Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleichender Zytotoxizitätsnachweis der Immunsuppressiva Sirolimus und Mycophenolatmofetil auf die humanen hepatozellulären Karzinom-Zelllinien HEP3B und SKHEP1 *in vitro*

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Hartwig

aus Bremen

Datum der Promotion: 05.12.2014

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....IV
Abbildungsverzeichnis.....VII
Tabellenverzeichnis.....VIII
Abstrakt.....1
1. Einleitung.....3
1.1 Vorbemerkung.....3
1.2. Hepatozelluläres Karzinom.....4
1.2.1 Epidemiologie.....5
1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....6
1.2.2.1 Hepatitis-B-Infektion.....6
1.2.2.2 Hepatitis-C-Infektion.....7
1.2.2.3 Alkoholkonsum.....7
1.2.2.4 Aflatoxin.....8
1.2.2.5 Adipositas.....8
1.2.2.6 Diabetes mellitus.....9
1.2.2.7 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung.....9
1.2.2.8 Hämochromatose.....9
1.2.2.9 Tabakkonsum.....10
1.2.2.10 Vinylchlorid.....10
1.2.2.11 Orale Kontrazeptiva.....11
1.2.3 Molekularpathologie der Hepatokarzinogenese.....11
1.2.3.1 Induktion der Hepatokarzinogenese im Zirrhosestadium.....11
1.2.3.2 Molekulare Modifikationen im HCC.....13
1.2.4 Therapie des Leberzellkarzinoms.....14
1.2.4.1 Staging vor Therapiebeginn.....14
1.2.4.2 Kurative Therapie.....21
1.2.4.3 Nicht-kurative Therapie.....34
2. Zielsetzung.....39
3. Material und Methoden.....42

3.1 Medikamente....42
3.1.1 Mycophenolatmofetil....42
3.1.1.1 Eigenschaften....42
3.1.1.2 Wirkmechanismus....43
3.1.1.3 Experimentelle Erfahrungen mit Mycophenolatmofetil....43
3.1.1.4 Klinische Erfahrungen mit Mycophenolatmofetil....44
3.1.1.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen....45
3.1.2 Sirolimus....45
3.1.2.1 Eigenschaften....45
3.1.2.2 Wirkmechanismus....46
3.1.2.3 Experimentelle Erfahrungen mit Sirolimus....47
3.1.2.4 Klinische Erfahrungen mit Sirolimus....48
3.1.2.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen....48
3.2 Zelllinien....49
3.3 Zellkultur....50
3.4 XTT-Proliferationstest....52
3.5 Statistische Auswertung....53
4. Ergebnisse....54
4.1 SKHEP1 + MMF....54
4.2 HEP3B + MMF....56
4.3 SKHEP1 + Sirolimus....58
4.4 HEP3B + Sirolimus....60
4.5 SKHEP1 + MMF + Sirolimus....62
4.6 HEP3B + MMF + Sirolimus....64
5. Diskussion....66
6. Zusammenfassung....77
7. Literaturverzeichnis....80
8. Danksagung....103
9. Eidesstattliche Versicherung....104
10. Curriculum Vitae....105

Abkürzungsverzeichnis

AFB1	Aflatoxin B1
AEP	Akustisch evozierte Potentiale
AJCC	*American Joint Committee on Cancer*
ATP	Adenosintriphosphat
ARF	*Alternate Reading Frame*
BCLC	*Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System*
BMI	*Body Mass Index*
CDK2	*Cyclin-Dependent Kinase 2*
CNI	Calcineurininhibitoren
CTP	Child-Turcotte-Pugh
DFS	*Disease-Free Survival*
DRI	*Donor Risk Index*
DSO	Deutsche Stiftung Organspende
EEG	Elektroenzephalografie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGRF	*Epidermal Growth Factor Receptor*
FLR	*Future Liver Remnant*
GEC	Galaktose-Eliminationskapazität
GMP	Guanosin-Monophosphat
HLA	*Human Leukocyte Antigen*
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
IARC	*International Agency for Research on Cancer*
ICG	*Indocyanine Green Clearance*
IGF	*Insulin-like Growth Factor*
IGF2R	*Insulin-like Growth Factor 2 Receptor*
IL	Interleukin
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
INR	*International Normalized Ratio*
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase

i.v.	intravenös
LCSGJ	*Liver Cancer Study Group of Japan*
LiMAx	Liver MAximum Capacity-Test
LOH	*Loss of Heterozygosity*
LTX	Lebertransplantation
MEGX	Monoethylglycinexylidid-Test
MELD	*Model of Endstage Liver Disease*
MMF	Mycophenolatmofetil
MPA	Mycophenolat
MPAG	MPA-Phenolglucuronid
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	*Mammalian Target of Rapamycin*
NAFLD	*Nonalcoholic Fatty Liver Disease*
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NTX	Nierentransplantation
p16-INK4a	*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PI3K/AKT	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B
PMS	Phenazinmethosulfat
ppm	*Parts per Million*
PVC	Polyvinylchlorid
Raf	*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*
Rb	Retinoblastoma
RFA	Radiofrequenzablation
RILD	*Radiation Induced Liver Disease*
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEP	Somatosensibel evozierte Potentiale
SERM	selektiver Estrogenrezeptor-Modulator
SIRT	Selektive intraarterielle Radiotherapie
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TPG	Transplantationsgesetz

UICC	*International Union Against Cancer*
UCSF	*University of California San Franscisco*
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5 - ((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Barcelona Clinic for Liver Cancer - HCC Behandlungsalgorithmus.....19
Abbildung 2: Nomenklatur der Leberresektion.....24
Abbildung 3: Strukturformel Mycophenolatmofetil.....42
Abbildung 4: Strukturformel Sirolimus.....46
Abbildung 5: SKHEP1-Zellen.....49
Abbildung 6: HEP3B-Zellen.....50
Abbildung 7: Strukturformel von XTT und seiner Reduktionsform Formazan.....52
Abbildung 8: XTT-Test-Platte mit unterschiedlich starker Vitalitätsfärbung.....53
Abbildung 9: Proliferationsverhalten SKHEP1 + MMF.....54
Abbildung 10: Zellviabilität SKHEP1 + MMF.....55
Abbildung 11: Proliferationsverhalten HEP3B + MMF.....56
Abbildung 12: Zellviabilität HEP3B + MMF.....57
Abbildung 13: Proliferationsverhalten SKHEP1 + Sirolimus.....58
Abbildung 14: Zellviabilität SKHEP1 + Sirolimus.....59
Abbildung 15: Proliferationsverhalten HEP3B + Sirolimus.....60
Abbildung 16: Zellviabilität HEP3B + Sirolimus.....61
Abbildung 17: Proliferationsverhalten SKHEP1 + MMF + Sirolimus.....62
Abbildung 18: Zellviabilität SKHEP1 + MMF + Sirolimus.....63
Abbildung 19: Proliferationsverhalten HEP3B + MMF + Sirolimus.....64
Abbildung 20: Zellviabilität HEP3B + MMF + Sirolimus.....65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Altersstandardisierte Inzidenzrate der HCC-Erkrankungen.....5
Tabelle 2: TNM-Klassifikation.....15
Tabelle 3: HCC-Stadieneinteilung der TNM-Klassifikation.....16
Tabelle 4: Scoring der Okuda-Klassifikation.....16
Tabelle 5: Berechnung des CLIP-Score.....17
Tabelle 6: Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System.....18
Tabelle 7: Scoring des Japan Integrated Staging Score.....20
Tabelle 8: 3-Monats-Todesrate in Abhängigkeit des MELD-Score.....26
Tabelle 9: Langzeit-Resultate von HCC-Patienten.....32
Tabelle 10: Übersicht der Versuchsgruppen.....51
Tabelle 11: Versuchsgruppenaufbau.....66
Tabelle 12: Zellviabilitäten der Zelllinien in Abhängigkeit des Medikamentes.....70
Tabelle 13: Vergleichende Wirksamkeit der Mono- und Dualkonzentrationen.....71

Abstrakt

Vergleichender Zytotoxizitätsnachweis der Immunsuppressiva Sirolimus und Mycophenolatmofetil auf die humanen hepatozellulären Karzinom-Zelllinien HEP3B und SKHEP1 *in vitro*.

Einleitung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eines der häufigsten Malignome weltweit und mit einer geringen Heilungsrate verbunden. Bezüglich Rezidivfreiheit und Überlebenswahrscheinlichkeit präsentieren sich aktuell bei der Lebertransplantation die besten Ergebnisse. Posttransplantär ist eine lebenslange Immunsuppression mit Calcineurininhibitoren (CNI) und/oder Antimetaboliten wie Sirolimus und Mycophenolatmofetil (MMF) notwendig. Für letztere ist bei verschiedenen Malignomentitäten ein antiproliferativer Effekt bekannt.

Methodik

Ziel dieser Arbeit war die Testung der mono- und dualtherapeutischen Proliferationshemmung von Sirolimus und MMF auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B. Nachgewiesen wurde die Reduktion der Zellviabilität *in vitro* durch den XTT-Proliferationstest.

Ergebnisse

Die ausgeprägteste Hemmung erreichte Sirolimus bei SKHEP1 mit einer Zellviabilität von 9,7 % ($p = 0,004$). Die Zelllinie HEP3B wurde durch die duale Anwendung maximal gehemmt auf 26,4 % ($p = 0,004$). Eine Dosisreduktion war jeweils durch die duale Anwendung möglich.

Schlussfolgerung

Es zeigte sich eine inhibierende Wirkung von Sirolimus und MMF auf die HCC-Zellen SKHEP1 und HEP3B. Somit ist klinisch eine antitumorale Wirkung denkbar. Indikationen wären der Einsatz zur Rezidivprophylaxe, zur Reduktion des Zweitkarzinomrisikos, zur Verhinderung von *de novo*-Malignomen sowie die palliative Therapie.

Abstract

Comparative verification of cytotoxicity of the immunosuppressive agents sirolimus and mycophenolate mofetil on the human hepatocellular carcinoma cell lines HEP3B and SKHEP1 *in vitro*.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies worldwide and is associated with a low cure rate. Currently liver transplantation represents the best results concerning the recurrence rate and the post operative survival. A lifelong immunosuppression is required with calcineurin inhibitors (CRI) and/or antimetabolites such as sirolimus and mycophenolate mofetil (MMF). For sirolimus and MMF an antiproliferative effect is proven with various tumor celllines.

Methodology

The aim of this study was to detect the mono and dual therapeutic inhibition of proliferation by sirolimus and MMF on the HCC cell lines HEP3B and SKHEP1. The effect of these drugs on the cell lines was tested *in vitro* by the XTT proliferation assay.

Results

The strongest inhibition of proliferation was achieved by sirolimus on SKHEP1 with a cell viability of 9,7 % ($p = 0,004$). The viability of the HEP3B-cell line was reduced to 26,4 % ($p = 0,004$) with a dual application of the drugs. A dose reduction was possible with dual application.

Conclusion

The results presented an inhibitory effect of sirolimus and/or MMF on the HCC-cell lines SKHEP1 and HEP3B. Due to the combined use of sirolimus and MMF an additional anti-tumor effect is conceivable in clinical settings. This would expand the range of indications: to prevent recurrence, to reduce the risk for second cancer, for the prevention of *de novo* malignancies and as therapeutic agents for palliative aspects.

1. Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Maligne Erkrankungen sind nach den Herz-Kreislauferkrankungen die häufigste Todesursache der deutschen Bevölkerung. Starben im Jahr 2012 insgesamt 349 217 Menschen durch kardiovaskuläre Krankheiten, so folgten die malignomassoziierten Todesfälle im gleichen Jahr mit 221 611 Todesfällen (Statistisches Bundesamt 2014). Unter den Krebssterbefällen 2010 sind Lebermalignome in Deutschland bei Männern an 6. Stelle zu finden mit einem Anteil von 4,1 % aller Malignome. Bei Frauen befinden sie sich an 10. Stelle mit knapp 2,5 % (RKI und GEKID 2013). Global betrachtet sind Lebermalignome mit einer jährlichen Inzidenz von 749 744 Fällen an fünfter Position unter den Krebserkrankungen vertreten (Ferlay et al. 2010). Unter den primären Lebermalignomen stellt das HCC mit einem Anteil zwischen 80 - 90 % die zahlenmäßig größte Entität dar. In 80 - 90 % der Fälle liegt dem HCC eine vorbestehende Leberzirrhose zugrunde.

Die Risikofaktoren hierfür sind mannigfaltig, regional verschieden und spiegeln die geographische Prävalenz der Erkrankung wider. Stellen in den Subsahara-Regionen sowie in Ostasien die Infektionen mit Hepatitis-B und -C sowie die Aflatoxinexposition die Hauptgründe für die Erkrankung dar, so ist die äthyltoxische Leberzirrhose in den westlichen Ländern der maßgebliche Risikofaktor. Der Verlauf der Leberzirrhose ist langsam und oft lange Zeit frei von klinischen Symptomen. Der zirrhotische Umbau gesunden Lebergewebes läuft unerkannt ab und wird oft erst im Spätstadium über die Kompensationsmechanismen und deren klinischer Symptomatiken erkannt, sodass ein notwendiges Karzinom-Screening in der Regel spät initiiert wird. Folglich werden HCC-Diagnosen üblicherweise im Spätstadium der Erkrankung gestellt, mit dementsprechend schlechter Prognose für den Patienten. Von den erstdiagnostizierten Patienten sind unter 20 % einer kurativen Therapie zugänglich (Borie et al. 2008; Livraghi et al. 2011). Patienten im fortgeschrittenem Stadium (Gefäßeinbruch, extrahepatische Metastasierung) haben eine 1-Jahres-Überlebensrate von ca. 50 %. Etwa 60 % der HCC-Patienten weisen bei Diagnosestellung bereits Metastasen auf (Bruns et al. 2010). Die kurativen Therapiemaßnahmen beschränken sich gegenwärtig auf die operative Therapie, wobei die Radiofrequenzablation als lokal ablative Maßnahme zur Diskussion steht. Der Umfang der Leberteilresektion ist von dem

funktionellen Restvolumen der verbleibenden Leber abhängig und ist bei gesunden Personen bis auf 25 % Restlebervolumen möglich (Clavien et al. 2007). Da jedoch die Leberzirrhose in der Frühgeschichte der Erkrankung einen großen Stellenwert hat, ist dieses funktionelle Volumen oft eingeschränkt und kann den notwendigen kurativen Resektionsumfang verhindern. Für diese Patienten stellt eine Lebertransplantation (LTX) eine kurative Therapiealternative dar. Posttransplantär benötigen diese Patienten eine lebenslange Immunsuppression, um eine Abstoßung des Organs zu verhindern. Problematisch kann die klassische Immunsuppression mit CNI aufgrund der medikamenteneigenen Nephrotoxizität werden, da nach LTX bereits *per se* ein erhöhtes Risiko für akutes Nierenversagen besteht (Lima et al. 2003). Unter den immunsuppressiven Medikamenten stellen die Antimetabolite Sirolimus und MMF aufgrund ihrer fehlenden Nephrotoxizität eine Alternative dar. Neben der immunsuppressiven konnte auch eine zytotoxische Wirkung für Sirolimus auf die HCC-Zelllinie H4IIEC und für MMF in Kombination mit Doxorubicin auf die HCC-Zelllinie HEPG2 nachgewiesen werden (Ribatti et al. 2007; Chu et al. 2010). Deshalb stellte sich die Frage, ob diese beiden Medikamente eine monotherapeutische Wirkung auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B besitzen und ob zusätzlich in der dualen Anwendung ein synergistischer antiproliferativer Effekt nachweisbar und dadurch eventuell eine Reduktion der jeweiligen Konzentration möglich ist. Diese antitumorale Wirkung könnte neben der immunsuppressiven einen positiven Einfluss auf die Rezidivbildung des Patienten haben. Auch ist eine Reduktion der Anzahl der *de novo*-Malignome denkbar, die für einen Großteil der Todesfälle nach LTX verantwortlich sind. Weiterhin wäre eine Tumortherapie unter palliativen Aspekten möglich, wodurch sich das Spektrum der Therapiemöglichkeiten nochmals erweitern würde (s. a. Kapitel 5: Diskussion).

1.2. Hepatozelluläres Karzinom

Unter den primären Lebermalignomen gibt es in abnehmender Häufigkeit das von den Hepatozyten ausgehende hepatozelluläre Karzinom (80 - 90 %), das von den Gallengangsepithelzellen ausgehende intrahepatische Gallengangskarzinom (cholangiozelluläres Karzinom [CCC]; 10 - 15 %), das Hepatoblastom, biliäre Zystadenokarzinome und Hämangiosarkome (< 1 - 5 %). Sekundäre Lebermalignome sind überwiegend Lebermetastasen von Malignomen anderer Entitäten.

1.2.1 Epidemiologie

Malignome der Leber stehen bei der weltweiten Inzidenz von Tumorerkrankungen mit 749 744 Fällen an fünfter Position. Unter den Geschlechtern ist eine deutliche Mehrbelastung bei den Männern zu finden: 523 432 Fälle bei Männern gegenüber 226 312 weiblichen Neuerkrankten im Jahr 2008. Die globale Verteilung des HCC ist ebenfalls ungleichmäßig. Über 80 % der Fälle sind in Subsahara-Afrika und Ost-Asien zu finden. Allein in China sind 54 % der weltweiten Fälle lokalisiert (Ferlay et al. 2010). Vergleicht man die altersstandardisierte Inzidenzrate der Hochrisiko- mit den Niedrigrisikoländern zeigen sich nach Parkin folgende Werte; siehe Tab. 1:

Land	Männer	Frauen
Süd-Korea	48,8/100 000	11,6/100 000
Gambia	39,6/100 000	14,6/100 000
China	35,2/100 000	13,3/100 000
Senegal	28,4/100 000	12,2/100 000
Italien	13,5/100 000	4,6/100 000
Spanien	7,5/100 000	2,4/100 000
Australien	3,6/100 000	1,0/100 000
England	2,2/100 000	1,1/100 000

Tabelle 1: Altersstandardisierte Inzidenzrate der HCC-Erkrankungen (nach Parkin 2002)

Die Ethnie kann bei der HCC-Erkrankung in einzelnen Regionen Unterschiede in der Inzidenz präsentieren. So zeigte sich im Zeitraum 1993 bis 1997 in Singapur eine Inzidenz bei chinesischen männlichen Bewohnern von 21,21/100 000 im Vergleich zu den regionalen indischen männlichen Bewohnern mit 7,86/100 000.

Bei der Betrachtung der Geschlechterverhältnisse zeigt sich eine deutlich höhere Belastung des männlichen Geschlechts. Das Verhältnis von Mann zu Frau beläuft sich in der Regel zwischen 2:1 bis 4:1. Man erklärt sich diese Tatsache zum einen damit, dass Männer Risikofaktoren stärker ausgesetzt sind: Sie rauchen mehr Zigaretten, nehmen mehr Alkohol zu sich und stecken sich häufiger mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) und dem Hepatitis-C-Virus (HCV) an (WHO 2004 und WHO 2010). Zum anderen konnte trotz dieser geschlechtsspezifischen Risikofaktorbelastung experimentell gezeigt werden, dass das männliche Geschlecht auch risikofaktorfrei ein höheres Risiko zur

HCC-Entstehung hat. Ein Erklärungsansatz beschäftigt sich mit den geschlechts-spezifischen Estrogenen und Androgenen. Während man den Androgenen einen pathogen-fördernden Effekt zuschreibt, scheinen die Estrogene einen positiven Einfluss auszuüben. Bereits während der HCV-Erkrankung haben männliche Erkrankte eine höhere Rate der Fibrosierung, reagieren schwächer auf die Interferon-Therapie und gelangen schneller in das Dekompensationsstadium (Poynard et al. 1997). Tierexperimente bestätigten diese Annahme: In Tumor-Mausversuchen konnte durch Kastration eine Reduktion der HCC-Bildung induziert werden (Toh 1981). Im Gegensatz dazu zeigte eine Ovarektomie bei Mäusen einen Anstieg des HCC-Risikos (Vesselinovitch et al. 1980). In einer epidemiologischen Studie ließ die frühe Ovarektomie (d. h. vor dem 50. Lebensjahr) das HCC-Risiko für Frauen steigen, wohingegen die postmenopausale Hormonersatztherapie ein protektiver Faktor war (Yu et al. 2003). Die Altersverteilung der HCC-Erkrankung differiert zwischen Hochrisiko- und Niedrigrisikoländern. Während in den Ländern mit höheren Erkrankungsraten die altersspezifische Inzidenz ihr Maximum um das Alter von 60 Jahren hat, beträgt es in den Niedrigrisikoländern 75 Jahre. Frauen haben im Schnitt ein fünf Jahre späteres Erkrankungsmaximum (Parkin 2002).

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Eine chronische Lebererkrankung mit Ausbildung einer Zirrhose ist die Hauptursache für das HCC; in 70 - 90 % der HCC-Fälle ist dies nachgewiesen worden (El-Serag und Rudolph 2007). Zu den Risikofaktoren hierfür zählen die HBV-Infektion, die HCV-Infektion, chronisch übermäßiger Alkoholkonsum, Aflatoxinexposition, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 1 und 2, die Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) und die Hämochromatose. Als Risikofaktoren, für die bisher noch keine hinreichende Evidenz gezeigt werden konnte, sind Tabakkonsum, Vinylchlorid und die Einnahme oraler Kontrazeptiva in der Diskussion. Es folgt eine kurze Skizzierung der soeben aufgezählten Risikofaktoren.

1.2.2.1 Hepatitis-B-Infektion

Die chronische Infektion mit dem HBV ist einer der Hauptgründe für die hohen Fallzahlen der HCC-Erkrankung in den Hochrisikoländern. Üblich ist die Übertragung von der Mutter auf das Kind (vertikale Übertragung) in den asiatischen Ländern. In den afrikanischen Ländern geschieht dies überwiegend in den jungen Lebensjahren durch

den geschwisterlichen Kontakt (horizontale Übertragung). Man schätzt, dass weltweit über 350 Millionen Personen chronisch mit dem HBV infiziert sind (Lavanchy 2005). Die chronische Hepatitis als Ursache für die Entstehung der Zirrhose und darüber hinaus des HCC ist noch nicht abschließend geklärt, da die chronische Infektion mit dem HBV in vielen Bereichen des Zellzyklus Einfluss nimmt. Man konnte nachweisen, dass es als Folge dieser Zellzyklusstörungen zur Produktion von monoklonalen Populationen, zu Chromosomeninstabilitäten und zu dysplastischen Hepatozyten kommt (Ng und Lee 2011; Tan 2011). Trotz der noch nicht endgültig verstandenen Pathogenese wird die HBV-Infektion in manchen Hochrisikoländern durch frühzeitige Vakzination eingedämmt (Zanetti et al. 2008).

