungsaktivität wurde jene Stelle des Präparats mit der höchsten Dichte an Inflammationsherden in 200-facher Vergrößerung eingestellt und die Anzahl der maximal sichtbaren Foci im 200x-Feld gezählt. Das Merkmal „portale Inflammation“ wurde lediglich dahingehend charakterisiert, ob es vorhanden war oder nicht. Musste nach dem Vorhandensein ballonierter Zellen erst gesucht werden, wurde dies als „wenig Ballooning“ bezeichnet, wogegen bei „viel“ oder „prominenter Ballonierung“ diese

geschädigten Zellen leicht und schnell auffindbar waren. Abhängig vom Verteilungsmuster und Ausmaß der Kollagenfasern wurde das Fibrosestadium festgelegt. Wie in der Literatur üblich werden die Stadien F2 und F3 in weiterer Folge auch als signifikante bzw. fortgeschrittene Fibrose bezeichnet.

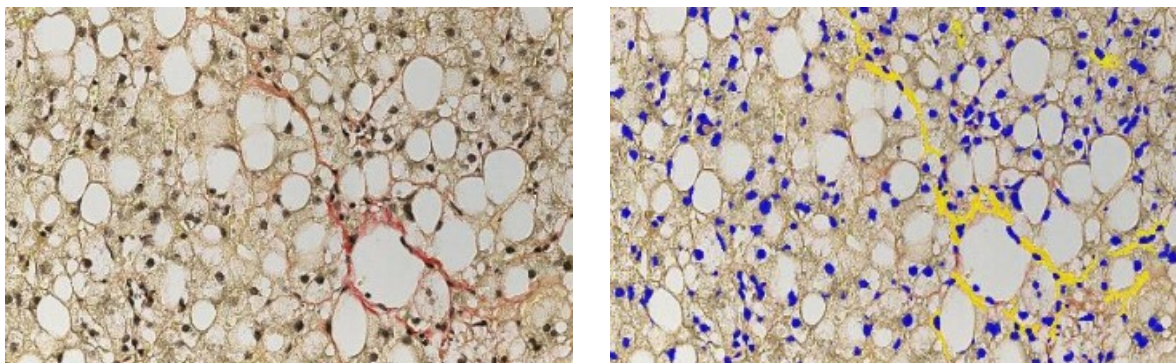
Für die Klassifizierung als NAFLD war gemäß Definition eine Steatose in mindestens fünf Prozent der Zellen ( $S \geq 1$ ) erforderlich (7, 26). Die Diagnose einer nichtalkoholischen Steatohepatitis wurde gestellt, wenn zusätzlich die beiden Kriterien Ballooning ( $B \geq 1$ ) und lobuläre Inflammation ( $I \geq 1$ ) erfüllt waren (15). Präparate mit einem Steatoseanteil unter fünf Prozent wurden als „No NAFLD“ klassifiziert.

Die mit Siriusrot gefärbten Gewebeproben wurden zusätzlich noch nach dem beim internationalen Leber-Kongress der EASL 2018 vorgestellten EPoS (Elucidating Pathways of Steatohepatitis) Staging System beurteilt (s. Tabelle 15 im Anhang). Es handelt sich dabei um ein erweitertes, siebenstufiges Modell, das mit dem Ziel entwickelt wurde, die verschiedenen Stadien der Fibrosierung bei NAFLD besser widerzuspiegeln, und neben veränderten Definitionen der Stadien 1 und 2 im Vergleich zu NASH CRN die fortgeschrittenen Fibrosestadien genauer differenziert (135).

## **2.5 Morphometrische Messungen**

Zur genaueren Quantifizierung des tatsächlichen Steatose- und Fibroseausmaßes führte ich im Rahmen dieser Arbeit digitale Bildanalysen durch. Nach Digitalisierung der Gewebsschnitte (HE und SR) mittels geeigneter Scanner im ScanScope Virtual Slide Format (Dateiendung .svs) wurden zur Vorbereitung in der Ansichtsoftware Aperio ImageScope (Version 12.3.2.8013; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland) Portalfelder und Septen händisch mit einem Pencil-Tool auf den Slides eingezeichnet („Annotations“), um portale und septale Fibrose später von der perizellulären und perisinusoidalen Fibrose differenzieren zu können. Weiters wurden leberfremde Gewebsteile, Leberkapselanteile, Verunreinigungen und Falten im Präparat gesondert markiert. Als Software für die morphometrischen Messungen wurde Definiens Developer XD™ 2.6.0 mit Tissue Studio® (Definiens®, München) verwendet, wobei Tissue Studio® zur Bildanalyse dient und Developer XD™ die Entwicklung automatisierter Bildanalyse-Lösungen („Solutions“) ermöglicht. Die Solutions für die Vermessung von Steatose und Fibrose kamen bereits in früheren Arbeiten am Institut für Pathologie in Graz zur Anwendung (136, 137) und wurden von den Autoren zur Verfügung gestellt.

Als erster Schritt der Fibroseanalysen erfolgt eine automatische Erkennung von Zellkernen („Nucleus Detection“), sodass diese später vom Algorithmus aufgrund ihrer dunklen Färbung nicht als Fibrose fehlgedeutet werden. Die Detektion der Fibrose („Marker Area Detection“) basiert auf dem Prinzip des sogenannten „operator-determined thresholding“ (138). Dabei wird anhand repräsentativer Bildausschnitte manuell ein Intensitäts-Grenzwert („Threshold“) unter visueller Kontrolle so festgelegt, dass nur die mit Siriusrot gefärbten Kollagenfasern von der Bildanalysesoftware als Fibrose erkannt<sup>6</sup> (Abbildung 7) und anschließend vermessen werden. Pro Slide wurden die Bildanalysen jeweils einmal an der gesamten Präparatfläche und einmal unter Verwendung der zuvor in Aperio ImageScope eingezeichneten Annotations nur innerhalb dieser Areale mit denselben Thresholds durchgeführt. Die vom Programm durchgeführten Messungen werden in einer CSV-Datei ausgegeben. Man erhält die Flächen (in  $\mu\text{m}^2$ ) für die als Fibrose detektierten gefärbten Areale und jene für die nicht gefärbten. Aus diesen wurde schließlich die Gesamtfläche des Präparats berechnet. Verunreinigungen und Falten, die aufgrund dunkler Färbung fälschlicherweise als Fibrose erkannt würden, wurden abgezogen. Ebenso wurden Leberkapselteile ausgeschlossen, um das Fibroseausmaß nicht zu überschätzen.



**Abbildung 7. Digitale Bildanalyse: Fibrose.** Detektion von Zellkernen (*blau markiert*) und mit Siriusrot gefärbten Kollagenfasern (*gelb markiert*) nach manueller Festlegung von Intensitäts-Thresholds.

Um das Ausmaß der Fibrose standardisiert quantifizieren zu können, wurde die Fibrosefläche auf die Gesamtfläche des Präparats normiert. Hierfür ist in der Literatur der Begriff „Collagen Proportionate Area<sup>7</sup>“ (CPA) als relativer Anteil von Kollagen an der Gewebsfläche geläufig (138).

---

<sup>6</sup> Da sich schon geringe Unterschiede in der Intensität der Präparatfärbung maßgeblich auf die detektierten Areale auswirken, können nicht dieselben Thresholds für alle Slides verwendet werden.

<sup>7</sup> Ursprünglich für chronische virale Hepatitiden validiert, wurde die CPA mittlerweile auch bei NAFLD als akkurate Methode für die Fibrosequantifizierung und als unabhängiger Prädiktor für das Langzeit-Outcome beschrieben (139).

Die folgenden CPAs wurden berechnet, um eine Differenzierung zwischen perizellulärer<sup>8</sup> und septaler bzw. portaler Fibrose zu ermöglichen:

$$\text{Overall CPA (Gesamtfibrose in \%)} = \frac{\text{gesamte Fibrosefläche } (\mu\text{m}^2)}{\text{Gesamtfläche } (\mu\text{m}^2)} * 100$$

$$\text{Pericellular CPA (perizelluläre Fibrose in \%)} = \frac{\text{lobuläre Fibrose } (\mu\text{m}^2)}{\text{Gesamtfläche } (\mu\text{m}^2)} * 100$$

$$\text{Septal\&portal CPA (septale \&portale Fibrose in \%)} = \frac{\text{gesamte Fibrosefläche} - \text{lobuläre Fibrose } (\mu\text{m}^2)}{\text{Gesamtfläche } (\mu\text{m}^2)} * 100$$

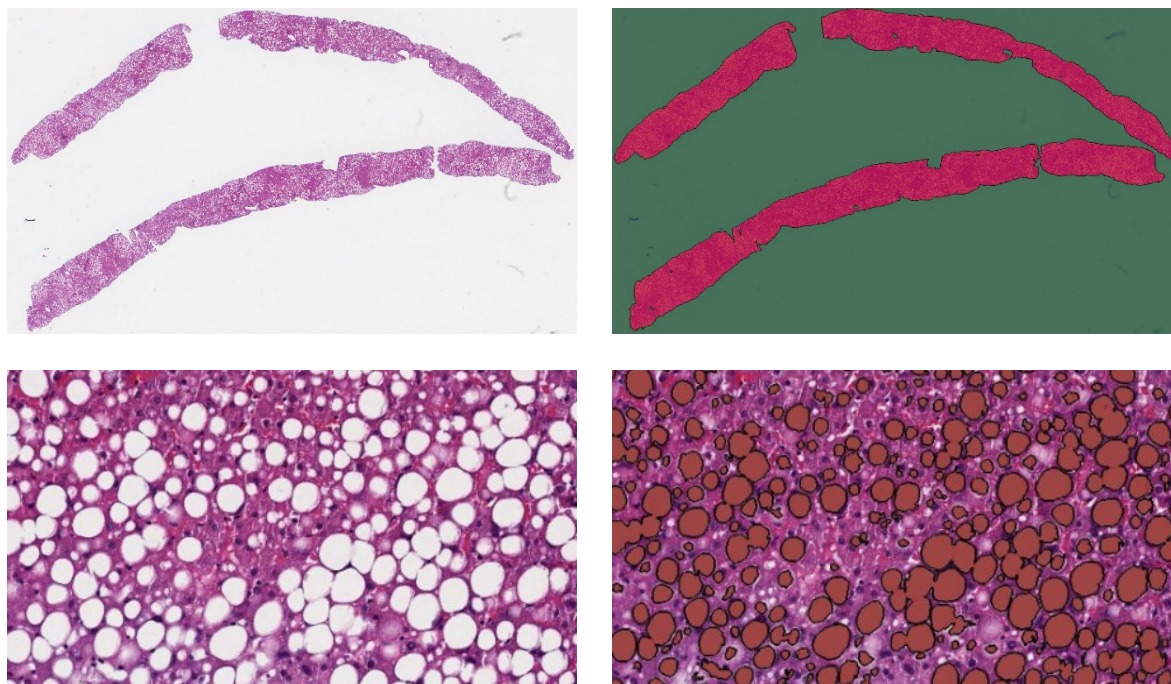
$$\text{Verhältnis septal\&portal CPA zu pericellular CPA} = \frac{\text{septal\&portal CPA}}{\text{pericellular CPA}}$$

Für die Steatose-Analysen wurden HE-gefärbte Slides verwendet, wobei nur die Präparate ab Juni 2012 vermessen wurden, da zuvor noch keine CAP-Werte erhoben worden waren. Als erstes erfolgt eine automatische Erkennung der Präparatfläche und Differenzierung vom Hintergrund. Größere Gefäße werden automatisch erkannt und nicht der Präparatfläche zugerechnet. Verunreinigungen am Slide, die Gewebe vortäuschen, oder andere Gewebspartikel wie Haut oder Subkutis müssen durch manuelle Nachjustierung ausgeschlossen werden. Bei der Detektion der Steatose macht man sich zunutze, dass das von der Software bereitgestellte Tool zur Erkennung von Gefäßen („Vessel Detection“) auch Fetttropfen als solche erkennt und markiert. Durch manuelle Veränderung der Parameter „Stain Threshold“, „Minimum Stain Area“ und „Gap to close“ („Vessel Detection“) sowie der Parameter „Roundness“, „Length/Width“ und „Shape Index“ („Vessel Classification“) müssen in weiterer Folge die Einstellungen unter visueller Kontrolle der markierten Strukturen so modifiziert werden, dass nur mehr makrovesikuläre Fetttropfen, jedoch keine kleinen Gefäße, Lebersinusoide oder schwach gefärbten Hepatozyten erkannt werden (Abbildung 8). Anschließend vermisst die Software die Präparatfläche sowie die Gesamtfläche der detektierten Fetttropfen. Die Fat Proportionate Area (FPA), welche dem Steatoseanteil an der Parenchymfläche entspricht (140), wurde wie folgt berechnet:

$$\text{FPA (\%)} = \frac{\text{Fläche Steatoseareale } (\mu\text{m}^2)}{\text{Gesamtfläche } (\mu\text{m}^2) - \text{Fibrosefläche } (\mu\text{m}^2)} * 100$$

---

<sup>8</sup> umfasst hier genau genommen perizelluläre, -venuläre und -sinusoidale Fibrose



**Abbildung 8. Digitale Bildanalyse: Steatose.** Automatische Erkennung der Präparatfläche und Differenzierung vom Hintergrund (*Screenshots oben*). Die Fettvakuolen (*Screenshot links unten*) werden vom Algorithmus detektiert (*rote Markierung, Screenshot rechts unten*) und nach manueller Feinadjustierung deren Fläche berechnet.

## 2.6 Statistische Analysen

Die erhobenen klinischen und laborchemischen Daten und die Ergebnisse der nichtinvasiven Messungen und histologischen Befundung wurden mit Methoden der deskriptiven Statistik zusammengefasst. Kategoriale Merkmale wurden als absolute (Anzahl) und relative (Prozent) Häufigkeiten dargestellt und für kontinuierliche Variablen der Median, unteres und oberes Quartil ( $Q_1, Q_2$ ) sowie die Spannweite (Range) angegeben. Zur graphischen Veranschaulichung wurden Balkendiagramme, Box-Whisker-Plots und Streudiagramme erstellt. Vergleiche zwischen Gruppen wurden für qualitative Zielgrößen mit dem Chi-Quadrat-Test bzw. exakten Fisher-Test und für quantitative Zielgrößen mit den nichtparametrischen Rangsummentests Mann-Whitney-U-Test (zwei unabhängige Stichproben) oder Kruskal-Wallis-Test ( $> 2$  unabhängige Stichproben; Bonferroni-Korrektur für Post-hoc-Tests) angestellt. Um die Stärke des Zusammenhangs von Variablen zu quantifizieren, wurden Rangkorrelationsanalysen nach Spearman (Rangkorrelationskoeffizient  $\rho$ ) durchgeführt. Die diagnostische Genauigkeit der nichtinvasiven Tests wurde mittels ROC-Analysen (Receiver Operating Characteristic) untersucht und als Fläche unter der ROC-Kurve (AUROC) graphisch dargestellt. Nach den Boursier-Kriterien „unzuverlässige“ Lebersteifigkeits-Werte wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Optimale Schwellenwerte der Tests wurden mit dem maximalen

Youden-Index (Sensitivität + Spezifität – 1) ermittelt. Für diese sowie für publizierte Cut-offs wurden die diagnostischen Gütewerte Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert (PPV, NPV) sowie positive und negative Likelihood-Ratio (LR+, LR–) berechnet. Die Auswertungen wurden mit Microsoft Excel 2013 und IBM SPSS Statistics 26 durchgeführt und die präsentierten ROC-Kurven mit Graphpad Prism 8 erstellt. Für alle statistischen Tests wurde ein zweiseitiges Signifikanzniveau von 5 % festgelegt.

### 3 Ergebnisse – Resultate

#### 3.1 Ablauf und Studienpopulation

Die finale Studienpopulation bestand aus 41 Männern (67,2 %) und 20 Frauen (32,8 %) mit klinischem Verdacht auf NAFLD ohne Hinweis auf andere Lebererkrankungen, bei denen verwertbare Gewebeproben entnommen und gültige Lebersteifigkeitsmessungen sowie Laborwertbestimmungen durchgeführt worden waren (Abbildung 9). Da die Möglichkeit der CAP-Messung in Graz erst ab Juni 2012 gegeben war, waren CAP-Werte nur für 37 Personen vorhanden. 19 der 80 PatientInnen in der NAFLD-Datenbank konnten bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden, da entweder die Einschlusskriterien nicht erfüllt wurden, keine Messergebnisse der VCTE vorlagen, kein bzw. nur unzureichendes Biopsiematerial zur Verfügung stand oder der histologische Befund eine andere Lebererkrankung nahelegte.

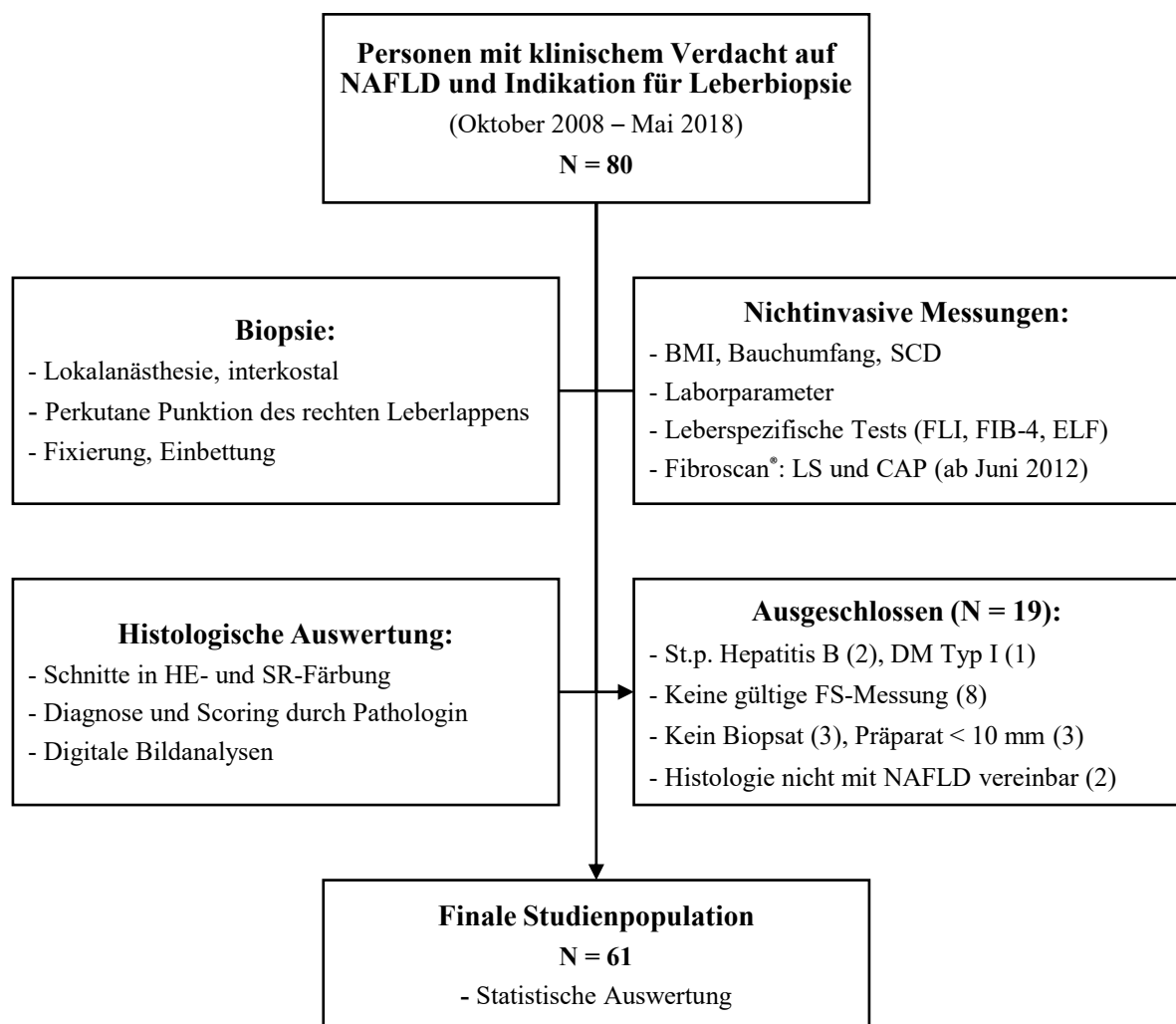


Abbildung 9. Studienablauf

### 3.2 Klinische und laborchemische Daten

Die demographischen, klinischen und laborchemischen Merkmale der Kohorte sind in Tabelle 4 dargestellt. Alle ProbandInnen gaben einen Alkoholkonsum unter den EASL-Grenzwerten von durchschnittlich 30 g (Männer) bzw. 20 g (Frauen) pro Tag an. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Leberpunktion betrug 52 Jahre. Der BMI lag im Median bei 28,4 kg/m<sup>2</sup>, wobei 41 % adipös (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) waren. Der mediane Bauchumfang betrug 101 cm und die mediane sonographisch gemessene SCD 22 mm. Ein diagnostizierter DM II lag bei 24,6 % der PatientInnen vor, 44,3 % litten an arterieller Hypertonie und 37,3 % erfüllten die Kriterien des metabolischen Syndroms. 55 StudienteilnehmerInnen (90,2 %) hatten die Leberpunktion und alle Laborwertbestimmungen am selben Tag, bei sechs Personen wurden die Laborwerte mit früheren oder späteren Daten ergänzt. Die maximale Zeitdifferenz zur Biopsie betrug 56 Tage.

**Tabelle 4. PatientInnencharakteristik**

Merkmal	Gesamte Studienpopulation (N = 61)		
	Verteilung	Range	n
Geschlecht: männlich / weiblich	41 (67,2) / 20 (32,8)	-	61
Alter (Jahre)	52 (40, 61)	19 – 78	61
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,4 (25,7, 31,8)	22,9 – 39,3	61
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) : < 25 / 25 – 30 / > 30	9 (14,8) / 27 (44,3) / 25 (41,0)	-	61
Bauchumfang (cm)	101 (94, 110)	87 – 187	52
SCD (cm)	22,0 (18,0, 24,0)	3,0 – 57,0	55
Diabetes Mellitus Typ II	15 (24,6)	-	61
Arterielle Hypertonie	27 (44,3)	-	61
Metabolisches Syndrom	23 (37,7)	-	55
Rauchen: ja / St.p.	8 (13,1) / 7 (11,5)	-	59
Glucose (mg/dl)	99 (88, 113)	61 – 276	61
Insulin (µU/ml)	12,1 (8,0, 21,2)	0,4 – 299,2	55
Triglyceride (mg/dl)	118 (84, 170)	41 – 1242	59
Gesamtcholesterin (mg/dl)	196 (176, 235)	128 – 308	59
HDL (mg/dl)	39 (32, 49)	15 – 112	57
ALT (U/l)	66 (47, 111)	19 – 231	61
AST (U/l)	51 (34, 73)	16 – 350	61
GGT (U/l)	104 (72, 222)	19 – 1364	61
AP (U/l)	73 (62, 96)	31 – 260	61

Bilirubin gesamt (mg/dl)	0,72 (0,54, 0,89)	0,31 – 2,27	61
Bilirubin direkt (mg/dl)	0,21 (0,15, 0,25)	0,09 – 1,17	57
Cholinesterase (U/l)	8990 (7261, 10448)	4094 – 15332	61
Albumin (g/dl)	4,6 (4,4, 4,8)	3,5 – 5,4	61
PZ (%)	96 (89, 103)	62 – 120	61
INR	1,03 (0,98, 1,07)	0,87 – 1,34	61
MCV (fl)	86,5 (84,0, 89,5)	78,5 – 99,1	61
Leukozytenzahl (G/l)	5,90 (4,94, 6,95)	2,80 – 9,95	61
Thrombozytenzahl (G/l)	212 (180, 244)	72 – 332	61
Kreatinin (mg/dl)	0,91 (0,79, 1,01)	0,58 – 1,26	61
HOMA-IR	3,43 (1,63, 5,12)	0,10 – 185,43	55

*Quantitative Merkmale sind als Median ( $Q_1$ ,  $Q_2$ ) und Range, qualitative Merkmale als absolute Häufigkeiten (relative Häufigkeiten in %) dargestellt. Alle Laborparameter stellen Nüchternwerte dar. Definition des metabolischen Syndroms nach AHA/NHLB (133): wenn  $\geq 3$  der folgenden Kriterien erfüllt: (i) Bauchumfang  $\geq 102$  cm ( $\text{♂}$ ) bzw.  $\geq 88$  cm ( $\text{♀}$ ); (ii) Triglyceride im Serum  $\geq 150$  mg/dl oder medikamentöse Therapie der Hypertriglyceridämie; (iii) HDL  $< 40$  mg/dl ( $\text{♂}$ ) bzw.  $< 50$  mg/dl ( $\text{♀}$ ) oder bestehende Pharmakotherapie; (iv) Blutdruck systolisch  $\geq 130$  mmHg oder diastolisch  $\geq 85$  mmHg oder antihypertensive Therapie; (v) Nüchternblutzucker  $> 100$  mg/dl oder medikamentöse Therapie der Hyperglykämie.*

### **3.3 Nichtinvasive leberspezifische Tests**

Die Ergebnisse der nichtinvasiven leberspezifischen Tests in der Studienpopulation zeigt Tabelle 5. Bei allen 61 PatientInnen wurde die LS ermittelt, 53 Messungen (86,9 %) fanden am Tag der Biopsie statt. Die maximale Zeitdifferenz der restlichen Messungen zur LP betrug 56 Tage. Die M-Sonde kam 48 Mal zum Einsatz, die XL-Sonde neun Mal. In vier Fällen war die verwendete Sonde im Studienprotokoll nicht angegeben. 56 LS-Werte (91,8 %) können nach den Boursier-Kriterien als „zuverlässig“ und somit aussagekräftig eingestuft werden. Der mediane Wert der zuverlässigen Messungen lag bei 7,6 kPa (Range: 4,0 – 75,0 kPa). CAP-Werte konnten bei 37 Personen erhoben werden, der Median betrug 309 dB/m (Range: 220 dB/m – 382 dB/m) und die mediane IQR innerhalb eines Untersuchungsvorgangs 24 dB/m.

**Tabelle 5. Nichtinvasive leberspezifische Tests**

Merkmal	Gesamte Studienpopulation (N = 61)		
	Verteilung	Spannweite	n
FLI	83 (67, 95)	32 – 100	52
FIB-4	1,39 (0,85, 2,31)	0,40 – 10,76	61
ELF	8,35 (8,03, 9,35)	6,87 – 13,10	53
LS (kPa), alle Messungen	8,7 (6,0, 17,0)	4,0 – 75,0	61
IQR/Med, alle Messungen (%)	15 (11, 23)	0 – 84	61
Zuverlässigkeitskriterien erfüllt: ja / nein	56 (91,8) / 5 (8,2)	-	-
LS, nur „reliable“ (kPa)	7,6 (5,9, 17,1)	4,0 – 75,0	56
IQR/Med, nur reliable LSMs (%)	15 (11, 21)	0 – 45	56
CAP (dB/m)	309 (284, 342)	220 – 382	37
IQR (dB/m)	24 (16, 37)	10 – 72	37
Sonde FS: medium / X-large / k. A.	48 (78,7) / 9 (14,8) / 4	-	-

Daten angegeben als Median ( $Q_1$ ,  $Q_3$ ) und Range bzw. absolute Häufigkeiten (relative Häufigkeiten in %). Unzuverlässige („unreliable“) LSM nach Boursier-Kriterien: wenn IQR/Med > 30 % bei LS > 7,0 kPa (130).

### 3.4 Leberhistologie

Tabelle 6 fasst die Ergebnisse der histologischen Beurteilung zusammen. Die mediane Länge der Biopsien betrug 23 mm, wobei 56 Stanzzyylinder (91,8 %) über 15 mm lang und 42 (68,9 %) über 20 mm lang waren. Fünf Präparate mit einer Länge zwischen 10 und 15 mm wurden in der Auswertung mitberücksichtigt, da die Qualität des repräsentierten Lebergewebes in diesen Fällen von der Pathologin als ausreichend für eine konfidente Diagnose eingeschätzt wurde. Das zusätzlich verwendete Fibrose-Staging-System nach EPoS erwies sich als einfach anwendbar und es bestand eine perfekte Korrelation mit den CRN-Fibrosestadien ( $\rho = 0,99$ ,  $p < 0,001$ ).

In 30 Fällen (49,2 %) wurde eine NAFL und in 17 Fällen (27,9 %) eine NASH diagnostiziert. Personen mit Steatohepatitis hatten im Vergleich zu jenen mit einfacher Fettleber (s. Tabelle 16 im Anhang) häufiger Adipositas ( $p = 0,010$ ) und DM II ( $p = 0,009$ ), einen größeren Bauchumfang ( $p = 0,033$ ), höhere Serumwerte von Glucose, Insulin ( $p = 0,004$  für beide) und AST ( $p = 0,019$ ) sowie einen höheren HOMA-Index ( $p = 0,002$ ). Weiters erzielten NASH-PatientInnen höhere Werte bei FLI, FIB-4 ( $p = 0,006$  für beide), ELF ( $p < 0,001$ ) und LS ( $p = 0,003$ ) und wiesen im histologischen Staging einen höheren Anteil an fortgeschrittenen Fibrosestadien und Zirrhose auf ( $p = 0,005$ ).

**Tabelle 6. Histopathologische Auswertung**

Merkmal	Gesamte Studienpopulation (N = 61)		
		Verteilung	Range
Länge der Biopsiezylinder (mm)		23 (18, 33)	10 – 60
Steatosegrad	S0	14 (23,0)	-
	S1	23 (37,7)	-
	S2	13 (21,3)	-
	S3	11 (18,0)	-
Lobuläre Inflammation	I0	7 (11,5)	-
	I1	20 (32,8)	-
	I2	26 (42,6)	-
	I3	8 (13,1)	-
Ballooning	B0	42 (68,9)	-
	B1	13 (21,3)	-
	B2	6 (9,8)	-
Portale Inflammation	0	53 (86,9)	-
	1	8 (13,1)	-
Fibrosestadium (CRN)	F0	27 (44,3)	-
	F1a	8 (13,1)	-
	F1b	1 (1,6)	-
	F1c	4 (6,6)	-
	F2	6 (9,8)	-
	F3	9 (14,8)	-
	F4 (Zirrhose)	6 (9,8)	-
Fibrosestadium (EPoS)	0	27 (44,3)	-
	1	14 (23,0)	-
	2	5 (8,2)	-
	3	4 (6,6)	-
	4	5 (8,2)	-
	5	0 (0,0)	-
	6 (Zirrhose)	6 (9,8)	-
Diagnose NAFLD (S ≥ 1)		47 (77,0)	-
	NAFL	30 (49,2)	-
	NASH	17 (27,9)	-
Anteil steatotischer Hepatozyten, geschätzt (%)		35 (20, 65)	5 – 90
Steatoseanteil an Präparatfläche, geschätzt (%)		30 (10, 50)	5 – 90

Angabe der Daten als absolute Häufigkeiten (relative Häufigkeit in %) bzw. Median ( $Q_1$ ,  $Q_3$ ) und Range. Grading und Staging gemäß NASH CRN Scoring System und EPoS Staging System (für Definitionen s. Tabelle 3 und Tabelle 15). Die Schätzung des Steatoseanteils durch die Pathologin wurde nur bei bestätigter NAFLD durchgeführt ( $n = 47$ ), der Steatoseanteil der restlichen Präparate betrug jeweils  $< 5\%$ .

14 Präparate (23,0 %) wurden als „No NAFLD“ (S0) klassifiziert. In diese Gruppe fielen acht Personen mit nur minimaler Steatose und keinen oder kaum lobulären Entzündungsherden (I0 – I1) ohne Fibrosierung. Drei S0-Präparate wiesen die Fibrosestadien F1 bis F2 auf und zwei hatten eine fortgeschrittene Fibrose (F3) ohne

ausgeprägte lobuläre Entzündungszeichen oder Ballonierung („kryptogene Fibrose“). Eine Person der S0-Gruppe litt an Zirrhose (F4), wobei in den Parenchymknoten prominentes Ballooning (B2) und einige aktive lobuläre Entzündungsherde (I2) festgestellt wurden und somit in erster Linie von einer NASH-assoziierten Zirrhose ausgegangen werden kann.

### 3.5 Morphometrische Messungen

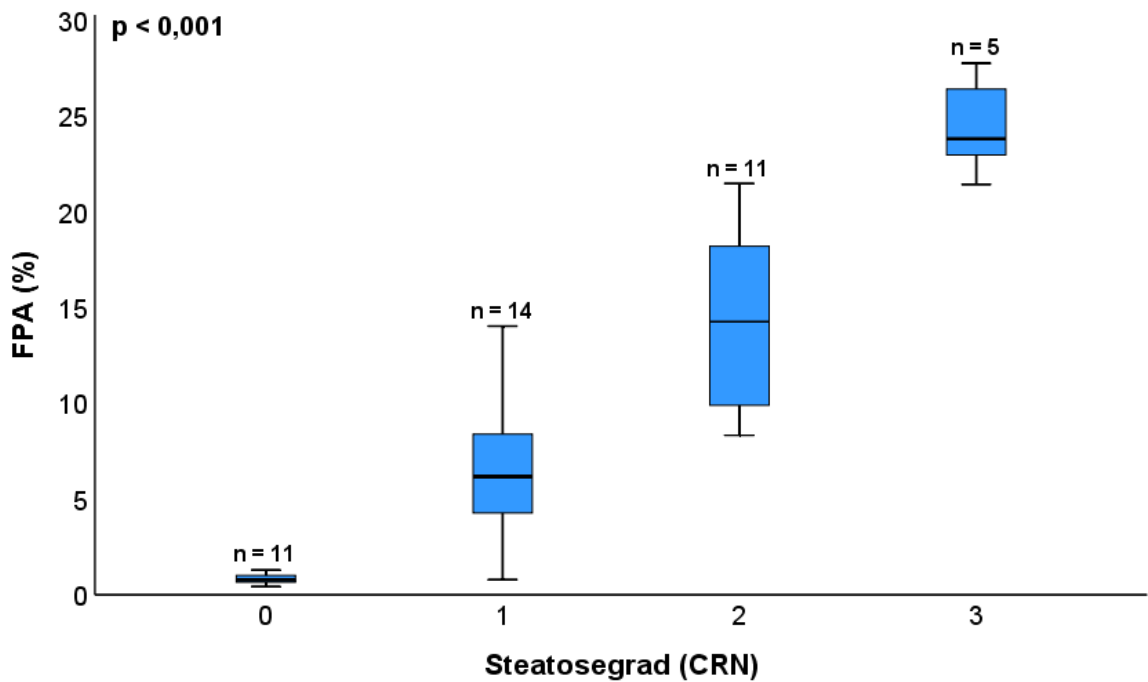
Die Ergebnisse der digitalen Bildanalysen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die CPA konnte an 60 Präparaten ermittelt werden. Ein Präparat musste aufgrund fehlenden Materials für die Digitalisierung von der morphometrischen Quantifizierung ausgeschlossen werden. Der mediane Gesamtfibroseanteil (overall CPA) in der Studienpopulation lag bei 1,6 % (Range: 0,3 – 25,9), die lobuläre Fibrose machte im Median 0,5 % (Range: 0,1 – 5,5) der Präparatfläche aus. Für die Steatoseanalysen wurden 41 Präparate vermessen. Die mediane FPA betrug 7,8 % (Range: 0,4 – 27,8).

**Tabelle 7. Digitale Bildanalysen**

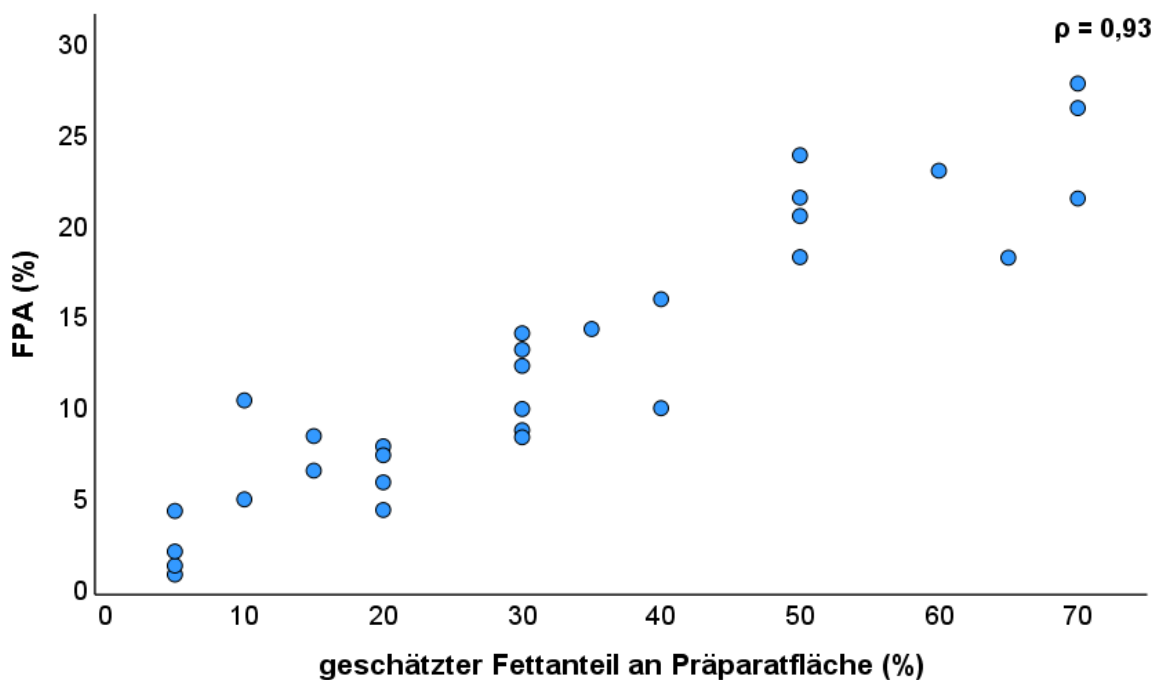
Morphometrische Messung	Median	IQR	Range	n
FPA (%)	7,83	(1,11, 15,10)	0,42 – 27,77	41
Overall CPA (%)	1,62	(0,89, 3,62)	0,30 – 25,85	60
Pericellular CPA (%)	0,54	(0,25, 1,04)	0,07 – 5,52	60
Septal&portal CPA (%)	1,16	(0,51, 2,55)	0,20 – 24,09	60
Verhältnis septal&portal : pericellular CPA	2,40	(1,31, 4,99)	0,36 – 20,83	60

#### 3.5.1 Steatose

Abbildung 10 zeigt die Verteilung des morphometrisch quantifizierten Fettanteils, aufgeschlüsselt nach dem histologischen Grading durch die Pathologin. In der S0-Gruppe lag die mediane FPA bei 0,8 % (IQR: 0,6 – 1,1), in der S1-Gruppe bei 6,2 % (IQR: 3,7 – 8,9), in der S2-Gruppe bei 14,3 % (IQR: 9,9 – 18,2) und in der S3-Gruppe bei 23,9 % (IQR: 22,2 – 27,1%). Der morphometrisch gemessene Fettanteil korrelierte sehr gut mit dem semiquantitativen histologischen Steatose-Score ( $\rho = 0,91$ ,  $p < 0,001$ ). Ein noch stärkerer Zusammenhang ( $\rho = 0,93$ ,  $p < 0,001$ ) ergab sich mit dem von der Pathologin auf fünf Prozent genau geschätzten Steatoseanteil an der Präparatfläche (Abbildung 11).



**Abbildung 10. Box-Whisker-Plot: Morphometrisch gemessene FPA vs. histologische Steatosegrade.** Die semiquantitativen Steatosegrade unterschieden sich in ihrem absoluten Fettgehalt: Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,001$ ; Post-hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur, 0-1:  $p = 0,054$ ; 0-2:  $p < 0,001$ ; 0-3:  $p < 0,001$ ; 1-2:  $p = 0,170$ ; 1-3:  $p = 0,010$ ; 2-3:  $p = 0,962$ .



**Abbildung 11. Streudiagramm: morphometrisch gemessene FPA vs. histologisch geschätzten Steatoseanteil an der Präparatfläche.** Schätzung durch die Pathologin auf 5 Prozent genau, S0-Fälle ( $< 5\%$  Fettanteil) wurden nicht berücksichtigt. Es bestand ein starker positiver Zusammenhang: Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho = 0,93$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 30$ . Das absolute Ausmaß des Fettanteils wurde bei der visuellen Beurteilung jedoch überschätzt.

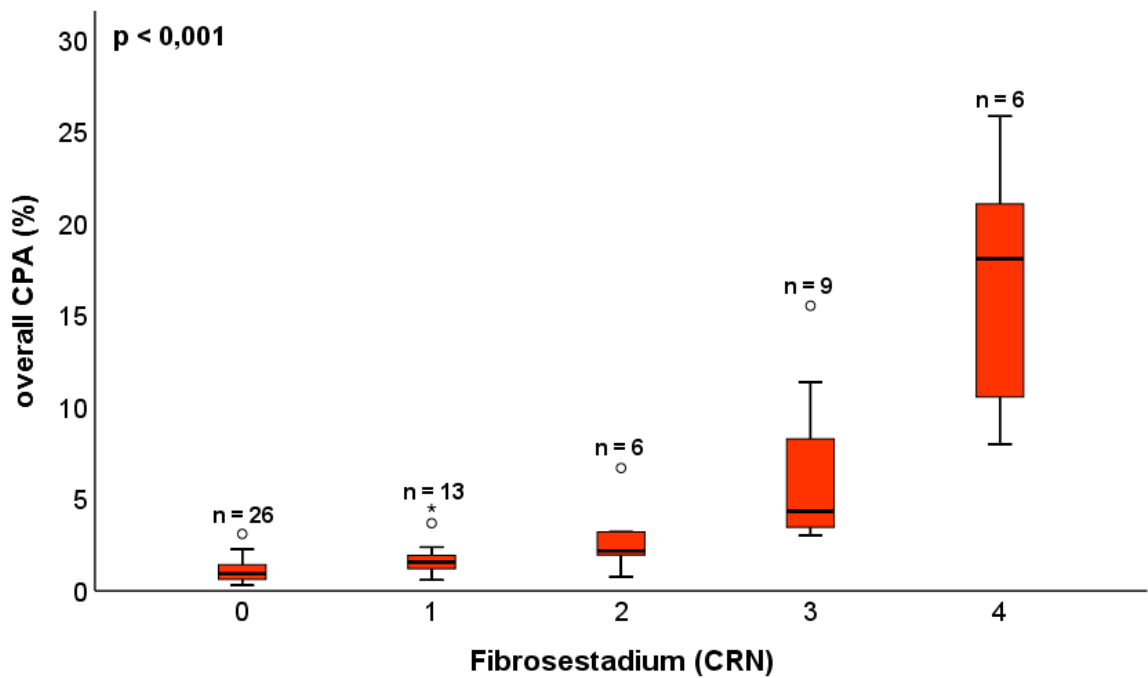
Der tatsächliche Leberfettgehalt war mit folgenden Variablen positiv assoziiert: Insulin ( $\rho = 0,34$ ,  $p = 0,048$ ), Triglyceride ( $\rho = 0,43$ ,  $p = 0,007$ ), ALT ( $\rho = 0,41$ ,  $p = 0,008$ ), Albumin ( $\rho = 0,56$ ,  $p < 0,001$ ), CHE ( $\rho = 0,44$ ,  $p = 0,004$ ), Leukozytenzahl ( $\rho = 0,38$ ,  $p = 0,015$ ), CAP (s. Kapitel 3.6) und lobulärer Inflamationsgrad ( $\rho = 0,50$ ,  $p = 0,001$ ). Eine negative Assoziation bestand mit der AP ( $\rho = -0,41$ ,  $p = 0,007$ ) und der perizellulären CPA ( $\rho = -0,32$ ,  $p = 0,040$ ).