1.2.2.2 Hepatitis-C-Infektion

Die Infektion mit dem HCV ist in der Regel begründet durch intravenösen (i.v.) Drogenabusus oder als Folge sexueller Übertragung. In den 1960er-Jahren gelang das Virus in das Blutspendesystem der USA und Europas. Bevor geeignete Detektionsmethoden entwickelt wurden, trug dies zu der Verbreitung der HCV-Erkrankung bei (Armstrong et al. 2000). Histopathologische Marker für eine stattgefundene chronische HCV-Infektion sind in HCC-Geweben in unterschiedlicher Ausprägung zu finden und spiegeln die regionale Verteilung des Risikofaktors HCV wider: Eine Metaanalyse ergab 44 - 66 % in Italien, 27 - 58 % in Frankreich, 60 - 75 % in Spanien und 80 - 90 % in Japan (El-Serag und Rudolph 2007). Wie bei der HBV-Infektion sind die Mechanismen, die zu Leberzirrhose führen, noch nicht vollständig geklärt. Zirrhoseraten von 15 - 35 % nach 25 - 30 Jahren *post-infectionem* zeigen jedoch die Potenz auf, mit der diese Infektion den zirrhotischen Umbau induzieren kann (Freeman et al. 2001). Patienten mit Leberzirrhose im chronischen HCV-Infektionsstadium haben eine jährliche HCC-Inzidenz von 1 - 4 % (Afdhal 2004).

1.2.2.3 Alkoholkonsum

Alkoholkonsum ist einer der Hauptrisikofaktoren in Niedrigrisikoländern. Er führt zur HCC-Entstehung zum einen über die alkoholinduzierte Leberzirrhose, zum anderen ist er direkt karzinogen. Ebenfalls zeigt er synergistische Wirkung mit anderen Risikofaktoren wie z. B. HCV (Szabo et al. 2010). Die Mengen an Alkohol, die man über lange Zeit zu sich nehmen muss, um ein erhöhtes HCC-Risiko zu haben, werden uneinheitlich angegeben und beginnen bei 50 g pro Tag (eine Flasche Bier mit 500 ml

und 4 ‰ Alkoholgehalt entspricht 16 g Alkohol). Experimentelle Tierversuche sind erst kürzlich erfolgreich erarbeitet worden und bedürfen noch der ausgedehnten Evaluation. In einem ersten Alkohol-Trinkversuch mit Ratten konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Leberneoplasien gezeigt werden (Yip-Schneider et al. 2011). In Niedrigrisikoländern ist Alkohol ein prominenter Risikofaktor. In den USA und Italien ist er mutmaßlich mit 32 - 45 % die Hauptursache für die HCC-Entstehung (Morgan et al. 2004).

1.2.2.4 Aflatoxin

Aflatoxinexposition ist in den Hochrisikoländern neben der chronischen HBV-Infektion einer der Hauptrisikofaktoren für das HCC. Das Mykotoxin Aflatoxin B1 (AFB1) entsteht als Stoffwechselprodukt des Schimmelpilzes *Aspergillus fungus* und ist ein potentes Hepatokarzinogen. Nach Ingestion wird es durch einen Teil der Cytochromfamilie der Leber (CYP3A4, -1A2, -2A3, -2A6, -2B7) in den aktiven Metaboliten Aflatoxin B1-8,9-Epoxid aktiviert, welcher an die DNA binden und diese schädigen kann. Bevorzugt erfolgt eine Schädigung des p53-Suppressorgens (Stern et al. 2001). Diese Mutation auf Codon 249 wird in Endemiegebieten für Aflatoxinexposition in 50 % der HCC-Fälle nachgewiesen (Bressac et al. 1991; Ming et al. 2001). Das Vorkommen von Mykotoxinen beruht auf dem primären Befall von rohen Agrarprodukten (vor der Ernte oder durch begünstigende Lagerung der Produkte) durch den Schimmelpilz. Eine sekundäre Verunreinigung von Lebensmitteln erfolgt durch das Schimmeln von Herstellungszwischenstufen oder den Endprodukten bzw. deren unsachgemäßer Lagerung. Der Schimmelpilz wächst leicht auf Körnern, Reis und Nüssen in warmer und feuchter Umgebung. Eine weitere Möglichkeit ist das sog. *Carry Over:* Das Mykotoxin gelangt in ein tierisches Produkt durch die Ingestion durch das Tier (z. B. durch kontaminiertes Futtermittel). Beispielhaft ist die Transformation des Aflatoxin B1, welches nach oraler Aufnahme über das Futtermittel in der Milchkuh zu Aflatoxin M1 transformiert und über die Milch ausgeschieden wird (Sugiyama et al. 2008).

1.2.2.5 Adipositas

Übergewicht erhöht die Wahrscheinlichkeit, an einem HCC zu erkranken. Adipositas und das häufig damit vergesellschaftete metabolische Syndrom können zur Nicht-alkoholischen Steatohepatitis führen, welche wiederum einen eigenen Risikofaktor für das HCC darstellt (s. u.). Prospektive Kohortenstudien konnten einen Zusammenhang

zwischen Übergewicht (als Maß hierfür der *Body Mass Index* [BMI]) und HCC-Wahrscheinlichkeit nachweisen. In einer prospektiven Kohortenstudie in den USA mit 900 053 Personen (404 576 Männer und 495 477 Frauen) war das Risiko für Männer mit starkem Übergewicht (BMI > 35) 4,5-mal höher an HCC zu erkranken gegenüber normalgewichtigen Männern (Calle et al. 2003). Eine jüngere Metaanalyse von Kohortenstudien bestätigte diesen Zusammenhang und zeigte große Unterschiede zwischen den Ethnien und den Geschlechtern auf (Rui et al. 2012).

1.2.2.6 Diabetes mellitus

Diese Stoffwechselerkrankung kann über die Entwicklung der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (s. u.) und Nichtalkoholischen Steatohepatitis (s. u.) zur Entstehung des HCC führen. In einer Kohortenstudie, die 173 643 Diabetes-positive (eine Unterscheidung in Typ 1 und 2 erfolgte nicht) mit 650 620 Diabetes-negativen Personen verglich, war das Risiko in der Diabetes-positiven Gruppe, ein HCC zu bekommen, zweifach erhöht (El-Serag et al. 2004).

1.2.2.7 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung

Man differenziert zwei Formen dieser Erkrankung: Die *Nonalcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD) zeichnet sich durch eine übermäßige Verfettung der Leber aus (> 5 % der Hepatozyten) ohne Entzündung und Fibrose. Letztgenannte liegen wiederum einzeln oder gemeinsam zusätzlich bei der *Nonalcoholic Steatohepatitis* (NASH) neben der Steatose vor. Die Diagnose und Einteilung in eine dieser Formen gelingt histologisch. Diese Erkrankungen stellen eine späte hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms dar. Folglich ist die Häufigkeit dieser Erkrankungen weltweit steigend. In Europa präsentieren sie eine Prävalenz zwischen 20 - 30 % (Ratziu et al. 2010). Eine HCC-Entstehung ist primär bei der NASH durch die chronische Entzündung gegeben, wohingegen die NAFLD als *benigne* klassifiziert ist. Patienten mit NASH entwickeln in 15 - 30 % der Fälle eine Fibrose, von diesen wiederum bekommen 12 - 35 % eine Leberzirrhose. Von den Letztgenannten entwickeln 25 % später ein HCC (Loria et al. 2010).

1.2.2.8 Hämochromatose

Bei der primären Eisenspeicherkrankheit kommt es durch die erhöhte Eisenaufnahme im Duodenum zu einem erhöhten Gesamtkörpereisengehalt, welcher zu Eisenablagerungen unter anderem in den Leberzellen führt.

Die dadurch induzierte Zellschädigung erklärt man sich zum einen direkt durch die Schädigung der DNA durch ungebundenes Eisen (hierdurch kann es auch zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 kommen), zum anderen indirekt durch peroxidative Schädigung von Zellorganellen wie Mitochondrien und Lysosomen (Kowdley 2004). Letztlich führen diese Mechanismen zur Leberzirrhose, welche 75 % der Patienten bei Erstdiagnose der Hämochromatose aufweisen (Herold 2011).

1.2.2.9 Tabakkonsum

Ein singulärer toxischer Effekt des Tabakkonsums auf die Leber, mit Erhöhung des Risikos der HCC-Entstehung, ist schwer von dem oft begleitenden Alkoholkonsum und seinen Folgen zu differenzieren. Eine multivariate Varianzanalyse einer Kohortenstudie von 90 000 Personen ergab ein signifikant höheres relatives Risiko von 4,2 für stark rauchende Frauen (definiert als > 10 Zigaretten pro Tag) - ein Effekt, der in der männlichen Kohorte mit einem relativen Risiko von 0,9 nicht vorkam (Evans et al. 2002). In einer jüngeren prospektiven Kohortenstudie (394 Fälle) konnte Tabakkonsumenten ein 1,6-fach erhöhtes relatives HCC-Risiko zugeordnet werden im Vergleich zu Nichtrauchern (Koh et al. 2011). Eine Metaanalyse, welche 28 Kohortenstudien und 58 Fall-Kontroll-Studien verglich, kam zu einem ähnlichen Ergebnis: Raucher hatten gegenüber den Nichtrauchern ein erhöhtes relatives Risiko von 1,5 und ehemalige Raucher von 1,1 (Lee et al. 2009).

1.2.2.10 Vinylchlorid

Dieses Gas, hergestellt über einen Zwischenschritt aus Chlor und Ethen, wird seit den 1930er-Jahren im großindustriellen Maßstab zur Herstellung von Polyvinylchlorid (PVC) genutzt. Die jährliche Produktion von PVC im Jahr 2004 machte mit 28 250 000 Tonnen 17 % der weltweiten Kunststoffproduktion aus. Die Toxizität des Gases wurde erst in den 1970er-Jahren entdeckt. Noch 1966 stand in einem Lehrbuch der Chemie: „Vinylchlorid ist ein verhältnismäßig wenig giftiges Gas. Es wirkt in höherer Konzentration leicht anästhetisch und hat Reizwirkungen auf die Augen.“ (Lefaux 1966). Als dann in den kommenden Jahren vermehrt Fälle von Vinylchlorid-assoziierten Krankheiten auftraten (sog. Vinylchlorid-Krankheit) und man die karzinogene Wirkung entdeckte, begann man diese Effekte experimentell zu reproduzieren und zu untersuchen (Preussmann 1974). Es wurden daraufhin schrittweise Grenzwerte für die Maximale-Arbeitsplatz-Konzentration (MAK-Wert) erstellt und konstant reduziert.

Die Festlegung der tolerierbaren täglichen Wirkstoffaufnahme wurde z. B. in den USA zuletzt im Jahr 1997 festgelegt, ausgedrückt als *Minimal Risk Level* (MRL). Bezüglich der akuten Inhalation von Vinylchlorid wurde der Wert von 0,5 *Parts per Million* (ppm) festgelegt (U.S. EPA 2007). Die karzinogene Wirkung des Vinylchlorids auf die Leber äußert sich überwiegend in der Entstehung des seltenen Hämangiosarkoms (Brandt-Rauf et al. 2012). Bezüglich der Entstehung anderer Lebermalignome wurde eine Metaanalyse von sechs Kohortenstudien durchgeführt, die eine standardisierte Sterberate für die Entstehung von Lebermalignomen (als Nichtangiosarkome: HCC, Gallengangs-, Gallenblasen- und Lebermalignome unbekannter Histologie) von 1,3 ergab und damit den Zusammenhang zwischen Vinylchloridexposition und HCC-Entstehungsrisiko als gering beschreibt (Boffetta et al. 2003).