### 3.5.2 Fibrose

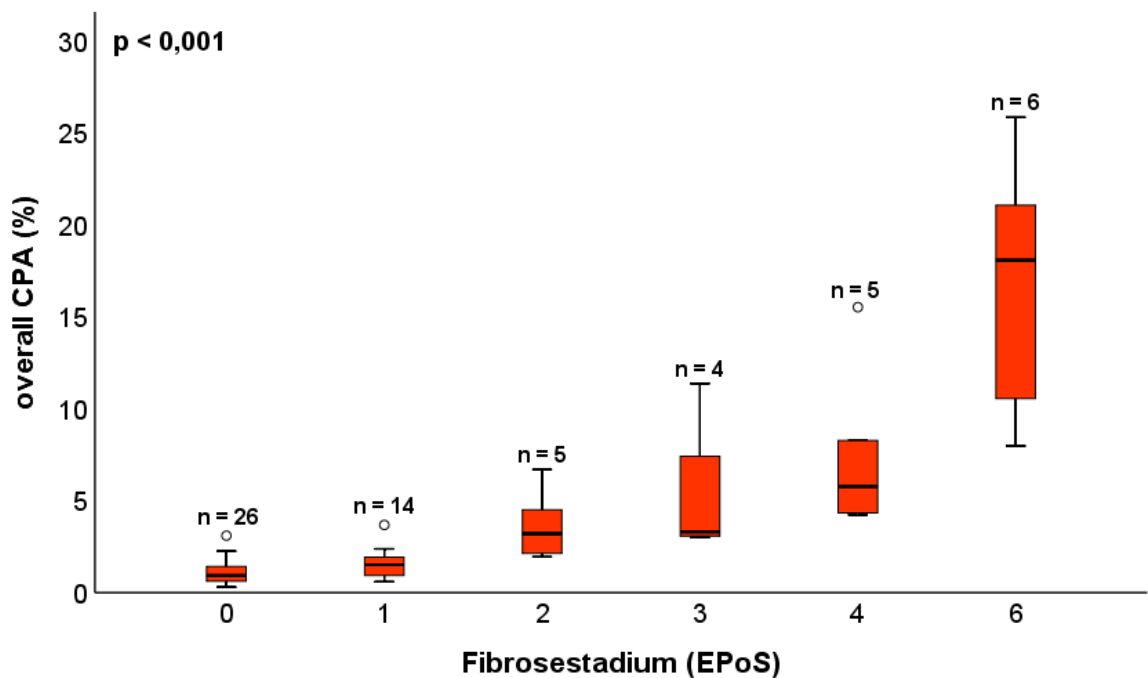
Die morphometrisch gemessenen Gesamtfibroseanteile (overall CPAs) sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 in Box-Plots nach den Fibrorestadien (CRN bzw. EPoS) aufgeschlüsselt aufgetragen. Auch wenn das Fibrose-Staging definitionsgemäß keine rein quantitative Beurteilung der Fibrosemenge darstellt, wird deutlich, dass mit höheren Fibrorestadien in der Regel auch eine höhere Fibrosemenge assoziiert war. Die mediane Gesamt-CPA (IQR in Klammer angegeben) für die CRN-Fibrorestadien 0, 1, 2, 3 und 4 betrug 0,9 % (0,6 – 1,4), 1,6 % (1,1 – 2,2), 2,2 % (1,6 – 4,1), 4,3 % (3,3 – 9,8) und 18,1 % (10,0 – 22,3). Es bestand eine gute Korrelation mit den Fibrorestadien nach CRN ( $\rho = 0,78$ ) und EPoS ( $\rho = 0,80$ ). Gleiches gilt für die perizelluläre ( $\rho_{\text{CRN}} = 0,74$ ,  $\rho_{\text{EPoS}} = 0,76$ ) und die septale CPA ( $\rho_{\text{CRN}} = 0,75$ ,  $\rho_{\text{EPoS}} = 0,76$ ;  $p$  jeweils  $< 0,001$ ).

Darüber hinaus korrelierte die Gesamtfibrosemenge mit dem Alter ( $\rho = 0,44$ ,  $p < 0,001$ ), der BMI-Klasse ( $\rho = 0,26$ ,  $p = 0,041$ ), dem Bauchumfang ( $\rho = 0,32$ ,  $p = 0,023$ ), der Nüchtern-glucose ( $\rho = 0,52$ ,  $p < 0,001$ ), dem Insulin ( $\rho = 0,35$ ,  $p = 0,010$ ), der AST ( $\rho = 0,41$ ,  $p = 0,001$ ), der AP ( $\rho = 0,33$ ,  $p = 0,010$ ), dem Gesamtbilirubin ( $\rho = 0,29$ ,  $p = 0,023$ ), der INR ( $\rho = 0,38$ ,  $p = 0,003$ ), dem MCV ( $\rho = 0,38$ ,  $p = 0,003$ ), dem HOMA-Index ( $\rho = 0,42$ ,  $p = 0,002$ ) sowie mit der Lebersteifigkeit (s. Kapitel 3.8), der IQR der intraindividuellen Lebersteifigkeitsmessungen ( $\rho = 0,42$ ,  $p = 0,001$ ), dem FIB-4-Index, dem ELF (beide s. Kapitel 3.8), dem FLI (s. Kapitel 3.7), dem Ballooning-Score ( $\rho = 0,54$ ,  $p < 0,001$ ) und der portalen Inflammation ( $\rho = 0,30$ ,  $p = 0,020$ ). Ein inverser Zusammenhang bestand mit der PZ ( $\rho = -0,41$ ,  $p = 0,001$ ) und der Thrombozytenzahl ( $\rho = -0,28$ ,  $p = 0,028$ ).

Präparate von PatientInnen mit Adipositas ( $p = 0,031$ ), DM II ( $p = 0,001$ ), metabolischem Syndrom ( $p = 0,012$ ) oder NASH ( $p = 0,001$ ) wiesen jeweils signifikant höhere Gesamtfibroseanteile auf als Biopsate von Personen ohne diese Erkrankungen.



**Abbildung 12. Box-Whisker-Plot: morphometrisch gemessene overall CPA vs. CRN-Fibrosestadien.** Der Gesamtfibroseanteil stieg mit höherem Fibrosestadium: Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,001$ . In den Post-hoc-Tests bestand nach Bonferroni-Korrektur ein signifikanter Unterschied zwischen den Stadien 0 und 3 ( $p < 0,001$ ), 0 und 4 ( $p < 0,001$ ) sowie 1 und 4 ( $p = 0,010$ ).

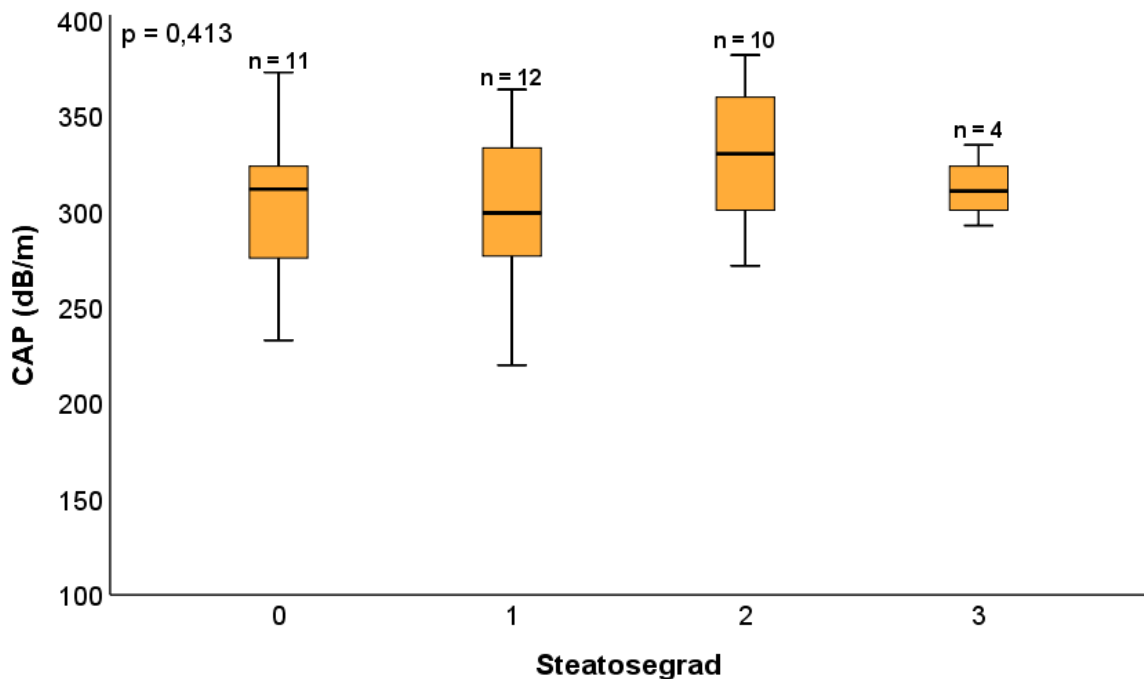


**Abbildung 13. Box-Whisker-Plot: morphometrisch gemessene overall CPA vs. EPoS-Fibrosestadien.** Der Gesamtfibroseanteil stieg mit höherem Fibrosestadium: Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,001$ . In den Post-hoc-Tests bestand nach Bonferroni-Korrektur ein signifikanter Unterschied zwischen den Stadien 0 und 3 ( $p = 0,042$ ), 0 und 4 ( $p = 0,002$ ), 0 und 6 ( $p < 0,001$ ) sowie 1 und 6 ( $p = 0,006$ ).

### 3.6 Controlled Attenuation Parameter

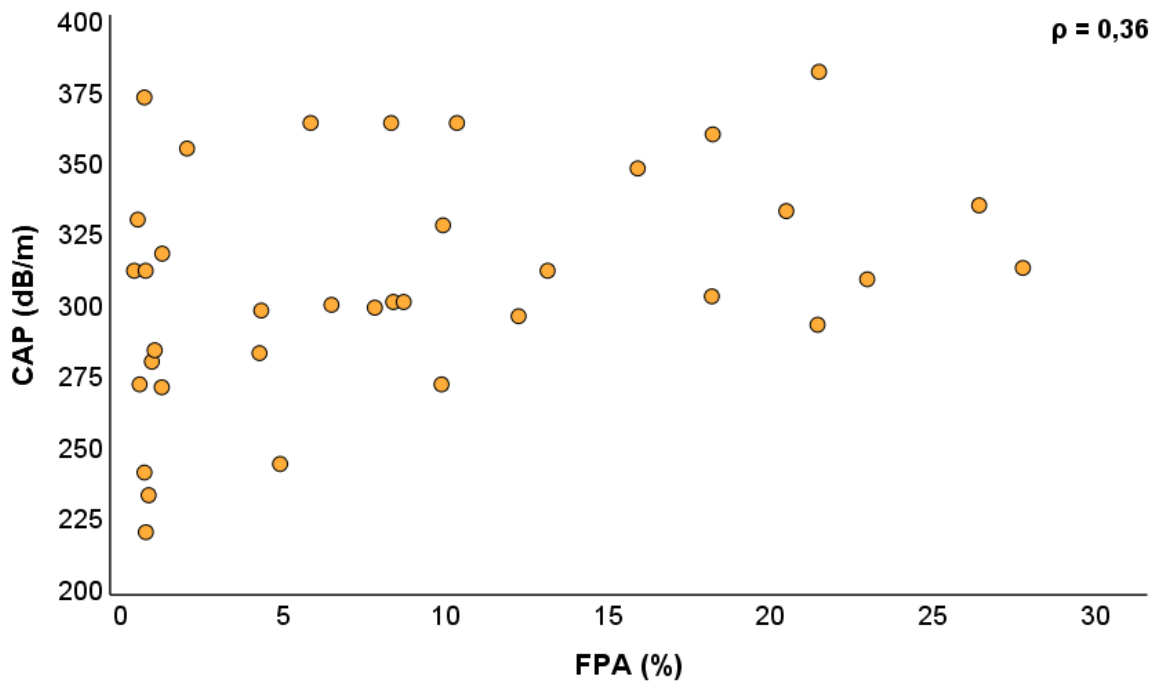
#### 3.6.1 Korrelation mit dem Leberfettgehalt

Abbildung 14 zeigt die Verteilung der CAP-Werte über die histologischen Steatosegrade. Der mediane CAP (IQR in Klammer) für S0, S1, S2 und S3 betrug 312 dB/m (272 – 330), 300 dB/m (274 – 344), 331 dB/m (300 – 361) und 311 dB/m (297 – 330). Die Messwerte unterschieden sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht ( $p = 0,413$ ) und es bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem CAP und den semiquantitativen Steatosegraden ( $\rho = 0,20$ ,  $p = 0,228$ ).



**Abbildung 14. Box-Whisker-Plot: Verteilung des CAP über die Steatosegrade.** Der CAP konnte die Steatosegrade nicht adäquat abbilden. Die Verteilung der Werte unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht: Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,413$ .

Eine schwache positive Korrelation konnte mit dem morphometrisch gemessenen Steatoseanteil (FPA) gefunden werden ( $\rho = 0,36$ ,  $p = 0,033$ ), wobei der CAP insbesondere bei niedrigem Steatosegehalt eine ausgeprägte Streuung aufwies (Abbildung 15).



**Abbildung 15. Streudiagramm: CAP vs. morphometrisch gemessene FPA.** Es bestand ein schwacher positiver Zusammenhang: Spearmans  $\rho = 0,36$ ,  $p = 0,033$ ,  $n = 36$ .

Um mögliche Einflüsse auf die Abbildung der Steatosemenge durch den CAP zu untersuchen, wurde die Studienpopulation retrospektiv nach potentiellen Einflussvariablen in Subgruppen unterteilt und die Korrelationskoeffizienten jeweils getrennt berechnet (Tabelle 8). In allen Gruppen korrelierte der CAP prinzipiell stärker mit der morphometrisch gemessenen FPA als mit dem geschätzten Steatosegrad. Berücksichtigt man nur CAP-Messungen, die am Tag der Leberpunktion durchgeführt wurden, erhöhen sich die Korrelationskoeffizienten. Ebenso steigt das Ausmaß der Korrelation, wenn Messungen mit einer IQR  $\geq 40$  dB/m ausgeschlossen werden.

Unterteilt man die Studienpopulation nach der medianen SCD (22 mm), dem Vorhandensein einer Adipositas ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) bzw. dem medianen Alter (52 Jahre), so zeigt sich, dass die CAP-Werte innerhalb der Gruppen mit einer SCD  $< 22$  mm, einem BMI  $< 30 \text{ kg/m}^2$  bzw. einem Alter  $< 52$  Jahren jeweils deutlich besser mit dem Steatosegrad und der FPA korrelierten als dies in der gesamten Studienpopulation der Fall war. Es bestand dann jeweils ein moderater positiver Zusammenhang des CAP mit der FPA und in der Gruppe der Nicht-Adipösen zeigte sich sogar ein schwacher positiver Zusammenhang mit den Steatosegraden. In den komplementären Gruppen (SCD  $\geq 22$  mm, BMI  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  bzw. Alter  $\geq 52$  Jahre) konnte dagegen praktisch überhaupt keine Assoziation des CAP mit der Fettmenge gefunden werden.

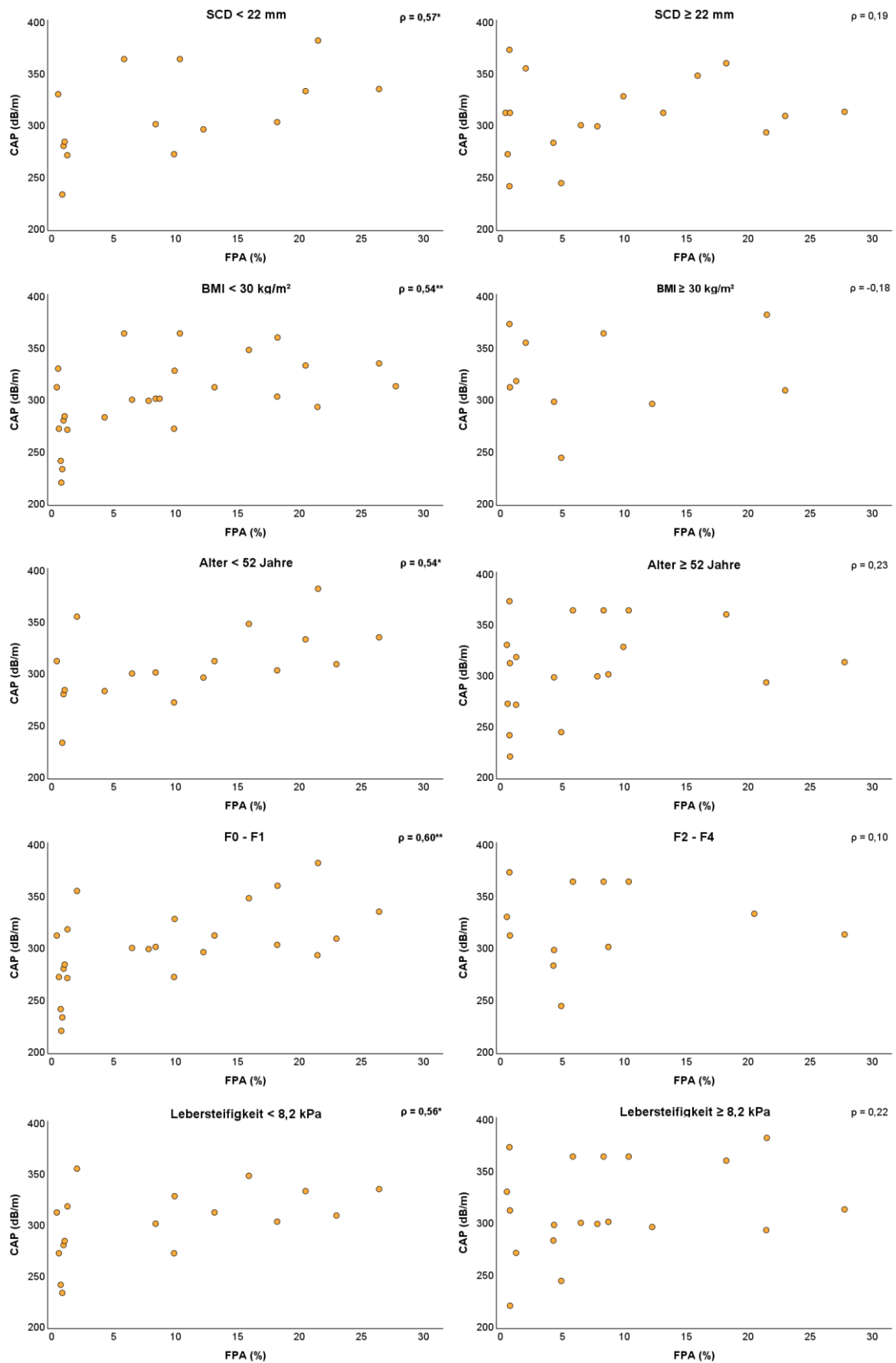
Außerdem schien das Vorliegen einer signifikanten Fibrosierung ( $F \geq 2$ ) einen Einfluss auf die CAP-Messung zu haben, da in diesem Fall der CAP überhaupt nicht mit dem Fettanteil korrelierte, während in der Gruppe mit nicht signifikanter Fibrosierung (F0 oder F1) wiederum ein moderater positiver Zusammenhang mit der FPA festgestellt werden konnte. Dies zeigte sich auch, wenn anstatt des histologisch verifizierten Fibrosestadiums der für das Stadium F2 von Eddowes et al publizierte Schwellenwert von 8,2 kPa in der LSM (100) als Trennpunkt der Gruppen verwendet wurde.

**Tabelle 8. Korrelationsanalysen des CAP mit dem Steatosegrad und der FPA**

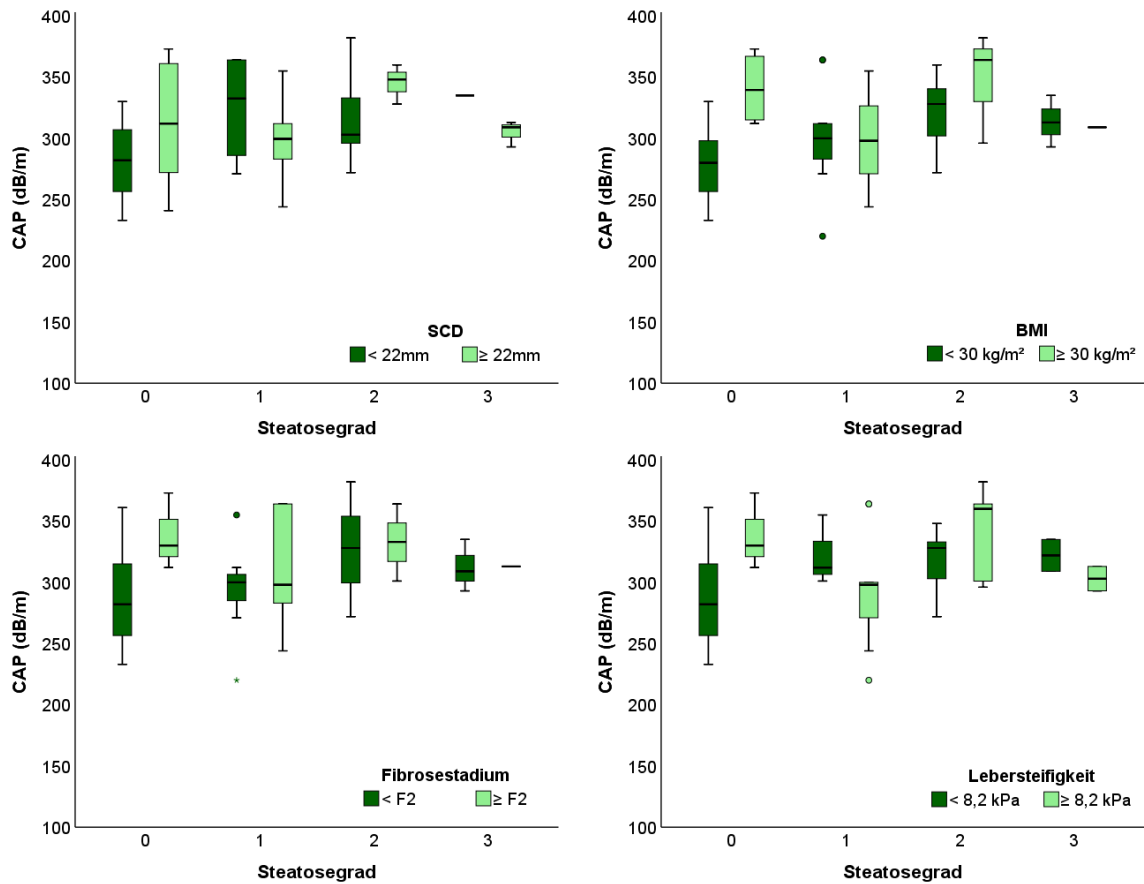
CAP	Steatosegrad			FPA		
	$\rho$	p-Wert	n	$\rho$	p-Wert	n
Alle Messungen	0,20	0,228	37	<b>0,36</b>	0,003	36
Messung am LP-Tag	0,27	0,144	30	<b>0,40</b>	0,033	29
IQR < 40 dB/m	0,30	0,103	31	<b>0,40</b>	0,024	31
IQR < 40 dB/m & LP-Tag	0,37	0,070	25	<b>0,46</b>	0,020	25
SCD < 22 mm	0,40	0,161	14	<b>0,57</b>	0,033	14
SCD $\geq$ 22 mm	0,06	0,818	18	0,19	0,467	17
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup>	<b>0,42</b>	0,033	26	<b>0,54</b>	0,005	26
BMI $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup>	-0,15	0,666	11	-0,18	0,627	10
Alter < 52 Jahre	0,28	0,259	18	<b>0,54</b>	0,026	17
Alter $\geq$ 52 Jahre	0,07	0,773	19	0,23	0,343	19
F < 2 (CRN)	0,32	0,123	25	<b>0,60</b>	0,002	24
F $\geq$ 2 (CRN)	-0,08	0,801	12	0,10	0,760	12
LS < 8,2 kPa	0,36	0,141	18	<b>0,56</b>	0,020	17
LS $\geq$ 8,2 kPa	0,00	0,991	19	0,22	0,358	19

*Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ( $\rho$ ). Signifikante Korrelationen sind fett gedruckt. Aufteilung der Studienpopulation für Subgruppenanalysen nach medianer SCD, Vorliegen einer Adipositas, medianem Alter und nach dem Vorliegen signifikanter Fibrosierung ( $F \geq 2$ ) bzw. eines dafür publizierten (100) Lebersteifigkeitswertes.*

Zur besseren Visualisierung des Einflusses der genannten Faktoren dienen Abbildung 16 und Abbildung 17. Es wird deutlich, dass die Höhe der CAP-Werte vor allem bei geringem Steatoseausmaß beeinflusst wurde.



**Abbildung 16. Streudiagramme: CAP vs. FPA in verschiedenen Subgruppen.** Signifikante Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten ( $\rho$ ) sind fett gedruckt, \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$ .



**Abbildung 17. Gruppierete Box-Whisker-Plots: Verteilung des CAP über die Steatosegrade für Personen mit SCD < und ≥ 22 mm (Grafik links oben), BMI < und ≥ 30 kg/m<sup>2</sup> (Grafik rechts oben), Fibroestadium < und ≥ F2 (Grafik links unten) bzw. Lebersteifigkeit < und ≥ 8,2 kPa (Grafik rechts unten).**

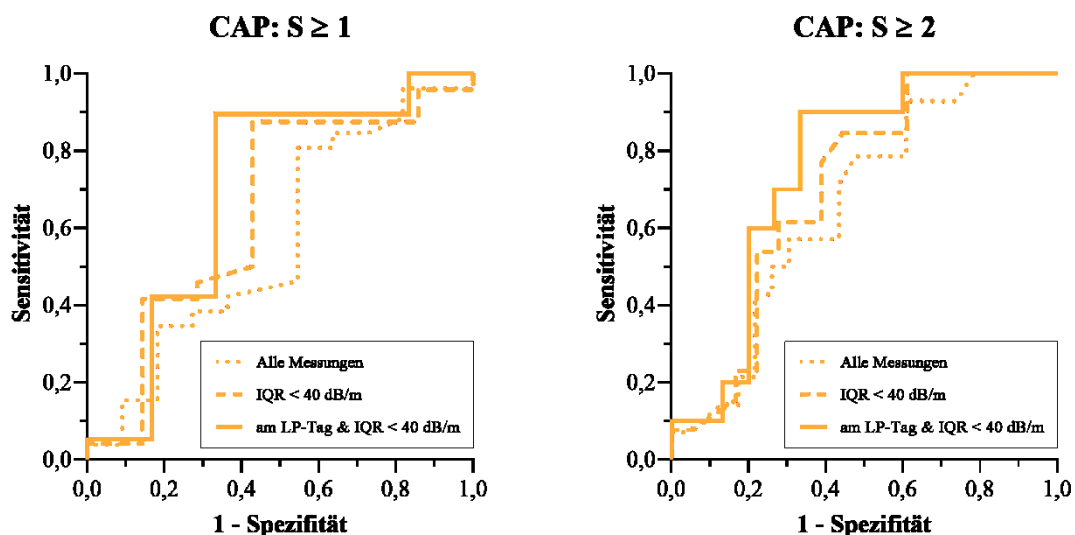
### 3.6.2 Diagnostische Performance und Schwellenwerte

Die Ergebnisse der ROC-Analysen sind in Tabelle 9 dargestellt. Bei der Auswertung aller gemessenen Werte konnte für den CAP keine statistisch signifikant von 0,5 verschiedene Fläche unter der ROC-Kurve für die Detektion der Steatosegrade  $S \geq 1$ ,  $S \geq 2$ ,  $S \geq 3$  oder einer NASH gefunden werden. Das bedeutet, dass der CAP in dieser Studienpopulation nicht in der Lage war, besser als ein Zufallsprozess zwischen „No NAFLD“ (S0) und NAFLD (S123) oder zwischen höheren Steatosegraden zu unterscheiden. Wurden nur Messungen vom Tag der LP berücksichtigt, erhöhte sich die diagnostische Performance. Ebenso wurden größere AUROCs erzielt, wenn nur Messungen mit einer intraindividuellen IQR unter 40 dB/m berücksichtigt wurden. Schließlich konnte für die Diagnose einer moderaten Steatose ( $S \geq 2$ ) am Leberpunktionstag bei CAP-Werten mit einer IQR < 40 dB/m eine AUROC von 0,75 (95%-KI: 0,56 – 0,95) ermittelt werden (Abbildung 18).

**Tabelle 9. ROC-Analysen des CAP für die Diagnose der Steatosegrade**

CAP	n	AUROC $S \geq 1$	AUROC $S \geq 2$	AUROC $S \geq 3$
		N = 26	N = 14	N = 4
Alle Messungen	37	0,57 (0,35 – 0,78)	0,66 (0,48 – 0,83)	0,54 (0,33 – 0,75)
Messung am LP-Tag	30	0,60 (0,36 – 0,84)	<b>0,73</b> (0,55 – 0,91)	0,53 (0,31 – 0,75)
IQR < 40 dB/m	31	0,65 (0,39 – 0,90)	<b>0,70</b> (0,52 – 0,89)	0,52 (0,29 – 0,74)
IQR < 40 dB/m & LP-Tag	25	0,69 (0,40 – 0,99)	<b>0,75</b> (0,56 – 0,95)	0,52 (0,29 – 0,76)
SCD < 22 mm	14	<b>0,78</b> (0,52 – 1,00)	0,65 (0,35 – 0,94)	<b>0,77</b> (0,54 – 1,00)
SCD $\geq$ 22 mm	18	0,47 (0,14 – 0,81)	0,65 (0,40 – 0,91)	0,42 (0,15 – 0,69)
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup>	26	<b>0,74</b> (0,52 – 0,95)	<b>0,73</b> (0,53 – 0,93)	0,64 (0,38 – 0,90)
BMI $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup>	11	0,32 (0,00 – 0,65)	0,57 (0,17 – 0,98)	0,30 (0,02 – 0,58)
Alter < 52 Jahre	18	0,65 (0,32 – 0,99)	0,64 (0,37 – 0,90)	0,66 (0,40 – 0,91)
Alter $\geq$ 52 Jahre	19	0,45 (0,18 – 0,77)	0,64 (0,40 – 0,89)	0,41 (0,14 – 0,68)
F (CRN) < 2	25	0,65 (0,40 – 0,90)	<b>0,71</b> (0,51 – 0,92)	0,58 (0,32 – 0,83)
F (CRN) $\geq$ 2	12	0,33 (0,00 – 0,69)	0,56 (0,24 – 0,89)	0,46 (0,16 – 0,75)
LSM < 8,2 kPa	18	0,73 (0,47 – 0,98)	0,66 (0,39 – 0,92)	0,66 (0,36 – 0,95)
LSM $\geq$ 8,2 kPa	19	<b>0,25</b> (0,01 – 0,49)	0,64 (0,39 – 0,90)	0,41 (0,09 – 0,73)

Flächen unter der ROC-Kurve mit signifikanter diagnostischer Trennschärfe ( $p < 0,05$ ) sind fett gedruckt. 95%-Konfidenzintervalle der AUROCs sind in Klammern angegeben. Aufteilung der Studienpopulation für Subgruppenanalysen nach medianer SCD, Vorliegen einer Adipositas, medianem Alter, und nach dem Vorliegen signifikanter Fibrosierung ( $F \geq 2$ ) bzw. eines dafür publizierten (100) Lebersteifigkeitswertes.



**Abbildung 18. ROC-Kurven des CAP für die Detektion einer milden ( $S \geq 1$ ) bzw. moderaten Steatose ( $S \geq 2$ ).** Die diagnostische Performance erhöhte sich, wenn Messungen mit einer IQR  $\geq$  40 dB/m ausgeschlossen und nur Messungen vom Biopsie-Tag berücksichtigt wurden.

Einen wesentlichen Einfluss auf die diagnostische Trennschärfe des CAP schienen der BMI und die SCD zu haben. Während bei Nicht-Adipösen und Personen mit geringer subkutaner Fettschicht (SCD < 22 mm) gute AUROCs von 0,74 bzw. 0,78 erreicht wurden, zeigte der CAP bei ProbandInnen mit einem BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> oder einer SCD  $\geq 22$  mm überhaupt keine diagnostische Trennschärfe. Auch ein möglicher Einfluss der Fibrose wird deutlich, da bei Personen ohne signifikante Fibrosierung größere AUROCs für die Detektion der Steatosegrade erzielt wurden als bei gleichzeitigem Vorliegen höherer Fibrorestadien. Ein ähnliches Bild zeigte sich, wenn die Kohorte nach dem Lebersteifigkeits-Grenzwert von 8,2 kPa) aufgeteilt wurde. Für einige wenige Subgruppen wurden optimale Cut-off-Werte des CAP und deren Gütemaße ermittelt, welche in Tabelle 10 angeführt sind<sup>9</sup>.

**Tabelle 10. Schwellenwerte und diagnostische Güte des CAP**

CAP	Cut-off	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	LR+	LR-
<b>S <math>\geq 1</math></b>							
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup>	<b>289 dB/m</b>	79 %	71 %	88 %	56 %	2,76	0,29
SCD < 22mm	<b>290 dB/m</b>	80 %	75 %	89 %	60 %	3,20	0,27
<b>S <math>\geq 2</math></b>							
LP-Tag & IQR < 40 dB/m	<b>302 dB/m</b>	90 %	67 %	64 %	91 %	2,70	0,15
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup>	<b>301 dB/m</b>	80 %	63 %	57 %	83 %	2,13	0,32

*Die Cut-off-Werte wurden mittels Youden-Index ermittelt.*

In einem weiteren Schritt wurden ROC-Analysen mit der morphometrisch gemessenen FPA als genauere Referenzmethode durchgeführt (Abbildung 19). Ein mindestens 5%iger Fettgehalt wurde vom CAP mit einer guten AUROC von 0,74 (95%-KI: 0,57 – 0,91) detektiert (optimaler Cut-off: 289 dB/m, Sensitivität 95 %, Spezifität 56 %, PPV 73 %, NPV 90 %, LR+ 2,17, LR– 0,09). Für die Diagnose von FPAs  $\geq 10$  % und  $\geq 20$  % betrogen die AUROCs 0,73 (95%-KI: 0,57 – 0,89) und 0,68 (95%-KI: 0,48 – 0,89), die optimalen Schwellenwerte lagen bei 302 dB/m (Sensitivität 83 %, Spezifität 63 %, PPV 53 %, NPV 88 %, LR+ 2,22, LR– 0,27) und 306 dB/m (Sensitivität 83 %, Spezifität 57 %, PPV 28 %, NPV 94 %, LR+ 1,92, LR– 0,29).

<sup>9</sup> Es wurde darauf verzichtet, bereits publizierte Schwellenwerte auf ihre Anwendbarkeit zu untersuchen, da dies aufgrund der insgesamt schlechten Trennschärfe des CAP in dieser Kohorte wenig aussagekräftig und somit nicht sinnvoll erschien.

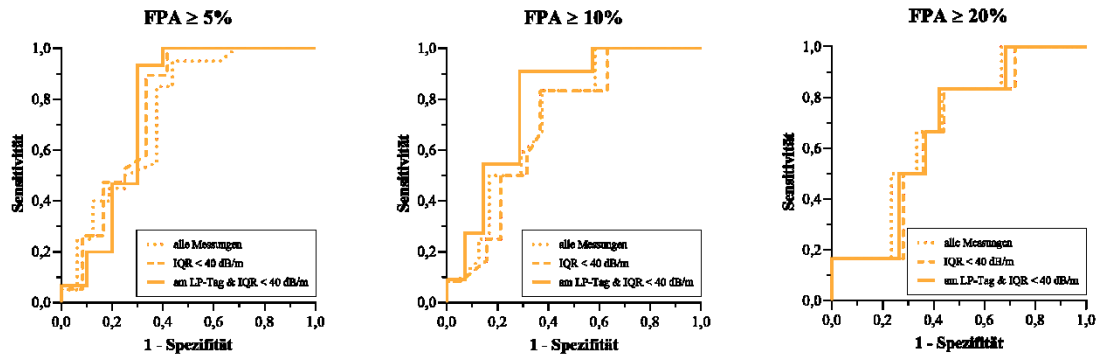


Abbildung 19. ROC-Kurven des CAP für die Detektion von  $\geq 5\%$ ,  $\geq 10\%$  und  $\geq 20\%$  FPA

Die zuvor beschriebenen Einflüsse von SCD, BMI und Fibrose auf die Genauigkeit der CAP-Messungen wurden in den Subgruppenanalysen auch bei Verwendung der FPA als Referenzmethode unterstrichen (Tabelle 11).

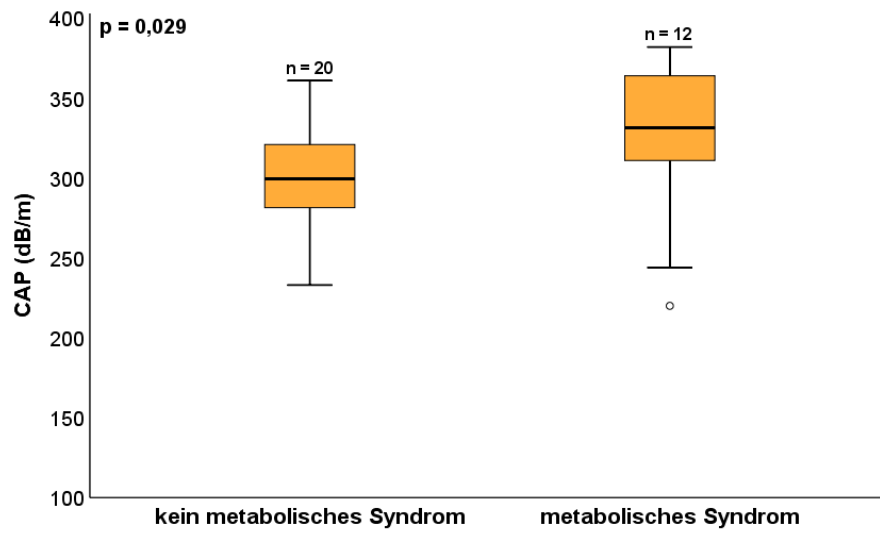
Tabelle 11. ROC-Analysen für die Detektion bestimmter FPAs mittels CAP

CAP	n	FPA $\geq 5\%$	FPA $\geq 10\%$	FPA $\geq 20\%$
		N = 20	N = 12	N = 6
Alle Messungen	36	<b>0,74</b> (0,57 – 0,91)	<b>0,73</b> (0,57 – 0,89)	0,68 (0,48 – 0,89)
IQR < 40 dB/m & LP-Tag	25	<b>0,77</b> (0,54 – 1,00)	<b>0,79</b> (0,61 – 0,97)	0,67 (0,44 – 0,89)
SCD < 22 mm	14	<b>0,87</b> (0,67 – 1,00)	<b>0,84</b> (0,63 – 1,00)	<b>0,88</b> (0,69 – 1,00)
SCD $\geq 22$ mm	17	0,64 (0,35 – 0,93)	0,67 (0,41 – 0,93)	0,45 (0,17 – 0,73)
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup>	26	<b>0,87</b> (0,72 – 1,00)	<b>0,85</b> (0,70 – 1,00)	0,69 (0,47 – 0,92)
BMI $\geq 30$ kg/m <sup>2</sup>	10	0,58 (0,18 – 0,98)	0,48 (0,01 – 0,95)	0,69 (0,21 – 1,00)
F (CRN) < 2	24	<b>0,77</b> (0,56 – 0,99)	<b>0,80</b> (0,62 – 0,97)	0,73 (0,47 – 0,98)
F (CRN) $\geq 2$	12	0,75 (0,44 – 1,00)	0,67 (0,37 – 0,97)	0,55 (0,24 – 0,86)
LS < 8,2 kPa	17	0,71 (0,44 – 0,98)	<b>0,78</b> (0,56 – 1,00)	<b>0,76</b> (0,52 – 1,00)
LS $\geq 8,2$ kPa	19	0,74 (0,49 – 0,99)	0,65 (0,39 – 0,92)	0,63 (0,25 – 1,00)

Flächen unter der ROC-Kurve mit signifikanter diagnostischer Trennschärfe ( $p < 0,05$ ) sind fett gedruckt, 95%-Konfidenzintervalle der AUROCs sind in Klammern angegeben. Aufteilung der Studienpopulation für Subgruppenanalysen nach medianer SCD, Vorliegen einer Adipositas und nach dem Vorliegen signifikanter Fibrosierung ( $F \geq 2$ ) bzw. eines dafür publizierten (100) Lebersteifigkeitswertes.

### 3.6.3 Assoziation des CAP mit weiteren Merkmalen

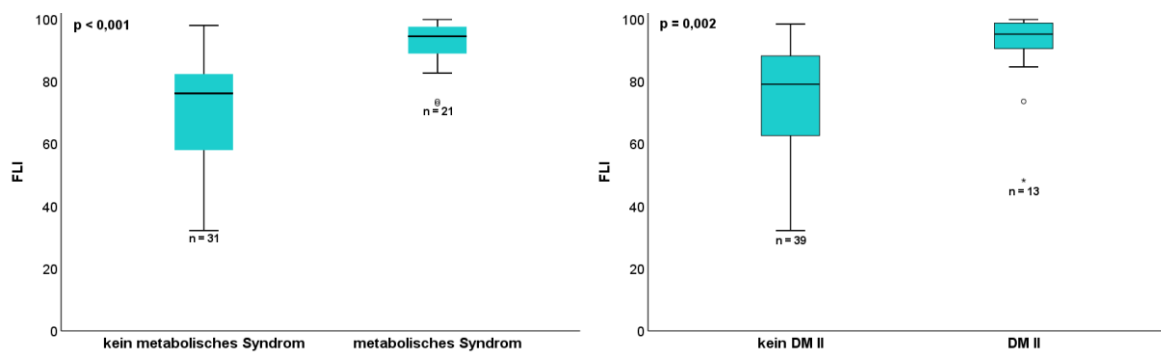
Der CAP korrelierte positiv mit der ALT ( $\rho = 0,33$ ,  $p = 0,044$ ) und dem CRN-Score der lobulären Inflammation ( $\rho = 0,33$ ,  $p = 0,049$ ) sowie invers mit dem HDL ( $\rho = -0,39$ ,  $p = 0,027$ ). Personen mit metabolischem Syndrom hatten signifikant höhere CAP-Werte als Personen ohne metabolisches Syndrom (Abbildung 20).



**Abbildung 20. Box-Whisker-Plot: CAP und metabolisches Syndrom.** PatientInnen mit metabolischem Syndrom hatten signifikant höhere CAP-Werte: Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,029$ .

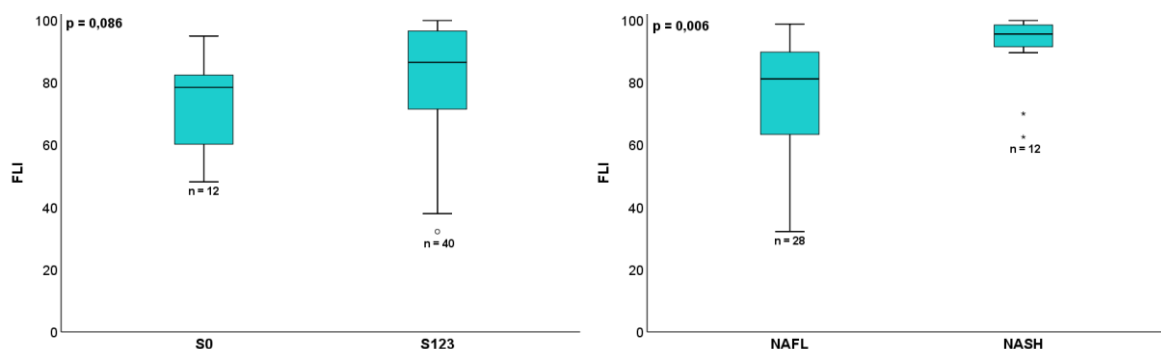
### 3.7 Fatty Liver Index

Der Fatty Liver Index zeigte weder mit den Steatosegraden ( $\rho = 0,16$ ,  $p = 0,268$ ) noch mit der FPA ( $\rho = 0,27$ ,  $p = 0,136$ ) eine signifikante Korrelation. Ein schwacher positiver Zusammenhang bestand mit dem Ballooning-Grad ( $\rho = 0,49$ ,  $p < 0,001$ ), dem CRN-Fibrosestadium ( $\rho = 0,48$ ,  $p < 0,001$ ) und der overall CPA ( $\rho = 0,42$ ,  $p = 0,002$ ). Außerdem korrelierte der FLI positiv mit dem Alter ( $\rho = 0,36$ ,  $p = 0,010$ ), der Subkutisdicke ( $\rho = 0,36$ ,  $p = 0,010$ ), der AST ( $\rho = 0,39$ ,  $p = 0,005$ ) und dem HOMA-Index ( $\rho = 0,55$ ,  $p < 0,001$ ). Bei PatientInnen mit metabolischem Syndrom oder DM II wurden im Vergleich zu Personen ohne diese Komorbiditäten signifikant höhere FLIs ermittelt (Abbildung 21).



**Abbildung 21. Box-Whisker-Plots: Fatty Liver Index bei metabolischem Syndrom und Diabetes mellitus Typ II.** Mann-Whitney-U-Test:  $p < 0,001$  (metabolisches Syndrom),  $p = 0,002$  (Diabetes Mellitus).

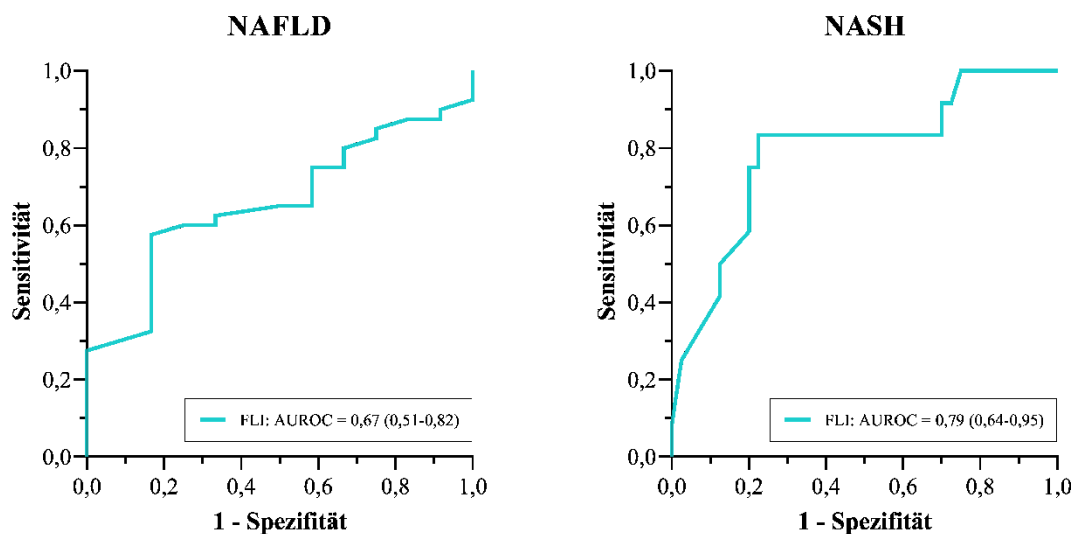
Alle in dieser Studie ermittelten FLIs betragen über 30, dem publizierten Grenzwert zum Ausschluss („niedriges Risiko“) einer Fettleber (57). Der mediane Wert lag bei 78 (IQR: 60 – 83) in der S0-Gruppe und bei 86 (IQR: 71 – 97) in der Gruppe mit histologisch bestätigter NAFLD. Bei NASH war der FLI signifikant höher als bei NAFL (Abbildung 22).