1.2.2.11 Orale Kontrazeptiva

Die Theorie, dass Estrogene zu der Entstehung des HCC beitragen könnten, begründet sich auf der Tatsache, dass in Hepatozyten nukleäre Estrogenrezeptoren vorhanden sind und im HCC-Gewebe in erhöhter Anzahl vorkommen (Ohnishi et al. 1986). Das *benigne* Lebertumoren wie das Adenom und die Fokale Noduläre Hyperplasie durch Estrogen- und Progesteronkomponenten in oralen Kontrazeptiva induziert werden können, wurde in Tierversuchen an Ratten und Mäusen gezeigt, wobei auch wenige Fälle von HCC-Induktion vorkamen (IARC 1999). Eine Metaanalyse von 12 Fall-Kontroll-Studien (739 HCC-Fälle gegen 5223 Kontrollen) kam zu dem Ergebnis, dass es zu keinem gesteigerten HCC-Risiko bei Kurzeinnahme (< 5 Jahren) kam. Die Ergebnisse bezüglich der Langzeiteinnahme waren jedoch zu heterogen, um wiederum eine klare Aussage bezüglich einer HCC-Risikoerhöhung treffen zu können (Maheshwari et al. 2007).

1.2.3 Molekularpathologie der Hepatokarzinogenese

1.2.3.1 Induktion der Hepatokarzinogenese im Zirrhosestadium

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass die Entstehung des HCC eng an einen chronischen Leberschaden gebunden ist, der in eine Leberzirrhose mündet. Im Stadium der Hepatitis ist das HCC-Risiko vergleichsweise gering, während es im Zirrhose-Stadium stark ansteigt. So durchlaufen z. B. Patienten mit einer HCV-Infektion über einen Zeitraum von 25 - 30 Jahren eine Zuspitzung ihrer Erkrankung. Von infizierten Patienten gelangen 60 - 95 % in das Stadium der chronischen Hepatitis.

Von dieser Gruppe bekommen wiederum 10 - 30 % eine Leberzirrhose und in diesem Kollektiv wird bei 1 - 3 % jährlich ein HCC diagnostiziert (El-Serag et al. 2007). Als Mechanismen, welche die Hepatokarzinogenese im Zirrhosestadium fördern, werden die Telomer-Kürzung, die Reduktion der Proliferationsrate und Veränderungen im extrazellulären Milieu diskutiert, welche nachfolgend skizziert werden.

Telomer-Kürzung

Telomere befinden sich an den Enden von Chromosomen eukaryontischer Zellen und stellen eine Schutzeinheit dar, um das Chromosom vor ungewollter Rekombination und Degradation zu schützen. Weiterhin schützen sie es vor ungewollter Verkürzung während der DNA-Replikation (Hahn und Meyerson 2001). Da an einem DNA-Strang am Ende der Replikation (5`-Ende) der DNA-Primer nicht abgebaut und neu synthetisiert werden kann, geht dieser Informationsbereich verloren, was als Endreplikationsproblem bezeichnet wird. Durch Beendigung der Replikation im Bereich des Telomers, welches aus der sich wiederholenden Basensequenz "TTAGGG" besteht und keine relevante genetische Information trägt, wird der Verlust wichtiger DNA-Information vermieden. Diese Telomer-Kürzung ist allerdings endlich und bestimmt die Replikationskapazität einer Zelle und damit die Anzahl ihrer Zellteilungen (sog. Hayflick-Grenze). Ist diese Kapazität erschöpft, gelangen die Zellen in einen fixierten Wachstumsstopp oder werden in den programmierten Zelltod überführt (Rubtsova et al. 2012).

Im Zirrhose-Stadium ist diese Telomer-Kürzung gesteigert. Es konnte in histo-pathologischen Untersuchungen eine Akkumulation von seneszenten Hepatozyten festgestellt werden (Wiemann et al. 2002).

Wenn die Telomerkürzung einen kritischen Wert erreicht, kommt es oft zur kompensatorischen Hochregulierung des Enzyms Telomerase. Dieses Enzym hat die Funktion, die Telomerstruktur wiederherzustellen und ist im intakten Lebergewebe nicht vorzufinden. Bei maligner Entartung ist es allerdings vermehrt nachweisbar, sodass die Detektion dieses Enzyms als Tumormarker wissenschaftlich evaluiert wird (Schriefer 2011). Die replikative Seneszenz von Hepatozyten ist von 10 % in regulärem Lebergewebe auf 84 % in zirrhotischem Gewebe gesteigert und zu 60 % in HCC-Gewebe nachweisbar (Paradis et al. 2001; Wiemann et al. 2002).

Proliferationsschwund

Die verminderte Proliferation von Hepatozyten kann selbst ein Faktor für die Hepatokarzinogenese sein. Im Tierversuch konnte durch medikamentöse Hemmung der zellulären Proliferationsmechanismen, vermittelt über das p53-Tumor-suppressorgen, eine Hepatokarzinogenese bei Ratten induziert werden (van Gijssel et al. 1997). Höheres Alter und die damit verbundene Verminderung der regenerativen Kapazität können zu einem beschleunigten Voranschreiten der Zirrhose bei chronischen Hepatitiden führen und damit das Risiko der malignen Entartung steigern. Dies konnte in einer Metaanalyse, welche 4852 Patienten mit den Grund-erkrankungen HIV, HCV, HBV, Hämochromatose, alkoholbedingte Leberzirrhose und primäre biliäre Zirrhose einschloss, gezeigt werden (Poynard et al. 2003).

Extrazelluläres Milieu

Die Leber kann nach Teilresektion durch Volumenzunahme wieder zu ihrer ursprünglichen Größe gelangen. Sie nimmt nach Transplantation sogar die Größe der ursprünglichen Leber des Empfängers an. Die genauen Ursachen und Mechanismen sind gegenwärtig noch unklar. Man nimmt unter anderem an, dass ein rückkopplungsgesteuerter Regelungskreislauf, der sog. Atrophie-Hypertrophie-Komplex, auf der Grundlage von hepatozellulären Metaboliten (Wachstumsfaktoren, Zytokine) einen Anteil daran hat (Kim et al. 2009). Bei Leberzirrhose sezerniert dieser Atrophie-Hypertrophie-Komplex über die Kupffer`schen Sternzellen massiv Wachstumsfaktoren, was unter anderem den fibrotischen Umbau fördert (Bataller und Brenner 2005). Da manche dieser Wachstumsfaktoren im HCC das Tumorwachstum fördern, besteht die Theorie, dass Veränderungen in der extrazellulären Matrix begünstigende Faktoren der Hepatokarzinogenese sind (Giannelli et al. 2005).

1.2.3.2 Molekulare Modifikationen im HCC

Im Vergleich zu normalem Lebergewebe kann man in den Zellen des HCC Veränderungen auf molekularer Ebene feststellen, die charakteristisch für dieses Malignom sind.

Aufhebung Zell-Zyklus-Kontrollpunkte

Der Verlust von Kontrollpunkten des Zellzyklus ist bei der überwiegenden Anzahl der HCC-Fälle vorzufinden. Das p53-Tumorsuppressorgen ist z. B. in über 50 % der Aflatoxin-assoziierten Fälle mutiert (Ozturk 1991). Eine Vorstufe der Regulation über

den p53-Pfad, das p14ARF-Protein (*Alternate Reading Frame;* ARF) war in einer Analyse von 71 HCC-Geweben über eine Mikrodeletion auf Chromosom 9 in 15 - 20 % der Fälle deaktiviert. In der gleichen Arbeit fanden sich Mutationen des Tumorsuppressorgens p16-INK4a (dieses reguliert über die Hemmung einer Cyclin-abhängigen Kinase den Übertritt von der Zellzyklusphase G1 in die S-Phase) in 66 % der Fälle (Tannapfel et al. 2001). Für das mit p16 korrelierende Tumorsuppressorgen pRb (Retinoblastoma; Rb) wurde in einer genetischen Analyse von 47 HCC-Geweben in 22 % der Fälle keine dementsprechende Genexpression gefunden (Azechi et al. 2001).

Insulin-like Growth Factor 2 Receptor

Dieser Rezeptor (IGF2R) für den Wachstumsfaktor IGF-2 überträgt die antiapoptotische und wachstumsstimulierende Wirkung auf Zellen. Der Verlust der Heterozytogenität dieses Rezeptorallels (*Loss of Heterozygosity*; LOH) und folglich seiner Funktion, ist in einer molekulargenetischen Analyse von 27 HCC-Geweben in über 60 % der Fälle nachgewiesen worden (Yamada et al. 1997). Die reaktive Überexpression des IGF-2 ist in HCC-Geweben nachweisbar (Breuhahn et al. 2004).

Onkogen-Aktivierung

Intrazelluläre Signalmoleküle sind potentielle Protoonkogene und können durch eine Mutation zu einem Onkogen werden. Diese Onkogen-Aktivierung kann mit einer schlechteren Prognose einhergehen und wird oft in HCC-Proben nachgewiesen. Es wurden u. a. Mutationen des intrazellulären Signalmoleküls beta-Catenin, des Hedgehog-Signaltransduktionsweges, des c-Met-Protoonkogens, des PI3K/AKT-Signalweges und des myc-Protoonkogens aufgezeigt (de La Coste et al. 1998; Sicklick et al. 2006; Kaposi-Novak et al. 2006; Hu et al. 2003; Schlaeger et al. 2008).

1.2.4 Therapie des Leberzellkarzinoms

1.2.4.1 Staging vor Therapiebeginn

Die Entscheidung über die patientenindividuelle Therapie und eine Aussage über die Prognose wird nach einer Evaluation der Faktoren Tumorlokalisation und -größe, Leberfunktion und allgemeiner Patientenzustand getroffen. Es gibt mehrere Staging-Systeme, die unterschiedlich klassifizieren. Die *Tumor-Node-Metastasis* (TNM)-Klassifikation ist eine histopathologische Einteilung und berücksichtigt nicht die

Leberfunktion oder den Allgemeinzustand des Patienten. Letztgenannte Faktoren haben Einfluss auf die Prognose des Patienten und damit auf die Wahl der Therapie. Es wurden deshalb weitere Scoring-Systeme entwickelt, um diesem Umstand Rechnung zu tragen und eine verbesserte Prognostizität auch im früheren und mittleren Tumorstadium zu ermöglichen: Die Okuda-Klassifikation, das *Cancer of the Liver Italian Program Staging System of HCC* (CLIP), das *Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System of HCC* (BCLC) und der *Japan Integrated Staging Score* (JIS) werden im Folgenden nach der TNM-Klassifikation einzeln vorgestellt.

Tumor-Node-Metastasis Staging System for HCC

Die Klassifikation der TNM-Systematik wurde von Pierre Denoix entwickelt (Denoix 1946) und von der *International Union Against Cancer* (UICC) sowie der *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) zunächst getrennt voneinander weiterentwickelt und international etabliert; die erste Ausgabe erschien 1968 (UICC) bzw. 1977 (AJCC). Im Jahr 1987 wurden beide Klassifikationssysteme zusammengelegt und fortan gemeinsam publiziert. Die letzte Ausgabe erschien 2009 (Sobin et al. 2009). Bei der TNM-Klassifikation wird die Tumorerkrankung eingeteilt nach Primarius, lokalen Lymphknotenbefall und dem Metastasenstatus; siehe Tab. 2.

Primärtumor		
T1		solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion
T2		solitärer Tumor mit Gefäßinvasion o. multiple Tumoren < 5 cm
T3	a	multiple Tumoren > 5 cm
	b	Tumor mit Infiltration größerer Äste der V. portae oder der Vv. hepaticae
T4		Invasion der Nachbarorgane (ohne Gallenblase) o. Perforation des viszeralen Peritoneums
Regionaler Lymphknotenbefall		
N0		nein
N1		ja
Fernmetastasen		
M0		nein
M1		ja

Tabelle 2: TNM-Klassifikation (nach Sobin et al. 2009); Regionäre Lymphknoten (LK) bezeichnet die hepatischen, periportalen und die LK entlang der Vena cava inferior (abdominalis) oberhalb der Nierenvenen

Die Kombination der einzelnen Variablen ergibt das TNM-Stadium; siehe Tab. 3:

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenbefall	Metastasen
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III A	T3a	N0	M0
III B	T3b	N0	M0
III C	T4	N0	M0
IV A	Tx	N1	M0
IV B	Tx	Nx	M1

Tabelle 3: HCC-Stadieneinteilung der TNM-Klassifikation (nach Sobin et al. 2009)

Okuda Staging System for HCC

Das von Okuda et al. durch die retrospektive Analyse von 850 HCC-Fällen entwickelte Scoring-System berücksichtigt neben der Tumorgröße die klinischen und laborparametrischen Faktoren Aszites, Albumin und Bilirubin (Okuda et al. 1985); siehe Tab. 4:

	0 Punkte	1 Punkt
Tumorgröße	< 50 % der Leber	> 50 % der Leber
Aszites	Nein	Ja
Albumin (g/dL)	> 3	< 3
Bilirubin (mg/dL)	< 3	> 3

Tabelle 4: Scoring der Okuda-Klassifikation (nach Okuda et al. 1985)

Stadieneinteilung nach Okuda-Klassifikation und 1-Jahres-Überlebensrate:

- Stadium I 0 Punkte = 39 %
- Stadium II 1 - 2 Punkte = 12 %
- Stadium III 3 - 4 Punkte = 3 %

Cancer of the Liver Italian Program Staging of HCC

Das 1998 publizierte Scoring-System einer italienischen Multicenter-Arbeitsgruppe entstand aus einer retrospektiven Analyse von 435 HCC-Patienten. Dieses Scoring-System beinhaltet den Leberzirrhosegrad (ausgedrückt durch das Child-Pugh-Stadium), die Tumorbeschaffenheit, die Serummenge an Alpha-Feto-Protein und das Vorhandensein einer Pfortaderthrombose (Gallo et al. 1998); siehe Tab. 5:

Parameter	Punkte
Child-Pugh-Stadium	
A	0
B	1
C	2
Tumor-Morphologie	
uninodular und Befall ≤ 50 % der Leber	0
multinodular und Befall ≤ 50 % der Leber	1
massiv oder Befall > 50 % der Leber	2
Alpha-Feto-Protein-Spiegel [ng/dl]	
< 400	0
≥ 400	1
Pfortaderthrombose	
nein	0
ja	1

Tabelle 5: Berechnung des CLIP-Score (nach Gallo et al. 1998)

Die Punkte der einzelnen Variablen ergeben in ihrer Summe den Score. Das mittlere Überleben der HCC-Patienten in der Studie war in Abhängigkeit der Punkte wie folgt:

Punkte	Überleben in Monaten	Punkte	Überleben in Monaten
0	42,5	3	4,5
1	32,0	4	2,5
2	16,5	5 + 6	1,0

Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System of HCC

Das *Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System* (BCLC) beinhaltet neben dem Tumorstadium und der Leberfunktion den Allgemeinzustand des Patienten (Llovet et al. 1999). Letzteres ist abgebildet durch den *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) - *Performance Status* (nach Oken et al. 1982):

Grad	Fähigkeiten/Einschränkungen
0	In der Lage alle Arbeiten, in dem selben Maß wie vor der Erkrankung, durchzuführen.
1	Einschränkungen in körperlich anstrengenden Arbeiten, aber in der Lage leichtere Arbeiten zu verrichten (leichtere Hausarbeit, Büroarbeit).
2	In der Lage, sich selbst zu versorgen, aber nicht in der Lage Arbeit zu verrichten.
3	Nur mehr begrenzt in der Lage, sich selbst zu versorgen; mehr als 50 % der wachen Zeit liegend oder sitzend.
4	Nur mehr an Bett und Stuhl gebunden; überhaupt nicht mehr in der Lage, sich selbst zu versorgen.
5	Tod.

Hierdurch erlaubt die Klassifikation eine Zuweisung des Patienten zu einer ihm verträglichen Therapie. Das BCLC-Staging setzt sich wie folgt zusammen; siehe Tab.6:

Stadium	ECOG-Grad	Tumormorphologie	Leberfunktion
A1	0	singulär < 2 cm	keine portale Hypertension; Bilirubin normal
A2	0	singulär < 2 cm	portale Hypertension; Bilirubin normal
A3	0	singulär < 2 cm	portale Hypertension; Bilirubin erhöht
A4	0	≤ 3 Tumore ≤ 3 cm	Child-Pugh A-B
B	0	multinodulär	Child-Pugh A-B
C	1 - 2	Gefäßeinbruch/extra-hepat. Metastasierung	Child-Pugh A-B
D	3 - 4	jedes Tumorstadium	Child-Pugh C

Tabelle 6: Klassifikation des *Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System* (nach Llovet et al. 1999)

Es wurde neben dem neuen Stagingsystem auch ein Behandlungsalgorithmus vorgestellt, der die schrittweise Therapieentscheidung unter Berücksichtigung des BCLC ermöglicht. Ausgehend von dem ermittelten Tumorstadium erfolgt eine Zuweisung des Patienten in die Therapiekategorie. Nach mehreren Modifikationen wurde zuletzt durch die *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) eine aktuelle Fassung veröffentlicht (Bruix und Shermann 2011); siehe Abb. 1:

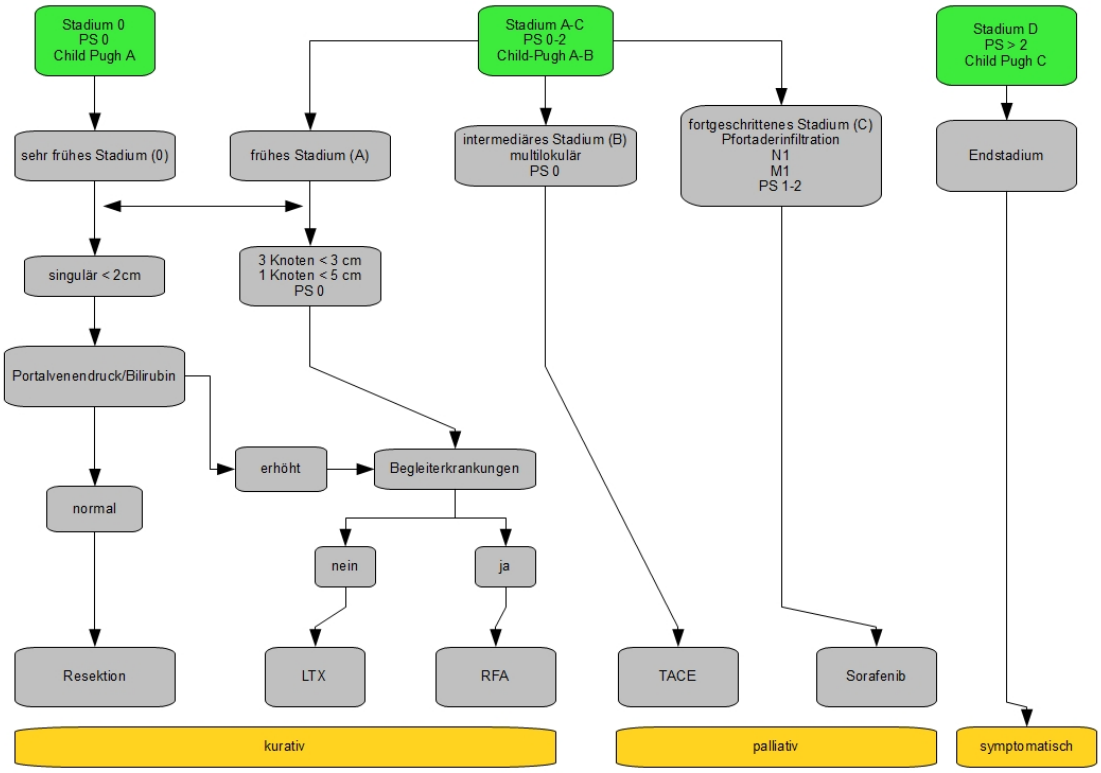

Abbildung 1: *Barcelona Clinic for Liver Cancer* - HCC Behandlungsalgorithmus [modifiziert nach Bruix und Shermann 2011]

Japan Integrated Staging Score

Das 2003 veröffentlichte JIS-Scoring-System kombiniert die Leberfunktion, ausgedrückt im Child-Pugh-Stadium, mit einer modifizierten TNM-Klassifikation der *Liver Cancer Study Group of Japan* (LCSGJ). Es gibt drei Faktoren (Knotenanzahl singulär, Tumorausdehnung < 2 cm sowie fehlende vaskuläre Invasion), welche durch ihre Kombinationsmöglichkeiten vier Tumorstadien definieren, wobei jedes Stadium eine Punktzahl erhält:

Tumorstadium 1 = drei Faktoren erfüllt = 0 Punkte

Tumorstadium 2 = zwei Faktoren erfüllt = 1 Punkt

Tumorstadium 3 = ein Faktor erfüllt = 2 Punkte

Tumorstadium 4 = kein Faktor erfüllt = 3 Punkte

Weitere Punkte erhalten die Patienten durch ihr Child-Pugh-Stadium:

Child-Pugh A = 0 Punkte

Child-Pugh B = 1 Punkt

Child-Pugh C = 2 Punkte

Die Summe dieser Punkte ergibt die Rangfolge und somit das Tumorstadium. Patienten mit null Punkten befinden sich in einem frühem Stadium, mit 1 oder 2 Punkten im mittleren Stadium, mit 3 oder 4 Punkten im fortgeschritteneren Stadium und mit 5 Punkten im späten Stadium. Kudo et al. versprachen sich eine bessere Prognose im früheren Erkrankungsstadium und eine bessere prädiktive Wirksamkeit im Vergleich zum CLIP-Score (Kudo et al. 2003). Es zeigten sich folgende 3-Jahres und 5-Jahres-Überlebensraten in einem Kollektiv von 722 Patienten; siehe Tab.: 7.

Punktzahl	3-Jahres-Überlebensrate [%]	5-Jahres-Überlebensrate [%]
0	89	80
1	78	60
2	69	42
3	40	27
4	17	11
5	7	0

Tabelle 7: Scoring des *Japan Integrated Staging Score* und die ermittelten 3-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten (nach Kudo et al. 2003)

1.2.4.2 Kurative Therapie

Patienten im Frühstadium der HCC-Erkrankung können einer kurativen Therapie unterzogen werden. Hierzu gehören momentan die chirurgische Resektion und die LTX und in Ausnahmefällen die lokale Ablation. Letztere bietet verschiedene Techniken: Radiofrequenz-Ablation, Freezing, Kryoablation, perkutane Ethanol- bzw. Essigsäure-instillation und laserinduzierte Thermotherapie, welche nach Vorstellung der chirurgischen Resektion und der LTX erläutert werden.