**Abbildung 22. Box-Whisker-Plots des FLI: S0 vs. S123 und NAFL vs. NASH.** Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Höhe des FLI zwischen der S0-Gruppe und Personen mit Fettleber (S123): Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,086$ . Personen mit NASH hatten einen höheren FLI als Personen mit NAFL: Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,006$ .

In der ROC-Analyse konnte der FLI mit einer AUROC von 0,67 (95%-KI: 0,51 – 0,82,  $p = 0,036$ ) eine NAFLD ( $S \geq 1$ ) akzeptabel detektieren (Abbildung 23). Der publizierte Grenzwert von 60 zur Detektion von Personen mit hohem Risiko für eine Fettleber (57) wies in dieser Studienpopulation eine Sensitivität von 85 % und eine Spezifität von 25 % auf (PPV 79 %, NPV 33 %, LR+ 1,13, LR– 0,6). Der mittels Youden-Index ermittelte optimale Schwellenwert lag in dieser Kohorte bei 84 (Sensitivität 75 %, Spezifität 83 %, PPV 92 %, NPV 37 %, LR+ 3,45, LR– 0,51). Für höhere Steatosegrade zeigte der FLI keine diagnostische Trennschärfe.

Das Vorliegen einer NASH konnte mit einer AUROC von 0,79 (95%-KI: 0,64 – 0,95,  $p < 0,001$ ) gut getestet werden (optimaler Cut-off = 89, Sensitivität 83 %, Spezifität 75 %, PPV 50%, NPV 94%, LR+ 3,33, LR– 0,22). Obwohl nicht als Fibrose-Test konzipiert, wies der FLI in dieser Studie auch eine gute diagnostische Performance in der Diskrimination zwischen nicht signifikanter ( $F < 2$ ) und signifikanter Fibrosierung ( $F \geq 2$ ) sowie in der Detektion von fortgeschrittener Fibrosierung ( $F \geq 3$ ) auf:  $AUROC_{F < 2 \text{ vs. } F \geq 2} = 0,79$  (95%-KI: 0,65 – 0,93,  $p < 0,001$ ),  $AUROC_{F < 3 \text{ vs. } F \geq 3} = 0,77$  (95%-KI: 0,59 – 0,95,  $p = 0,004$ ).

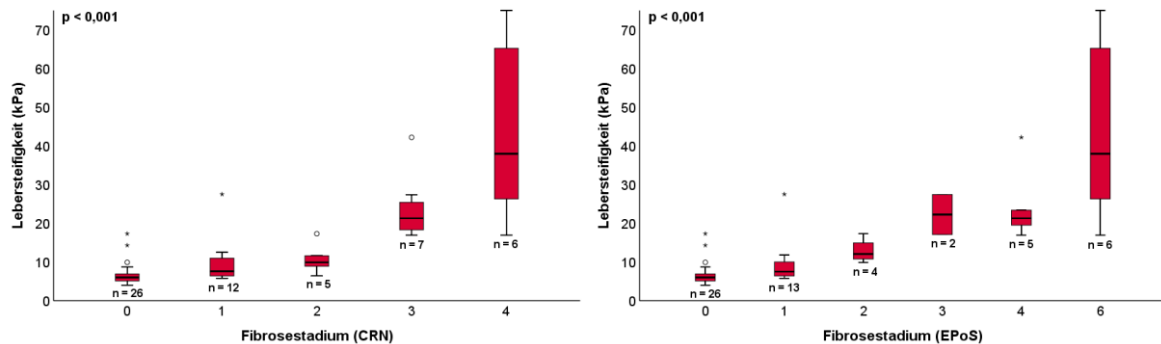


**Abbildung 23.** ROC-Kurven des FLI für die Detektion einer NAFLD (Grafik links,  $p = 0,036$ ) und für die Detektion einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (Grafik rechts,  $p < 0,001$ ).

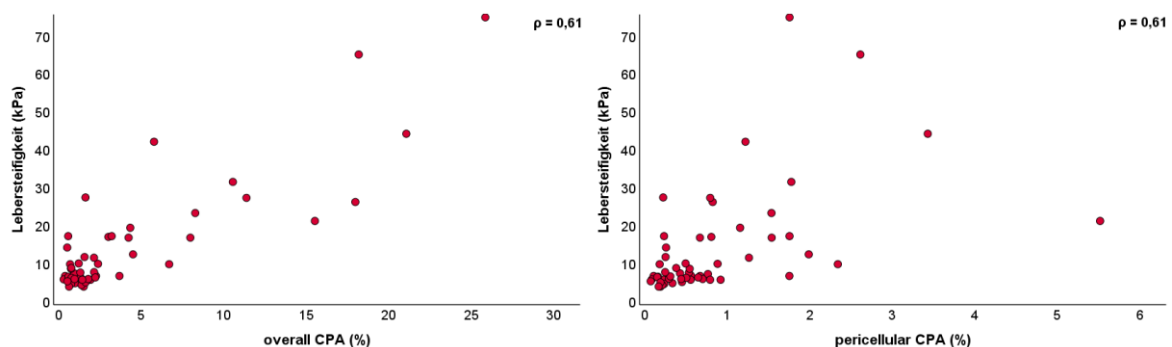
## 3.8 Lebersteifigkeitsmessung und nichtinvasive Fibrosemarker

### 3.8.1 Korrelation mit den Fibrosestadien und dem Fibrosegehalt

Für die folgenden Auswertungen wurden nur „zuverlässige“ Lebersteifigkeitsmessungen berücksichtigt. Die LS stieg mit höherem Fibrosestadium (Abbildung 24, Tabelle 12) und der Fibrosemenge (Abbildung 25). Die mediane LS (IQR in Klammer) für die CRN-Fibrosestadien F0, F1, F2, F3 und F4 betrug 6,0 kPa (5,1 – 7,0), 7,6 kPa (6,3 – 11,4), 9,9 kPa (7,7 – 15,5), 21,3 kPa (17,1 – 27,4) und 38,0 kPa (24,0 – 67,7). Es bestand eine gute Korrelation mit den Fibrosestadien nach CRN ( $\rho = 0,76$ ) und EPoS ( $\rho = 0,77$ ) sowie ein moderater Zusammenhang mit der overall CPA ( $\rho = 0,61$ ), der perizellulären CPA ( $\rho = 0,61$ ) und der septalen & portalen CPA ( $\rho = 0,579$ ;  $p$  jeweils  $< 0,001$ ).



**Abbildung 24. Box-Whisker-Plots: Lebersteifigkeit vs. Fibrosestadien.** *Grafik links:* Verteilung der Lebersteifigkeit über die CRN-Stadien (Kruskal-Wallis-Test:  $p < 0,001$ ). In den Post-hoc-Tests bestand nach Bonferroni-Korrektur ein signifikanter Unterschied zwischen den Stadien 0 und 3 ( $p < 0,001$ ) bzw. 0 und 4 ( $p < 0,001$ ). *Grafik rechts:* Verteilung der Lebersteifigkeit über die EPoS-Stadien (Kruskal-Wallis-Test:  $p < 0,001$ ). In den Post-hoc-Tests bestand nach Bonferroni-Korrektur ein signifikanter Unterschied zwischen den Stadien 0 und 4 ( $p = 0,003$ ), 0 und 6 ( $p < 0,001$ ) bzw. 1 und 6 ( $p = 0,043$ ).



**Abbildung 25. Streudiagramme: Lebersteifigkeit vs. Fibrosegehalt.** Es bestand jeweils ein moderater positiver Zusammenhang zwischen der Lebersteifigkeit und der overall CPA (*Grafik links*,  $\rho = 0,61$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 55$ ) bzw. der perizellulären CPA (*Grafik rechts*,  $\rho = 0,61$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 55$ ).

**Tabelle 12. Ergebnisse der nichtinvasiven Fibrose-Tests nach Fibrorestadium (CRN)**

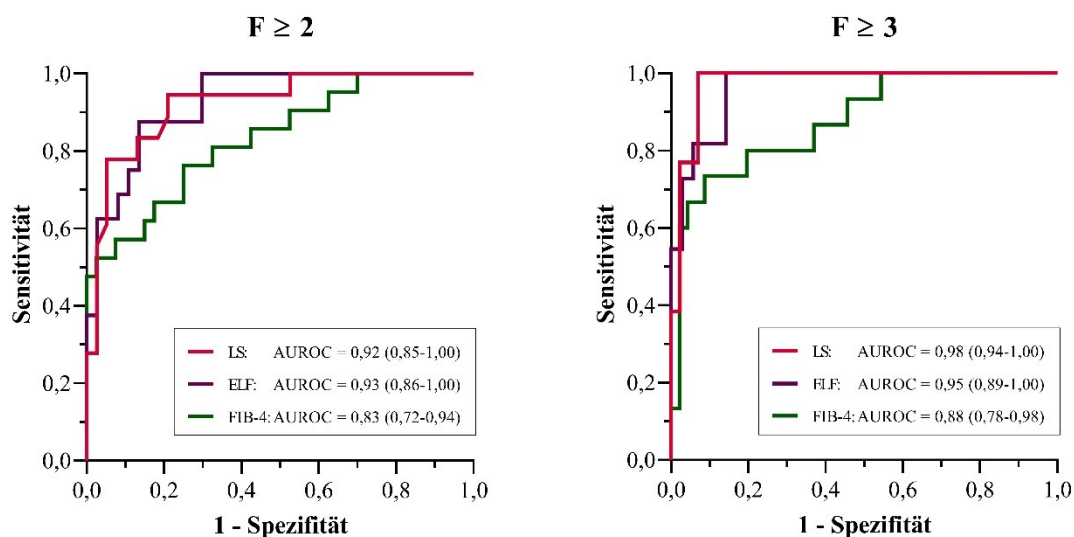
Test	n	F < 2		p-Wert	F < 3		p-Wert
		N = 40	N = 21		N = 46	N = 15	
LS (kPa)	56	6,6 (5,7, 8,0)	20,4 (15,6, 34,3)	< 0,001	6,7 (5,8, 9,9)	26,3 (18,3, 43,3)	< 0,001
FIB-4	61	1,23 (0,62, 1,69)	3,18 (1,56, 4,94)	< 0,001	1,26 (0,76, 1,75)	4,16 (2,07, 5,04)	< 0,001
ELF	53	8,13 (7,92, 8,51)	9,82 (9,19, 11,5)	< 0,001	8,26 (7,93, 8,87)	10,39 (9,33, 11,64)	< 0,001

Daten als Median (Q1, Q3), statistische Vergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test.

FIB-4-Index und ELF<sup>TM</sup>-Test stiegen ebenso im Trend mit höherem Fibrorestadium (Tabelle 12) und höherer Fibrosemenge. Es bestand jeweils ein moderater positiver Zusammenhang mit dem CRN-Staging ( $\rho_{\text{FIB-4}} = 0,61$ ,  $\rho_{\text{ELF}} = 0,58$ ), dem EPoS-Staging ( $\rho_{\text{FIB-4}} = 0,64$ ,  $\rho_{\text{ELF}} = 0,58$ ) und mit der Gesamt-CPA ( $\rho_{\text{FIB-4}} = 0,53$ ,  $\rho_{\text{ELF}} = 0,55$ ), der perizellulären CPA ( $\rho_{\text{FIB-4}} = 0,51$ ,  $\rho_{\text{ELF}} = 0,51$ ) bzw. der septalen CPA ( $\rho_{\text{FIB-4}} = 0,50$ ,  $\rho_{\text{ELF}} = 0,54$ ; p jeweils < 0,001). Unter den drei Fibrose-Tests wies die LS jeweils die höchsten Korrelationskoeffizienten auf.

### 3.8.2 Diagnostische Performance und Schwellenwerte

Tabelle 13 präsentiert die Ergebnisse der ROC-Analysen. Die diagnostischen Gütemaße publizierter und optimaler Cut-off-Werte sind in der Tabelle 14 angeführt. FS und ELF zeigten eine exzellente Genauigkeit und waren dem FIB-4-Index im direkten Vergleich überlegen (Abbildung 26).



**Abbildung 26. Vergleich der ROC-Kurven der nichtinvasiven Fibrose-Tests für die Diagnose einer signifikanten Fibrose (Grafik links) bzw. fortgeschrittenen Fibrose (Grafik rechts).**

**Tabelle 13. ROC-Analysen der nichtinvasiven Fibrose-Tests**

Test	n	AUROC $F \geq 1$	AUROC $F \geq 2$	AUROC $F \geq 3$	AUROC $F \geq 4$	AUROC NASH
		N = 34	N = 21	N = 15	N = 6	N = 17
LSM	56	0,87 (0,78 – 0,96)	0,92 (0,85 – 1,00)	0,98 (0,94 – 1,00)	0,96 (0,89 – 1,00)	0,78 (0,65 – 0,91)
FIB-4	61	0,79 (0,68 – 0,90)	0,83 (0,72 – 0,94)	0,88 (0,78 – 0,98)	0,94 (0,88 – 1,00)	0,71 (0,57 – 0,86)*
ELF	53	0,72 (0,58 – 0,86)†	0,93 (0,86 – 1,00)	0,95 (0,89 – 1,00)	0,94 (0,88 – 1,00)	0,82 (0,70 – 0,94)

Flächen unter der ROC-Kurve (95%-Konfidenzintervalle in Klammer) für die Diagnose der Fibrosestadien nach CRN bzw. einer NASH. Statistische Signifikanz der AUROCs (Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0,5): wenn nicht anders angegeben, jeweils  $p < 0,001$ . \*  $p = 0,004$ ; †  $p = 0,002$ .

**Tabelle 14. Schwellenwerte und diagnostische Güte der nichtinvasiven Fibrose-Tests**

	Cut-off	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	LR+	LR-
<b>F <math>\geq 2</math></b>							
LS (kPa)	8,2 <sup>a</sup>	94 %	76 %	65 %	97 %	3,99	0,07
	8,8 <sup>b</sup>	94 %	79 %	68 %	97 %	4,49	0,07
FIB-4	1,30 <sup>a</sup>	81 %	60 %	52 %	86 %	2,02	0,32
	2,67 <sup>a</sup>	52 %	98 %	92 %	80 %	20,95	0,49
	1,64 <sup>b</sup>	76 %	75 %	62 %	86 %	3,05	0,32
ELF	7,7 <sup>a</sup>	100 %	14 %	33 %	100 %	1,16	0
	9,1 <sup>b</sup>	88 %	86 %	74 %	94 %	6,48	0,14
<b>F <math>\geq 3</math></b>							
LSM (kPa)	9,7 <sup>a</sup>	100 %	74 %	54 %	100 %	3,91	0
	15,6 <sup>b</sup>	100 %	93 %	81 %	100 %	14,33	0
FIB-4	1,30 <sup>a</sup>	87 %	57 %	39 %	93 %	1,99	0,24
	2,67 <sup>a</sup>	67 %	96 %	83 %	90 %	15,33	0,35
	2,31 <sup>b</sup>	73 %	91 %	73 %	91 %	8,43	0,29
ELF Score	9,8 <sup>a</sup>	64 %	95 %	78 %	91 %	13,36	0,38
	9,1 <sup>b</sup>	100 %	81 %	58 %	100 %	5,25	0
<b>F = 4</b>							
LS (kPa)	13,6 <sup>a</sup>	100 %	78 %	35 %	100 %	4,55	0
	15,6 <sup>b</sup>	100 %	80 %	38 %	100 %	5	0

Den Berechnungen wurden (a) publizierte (65, 71, 100) und (b) optimale Schwellenwerte zugrunde gelegt.

Die Youden-Cut-offs für die Diagnose einer fortgeschrittenen Fibrose oder Zirrhose ( $F \geq 3$ ) lagen bei 15,6 kPa (LS), 9,1 (ELF) und 2,31 (FIB-4). Insgesamt konnten mit allen drei Tests höhere Fibrosestadien mit sehr hohen negativen Vorhersagewerten ausgeschlossen werden.

Das Alter der PatientInnen beeinträchtigte die diagnostische Trennschärfe des FIB-4 nicht, die AUROC<sub>F<sub>≥3</sub></sub> bei Personen unter 36 und ab 65 Jahren (0,96) war numerisch sogar höher als die AUROC<sub>F<sub>≥3</sub></sub> bei 36- bis 65-Jährigen (0,84).

### 3.8.3 Einflüsse auf die Lebersteifigkeitsmessung

Um zu untersuchen, ob es durch hohe BMI- und SCD-Werte oder ein höheres Alter ähnlich wie bei der CAP-Ermittlung auch zu einer Beeinträchtigung der Genauigkeit der Lebersteifigkeitsmessung kam, wurden dieselben Subgruppenanalysen durchgeführt (s. Tabelle 17 und Tabelle 18 im Anhang). Dabei zeigten sich allerdings keine relevanten Unterschiede in der Stärke der Korrelation mit der Fibrosemenge oder der diagnostischen Performance. Weiters schienen auch höhere Steatosegrade ( $S \geq 2$ ) oder CAP-Werte über 300 dB/m keine wesentlichen Auswirkungen auf die Höhe der LS (Abbildung 27) und die diagnostische Genauigkeit zu haben.

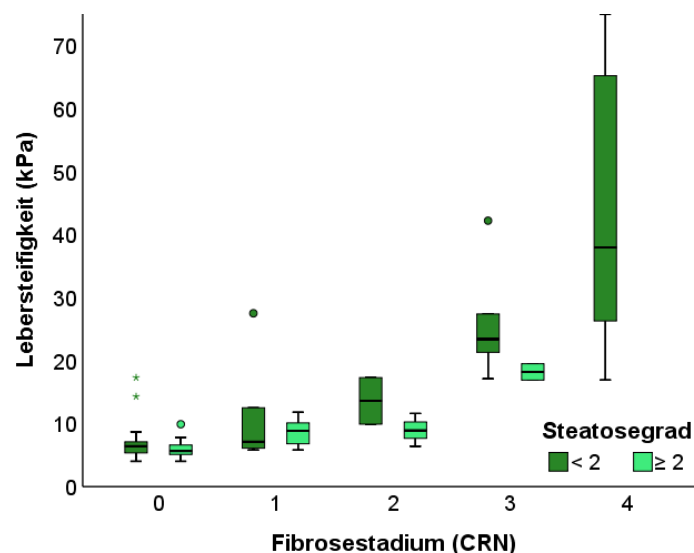
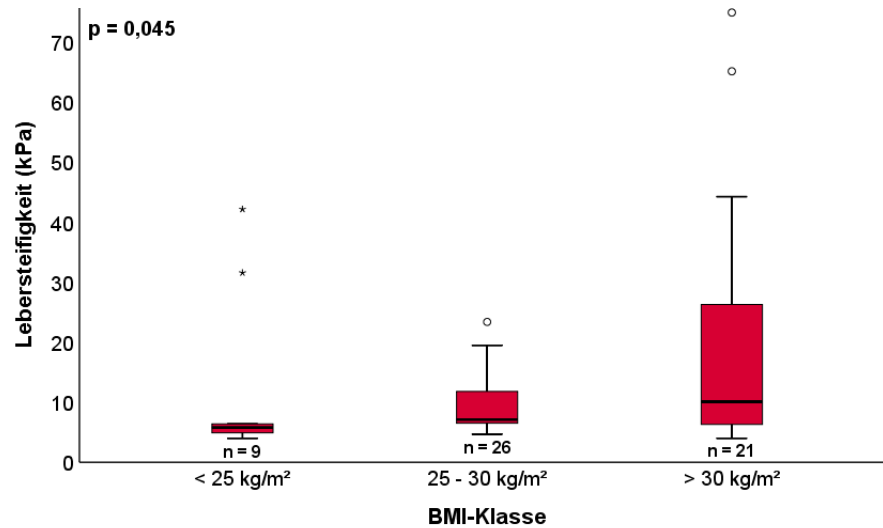


Abbildung 27. Gruppierte Box-Whisker-Plots: Verteilung der Lebersteifigkeit über die Fibrotestadien für Personen mit niedrigem (*S01*) und hohem Steatosegrad (*S23*)

### 3.8.4 Assoziation der Lebersteifigkeit mit anderen Merkmalen

Die mit dem FS erhobene LS korrelierte positiv mit dem Alter ( $\rho = 0,62$ ,  $p < 0,001$ ), dem BMI ( $\rho = 0,27$ ,  $p = 0,044$ , Abbildung 28), dem Bauchumfang ( $\rho = 0,43$ ,  $p = 0,002$ ), der Subkutisdicke ( $\rho = 0,33$ ,  $p = 0,019$ ), den Laborparametern Glucose ( $\rho = 0,57$ ,  $p < 0,001$ ), Insulin ( $\rho = 0,48$ ,  $p < 0,001$ ), Triglyceride ( $\rho = 0,39$ ,  $p = 0,004$ ), AST ( $\rho = 0,24$ ,  $p = 0,001$ ), GGT ( $\rho = 0,27$ ,  $p = 0,045$ ), AP ( $\rho = 0,39$ ,  $p = 0,003$ ), INR ( $\rho = 0,27$ ,  $p = 0,044$ ), MCV ( $\rho = 0,39$ ,  $p = 0,003$ ) und dem HOMA-Index ( $\rho = 0,56$ ,  $p < 0,001$ ) sowie invers mit Albumin ( $\rho = -0,41$ ,  $p = 0,002$ ), CHE ( $\rho = -0,31$ ,  $p = 0,020$ ), PZ ( $\rho = -0,28$ ,  $p = 0,036$ ) und der

Thrombozytenzahl ( $\rho = -0,42$ ,  $p = 0,001$ ). Außerdem bestand ein positiver Zusammenhang mit dem Ballooning-Score ( $\rho = 0,53$ ,  $p < 0,001$ ) und portaler Inflammation ( $\rho = 0,32$ ,  $p = 0,016$ ). Personen mit metabolischem Syndrom ( $p < 0,001$ ), DM II ( $p < 0,001$ ) oder NASH ( $p = 0,003$ ) hatten jeweils signifikant höhere Lebersteifigkeitswerte als Personen ohne diese Erkrankungen.



**Abbildung 28. Box-Whisker-Plots: Verteilung der Lebersteifigkeit über die BMI-Klassen.** Mit steigender BMI-Klasse wurden höhere Lebersteifigkeitswerte gemessen: Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,045$ . Nach Bonferroni-Korrektur bestand ein signifikanter Unterschied zwischen normalgewichtigen ( $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ ) und adipösen ( $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ ) PatientInnen ( $p = 0,043$ ).

## 4 Diskussion

In dieser diagnostischen Studie wurde bei PatientInnen mit suspizierter nichtalkoholischer Fettlebererkrankung untersucht, wie gut die zeitgleich mit einer Biopsie durchgeführte VCTE (Fibroscan<sup>®</sup>) zur Ermittlung von Controlled Attenuation Parameter und Lebersteifigkeit sowie die miterhobenen nichtinvasiven Scores FLI, FIB-4 und ELF den tatsächlichen Leberfettgehalt bzw. das Fibroseausmaß vorhersagen konnten. Als Referenzmethode kamen neben der konventionellen histologischen Beurteilung (NASH CRN Scoring System und EPoS Staging System) durch eine erfahrene Pathologin digitale Bildanalysen (computergestützte Morphometrie) zur Anwendung.

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Der CAP korrelierte signifikant mit dem morphometrisch bestimmten Leberfettgehalt, wengleich die Stärke des Zusammenhangs nur gering war ( $\rho = 0,36$ ). Personen mit 5 % bzw. 10 % FPA wurden mit AUROCs von 0,74 bzw. 0,73 detektiert. Die optimalen Schwellenwerte lagen hierfür bei 289 dB/m (95 % Sensitivität, 56 % Spezifität) bzw. 302 dB/m (83 % Sensitivität, 63 % Spezifität) und sind somit nahezu ident mit den von Caussy et al. ermittelten optimalen Cut-offs für die Detektion einer PDFF von 5 % bzw. 10 % in der MR-Bildgebung (288 dB/m bzw. 306 dB/m) (103). Kein signifikanter Zusammenhang bestand dagegen mit dem von der Pathologin geschätzten Fettanteil und dem semiquantitativen Steatose-Score. Der FS war weder in der Lage, Personen mit hepatischer Steatose ( $S \geq 1$ ) ausreichend sicher von Personen ohne Leberverfettung ( $S_0$ ) zu unterscheiden (AUROC = 0,57) noch zwischen höheren Steatosegraden zu differenzieren. Besonders bei Personen mit niedrigem Leberfettgehalt streuten die CAP-Werte beträchtlich (s. Abbildung 15) und der mediane Wert der  $S_0$ -Gruppe lag mit 312 dB/m sogar über dem der  $S_1$ - und  $S_3$ -Gruppen. Insgesamt zeigte sich in dieser Studienpopulation somit eine unzureichende Genauigkeit des CAP, die unter den in der Literatur beschriebenen Performance-Werten bei NAFLD (s. Tabelle 2) lag.

In Subgruppenanalysen wurde deutlich, dass eine Adipositas ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), eine dickere Subkutisschicht ( $SCD \geq 22 \text{ mm}$ ), ein höheres Alter ( $\geq 52$  Jahre) sowie eine signifikante Fibrose ( $F \geq 2$ ) bzw. erhöhte Lebersteifigkeit ( $\geq 8,2 \text{ kPa}$ ) jeweils maßgeblich zur schwachen Korrelation des CAP mit der Steatosemenge und der infolgedessen schlechten diagnostischen Trennschärfe beitrugen und insbesondere bei niedrigem Steatoseausmaß in höheren CAP-Werten als in der komplementären Subgruppe zu resultieren schienen (s. Abbildung 17). In manchen Subgruppen erreichte der CAP eine zumindest akzeptable

diagnostische Genauigkeit. Bei Personen mit einem BMI unter 30 kg/m<sup>2</sup> konnte eine milde ( $S \geq 1$ ) bzw. moderate Steatose ( $S \geq 2$ ) beispielsweise mit AUROCs von 0,74 bzw. 0,73 bei Cut-offs von 289 dB/m (79 % Sensitivität, 71 % Spezifität) bzw. 301 dB/m (80 % Sensitivität, 63 % Spezifität) diagnostiziert werden. Für die Detektion von  $\geq 5$  % und  $\geq 10$  % FPA bei Nicht-Adipösen betragen die AUROCs sogar 0,87 und 0,85.

Eine genauere statistische Analyse und Quantifizierung des Einflusses von BMI, SCD, Alter, Fibrose und Lebersteifigkeit war aufgrund der niedrigen Stichprobengröße leider nicht möglich. Allerdings sind die Resultate betreffend die Einflussfaktoren durchaus im Einklang mit der bisherigen Literatur. Eine vergleichbare Studie zu dieser Arbeit mit ähnlichen Ergebnissen wurde 2016 von Fujimori et al. publiziert (141). Es war dies meines Wissens nach die erste Studie, in welcher CAP-Werte (ebenfalls bei NAFLD-PatientInnen) mit dem mittels computergestützter Bildanalyse quantifizierten, tatsächlichen Steatoseanteil in Beziehung gesetzt wurden. Wie in unseren Daten wurde insgesamt eine schwache positive Korrelation mit dem Fettanteil ( $r = 0,48$ ,  $p < 0,001$ ) und in Subgruppenanalysen ein wesentlicher Einfluss von BMI und Fibrorestadium gefunden. Während bei einem BMI  $< 25$  kg/m<sup>2</sup> ( $r = 0,71$ ,  $p < 0,01$ ) bzw.  $< 28$  kg/m<sup>2</sup> ( $r = 0,58$ ,  $p < 0,001$ ) und bei niedrigen Fibrorestadien (F0:  $r = 0,96$ ,  $p < 0,01$ ; F1:  $r = 0,51$ ,  $p < 0,05$ ) eine gute Korrelation zwischen CAP und Fettmenge bestand, war der Zusammenhang in den Gruppen mit höherem BMI (25 – 30 kg/m<sup>2</sup>:  $r = 0,14$ ;  $> 30$  kg/m<sup>2</sup>:  $r = -0,04$ ;  $\geq 28$  kg/m<sup>2</sup>:  $r = 0,24$ ) oder höheren Fibrorestadien ( $F \geq 2$ :  $r = 0,11$ ) jeweils nicht mehr signifikant (141).

Shen et al., die den Einfluss der SCD auf die Performance des CAP untersuchten, fanden in ihren Daten eine unabhängige Assoziation der SCD mit der Höhe der CAP-Werte, und dass eine SCD  $> 25$  mm zu einer Überschätzung der Steatose durch den CAP führte (120). Wie auch Myers et al. (87) berichteten sie in weiterer Folge von niedrigeren AUROCs des CAP bei Personen mit einer SCD  $> 25$  mm. Man geht davon aus, dass die für die höhere SCD verantwortliche dickere subkutane Fettschicht bereits zu einer relevanten Abschwächung der Ultraschallwellen führen kann (120).

Eine weitere Erklärung für die starke Beeinträchtigung der Genauigkeit des CAP durch BMI und SCD in der vorliegenden Studienpopulation stellt möglicherweise die verwendete Sondengröße dar. Lediglich zwei CAP-Werte wurden mit der XL-, der Rest mit der M-Sonde erhoben, auch wenn die SCD über 25 mm lag. Der Hauptgrund für die „falsche“ Sondenwahl war die Nichtverfügbarkeit der XL-Sonde, einerseits bei Untersuchungen vor dem Jahr 2012, als es die XL-Sonde noch nicht gab, andererseits im Falle der Sondenwartung (ein- bis

zweimal pro Jahr für ca. ein Monat), währenddessen keine Ersatzsonde zur Verfügung stand und alle Messungen mit der verbliebenen Sonde durchgeführt werden mussten. Somit entsprach die benutzte Sondengröße nicht immer den Empfehlungen von Hersteller und Literatur, und es darf angenommen werden, dass eine korrekte Verwendung wohl zu verlässlicheren CAP-Werten beigetragen hätte.

Während die Assoziation des CAP mit dem BMI und die schlechtere Anwendbarkeit bei Fettleibigkeit in der Literatur häufig thematisiert wurden (84, 88-90, 92, 94-96, 99, 101, 102, 121, 131), haben nur wenige Studien einen Einfluss von Fibrose oder Lebersteifigkeit auf die diagnostische Genauigkeit des CAP festgestellt (87, 108, 141). Zukünftige Studien sollten einen Fokus auf den potentiellen Einfluss der Fibrose legen. Beim Alter, das laut unseren Daten einen Einfluss auf die Korrelation des CAP mit dem Fettgehalt hatte, könnte es sich um einen Confounder handeln, da ältere Menschen in dieser Studienpopulation erwartungsgemäß häufiger höhere Fibrotestadien aufwiesen als jüngere und somit möglicherweise nicht das Alter selbst, sondern die stärkere Fibrosierung den Effekt verursacht haben könnte.

Die Daten aus der vorliegenden Studie sprechen außerdem eher für die Berücksichtigung der IQR der intraindividuellen Werte eines Messdurchgangs als Zuverlässigkeitskriterium bei der Beurteilung des CAP. So verbesserten sich die Korrelation mit der Steatosemenge und die diagnostische Genauigkeit, wenn CAP-Werte mit einer IQR  $\geq 40$  dB/m, wie von Wong et al. (131) vorgeschlagen, als ungültig gewertet und nicht berücksichtigt wurden. Während manche StudienautorInnen ähnliche Beobachtungen machten (103, 142), konnte dieses Qualitätsmerkmal von anderen wiederum nicht bestätigt werden (93, 96, 98, 100), weswegen sein Stellenwert weiter unklar bleibt. Auch der Ausschluss von Messungen, welche nicht am Tag der Leberpunktion durchgeführt wurden, führte zu einer geringgradigen Verbesserung der Genauigkeit. Da nicht erhoben wurde, ob und wie die PatientInnen in der Zeit zwischen LP und TE ihren Lebensstil änderten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Unterschied in einer Veränderung der Steatosemenge begründet sein mag.

Im Gegensatz zum CAP war die diagnostische Performance der Lebersteifigkeitsmessung ausgezeichnet. Die Flächen unter der ROC-Kurve für die Diagnose der Fibrotestadien  $F \geq 2$ ,  $F \geq 3$  und  $F4$  betragen 0,92, 0,98 und 0,96 und lagen damit numerisch sogar deutlich höher als in den im Vorjahr publizierten größeren Arbeiten zur diagnostischen Genauigkeit der VCTE bei NAFLD von Siddiqui et al. (99) und Eddowes et al. (100). Dafür gibt es mehrere

mögliche Erklärungen: Erstens wies das in den erwähnten Studien untersuchte PatientInnenkollektiv im Vergleich zu unserer Studienpopulation einen höheren BMI (Mittelwert = 34,4 kg/m<sup>2</sup> bei Siddiqui et al. bzw. Median = 33,8 kg/m<sup>2</sup> bei Eddowes et al. vs. Median = 28,4 kg/m<sup>2</sup> in der vorliegenden Arbeit) sowie einen höheren Anteil an DiabetikerInnen (44 % bzw. 50 % vs. 24,6 %) auf, was einen Einfluss auf die diagnostische Genauigkeit der LSM gehabt haben könnte. Zweitens bestehen Unterschiede in der Prävalenz der einzelnen Fibrosestadien zwischen den Studienpopulationen. Während gemäß der PatientInnencharakteristik in den beiden Studien aus dem Vorjahr die Fibrosestadien relativ regelmäßig verteilt waren (F0, F1, F2, F3 und F4: 24 %, 25 %, 19 %, 23 %, und 9 % bei Siddiqui et al. bzw. 17 %, 23 %, 23 %, 28 % und 9 % bei Eddowes et al.), lag in unserer Studienpopulation ein deutlich höherer Anteil an Personen mit dem Fibrosestadium F0 vor. Die Fibrosestadien 2 und 3 waren dagegen vergleichsweise unterrepräsentiert, wodurch sich in der Häufigkeitsverteilung Gipfel an den Extremen ergaben (F0, F1, F2, F3 und F4: 44,3 %, 21,3 %, 9,8 %, 14,8 %, 9,8 %). Aus diesem Grund ist ein sogenannter „spectrum bias“ anzunehmen, welcher in der vorliegenden Arbeit zur höheren diagnostischen Performance des Tests beigetragen haben könnte. Dieser Einfluss der Häufigkeitsverteilung der Fibrosestadien auf die Höhe der AUROC nichtinvasiver Fibrose-Tests ist aus der Literatur bekannt (143, 144). Drittens können die höheren AUROCs der LSM in unserem PatientInnenkollektiv vielleicht auch durch eine „genauere“ histologische Beurteilung der Präparate erklärt werden, da diese in allen Fällen nur durch eine erfahrene Leberpathologin erfolgte, während das histologische Scoring bei Eddowes et al. und Siddiqui et al. von zwei bzw. mehreren PathologInnen übernommen wurde und somit potentielle Interobserver-Variabilitäten nicht auszuschließen sind. Zudem betrug die Zeitdifferenz zwischen LP und VCTE in der Studie von Siddiqui et al. bis zu einem Jahr, was zu einer schlechteren Übereinstimmung von VCTE und Biopsie beigetragen haben mag.

Die Cut-offs von Eddowes et al. eigneten sich gut für die Anwendung in der vorliegenden Studienpopulation: 8,2 kPa für  $F \geq 2$  (94 % Sensitivität, 76 % Spezifität), 9,7 kPa für  $F \geq 3$  (100 % Sensitivität, 74 % Spezifität) und 13,6 kPa für F4 (100 % Sensitivität, 78 % Spezifität). Alle Personen mit fortgeschrittenen Fibrosestadien wurden zuverlässig erkannt. Die optimalen Youden-Cut-offs lagen bei 8,8 kPa ( $F \geq 2$ ) bzw. 15,6 kPa (sowohl für  $F \geq 3$  als auch für Zirrhose) und verbesserten zwar die Spezifität, allerdings scheinen 15,6 kPa als Grenze zwischen F2 und F3 wohl zu hoch angesetzt. Dieser vergleichsweise hohe Cut-off in unserer Studienpopulation dürfte in erster Linie auf den oben erwähnten „spectrum bias“ zurückzuführen sein.

Die Lebersteifigkeit korrelierte gut mit den Fibrosestadien nach CRN und EPoS sowie mit dem morphometrisch gemessenen Fibrosegehalt. Adipositas, eine SCD über 22 mm und ein höheres Alter hatten in Subgruppenanalysen keinen negativen Einfluss auf die Stärke der Korrelation, im Gegenteil wurden innerhalb dieser Gruppen sogar höhere Korrelationskoeffizienten ermittelt. In erster Linie lässt sich diese Tatsache vermutlich darauf zurückführen, dass fettleibige und ältere PatientInnen per se ein höheres Fibrosiserisiko und somit auch häufiger höhere Fibrosestadien aufweisen, was die Stärke des Zusammenhangs erhöht. In den getrennten ROC-Analysen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der diagnostischen Performance.

Auch bei der LSM entsprach die verwendete Sondengröße aufgrund mangelnder Verfügbarkeit nicht immer den Empfehlungen, lediglich bei neun Personen kam die XL-Sonde zum Einsatz. Interessanterweise schien eine „falsche“ Sondenauswahl bei Personen mit dickerer Subkutisschicht die Ermittlung der LS weniger zu beeinträchtigen als die Messung des CAP.

Der in einzelnen Arbeiten beschriebene Einfluss der Steatose auf die Lebersteifigkeitsmessung (108, 122, 145), konnte in unseren Daten nicht eindeutig nachgewiesen werden, wiewohl aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht dieselben Analysen wie in den genannten Studien durchgeführt werden konnten. Das Vorliegen einer höhergradigen Steatose führte bei niedrigen Fibrosestadien jedoch nicht wie bei Petta et al. (122) zu einer Erhöhung der LS-Werte (s. Abbildung 27), und es bestand zwischen Gruppen mit einem CAP  $\geq$  und  $<$  300 dB/m bzw. mit einer FPA  $\geq$  und  $<$  4 % zumindest kein wesentlicher Unterschied in der Korrelation der LS mit dem Fibroseausmaß bzw. in der diagnostischen Genauigkeit. Letztlich ist ein gewisser Einfluss der Steatose allerdings auch nicht völlig auszuschließen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Der Fatty Liver Index detektierte Personen mit Steatose ( $S \geq 1$ ) mit einer AUROC von lediglich 0,67 bei einem optimalen Cut-off von 84 (75 % Sensitivität, 83 % Spezifität%), der damit weit über dem publizierten Cut-off von 60 lag. Es ist jedoch festzuhalten, dass der FLI ursprünglich für den Einsatz in der Allgemeinbevölkerung zum Screening nach einer Fettleber entwickelt wurde und hierfür in Validationsstudien AUROCs um 0,80 erreicht (146, 147). Im Gegensatz dazu handelt es sich in der vorliegenden Studienpopulation um eine Hochrisikogruppe, bei der mit dem Vorliegen einer Fettleber zu rechnen war, weswegen die allermeisten PatientInnen ohnehin einen erhöhten FLI aufwiesen. Weiters ist bekannt,

dass der FLI nicht für die Steatosequantifizierung geeignet ist (56, 147). Die vorbeschriebene Assoziation des FLI mit der Insulinresistenz (HOMA-IR) wurde auch in unseren Daten bestätigt (56, 58). Außerdem korrelierte der FLI auch mit dem Fibroseausmaß und dem Ballooning-Score, wodurch sich die überraschend hohen AUROCs für die Detektion einer NASH bzw. von signifikanter und fortgeschrittener Fibrosierung erklären lassen. Ein Einsatz des FLI als potentieller Fibrose-Score wurde bis dato meines Wissens jedoch nicht untersucht.

Mit einer guten AUROC von 0,88 für die Detektion von fortgeschrittener Fibrose und Zirrhose ( $F \geq 3$ ) konnte die Performance des FIB-4-Index aus vorangegangenen Studien bestätigt werden (61, 62, 65), allerdings zeigten sich die bekannten Probleme in der Diagnosesicherheit im grauen Bereich zwischen den beiden publizierten Schwellenwerten. Mit dem unteren Cut-off (1,30) konnte eine schwere Fibrosierung mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit (NPV 93 %), jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei einer Sensitivität von 87 % wären immerhin zwei von 15 Personen mit brückenbildender Fibrose oder Zirrhose mit dem Test übersehen worden. Gleichzeitig bestand bei einer Spezifität von 57 % eine hohe Rate an falsch Positiven, die eigentlich keine Fibrose aufwiesen. Der PPV betrug lediglich 39 %. Bei Anwendung des oberen (2,67) bzw. errechneten optimalen Cut-offs (2,31) erhöhte sich die Spezifität zwar auf über 90 %, jedoch wären dann bei niedrigerer Sensitivität bereits bis zu einem Drittel der PatientInnen mit  $F \geq 3$  übersehen worden. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass PatientInnen mit einem FIB-4 über 1,30 auf jeden Fall einer weiteren Abklärung zugeführt werden sollten. Eine schlechtere diagnostische Genauigkeit bei Personen unter 35 oder ab 65 Jahren, wie von McPherson et al. beschrieben (66), wurde in getrennten ROC-Analysen nicht gefunden.

Der ELF<sup>TM</sup>-Test detektierte fortgeschrittene Fibrotestadien mit der in der Literatur beschriebenen (92) hohen Genauigkeit (AUROC = 0,95) und war wie die VCTE dem FIB-4-Index im nichtinvasiven Fibrose-Assessment überlegen (s. Abbildung 26). Der optimale Cut-off des ELF lag bei 9,1, womit alle PatientInnen mit Fibrotestadium 3 und 4 erfasst und 81 % jener mit niedrigeren Fibrotestadien richtig klassifiziert wurden. Bei Verwendung des publizierten Cut-offs von 9,8 (69-71) erhöhte sich zwar der positive Vorhersagewert, allerdings lag die Sensitivität dann nur mehr bei 64 %.

## **4.2 Stärken und Limitationen**

Als wichtige Stärke der Studie ist die einheitliche histologische Beurteilung aller Präparate durch dieselbe erfahrene Leberpathologin, welche für die Ergebnisse der nichtinvasiven

Tests verblindet war, anzuführen. Etwaige Interobserver-Variabilitäten aus den ursprünglichen Befunden wurden somit ausgeschaltet und ein einheitliches Scoring nach dem CRN Scoring System und EPoS Staging System gewährleistet.

Eine Besonderheit der Arbeit ist die Verwendung der computergestützten Morphometrie als zusätzliche Referenzmethode. Es ist sinnvoll, diagnostische Methoden, die wie die VCTE zu einem quantitativen Ergebnis (CAP, LS) führen, auch mit möglichst objektiven quantitativen Referenzmethoden wie z.B. der MRS-/MRI-PDFD oder eben der Morphometrie zu vergleichen. Insbesondere die konventionelle histologische Steatosebeurteilung ist sehr subjektiv und hat eine schlechte Reproduzierbarkeit (148). Auch für andere Merkmale des NASH CRN Scoring System wurden relevante Interobserver-Variabilitäten und eine große Abhängigkeit von der Erfahrung der befundenden Person beschrieben (149). Nichtsdestotrotz zeigten die Ergebnisse der morphometrischen Messungen in der vorliegenden Studie sowohl eine beeindruckende Korrelation mit dem von der Pathologin geschätzten Steatoseanteil und den darauf basierenden Steatosegraden als auch mit den Fibrorestadien nach CRN und EPoS. Die aus der Literatur bekannte Überschätzung der absoluten Steatosemenge durch das menschliche Auge wurde bestätigt (150, 151). Selbst Präparate mit hochgradiger Steatose hatten eine FPA im Bereich von nur 25 %. Zum Teil mag dies auch an der unterschiedlichen Definition des Steatoseanteils liegen. Während für die Steatosegrade der Anteil an verfetteten Hepatozyten eingeschätzt wird, wurde für die FPA der Anteil der Steatosefläche an der Parenchymfläche gemessen. Bei der Beurteilung der Fibrose ist zu beachten, dass die Stadieneinteilung auf dem Verteilungsmuster der Fibrose und nicht auf dem bloßen Fibrosegehalt (CPA) beruht, weshalb hier ein direkter Vergleich der beiden Methoden im Grunde nicht zulässig ist. Interessanterweise korrelierte die Lebersteifigkeit sogar geringgradig besser mit den Fibrorestadien als mit der CPA.

Eine weitere Stärke des Studiendesigns ist, dass die PatientInnen bereits prospektiv und fortlaufend mit dem Ziel eingeschlossen wurden, die Ergebnisse von nichtinvasiven Messungen mit dem histologischen Befund zu vergleichen, und dass diese Untersuchungen zum Großteil (86,9 %) am selben Tag unmittelbar vor der Biopsie durchgeführt wurden. Im Grunde stellt die Kohorte auch einen realitätsnahen Querschnitt des PatientInnenkollektivs bei NAFLD in einer tertiären Versorgungseinheit dar, welches sich mit der Vielzahl an erhobenen Daten gut charakterisieren ließ. Die Unterschiede im metabolischen Risikoprofil und in der Prävalenz fortgeschrittener Erkrankungsstadien zwischen NASH und NAFL konnten beispielsweise eindrucksvoll gezeigt werden.