Chirurgische Resektion

Die Option einer chirurgischen Resektion wird neben der lokalen Befundgröße auch vom Grad der bestehenden Leberzirrhose beeinflusst. Da in Mitteleuropa 80 - 90 % der HCC-Erkrankungen aus einer Leberzirrhose heraus entstehen, ist eine präoperative Einschätzung der hepatischen Funktionsreserve immer erforderlich.

Präoperatives Management

Ein verbreitetes Instrument zur Bestimmung der Leberfunktion ist der Child-Pugh-Score. Anhand von drei Serumparametern (Serum-Bilirubin, Serum-Albumin und der Prothrombinzeit (*International Normalized Ratio;* INR) sowie zwei klinischen Parametern (Aszites und hepatische Enzephalopathie) wird eine Stadieneinteilung der Leber-zirrhose in die Child-Turcotte-Pugh (CTP)-Klasse A, B oder C durchgeführt. Patienten mit einer CTP-Klasse von B und C eignen sich am geringsten für eine operative Therapie, da ihre postoperative Leberfunktion zu stark reduziert wäre (Nagasue et al. 1999).

Zur besseren Einschätzung der Patienten mit kompensierter Leberzirrhose (CTP-Klasse A) werden dann dynamische Leberfunktionstests angewendet. Vier Tests werden im folgenden in chronologischer Reihenfolge ihrer Entwicklung vorgestellt:

Indocyaningrün-Clearance (*Indocyanine Green Clearance Rate*; ICG)

Nach Injektion des Farbstoffes Indocyaningrün (0,25 - 0,5 mg/kg KG) wird dieser nach Aufnahme durch die Leber unkonjugiert unter ATP-Verbrauch biliär ausgeschieden. Die ICG-Clearance ist proportional zur Aufnahme, Elimination und Leberdurchblutung (Reemstsma et al. 1960). Die Messung erfolgt nicht-invasiv durch Pulsdensitometrie 4 - 6 min nach Injektion und Wertangabe als prozentuale Änderung pro Zeiteinheit [%/min]. Normwert: > 18 % /min.

Galaktose-Eliminationskapazität (*Galactose Elimination Capacity*; GEC)

Zunächst intravenöse Gabe von 40 %iger Galaktoselösung (0,5 g/kg KG). Anschließend Messung der Serumkonzentration von Galaktose über 120 min und Berechnung der verstoffwechselten Galaktosemenge, welche proportional zur gesunden Leberzellmasse ist (Tygstrup 1964). Normwert 6,0 - 9,1 mg/kg/min.

Monoethylglycinexylidid-Test (MEGX)

Dieser Metabolit des Lidocains entsteht in der Leber durch die Lidocainmetabolisierung im Cytochrom-P450-System. Die Serumkonzentration von MEGX wird vor sowie 15 und 30 min nach der i.v. Gabe von Lidocain (1 mg/ 1 kg KG) im Serum bestimmt. Da die entstehende Menge an MEGX die Metabolisierungsleistung der Leber widerspiegelt, ist die Serumkonzentration von MEGX proportional zur Leberschädigung (Oellerich et al. 1987). Normwert: 70 µg/l nach 30 min.

Trotz der Fülle an Tests und ihrer wissenschaftlichen Evaluation konnte sich bisher keine dieser Untersuchungen in der klinischen Routinediagnostik klar durchsetzen. Ein Hauptkritikpunkt ist die jeweilige Abhängigkeit eines gemessenen Parameters von unterschiedlichen Faktoren, welche die diagnostische Wertigkeit einschränken. Der verbreitete ICG-Test wird z. B. durch den Galleabfluss, der Hämodynamik und der Durchblutung der Leber beeinflusst (Stockmann et al. 2009; Lehmann et al. 2000; Janssen et al. 2010). Bei der Suche nach einem geeigneteren Test zur Einschätzung der Leberfunktion wurde an der Berliner Charité als Verbesserung des ^{13}C-Atemtest der LiMAx-Test entwickelt:

Liver MAximum Capacity-Test (LiMAx)

Das Prinzip beruht auf dem Abbau eines ^{13}C-markierten Substrates durch das Cytochrom P450-1A2-Enzym. Das nicht-toxische ^{13}C-markierte Methacetin wird nach i.v. Applikation (2 mg/kg KG) regelkreisunabhängig und frei von weiteren Einflussfaktoren hepatisch verstoffwechselt (Demethylierung) und als $^{13}CO_2$ ausgeatmet. Das Verhältnis von $^{13}CO_2/^{12}CO_2$ in der Ausatemluft ist dabei proportional zu der Leberleistung (Stockmann et al. 2009). Die Tatsache, dass sich $^{13}CO_2$ neben der Exhalation auch in andere Kompartimente verteilt und mit dem Bikarbonat-Pool interagiert, führte aktuell zu einer Modifikation der

Testdurchführung, bei der vorab ^{13}C-Bikarbonat appliziert wird, um diesen Einflussfaktor bei der Ergebnisberechnung zu berücksichtigen (Holzhütter et al. 2013). Neben der präoperativen Funktionsanalyse vor Resektion und Transplantation sowie Funktionstestung nach LTX, kann durch den LiMAx-Test auch die Prognose bei akutem Leberversagen eingeschätzt werden (Stockmann et al. 2010; Stockmann et al. 2010; Lock et al. 2010; Lock et al. 2013).

Stellt sich die ermittelte Restleberfunktion als zu gering dar, gibt es die Möglichkeit, über die Portalvenenembolisation eine Reduktion des Risikos eines postoperativen Leberversagens zu erwirken. Bei ausgedehnten Leberteilresektionen kann hierdurch präoperativ durch Embolisation der Portalvenenäste des zu resezierenden Leberanteils die kompensatorische Hypertrophie des zu verbleibenden Leberanteils induziert werden. Damit wird die postoperative Restleberfunktion (*Future Liver Remnant;* FLR) gesteigert und das Risiko für postoperatives Leberversagen vor allem für Patienten mit chronischen Lebererkrankungen reduziert. Von der Anwendung bei HCC-Patienten wurde erstmalig 1986 berichtet (Kinoshita et al. 1986). Die Empfehlungen zur Dauer der Hypertrophiephase sind aufgrund der großen Bandbreite an Ergebnissen noch recht uneinheitlich und können zwischen 4 und 8 Wochen liegen (Farges et al. 2003).

Technik der chirurgischen Resektion

Als operative Zugangswege sind geeignet die umgekehrte L-Inzision (Rippenbogenrandschnitt rechts mit Verlängerung zum Xyphoid) und die Mercedes-Stern-Inzision (wie umgekehrte L-Inzision; zusätzlich mit Verlängerung des Rippenbogenrandschnittes nach links subkostal) geeignet. Beide Varianten können bei Bedarf über eine interkostale Inzision in den Thorax erweitert werden. Daneben gibt es für Eingriffe am linken Leberlappen oder den inferioren Bereichen die Möglichkeit der laparoskopischen Resektion.

Man unterscheidet anatomische von atypischen Resektionsverfahren. Bei ersteren geht man davon aus, dass die Lebertumore anatomische Grenzen tolerieren. Man reseziert einen solitären Tumor aus dem befallenen Segment und kann durch die Beachtung anatomisch-funktioneller Grenzen (arterieller, venöser und biliärer Zu- bzw. Abfluss) das Restparenchym funktionell günstig beeinflussen.

Bei der atypischen Leberresektion gelten die befundorientierten Resektionsränder unter Berücksichtigung des Sicherheitsabstandes. Eine Einteilung der Leberresektion nach Segmenten wird von Lang vorgeschlagen (Lang 2007). Siehe Abb. 2.

Nomenklatur der Leberresektion**:**

- zentrale Leberresektion (Segment IVa/IVb/V/VIII ±I)
- Hemihepatektomie rechts (Segment V-VIII ±I)
- Hemihepatektomie links (Segment II-IV ±I)
- erweiterte Hemihepatektomie rechts (Segment IV, V-VIII ±I)
- erweiterte Hemihepatektomie links (Segment II-V, VIII ±I)

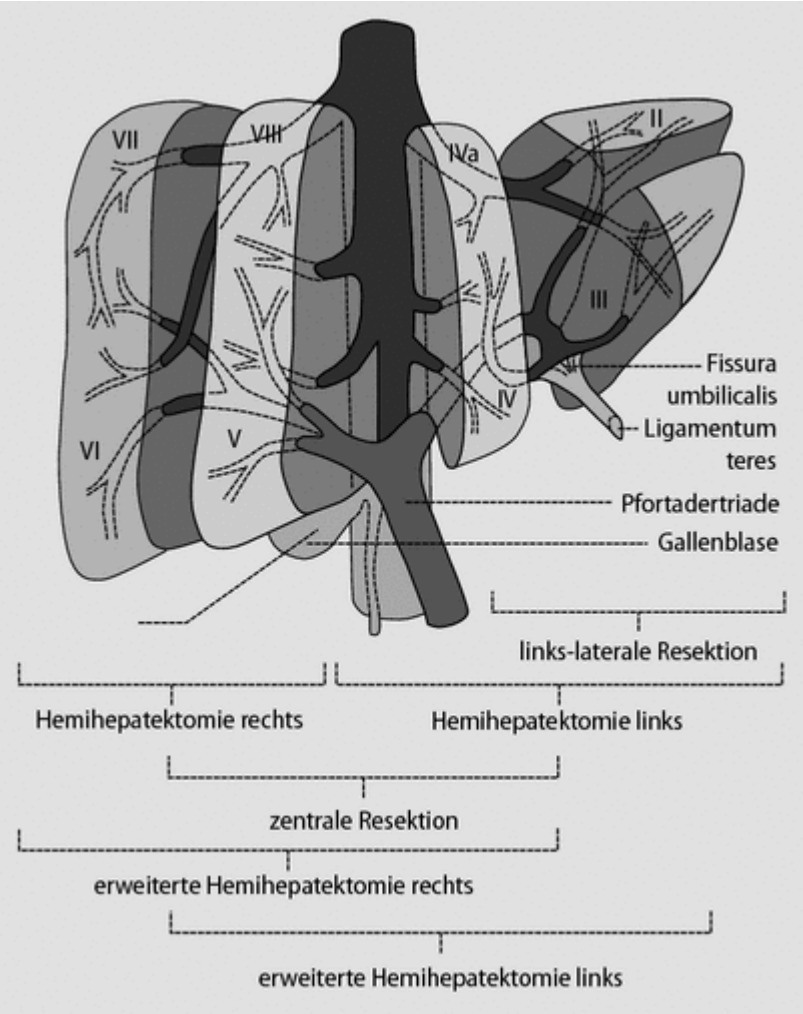

Abbildung 2: Nomenklatur der Leberresektion (aus Lang 2007)

Ein- und Ausschlusskriterien für eine Operation

Bei der Planung der Operation wird durch Evaluation der Leberfunktion und des geplanten Resektionsausmaßes die postoperative hepatische Funktionsreserve ermittelt. Leberresektionen im Stadium Child-Pugh B bzw. C führen zu einer erhöhten Letalität, sodass in diesen Fällen von einer Resektion abgesehen wird. Bei einer nichtzirrhotischen Leber ist eine Gewebereduktion von bis zu 75 % möglich (Clavien et al. 2007).

Lebertransplantation

Die Lebertransplantation (LTX) stellt für Patienten, denen aufgrund ihrer Leberzirrhosenausdehnung eine Leberteilresektion verwehrt ist, eine operative Alternative dar. Im Folgenden wird auf die Selektionskriterien, die prätransplantäre Therapie, die Lebend- und Leichenspende, dem HLA-*Matching*, der Organuntersuchung und Labordiagnostik und abschließend auf die postoperative Immunsuppression eingegangen.