Einige Limitationen der Studie müssen dennoch berücksichtigt werden. Erstens ist die Fallzahl – vor allem die der erhobenen CAP-Werte – relativ klein, was die Aussagekraft der Ergebnisse verzerrt haben könnte, obwohl alle Steatosegrade und Fibrosestadien repräsentativ vertreten waren. Zweitens war die Sondengröße XL nicht über den gesamten Studienzeitraum verfügbar und es wurde kein direkter Vergleich zwischen M- und XL-Sonde durchgeführt. Die Messergebnisse von formal „falsch“ eingesetzten Sonden wurden im Sinne einer „Intention-to-diagnose“-Analyse in der Auswertung mitberücksichtigt. Es darf angenommen werden, dass zumindest ein Teil des Einflusses von SCD und BMI auf die diagnostische Genauigkeit des CAP durch den Einsatz der M-Sonde erklärt werden kann. Da Personen mit erfolglosen FS-Untersuchungen bereits im Vorfeld von der Datenanalyse ausgeschlossen wurden, konnten etwaige Gründe für eine erfolglose Messung nicht untersucht werden. Wie bei jeder biopsiekontrollierten Studie sind schließlich auch „sampling errors“ nicht auszuschließen, welche ebenfalls einen gewissen Einfluss auf die Korrelation des CAP mit der Steatosemenge gehabt haben könnten. Immerhin ist das mit dem FS erfasste Lebervolumen etwa 100-mal größer als das bei einer Leberbiopsie entnommene (81). Der Einfluss fokaler Variabilitäten wurde jedoch so gut wie möglich zu verringern versucht, indem Biopsie und VCTE möglichst an derselben Stelle durchgeführt wurden. Gegen einen großen Stichprobenfehler spricht auch, dass die Lebersteifigkeit relativ gut mit dem Fibrosegehalt im Biopsat korrelierte.

### **4.3 Ausblick**

Da es sich um eine Querschnittsstudie handelte und keine Outcome-Daten erhoben wurden, können keine Aussagen bezüglich der prognostischen Relevanz der untersuchten Tests gemacht werden. Während der Nutzen für die Lebersteifigkeitsmessung mehrfach bewiesen wurde (106, 111), ist es insgesamt sehr fraglich, ob der CAP prognostische Informationen liefern kann. In einer großen retrospektiven Datenanalyse von über 4000 PatientInnen mit CAP-Messungen bei chronischen Lebererkrankungen verschiedener Ätiologien waren höhere CAP-Werte bei Liu et al. nach einem medianen Follow-up von 26 Monaten nicht mit dem Auftreten von leberbezogenen Komplikationen, malignen Erkrankungen oder kardiovaskulären Ereignissen assoziiert (152). In einer ebenfalls retrospektiven Studie in der Schweiz an 193 PatientInnen mit kompensierten fortgeschrittenen Lebererkrankungen (definiert durch eine LS  $\geq$  10 kPa) erhöhte ein CAP  $\geq$  220 dB/m unabhängig von der Lebersteifigkeit das Risiko für eine Leberdekompensation oder eine schwere bakterielle Erkrankung nach einem medianen Follow-up von 18 Monaten (153). Diesem Ergebnis widerspricht wiederum eine rezente Wiener Publikation mit sehr ähnlichem Studiensetting

(430 PatientInnen mit chronischer fortgeschrittener Lebererkrankung), nach welcher der CAP das Auftreten einer erstmaligen oder weiteren hepatischen Dekompensation nach einem medianen Follow-up von 12 bis 22 Monaten nicht voraussagen konnte (154). Prospektive Studien mit längerem Follow-up zur Evaluierung der prognostischen Aussagekraft des CAP – insbesondere bei NAFLD – fehlen bisher. Dass die Wichtigkeit eines akkuraten Steatose-Assessments trotzdem nicht unterschätzt werden sollte, wird z.B. durch Arbeiten untermauert, die eine Assoziation zwischen höhergradiger Steatose und dem Vorliegen einer NASH (155) bzw. einer Fibroseprogression (156) fanden.

Weitere Einsatzmöglichkeiten der VCTE mit CAP sind im Screening von Hochrisikogruppen wie DiabetikerInnen (157) oder in der Allgemeinbevölkerung gegeben, um eine Fettleber mit den damit einhergehenden metabolischen und hepatologischen Risiken frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls therapeutische Konsequenzen zu ziehen. Schwierig ist es, generalisierbare Aussagen über die besten Cut-offs zu treffen. Generell hängt die Ermittlung und Verwendung von diagnostischen Schwellenwerten immer vom Kontext der Anwendung der diagnostischen Methode ab (99). Möchte man möglichst wenig Betroffene übersehen und nimmt dafür eine höhere Rate an falsch Positiven in Kauf, wie dies bei Screenings der Fall ist, so wird man einen Test bzw. einen Cut-off mit hoher Sensitivität wählen. Bei einem negativen Testergebnis kann das Vorliegen der Erkrankung dann mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden. Ein solches Beispiel ist die Detektion von fortgeschrittener Fibrosierung, welche bekanntlich den wichtigsten Faktor für ein negatives Outcome bei NAFLD darstellt. Möchte man dagegen nur PatientInnen mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Erkrankung detektieren (beispielsweise für einen Einschluss in eine Studie), sollte ein Cut-off mit hoher Spezifität verwendet werden.

Eine weitere Problematik ergibt sich, dass die meisten der biopsiekontrollierten Studien in Tertiärzentren mit hoher Vortestwahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Steatose bzw. Fibrosierung durchgeführt wurden, und die diagnostische Performance der VCTE daher nicht eins zu eins auf die Anwendung in der Primärversorgung bzw. in der Allgemeinbevölkerung übertragen werden kann, sondern aufgrund anderer Prävalenzen die Nachttestwahrscheinlichkeiten bei gleichem Testergebnis verändert sind (99, 100). Eddowes et al. trugen diesem sogenannten „selection bias“ (158) Rechnung, indem sie für die gefundenen Cut-offs anhand geschätzter Prävalenzen eigene Vorhersagewerte für Hochrisikopopulationen (z.B. in einer Diabetesklinik) bzw. die Allgemeinbevölkerung

errechneten. Eine niedrigere Prävalenz führte dabei zu einer Erhöhung des NPV und zu einer Verringerung des PPV (100).

Die wohl größten Vorteile des CAP liegen in seiner einfachen, raschen und patientInnenfreundlichen Anwendung sowie in der Kombination mit der zeitgleich durchgeführten Lebersteifigkeitsmessung, was seinen routinemäßigen Einsatz rechtfertigt. Geht es jedoch um die genaue Quantifizierung des Fettgehaltes (etwa für Studien), so scheint die MR-basierte Ermittlung der PDFF wesentlich zuverlässiger zu sein (53-55). Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, weisen die in den verschiedenen Studien eruierten optimalen Cut-offs des CAP für die Detektion der einzelnen Steatosegrade bei NAFLD eine viel zu große Schwankungsbreite auf, um sich auf einen einigermaßen zuverlässig anwendbaren Schwellenwert festlegen zu können. Auch die Verwendung des CAP zum Monitoring von Veränderungen der hepatischen Steatosemenge im Verlauf (z.B. zur Therapiekontrolle) muss nach derzeitigem Erkenntnisstand kritisch beurteilt werden (159, 160). In einer longitudinalen Studie waren hohe absolute Veränderungen des CAP (über 38 dB/m) nötig, um mit einigermaßen sicherer Wahrscheinlichkeit eine mehr als 1%ige Veränderung der MR-PDFF zu detektieren (159).

#### **4.4 Conclusio**

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass der CAP zwar schwach mit dem morphometrisch bestimmten Leberfettgehalt korrelierte, die histologischen Steatosegrade jedoch nicht adäquat abbilden konnte. Die optimalen Schwellenwerte für die Detektion von 5 % FPA bzw. 10 % FPA lagen bei 289 dB/m und 302 dB/m. Das Ausmaß der Korrelation und die diagnostische Genauigkeit wurden jeweils maßgeblich durch die Faktoren hoher BMI ( $> 30 \text{ kg/m}^2$ ), große Skin-Liver Capsule Distance ( $> 22 \text{ mm}$ ), höheres Alter ( $> 52$  Jahre) und signifikante Fibrosierung ( $F \geq 2$ ) bzw. erhöhte Lebersteifigkeit ( $\geq 8,2 \text{ kPa}$ ) beeinträchtigt. Bei Personen mit metabolischen Risikofaktoren müssen CAP-Werte daher stets mit Vorsicht interpretiert werden, um eine Überschätzung des tatsächlichen hepatischen Steatosegehalts zu vermeiden. Ein potentieller direkter Einfluss der Fibrose auf den CAP sollte in zukünftigen Studien genauer untersucht werden.

## 5 Literaturverzeichnis

### References

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73-84.
2. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019 Jun;69(6):2672-82.
3. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017 Dec 21;23(47):8263-76.
4. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005 Jul;42(1):44-52.
5. Lonardo A, Nascimbeni F, Maurantonio M, Marrazzo A, Rinaldi L, Adinolfi LE. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol*. 2017 Sep 28;23(36):6571-92.
6. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018 Jul;24(7):908-22.
7. European Association for the Study of the Liver, (EASL), European Association for the Study of Diabetes, (EASD), European Association for the Study of Obesity, (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016 Jun;64(6):1388-402.
8. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):328-57.
9. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015 May;61(5):1547-54.
10. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015 Aug;149(2):389,97.e10.
11. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015 Apr;13(4):643-40.

12. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015 Mar;148(3):547-55.
13. Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, Venkatesan C, Mishra A, Erario M, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology*. 2015 Dec;62(6):1723-30.
14. Younossi Z, Stepanova M, Ong JP, Jacobson IM, Bugianesi E, Duseja A, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019 Mar;17(4):748,755.e3.
15. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011 Jul;54(1):344-53.
16. Tapper EB, Lok AS. Use of Liver Imaging and Biopsy in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2017 Aug 24;377(8):756-68.
17. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):1898-906.
18. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019 Apr;156(5):1264,1281.e4.
19. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol*. 2018 Feb;68(2):305-15.
20. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol*. 2003 Dec;29(12):1705-13.
21. Sasso M, Beaugrand M, de Ledinghen V, Douvin C, Marcellin P, Poupon R, et al. Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound Med Biol*. 2010 Nov;36(11):1825-35.
22. Roeb E, Steffen HM, Bantel H, Baumann U, Canbay A, Demir M, et al. S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease. *Z Gastroenterol*. 2015 Jul;53(7):668-723.
23. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010 Nov 14;16(42):5286-96.
24. Kleiner DE, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Semin Liver Dis*. 2012 Feb;32(1):3-13.

25. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2017 Jan;37 Suppl 1:85-9.
26. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1313-21.
27. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2004 Feb;24(1):3-20.
28. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt EM, Denk H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *J Hepatol.* 2008 May;48(5):821-8.
29. Caldwell SH, Lee VD, Kleiner DE, Al-Osaimi AM, Argo CK, Northup PG, et al. NASH and cryptogenic cirrhosis: a histological analysis. *Ann Hepatol.* 2009;8(4):346-52.
30. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Aug;34(3):274-85.
31. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore).* 2012 Nov;91(6):319-27.
32. Barrera F, George J. The role of diet and nutritional intervention for the management of patients with NAFLD. *Clin Liver Dis.* 2014 Feb;18(1):91-112.
33. Gerber L, Otgonsuren M, Mishra A, Escheik C, Birerdinc A, Stepanova M, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Oct;36(8):772-81.
34. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1038-48.
35. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology.* 2005 Nov;42(5):987-1000.
36. Kim KH, Lee MS. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis and Hormone-Based Therapeutic Approaches. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 24;9:485.
37. Nascimbeni F, Loria P, Ratziu V. Non-alcoholic fatty liver disease: diagnosis and investigation. *Dig Dis.* 2014;32(5):586-96.
38. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology.* 2008 Sep;48(3):792-8.
39. Ekstedt M, Nasr P, Kechagias S. Natural History of NAFLD/NASH. *Curr Hepatol Rep.* 2017;16(4):391-7.

40. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):113-21.
41. Hagstrom H, Nasr P, Ekstedt M, Hammar U, Stal P, Hultcrantz R, et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol*. 2017 Dec;67(6):1265-73.
42. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017 May;65(5):1557-65.
43. Alexander M, Loomis AK, van der Lei J, Duarte-Salles T, Prieto-Alhambra D, Ansell D, et al. Risks and clinical predictors of cirrhosis and hepatocellular carcinoma diagnoses in adults with diagnosed NAFLD: real-world study of 18 million patients in four European cohorts. *BMC Med*. 2019 May 20;17(1):95-x.
44. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol*. 2016 Sep;65(3):589-600.
45. Labenz C, Huber Y, Michel M, Nagel M, Galle PR, Kostev K, et al. Impact of NAFLD on the Incidence of Cardiovascular Diseases in a Primary Care Population in Germany. *Dig Dis Sci*. 2019 Dec 3.
46. VanWagner LB, Rinella ME. Extrahepatic Manifestations of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Hepatol Rep*. 2016 Jun;15(2):75-85.
47. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med*. 2001 Feb 15;344(7):495-500.
48. Zhang YN, Fowler KJ, Hamilton G, Cui JY, Sy EZ, Balanay M, et al. Liver fat imaging-a clinical overview of ultrasound, CT, and MR imaging. *Br J Radiol*. 2018 Sep;91(1089):20170959.
49. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):1082-90.
50. Ozturk A, Grajo JR, Gee MS, Benjamin A, Zubajlo RE, Thomenius KE, et al. Quantitative Hepatic Fat Quantification in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Using Ultrasound-Based Techniques: A Review of Literature and Their Diagnostic Performance. *Ultrasound Med Biol*. 2018 Dec;44(12):2461-75.
51. Nouredin M, Lam J, Peterson MR, Middleton M, Hamilton G, Le TA, et al. Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. *Hepatology*. 2013 Dec;58(6):1930-40.
52. Middleton MS, Heba ER, Hooker CA, Bashir MR, Fowler KJ, Sandrasegaran K, et al. Agreement Between Magnetic Resonance Imaging Proton Density Fat Fraction

Measurements and Pathologist-Assigned Steatosis Grades of Liver Biopsies From Adults With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2017 Sep;153(3):753-61.

53. Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, et al. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology*. 2016 Mar;150(3):626,637.e7.

54. Runge JH, Smits LP, Verheij J, Depla A, Kuiken SD, Baak BC, et al. MR Spectroscopy-derived Proton Density Fat Fraction Is Superior to Controlled Attenuation Parameter for Detecting and Grading Hepatic Steatosis. *Radiology*. 2018 Feb;286(2):547-56.

55. Park CC, Nguyen P, Hernandez C, Bettencourt R, Ramirez K, Fortney L, et al. Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2017 Feb;152(3):598,607.e2.

56. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratzu V, et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 Nov;40(10):1209-22.

57. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006 Nov 2;6:33-.

58. Calori G, Lattuada G, Ragogna F, Garancini MP, Crosignani P, Villa M, et al. Fatty liver index and mortality: the Cremona study in the 15th year of follow-up. *Hepatology*. 2011 Jul;54(1):145-52.

59. European Association for Study of Liver, Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hígado. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 2015 Jul;63(1):237-64.

60. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, et al. Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology*. 2018 Jul;68(1):349-60.

61. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2010 Sep;59(9):1265-9.

62. Xiao G, Zhu S, Xiao X, Yan L, Yang J, Wu G. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Hepatology*. 2017 Nov;66(5):1486-501.

63. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):846-54.

64. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006 Jun;43(6):1317-25.
65. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Oct;7(10):1104-12.
66. McPherson S, Hardy T, Dufour JF, Petta S, Romero-Gomez M, Allison M, et al. Age as a Confounding Factor for the Accurate Non-Invasive Diagnosis of Advanced NAFLD Fibrosis. *Am J Gastroenterol*. 2017 May;112(5):740-51.
67. Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1357-65.
68. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):455-60.
69. Fagan KJ, Pretorius CJ, Horsfall LU, Irvine KM, Wilgen U, Choi K, et al. ELF score  $\geq 9.8$  indicates advanced hepatic fibrosis and is influenced by age, steatosis and histological activity. *Liver Int*. 2015 Jun;35(6):1673-81.
70. Miele L, De Michele T, Marrone G, Antonietta Isgro M, Basile U, Cefalo C, et al. Enhanced liver fibrosis test as a reliable tool for assessing fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease in a clinical setting. *Int J Biol Markers*. 2017 Oct 31;32(4):e397-402.
71. Lichtinghagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, Bahr MJ. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol*. 2013 Aug;59(2):236-42.
72. Dietrich CF, Bamber J, Berzigotti A, Bota S, Cantisani V, Castera L, et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version). *Ultraschall Med*. 2017 Aug;38(4):e16-47.
73. Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol*. 2017 Oct;67(4):829-46.
74. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2015 Aug;149(2):367-5.
75. Ganguli S, DeLeeuw P, Satapathy SK. A Review Of Current And Upcoming Treatment Modalities In Non-Alcoholic Fatty Liver Disease And Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Hepat Med*. 2019 Nov 15;11:159-78.
76. Pennisi G, Celsa C, Spatola F, Dallio M, Federico A, Petta S. Pharmacological Therapy of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: What Drugs Are Available Now and Future

Perspectives. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Nov 7;16(22):10.3390/ijerph16224334.

77. Sandrin L, Tanter M, Gennisson JL, Catheline S, Fink M. Shear elasticity probe for soft tissues with 1-D transient elastography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2002 Apr;49(4):436-46.

78. de Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Biol*. 2008 Sep;32(6 Suppl 1):58-67.

79. Vibration-Controlled Transient Elastography (VCTE), White Paper [Internet]. [cited 21.01.2020]. Available from: <https://fr.zone-secure.net/56337/910844>.

80. Mueller S, Sandrin L. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepat Med*. 2010 May 25;2:49-67.

81. Sasso M, Miette V, Sandrin L, Beaugrand M. The controlled attenuation parameter (CAP): a novel tool for the non-invasive evaluation of steatosis using Fibroscan. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012 Feb;36(1):13-20.

82. Fibroscan 502 Touch Leaflet [Internet].; 2009 [cited 23.01.2020]. Available from: <http://fr.zone-secure.net/56337/890898>.

83. Roulot D, Czernichow S, Le Clesiau H, Costes JL, Vergnaud AC, Beaugrand M. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *J Hepatol*. 2008 Apr;48(4):606-13.

84. Sasso M, Audiere S, Kemgang A, Gaouar F, Corpechot C, Chazouilleres O, et al. Liver Steatosis Assessed by Controlled Attenuation Parameter (CAP) Measured with the XL Probe of the FibroScan: A Pilot Study Assessing Diagnostic Accuracy. *Ultrasound Med Biol*. 2016 Jan;42(1):92-103.

85. FibroScan User Tutorial - Full version [Internet].; 2016 [updated 27.12.; cited 23.01.2020]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=UAWkRCUilGA&list=PLzUuMmAJ6SkLXIGHv7mUcVCwul39SnhUi>.

86. Sasso M, Tengher-Barna I, Zioli M, Miette V, Fournier C, Sandrin L, et al. Novel controlled attenuation parameter for noninvasive assessment of steatosis using Fibroscan((R)): validation in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2012 Apr;19(4):244-53.

87. Myers RP, Pollett A, Kirsch R, Pomier-Layrargues G, Beaton M, Levstik M, et al. Controlled Attenuation Parameter (CAP): a noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography. *Liver Int*. 2012 Jul;32(6):902-10.

88. de Ledinghen V, Vergniol J, Foucher J, Merrouche W, le Bail B. Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver Int*. 2012 Jul;32(6):911-8.

89. de Ledinghen V, Vergniol J, Capdepon M, Chermak F, Hiriart JB, Cassinotto C, et al. Controlled attenuation parameter (CAP) for the diagnosis of steatosis: a prospective study of 5323 examinations. *J Hepatol.* 2014 May;60(5):1026-31.
90. Mi YQ, Shi QY, Xu L, Shi RF, Liu YG, Li P, et al. Controlled attenuation parameter for noninvasive assessment of hepatic steatosis using Fibroscan(R): validation in chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci.* 2015 Jan;60(1):243-51.
91. Lupsor-Platon M, Feier D, Stefanescu H, Tamas A, Botan E, Sparchez Z, et al. Diagnostic accuracy of controlled attenuation parameter measured by transient elastography for the non-invasive assessment of liver steatosis: a prospective study. *J Gastrointest Liver Dis.* 2015 Mar;24(1):35-42.
92. Thiele M, Rausch V, Fluhr G, Kjaergaard M, Piecha F, Mueller J, et al. Controlled attenuation parameter and alcoholic hepatic steatosis: Diagnostic accuracy and role of alcohol detoxification. *J Hepatol.* 2018 May;68(5):1025-32.
93. Piccinni R, Rodrigues SG, Montani M, Murgia G, Delgado MG, Casu S, et al. Controlled attenuation parameter reflects steatosis in compensated advanced chronic liver disease. *Liver Int.* 2019 Dec 10.
94. Baumeler S, Jochum W, Neuweiler J, Bergamin I, Semela D. Controlled attenuation parameter for the assessment of liver steatosis in comparison with liver histology: a single-centre real life experience. *Swiss Med Wkly.* 2019 Apr 26;149:w20077.
95. Chan WK, Nik Mustapha NR, Mahadeva S. Controlled attenuation parameter for the detection and quantification of hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29(7):1470-6.
96. de Ledinghen V, Wong GL, Vergniol J, Chan HL, Hiriart JB, Chan AW, et al. Controlled attenuation parameter for the diagnosis of steatosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016 Apr;31(4):848-55.
97. Lee HW, Park SY, Kim SU, Jang JY, Park H, Kim JK, et al. Discrimination of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Transient Elastography in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One.* 2016 Jun 10;11(6):e0157358.
98. Naveau S, Voican CS, Lebrun A, Gaillard M, Lamouri K, Njike-Nakseu M, et al. Controlled attenuation parameter for diagnosing steatosis in bariatric surgery candidates with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017 Sep;29(9):1022-30.
99. Siddiqui MS, Vuppalanchi R, Van Natta ML, Hallinan E, Kowdley KV, Abdelmalek M, et al. Vibration-Controlled Transient Elastography to Assess Fibrosis and Steatosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jan;17(1):156,163.e2.
100. Eddowes PJ, Sasso M, Allison M, Tsochatzis E, Anstee QM, Sheridan D, et al. Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2019 May;156(6):1717-30.

101. Somda S, Lebrun A, Tranchart H, Lamouri K, Prevot S, Njike-Nakseu M, et al. Adaptation of controlled attenuation parameter (CAP) measurement depth in morbidly obese patients addressed for bariatric surgery. *PLoS One*. 2019 May 24;14(5):e0217093.
102. Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Ledinghen V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol*. 2017 May;66(5):1022-30.
103. Caussy C, Alquraish MH, Nguyen P, Hernandez C, Cepin S, Fortney LE, et al. Optimal threshold of controlled attenuation parameter with MRI-PDFF as the gold standard for the detection of hepatic steatosis. *Hepatology*. 2018 Apr;67(4):1348-59.
104. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010 Feb;51(2):454-62.
105. Petta S, Di Marco V, Camma C, Butera G, Cabibi D, Craxi A. Reliability of liver stiffness measurement in non-alcoholic fatty liver disease: the effects of body mass index. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Jun;33(12):1350-60.
106. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, Hiriart JB, Lannes A, Le Bail B, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016 Sep;65(3):570-8.
107. Tapper EB, Challies T, Nasser I, Afdhal NH, Lai M. The Performance of Vibration Controlled Transient Elastography in a US Cohort of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2016 May;111(5):677-84.
108. Petta S, Wong VW, Camma C, Hiriart JB, Wong GL, Marra F, et al. Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values. *Hepatology*. 2017 Apr;65(4):1145-55.
109. Wong VW, Irls M, Wong GL, Shili S, Chan AW, Merrouche W, et al. Unified interpretation of liver stiffness measurement by M and XL probes in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2019 Nov;68(11):2057-64.
110. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan AW, Chermak F, et al. Liver stiffness measurement using XL probe in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2012 Dec;107(12):1862-71.
111. Singh S, Fujii LL, Murad MH, Wang Z, Asrani SK, Ehman RL, et al. Liver stiffness is associated with risk of decompensation, liver cancer, and death in patients with chronic liver diseases: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Dec;11(12):1573-9.
112. Ferraioli G, Wong VW, Castera L, Berzigotti A, Sporea I, Dietrich CF, et al. Liver Ultrasound Elastography: An Update to the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Guidelines and Recommendations. *Ultrasound Med Biol*. 2018 Dec;44(12):2419-40.

113. de Franchis R, Baveno VI Faculty. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol.* 2015 Sep;63(3):743-52.
114. Mederacke I, Wurstthorn K, Kirschner J, Rifai K, Manns MP, Wedemeyer H, et al. Food intake increases liver stiffness in patients with chronic or resolved hepatitis C virus infection. *Liver Int.* 2009 Nov;29(10):1500-6.
115. Petzold G, Porsche M, Ellenrieder V, Kunsch S, Neesse A. Impact of Food Intake on Liver Stiffness Determined by 2-D Shear Wave Elastography: Prospective Interventional Study in 100 Healthy Patients. *Ultrasound Med Biol.* 2019 Feb;45(2):402-10.
116. Ratchataseetakul K, Rattanasiri S, Promson K, Sringam P, Sobhonslidsuk A. The inverse effect of meal intake on controlled attenuation parameter and liver stiffness as assessed by transient elastography. *BMC Gastroenterol.* 2017 Apr 13;17(1):50-6.
117. Arena U, Vizzutti F, Corti G, Ambu S, Stasi C, Bresci S, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology.* 2008 Feb;47(2):380-4.
118. Tapper EB, Cohen EB, Patel K, Bacon B, Gordon S, Lawitz E, et al. Levels of alanine aminotransferase confound use of transient elastography to diagnose fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012 Aug;10(8):932,937.e1.
119. Wong GL, Chan HL, Choi PC, Chan AW, Lo AO, Chim AM, et al. Association between anthropometric parameters and measurements of liver stiffness by transient elastography. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Mar;11(3):295-3.
120. Shen F, Zheng RD, Shi JP, Mi YQ, Chen GF, Hu X, et al. Impact of skin capsular distance on the performance of controlled attenuation parameter in patients with chronic liver disease. *Liver Int.* 2015 Nov;35(11):2392-400.
121. Kumar M, Rastogi A, Singh T, Behari C, Gupta E, Garg H, et al. Controlled attenuation parameter for non-invasive assessment of hepatic steatosis: does etiology affect performance? *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jul;28(7):1194-201.
122. Petta S, Maida M, Macaluso FS, Di Marco V, Camma C, Cabibi D, et al. The severity of steatosis influences liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2015 Oct;62(4):1101-10.
123. Castera L, Foucher J, Bernard PH, Carvalho F, Allaix D, Merrouche W, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology.* 2010 Mar;51(3):828-35.
124. Myers RP, Pomier-Layrargues G, Kirsch R, Pollett A, Duarte-Rojo A, Wong D, et al. Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients. *Hepatology.* 2012 Jan;55(1):199-208.

125. Berger A, Shili S, Zuberbuhler F, Hiriart JB, Lannes A, Chermak F, et al. Liver Stiffness Measurement With FibroScan: Use the Right Probe in the Right Conditions! *Clin Transl Gastroenterol*. 2019 Apr;10(4):e00023.
126. Chan WK, Nik Mustapha NR, Wong GL, Wong VW, Mahadeva S. Controlled attenuation parameter using the FibroScan(R) XL probe for quantification of hepatic steatosis for non-alcoholic fatty liver disease in an Asian population. *United European Gastroenterol J*. 2017 Feb;5(1):76-85.
127. Chan WK, Nik Mustapha NR, Mahadeva S, Wong VW, Cheng JY, Wong GL. Can the same controlled attenuation parameter cut-offs be used for M and XL probes for diagnosing hepatic steatosis? *J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Oct;33(10):1787-94.
128. Caussy C, Brissot J, Singh S, Bassirian S, Hernandez C, Bettencourt R, et al. Prospective, Same-day, Direct Comparison of CAP With the M vs the XL Probe in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Using Magnetic Resonance Imaging Proton Density Fat Fraction as the Standard. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec 13.
129. de Ledinghen V, Hiriart JB, Vergniol J, Merrouche W, Bedossa P, Paradis V. Controlled Attenuation Parameter (CAP) with the XL Probe of the Fibroscan((R)): A Comparative Study with the M Probe and Liver Biopsy. *Dig Dis Sci*. 2017 Sep;62(9):2569-77.
130. Boursier J, Zarski JP, de Ledinghen V, Rousselet MC, Sturm N, Lebaill B, et al. Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography. *Hepatology*. 2013 Mar;57(3):1182-91.
131. Wong VW, Petta S, Hiriart JB, Camma C, Wong GL, Marra F, et al. Validity criteria for the diagnosis of fatty liver by M probe-based controlled attenuation parameter. *J Hepatol*. 2017 Sep;67(3):577-84.
132. Vuppalanchi R, Siddiqui MS, Van Natta ML, Hallinan E, Brandman D, Kowdley K, et al. Performance characteristics of vibration-controlled transient elastography for evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):134-44.
133. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2735-52.
134. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
135. Bedossa P, Arola J, Susan D, Gouw AS, Maria G, Lackner K, et al. The EPoS staging system is a reproducible 7-tier fibrosis score for NAFLD adapted both to glass slides and digitized images (e-slides). *J Hepatol*. 2018;68:S553.
136. Binder LP. Morphometric analysis of hepatic steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis [dissertation]. Medical University of Graz; 2015.

137. Käferböck P. Morphologic features of alcohol-related liver Disease: Correlation with clinical stages and prognostic relevance [dissertation]. Medical University of Graz; 2019.
138. Calvaruso V, Burroughs AK, Standish R, Manousou P, Grillo F, Leandro G, et al. Computer-assisted image analysis of liver collagen: relationship to Ishak scoring and hepatic venous pressure gradient. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1236-44.
139. Buzzetti E, Hall A, Ekstedt M, Manuguerra R, Guerrero Misas M, Covelli C, et al. Collagen proportionate area is an independent predictor of long-term outcome in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019 May;49(9):1214-22.
140. Hall AR, Dhillon AP, Green AC, Ferrell L, Crawford JM, Alves V, et al. Hepatic steatosis estimated microscopically versus digital image analysis. *Liver Int*. 2013 Jul;33(6):926-35.
141. Fujimori N, Tanaka N, Shibata S, Sano K, Yamazaki T, Sekiguchi T, et al. Controlled attenuation parameter is correlated with actual hepatic fat content in patients with non-alcoholic fatty liver disease with none-to-mild obesity and liver fibrosis. *Hepatol Res*. 2016 Sep;46(10):1019-27.
142. Galaski J, Schulz L, Krause J, Lohse AW. Discordance in steatosis classification between liver biopsy and transient elastography for high controlled attenuation parameter (CAP) values. *Z Gastroenterol*. 2018 Jan;56(1):36-42.
143. Perazzo H, Veloso VG, Grinsztejn B, Hyde C, Castro R. Factors That Could Impact on Liver Fibrosis Staging by Transient Elastography. *Int J Hepatol*. 2015;2015:624596.
144. Lambert J, Halfon P, Penaranda G, Bedossa P, Cacoub P, Carrat F. How to measure the diagnostic accuracy of noninvasive liver fibrosis indices: the area under the ROC curve revisited. *Clin Chem*. 2008 Aug;54(8):1372-8.
145. Boursier J, de Ledinghen V, Sturm N, Amrani L, Bacq Y, Sandrini J, et al. Precise evaluation of liver histology by computerized morphometry shows that steatosis influences liver stiffness measured by transient elastography in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2014 Mar;49(3):527-37.
146. Koehler EM, Schouten JN, Hansen BE, Hofman A, Stricker BH, Janssen HL. External validation of the fatty liver index for identifying nonalcoholic fatty liver disease in a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Sep;11(9):1201-4.
147. Cuthbertson DJ, Weickert MO, Lythgoe D, Sprung VS, Dobson R, Shoajee-Moradie F, et al. External validation of the fatty liver index and lipid accumulation product indices, using 1H-magnetic resonance spectroscopy, to identify hepatic steatosis in healthy controls and obese, insulin-resistant individuals. *Eur J Endocrinol*. 2014 Nov;171(5):561-9.
148. El-Badry AM, Breitenstein S, Jochum W, Washington K, Paradis V, Rubbia-Brandt L, et al. Assessment of hepatic steatosis by expert pathologists: the end of a gold standard. *Ann Surg*. 2009 Nov;250(5):691-7.
149. Juluri R, Vuppalanchi R, Olson J, Unalp A, Van Natta ML, Cummings OW, et al. Generalizability of the nonalcoholic steatohepatitis Clinical Research Network histologic

scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Jan;45(1):55-8.

150. Franzen LE, Ekstedt M, Kechagias S, Bodin L. Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. *Mod Pathol*. 2005 Jul;18(7):912-6.

151. Li M, Song J, Mirkov S, Xiao SY, Hart J, Liu W. Comparing morphometric, biochemical, and visual measurements of macrovesicular steatosis of liver. *Hum Pathol*. 2011 Mar;42(3):356-60.

152. Liu K, Wong VW, Lau K, Liu SD, Tse YK, Yip TC, et al. Prognostic Value of Controlled Attenuation Parameter by Transient Elastography. *Am J Gastroenterol*. 2017 Dec;112(12):1812-23.

153. Margini C, Murgia G, Stirnimann G, De Gottardi A, Semmo N, Casu S, et al. Prognostic Significance of Controlled Attenuation Parameter in Patients With Compensated Advanced Chronic Liver Disease. *Hepatology*. 2018 Jul 24;67(2):929-40.

154. Scheiner B, Steininger L, Semmler G, Unger LW, Schwabl P, Bucsics T, et al. Controlled attenuation parameter does not predict hepatic decompensation in patients with advanced chronic liver disease. *Liver Int*. 2019 Jan;39(1):127-35.

155. Chalasani N, Wilson L, Kleiner DE, Cummings OW, Brunt EM, Unalp A, et al. Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008 May;48(5):829-34.

156. Ajmera V, Park CC, Caussy C, Singh S, Hernandez C, Bettencourt R, et al. Magnetic Resonance Imaging Proton Density Fat Fraction Associates With Progression of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018 Aug;155(2):307,310.e2.

157. Kwok R, Choi KC, Wong GL, Zhang Y, Chan HL, Luk AO, et al. Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study. *Gut*. 2016 Aug;65(8):1359-68.

158. Catalogue of Bias Collaboration, Nunan D, Bankhead C, Aronson JK. Selection bias. *Catalogue Of Bias* 2017 [Internet]. [cited May 14, 2020]. Available from: <http://www.catalogofbias.org/biases/selection-bias/>.

159. Ahn SB, Jun DW, Kang BK, Kim M, Chang M, Nam E. Optimal cutoff value for assessing changes in intrahepatic fat amount by using the controlled attenuation parameter in a longitudinal setting. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Dec;97(50):e13636.

160. Wang JH, Ou HY, Yen YH, Chen CH, Lu SN. Usefulness of Controlled Attenuation Parameter in Detecting and Monitoring Hepatic Steatosis with MRI-PDFF as Reference. *Dig Dis Sci*. 2019 Oct 15.

## Anhang – A

Tabelle 15. EPoS (Elucidating Pathways of Steatohepatitis) Staging System, nach Bedossa et al. (135)

Stadium	Definition
0	Keine oder wenig Fibrose: <i>perivenulär (max. 2 terminale Venolen, sinusoidal nur zart) und/oder portal (mild)</i>
1	Milde Fibrose: <i>Perivenulär (bis 5 Hepatozyten), perizellulär und/oder sinusoidal (&gt;2 terminale Venolen) und/oder periportal (Ausdehnung ins periportale Parenchym in mind. 1 Portaltrakt)</i>
2	Moderate Fibrose: <i>Sinusoidal und/oder perizellulär, Ausdehnung von Portaltrakt und/oder perivenulärer Zone zur mittleren Zone</i>
3	Vereinzelte septale Fibrose: <i>mind. 1 komplettes Septum, &lt; 2 Septen pro 10 mm Biopsielänge</i>
4	Fortgeschrittene septale Fibrose: <i>&gt; 2 fibröse Septen pro 10 mm Biopsielänge</i>
5	Inkomplette Zirrhose: <i>Septale Fibrose mit wenigen isolierten Knoten</i>
6	Zirrhose

## Anhang – B

Tabelle 16. NAFL vs. NASH

Merkmal	NAFL (N = 30)	NASH (N = 17)	p-Wert
Geschlecht: ♂ / ♀ (%)	21 (70,0) / 9 (30,0)	11 (64,7) / 6 (35,3)	0,708
Alter (Jahre)	51 (36, 60)	55 (47, 62)	0,184
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,7 (25,3, 30,7)	31,6 (27,0, 33,5)	0,057
< 25 / 25 – 30 / > 30 (%)	5 (16,7) / 17 (56,7) / 8 (26,7)	2 (11,8) / 3 (17,6) / 12 (70,6)	<b>0,010</b>
Bauchumfang (cm)	101 (94, 109)	108 (104, 123)	<b>0,033</b>
SCD (mm)	20,0 (16,3, 23,0)	23,0 (20,5, 27,5)	0,053
Diabetes Mellitus Typ II (%)	5 (16,7)	9 (52,9)	<b>0,009</b>
Arterielle Hypertonie (%)	14 (46,7)	10 (58,8)	0,423
Metabolisches Syndrom (%)	11 (36,7)	10 (58,8)	0,050
Rauchen: ja / St.p. (%)	6 (20,0) / 4 (13,3)	1 (5,9) / 3 (17,6)	0,627
Glucose, nüchtern	98 (86, 108)	118 (98, 167)	<b>0,004</b>
Insulin (µU/ml)	11,4 (8,1, 18,8)	19,3 (14,6, 33,6)	<b>0,004</b>
Triglyceride (mg/dl)	117 (80, 182)	154 (125, 205)	0,063
Gesamtcholesterin (mg/dl)	206 (178, 243)	173 (148, 194)	<b>0,006</b>
HDL (mg/dl)	41 (34, 48)	34 (28, 42)	0,083
ALT (U/l)	69 (50, 114)	83 (48, 126)	0,790
AST (U/l)	47 (34, 63)	65 (54, 98)	<b>0,019</b>
GGT (U/l)	87 (52, 179)	128 (74, 330)	0,245
AP (U/l)	67 (55, 84)	79 (65, 117)	0,106
Bilirubin gesamt (mg/dl)	0,71 (0,45, 0,87)	0,84 (0,55, 1,22)	0,126
Bilirubin direkt (mg/dl)	0,18 (0,14, 0,25)	0,23 (0,13, 0,33)	0,427
Cholinesterase (U/l)	9379 (7927, 10772)	8497 (6265, 10189)	0,207
Albumin (g/dl)	4,7 (4,5, 4,9)	4,6 (4,3, 4,8)	0,109
PZ (%)	98 (91, 107)	90 (86, 103)	0,074
INR	1,02 (0,97, 1,05)	1,06 (0,99, 1,10)	0,086
MCV (fl)	86,1 (82,7, 90,2)	87,6 (84,8, 89,6)	0,438
Leukozytenzahl (G/l)	6,00 (4,94, 7,00)	6,80 (5,47, 8,25)	0,075
Thrombozytenzahl (G/l)	223 (192, 258)	199 (142, 236)	0,057
Kreatinin (mg/dl)	0,95 (0,76, 1,00)	0,88 (0,79, 0,99)	0,706
HOMA-IR	2,89 (1,61, 4,53)	4,78 (3,67, 16,71)	<b>0,002</b>
FLI	81 (62, 90)	96 (91, 99)	<b>0,006</b>
FIB-4	1,27 (0,59, 1,87)	2,10 (1,20, 4,82)	<b>0,006</b>
ELF	8,26 (7,95, 9,00)	9,46 (8,80, 10,77)	<b>&lt; 0,001</b>
CAP	313 (297, 353)	300 (273, 341)	0,391
LS	7,2 (5,4, 11,7)	14,8 (10,0, 24,4)	<b>0,003</b>
Steatose: S1 / S2 / S3 (%)	14 (46,7) / 7 (23,3) / 9 (30,0)	9 (52,9) / 6 (35,3) / 2 (11,8)	0,361
Fibrose: F1 / F2 / F3 / F4 (%)	9 (30) / 2 (6,7) / 2 (6,7) / 1 (3,3)	2 (11,8) / 3 (17,6) / 5 (29,4) / 4 (23,5)	<b>0,005</b>
FPA	12,70 (7,92, 19,03)	8,08 (4,48, 18,94)	0,215
Overall CPA	1,41 (0,75, 2,17)	4,33 (2,04, 10,96)	<b>0,001</b>
Pericellular CPA	0,37 (0,21, 0,70)	1,08 (0,49, 2,16)	<b>0,001</b>

*Chi-Quadrat-Test bzw. exakter Fisher-Test (qualitative Merkmale), Mann-Whitney-U-Test (quantitative Merkmale).*

## Anhang – C

Tabelle 17. Korrelationsanalysen der LS mit dem Fibroestadium und der CPA in Subgruppen

LSM	Fibroestadium (CRN)			pericellular CPA		
	$\rho$	p-Wert	n	$\rho$	p-Wert	n
inklusive unzuverlässige Messungen	<b>0,72</b>	< 0,001	61	<b>0,59</b>	< 0,001	60
alle zuverlässigen Messungen	<b>0,76</b>	< 0,001	56	<b>0,61</b>	< 0,001	55
SCD < 22 mm	<b>0,55</b>	0,005	24	<b>0,43</b>	0,037	24
SCD $\geq$ 22 mm	<b>0,83</b>	< 0,001	26	<b>0,70</b>	< 0,001	25
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup>	<b>0,59</b>	< 0,001	35	<b>0,53</b>	0,001	35
BMI $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup>	<b>0,87</b>	< 0,001	21	<b>0,64</b>	< 0,001	20
Alter < 52 Jahre	<b>0,42</b>	0,031	27	<b>0,41</b>	0,037	26
Alter $\geq$ 52 Jahre	<b>0,77</b>	< 0,001	29	<b>0,45</b>	0,015	29
S (CRN) < 2	<b>0,78</b>	< 0,001	35	<b>0,60</b>	< 0,001	34
S (CRN) $\geq$ 2	<b>0,70</b>	< 0,001	21	<b>0,51</b>	0,017	21
CAP < 300 dB/m	<b>0,60</b>	0,030	13	<b>0,56</b>	0,046	13
CAP $\geq$ 300 dB/m	<b>0,81</b>	< 0,001	22	<b>0,72</b>	< 0,001	21
FPA < 4%	<b>0,67</b>	0,013	13	<b>0,66</b>	0,015	13
FPA $\geq$ 4%	<b>0,74</b>	< 0,001	25	<b>0,63</b>	0,001	25

Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ( $\rho$ ), signifikante Korrelationen sind fett gedruckt.

Tabelle 18. ROC-Analysen der Lebersteifigkeitsmessung in Subgruppen

LSM		AUROC F $\geq$ 2	AUROC F $\geq$ 3	AUROC F = 4
inklusive „unzuverlässige“ Messungen	61	<b>0,90</b> (0,82 – 0,98)	<b>0,94</b> (0,88 – 1,00)	<b>0,95</b> (0,88 – 1,00)
Alle zuverlässigen Messungen	56	<b>0,92</b> (0,85 – 1,00)	<b>0,98</b> (0,94 – 1,00)	<b>0,96</b> (0,89 – 1,00)
SCD < 22 mm	24	<b>0,90</b> (0,72 – 1,00)	<b>0,99</b> (0,95 – 1,00)	ND
SCD $\geq$ 22 mm	26	<b>0,94</b> (0,86 – 1,00)	<b>0,98</b> (0,94 – 1,00)	ND
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup>	35	<b>0,89</b> (0,75 – 1,00)	<b>0,99</b> (0,97 – 1,00)	<b>0,97</b> (0,91 – 1,00)
BMI $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup>	21	<b>0,91</b> (0,78 – 1,00)	<b>0,93</b> (0,82 – 1,00)	<b>0,92</b> (0,79 – 1,00)
Alter < 52 Jahre	18	<b>0,88</b> (0,66 – 1,00)	<b>1,00</b> (1,00 – 1,00)	<b>1,00</b> (1,00 – 1,00)
Alter $\geq$ 52 Jahre	19	<b>0,88</b> (0,76 – 1,00)	<b>0,93</b> (0,84 – 1,00)	<b>0,90</b> (0,74 – 1,00)
S (CRN) < 2	35	<b>0,95</b> (0,89 – 1,00)	<b>0,96</b> (0,91 – 1,00)	ND
S (CRN) $\geq$ 2	21	<b>0,84</b> (0,64 – 1,00)	<b>1,00</b> (1,00 – 1,00)	ND
CAP < 300 dB/m	13	<b>0,97</b> (0,87 – 1,00)	<b>0,97</b> (0,87 – 1,00)	ND
CAP $\geq$ 300 dB/m	22	<b>0,92</b> (0,79 – 1,00)	<b>0,98</b> (0,92 – 1,00)	ND
FPA < 4 %	13	<b>0,98</b> (0,92 – 1,00)	<b>1,00</b> (1,00 – 1,00)	<b>1,00</b> (1,00 – 1,00)
FPA $\geq$ 4 %	25	<b>0,86</b> (0,70 – 1,00)	<b>0,96</b> (0,89 – 1,00)	<b>0,90</b> (0,75 – 1,00)

Signifikante AUROCs fett gedruckt, 95%-KI in Klammern; ND, nicht durchgeführt.