Selektionskriterien

Mazzaferro et al. konnten zeigen, dass Patienten mit solitärem Herd ≤ 5 cm oder bis zu drei Herden ≤ 3 cm durch eine LTX eine 4-Jahres-Überlebensrate von 75 % aufwiesen (Mazzaferro et al. 1996). Diese sog. *Milan*-Kriterien waren weit verbreitete Einschlußkriterien für eine LTX. Aufgrund der guten Erfahrungen wurde die Expansion dieser Kriterien evaluiert. Eine Ausdehnung des Einzelherdes auf bis zu 6,5 cm, oder von bis zu drei Herden mit einer maximalen Ausdehnung von bis zu 4,5 cm und einer kumulativen Größe aller Herde von bis zu 8 cm, zeigten in einer Studie von Yao und Mitarbeitern eine 5-Jahres-Überlebensrate von 75 % (Yao et al. 2002); dies waren die sog. UCSF-Kriterien (*University of California San Franscisco*).

Die retrospektive Analyse von Transplantationsfällen außerhalb der *Milan*-Kriterien führte zur Postulierung der 'Bis-zu-7-Regel': Summe aus Zahl der Herde und Durchmesser des größten Einzelherdes ≤ 7. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug hier 71 % (Mazzaferro et al. 2009). Die Erweiterung des Indikationsspektrums führte zum Anstieg der Wartezeiten. Es entstand die Problematik, dass Patienten, welche in einem frühen Krankheitsstadium auf die Warteliste gesetzt wurden, aufgrund langer Wartezeiten einen Progress der Erkrankung durchmachten, der im schlimmsten Fall zu einem Ausschluss von der Warteliste führte. Das sog. MELD-System (*Model of Endstage Liver Disease*) erlaubt hier eine extra Zuweisung an Punkten, um so in der Warteliste

aufzusteigen. Das MELD-System wurde ursprünglich eingeführt zur Abschätzung des Überlebens nach Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (Malinchoc et al. 2000). Die wissenschaftliche Evaluation ergab jedoch auch eine verlässliche Vorhersagbarkeit für das 3-Monats-Überleben leberkranker Patienten (Kamath und Kim 2007). Für den Score werden die Laborwerte Serumkreatinin, Serum-Bilirubin und dem INR. Diese setzt man in folgende Formel ein:

$$6{,}3 + [0{,}957 \times \ln(\text{Kreatinin}) + 0{,}378 \times \ln(\text{Bilirubin}) + 1{,}12 \times \ln(\text{INR}) + 0{,}643] \times 10$$

Je größer die sich ergebende Punktezahl, desto höher ist die 3-Monats-Todesrate; siehe Tab.8:

MELD	≤ 9	10 - 19	20 - 29	30 - 39	≥ 40
Sterberate	4 %	27 %	76 %	83 %	100 %

Tabelle 8: 3-Monats-Todesrate in Abhängigkeit des MELD-Score hospitalisierter Patienten (nach Kamath et al. 2001)

Der sich aus den Laborwerten ergebende MELD ist der sog. labMELD. Verschiedene zusätzliche Faktoren wie z. B. eine ursächliche Erkrankung (HCC) oder kindliches Alter des Patienten können den MELD-Score modifizieren und zu zusätzlichen Punkten führen. Grund für die Einführung dieser Standard-Ausnahmen (*Standard Exceptions*) war die ungenügende Wiedergabe der Dringlichkeit von Patienten mit einer Indikation zur LTX ohne virale oder äthyltoxische Genese.

Prätransplantäre Therapie

Während der Wartezeit kommt es regelmäßig zu einem Fortschreiten der Erkrankung, welches zu einem Ausscheiden von der Warteliste führen kann. Um dieser Tatsache Einhalt zu gebieten, wurde das Prinzip der neo-adjuvanten Therapie (s. u.) auf diese Patienten angewendet. Als Interventionen zum sog. *Bridging* wurden bisher die transarterielle Embolisation, die Radiofrequenz-Ablation und die selektive interne Radiotherapie evaluiert (Toso et al. 2010), welche nach dem Abschnitt "LTX" erläutert werden.

Lebendspende

Da die Leichenspende in ihrer zahlenmäßigen Begrenzung zu langen Wartezeiten führte, wurde 1989 mit einer linken Teilleber erfolgreich die erste Lebendspende durchgeführt (Strong et al. 1990). Mittlerweile reduziert sich die postoperative Sterblichkeit der Empfänger einer Lebendspende annähernd auf die der Leichenspende. Das 5-Jahres-Patientenüberleben betrug in einer retrospektiven Analyse bei der Lebend- und Leichenspende jeweils ca. 80 % (Walter et al. 2008).

Die Spender-Morbiditätsraten schwanken aufgrund uneinheitlicher Einordnung und Definition von Komplikationen zwischen 0 und 100 % (Middleton et al. 2006). Das mittlerweile standardisierte peri- und intraoperative Management führte zu einem Rückgang der anfänglichen Probleme und inzwischen zu einem Entlassen des Spenders aus der Hospitalität nach 7 - 10 Tagen (Mittler et al. 2007). Zu 1187 im Jahre 2010 durchgeführten Leichenspenden in Deutschland kamen 96 Lebendspenden (Eurotransplant 2010).

Leichenspende

Im Transplantationsgesetz (TPG) ist die Todesfeststellung nach Regeln, die dem aktuellen Wissensstand entsprechen, vorgesehen (TPG 2009). Die Richtlinien zur standardisierten Feststellung des Hirntodes werden von der Bundesärztekammer veröffentlicht. Als Definition gilt: ”Als Hirntod wird der Zustand der irreversibel erloschenen Funktionen des gesamten Gehirns, also des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms, bezeichnet. Dabei wird durch Beatmung und Medikamente Herz- und Kreislauffunktion des Verstorbenen künstlich aufrechterhalten.“ (Richtlinien zur Feststellung des Hirntodes, 3. Fortschreibung 1997). Gemäß § 5 TPG muss der Hirntod des Organspenders „von zwei dafür qualifizierten Ärzten unabhängig voneinander festgestellt werden. [...] Sie dürfen weder an der Entnahme, noch an der Übertragung der Organe des Organspenders beteiligt sein, noch der Weisung eines beteiligten Arztes unterstehen.“ Die Hirntod-Feststellung erfolgt in drei Stufen (aus Richtlinien zur Feststellung des Hirntodes, 3. Fortschreibung 1997):

“1. Erfüllung der Voraussetzungen

Vorliegen einer akuten schweren primären oder sekundären Hirnschädigung. Bei den primären Hirnschädigungen ist zwischen supratentoriellen und infratentoriellen Schädigungen zu unterscheiden.

Ausschluss von Intoxikation, dämpfender Wirkung von Medikamenten, neuromuskulärer Blockade, primärer Unterkühlung, Kreislaufschock, Koma bei endokriner, metabolischer oder entzündlicher Erkrankung als mögliche Ursache oder Mitursache des Ausfalls der Hirnfunktion im Untersuchungszeitraum.

2. Die Feststellung der klinischen Symptome

- Bewusstlosigkeit (Koma)
- Lichtstarre beider ohne Mydriatikum mittel- bis maximal weiten Pupillen
- Fehlen des okulozephalen Reflexes
- Fehlen des Kornealreflexes
- Fehlen von Reaktionen auf Schmerzreize im Trigeminusbereich
- Fehlen des Pharyngeal- und Trachealreflexes
- Ausfall der Spontanatmung

3. Nachweis der Irreversibilität durch Untersuchungswiederholung oder apparative Zusatzuntersuchung

- EEG [Elektroenzephalografie; Anm. d. Verf.]
- AEP/SEP [Akustisch evozierte Potentiale/ Somatosensibel evozierte Potentiale; Anm. d. Verf.]
- Dopplersonographie
- Perfusionsszintigraphie
- Angiographie“

Nach Hirntodfeststellung erfolgt das Angehörigengespräch, um die eventuell prämortal bestehende Spenderentscheidung mitzuteilen (die Entscheidung des Verstorbenen ist bindend) und zu besprechen. Für den Fall einer nicht vorhanden schriftlichen Erklärung (z. B. Organspendeausweis) ist eine Entscheidung auf Grundlage eines mündlich geäußerten oder mutmaßlichen Willens des Verstorbenen oder nach den ethischen Standpunkten der Angehörigen (Eltern, Ehepartner/eingetragener Lebenspartner, volljährige Kinder oder volljährige Geschwister, Großeltern oder Vormund) zu fällen. Diese erweiterte Zustimmungsregelung ist durch die Reform des Transplantationsgesetzes vom 19.10.2012 in die sog. Entscheidungslösung geändert worden. Jeder Bürger der BRD wird nun ab dem 16. Lebensjahr regelmäßig durch die Krankenkasse gefragt, ob er Organspender werden möchte, wobei eine Antwort nicht zwingend gegeben werden muss. Fehlt diese, so wird die mögliche Entscheidung im Angehörigengespräch, wie oben skizziert, ermittelt. Ist eine Entscheidung für die

Organspende getroffen worden, so wird der Spender und das Spenderorgan evaluiert, um Infektionen auszuschließen, die Organqualität zu bestimmen und das *Human Leukocyte Antigen*-(HLA)-*Matching* (s. u.) zu ermöglichen. Die Qualität des Organs und die Risikobewertung für ein postoperatives Transplantatversagen wird durch den *Donor Risk Index* (DRI) bestimmt. Die Faktoren Spenderalter, Größe des Spenders, Ethnie des Spenders, Teil-LTX oder Vollorgantransplantation, Herzstillstand vor Transplantation und die Ursache des Hirntodes stellten sich in einer retrospektiven Analyse von 20 023 LTX als signifikante Prädiktoren heraus. Jeder dieser Faktoren bekommt in einem Wertespektrum mehrere Werte zugeteilt. Ist z. B. der Spender 40 Jahre alt, gibt es 1,17 Punkte; ist er jedoch über 70 Jahre alt, dann 1,65 Punkte. Die Punkte ergeben in der Summe den Index. Das Transplantatüberleben nach 3 Jahren war proportional zum DRI: Ein DRI zwischen 1 und 1,1 zeigte im 95-Prozent-Konfidenzintervall eine Überlebensrate von 79 %. Ein DRI zwischen 1,8 und 2 korrelierte hingegen mit einer Überlebensrate von 66 % (Feng et al. 2006). Eine jüngere Untersuchung konnte jedoch aufzeigen, dass das Spenderalter keinen Einfluss auf das Outcome nach LTX hat (Faber et al. 2011).

HLA-*Matching*

Die immunologische Untersuchung des Organspenders umfasst neben der Blutgruppenkompatibilität die Gewebetypisierung durch HLA-*Matching*. Das HLA umfasst eine Gruppe von Zelloberflächenproteinen, die an der Antigenpräsentation im Rahmen der Immunabwehr beteiligt sind.

Klasse I-Antigene (HLA-A, -B und -C) befinden sich auf allen Zellen mit Zellkern. Klasse II-Antigene (HLA-DQ, -DP, -DR) befinden sich auf mobilen, antigenpräsentierenden Zellen wie z. B. B-Zellen und Makrophagen (Neumann et al. 2003). Die Gene für diese zelleigenen Oberflächenmoleküle befinden sich auf dem kurzen Arm (p) des Chromosoms 6 (Ausnahme: beta-Mikroglobulin = Chromosom 15). Aufgrund der Bedeutung dieser Genregion für die Transplantationsmedizin wird sie als Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histo-Compatibility Complex;* MHC) bezeichnet. Der Polymorphismus dieser HLA-Typen führt zu einer individuellen HLA-Exprimierung, welche bei Transplantationen den Grad der "Organfremdheit" definiert (Lan et al. 2010). Mit Durchführung des *Cross-Matchings* erhofft man sich eine möglichst hohe Übereinstimmung der HLA-Typen, um so das Abstoßungsrisiko zu reduzieren.

Die Ergebnisse werden mit denen potentieller Empfänger in der Eurotransplant-Datenbank verglichen.

Organuntersuchung und Labordiagnostik

Die Organqualität wird vor Entnahme über die Labordiagnostik evaluiert. Von der Deutschen Stiftung Organspende (DSO) wird ein Standardprofil vorgegeben (DSO 2011):

- Blutgruppe
- arterielle Blutgase
- Blutbild
- Blutzucker
- Urinstatus und -sediment
- Klinische Chemie
- Natrium
- Kalium
- Kreatinin i. S.
- Harnstoff i. S.
- Amylase
- Lipase
- HbA1c
- alkalische Phosphatase
- ASAT (GOT)
- ALAT (GPT)
- γ-GT
- Bilirubin (total und direkt)
- LDH
- CK
- CK-MB oder Troponin T/I
- Albumin/Protein
- Quick
- PTT
- Fibrinogen
- C-reaktives Protein

Zusätzlich kann es zentrenspezifische ”Organprofile“ mit weiteren leberfunktions-spezifischen Laborparametern geben. Es erfolgt intraoperativ die klinische Begutachtung der Leber nach Gewicht, Größe und Verfettungsgrad.

Postoperative Immunsuppression

Die Immunsuppression nach erfolgter Transplantation wird zur Prophylaxe einer potentiellen Abstoßungsreaktion durchgeführt und muss ein Leben lang fortgesetzt werden. Durch die Einführung des CNI Ciclosporin A konnte die 1-Jahres-Überlebensrate nach erfolgter LTX im Vergleich zur kombinierten Azathioprin/ Prednisolongabe von 33 auf 83 % gesteigert werden (Starzl et al. 1981). Später wurde mit Einführung des Macrolidlactons Tacrolimus - ebenfalls ein CNI - das therapeutische Spektrum erweitert. Mit diesem Medikament wurden erstmals Rejektionen, die unter Ciclosporin A auftraten, als sog. *Rescue*-Therapie erfolgreich behandelt (Starzl et al. 1989).

Das makrozyklische Lacton Sirolimus (s. a. Kapitel 3.1.2) wurde nach initialer Anwendung in der Nierentransplantation ebenfalls nach LTX angewendet. Der Vorteil von Sirolimus gegenüber Ciclosporin A ist seine geringere Nephrotoxizität, sodass bei Patienten mit posttransplantärem Nierenversagen auf dieses Medikament gewechselt werden kann. Auch MMF (s. a. Kapitel 3.1.1) wurde zunächst an Nierentransplantierten getestet, bevor es Einzug in die Lebertransplantationsmedizin hielt (Mc Diarmid 1996). MMF kommt aufgrund seiner nierenschonenderen Pharmakokinetik ebenfalls als Ersatzmedikament bei posttransplantärer Niereninsuffizienz in Frage.

Die Immunsuppression kann zentrenspezifisch und uneinheitlich sein. Grundsätzlich teilt sich die posttransplantäre Immunsuppression in die Phasen Induktions-, Initial- und Erhaltungstherapie auf. Eine Möglichkeit des Therapieschemas ist der Beginn der Induktionstherapie mit einem Interleukin (IL)-2-Antikörper, welcher über die Blockade des IL-2-Rezeptors auf T-Zellen die Proliferation derselben inhibiert. Anschließend folgt für die Initialtherapie eine Dreifachkombination aus einem CNI (Ciclosporin A oder Tacrolimus), Steroiden und einem Antimetaboliten (Sirolimus oder MMF). Im Laufe der ersten sechs Monate werden die Steroide sukzessive reduziert und die Erhaltungstherapeutika den möglicherweise auftretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) angepasst. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die steroidfreie Immunsuppression keinen Nachteil zeigt (Langrehr et al. 2002; Sgourakis et al. 2009). Akute Abstoßungsreaktionen werden mit Methylprednisolon therapiert.

Prognosen nach chirurgischer Therapie

Die Überlebensrate hängt von der präoperativen Situation ab. Zum einen vom Zustand des tumorfreien Lebergewebes und zum anderen von der Tumorkonfiguration. Eine Metaanalyse von Rahbari verglich die Prognostikparameter "Zirrhose" und "Tumorgröße" in den Therapiegruppen "Resektion" sowie "LTX" in Bezug auf die Parameter 5-Jahres-Rezidivfreiheit und 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit und kam zu folgenden Ergebnissen; siehe Tab. 9, folgende Seite.

Therapie	Prognostik-parameter	Variablen	5-Jahres-Überlebenswahr-scheinlichkeit [%]	5-Jahres-Rezidivfreiheit [%]
Resektion	Zirrhose	HCC + Zirrhose	23 - 48	22 - 36
		HCC ohne Zirrhose	44 - 58	24 - 45
	Tumorgröße	HCC ≤ 3 cm	55 - 78	30 - 51
		HCC ≤ 5 cm	41 - 67	21 - 44
		HCC > 5 cm	29 - 56	22 - 23
		singulär	35 - 68	19 - 46
		multipel	21 - 58	6 - 25
Transplan-tation	*Milan*-Kriterien		59 - 83	62 - 92
	UCSF-Kriterien		50 - 78	43 - 93

Tabelle 9: Langzeit-Resultate von HCC-Patienten, geschichtet nach chirurgischer Therapieform und Prognostikparametern (nach Rahbari et al. 2011)

Wissenschaftliche Arbeiten, die das postoperative Langzeitüberleben über fünf Jahre hinaus evaluieren, wurden erst in jüngerer Zeit publiziert. So hat die Arbeitsgruppe um Faber die Langzeitergebnisse nach chirurgischer Resektion in der nicht-zirrhotischen Leber retrospektiv untersucht und kam zu folgenden Ergebnissen (Faber et al. 2012): Die kumulierten Überlebensraten betrugen für die postoperativen Jahre die Werte 74 % (1 Jahr), 55 % (3 Jahre), 39 % (5 Jahre) und 32 % (7 Jahre). In einer anderen Analyse von insgesamt 4197 HCC-Fällen haben Gluer et al. die 10-Jahres-Überlebensrate berechnet, welche 7 % betrug (Gluer et al. 2012). Die Überlebensraten nach sekundärer Resektion bei intrahepatischem Rezidiv waren in einer Untersuchung an 483 Patienten 96 % (1 Jahr), 70 % (3 Jahre) und 42 % (5 Jahre) (Faber et al. 2011).

Lokal ablative Verfahren

Weniger als 20 % der neu diagnostizierten HCC-Patienten eignen sich für eine chirurgische Therapie (Borie et al. 2008; Livraghi et al. 2011). Die zu erwartende Mortalität, bezogen auf die chirurgische Resektion, sollte 3 % nicht übersteigen (Bruix und Sherman 2005). Für Patienten, denen die Resektion verwehrt ist, sind lokal ablative Verfahren die Alternative. Sie werden angewendet, um den Tumor in einen Zustand der Resektabilität zu bringen (sog. *Downstaging*), als neoadjuvante Therapie, als adjuvante Therapie nicht-resektablen Resttumorgewebes oder als palliative Therapieoption. Als ablative Verfahren eignen sich die Radiofrequenz-Ablation (RFA),

die Kryoablation, die perkutane Ethanol-Instillation und die laserinduzierte Thermotherapie, die nachfolgend skizziert werden.

Radiofrequenz-Ablation

Unter CT- oder Sonographie-Kontrolle wird in örtlicher Betäubung/Analgosedierung eine ca. 3 mm große RFA-Sonde perkutan ins Zentrum der Läsion eingebracht. Ein Radiofrequenzgenerator erzeugt einen hochfrequenten Wechselstrom, der um die Sonde herum eine Temperatur von bis zu 125 °C erzeugt und darüber zu einer Kauterisierung des Gewebes führt. Durch Impedanzmessung (Gewebeleitfähigkeit) kann eine Erfolgskontrolle *in situ* erfolgen. Im direkten Vergleich mit der Ethanolinstillation (s. u.) zeigte sich bei Läsionen bis 4 cm eine bessere Rezidivfreiheit und geringere Komplikationsrate bei weniger Therapiesitzungen (Lin et al. 2004). Eine Kohortenstudie konnte aufzeigen, dass eine RFA von Läsionen bis 2 cm Größe eine Remission in den folgenden 31 Monaten von 97,2 % ergab (Livraghi et al. 2008). Es wird deshalb ein Einsatz als Erstlinientherapie diskutiert.

Kryoablation

In Allgemeinnarkose wird perkutan eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte Sonde in die Läsion gebracht. Die Nekroseinduktion erfolgt zum einen direkt über die Temperaturverschiebung im Umkreis der Sonde und zum anderen über die durch die Zellnekrose zunehmende Elektrolytverschiebung perizellulär. Ein Späteffekt ist die Gewebehypoxie während des Auftauvorganges, da es in den Gefäßen hierbei zu einer Stase kommt (Hoffmann und Bischof 2001). Zusätzlich zur direkten Kältenekrose wurde auch eine Induktion der zellulären Apoptose nachgewiesen (Grdović et al. 2010). Bezüglich der Wirksamkeit konnten unterschiedliche Prognosen im Zusammenhang mit der Tumorgröße ermittelt werden. In einer Kohortenstudie mit 63 Patienten betrug die 2-Jahres-Überlebensrate in der Gruppe mit Tumoren < 3 cm 64 % im Vergleich zu 33 % in der Gruppe mit Tumoren > 3 cm (Adam et al. 1997). In einer Kohortenstudie mit 113 Fällen wurden nach Kryoablation von primären Läsionen < 5 cm 5- und 10-Jahres-Überlebensraten von 49 % bzw. 17 % erreicht (Zhou et al. 1993).

Perkutane Ethanol-Instillation

Die Anwendung wird überwiegend in örtlicher Betäubung durchgeführt. Die Nadel verfügt über mehrere Öffnungen an ihrer Spitze und wird unter sonographischer Kontrolle in das Zentrum der Läsion eingebracht. Es erfolgt unter Echtzeitkontrolle die

Injektion von 96-prozentigen Ethanol, der eine Koagulationsnekrose des Gewebes verursacht. Erstmals in den 1980er-Jahren vorgestellt (Sugiura et al. 1983), ist diese Behandlung aufgrund seines geringen Nebenwirkungsprofils und der geringen Kosten weit verbreitet. In Langzeitstudien konnten 3- und 5-Jahres-Überlebensraten von 47 - 79 % bzw. 42 - 63 % bei Patienten mit Child-Pugh-A-Status erreicht werden (Livraghi et al. 1995; Sala et al. 2004).

Laserinduzierte Thermotherapie

Durchgeführt wird dieser Eingriff ebenfalls in Lokalanästhesie. Bei dieser Technik wird über die Photokoagulation das Gewebe im Umkreis der Sonde thermisch zerstört. Technische Grundlage ist ein Neodym-Yttrium-Aluminium-Granat (YAG)-Laser, der über die Sonde (Quarz-Fiber-Optik) Nekrosezonen von 3 - 4 cm erreichen kann (Usatoff und Habib 2001). Die Echtzeitkontrolle kann sonographisch erfolgen, üblicherweise wird jedoch eine thermosensible Magnetresonanztomographie (MRT; T1-gewichtete, fettsupprimierende Gradientenechosequenz) angewendet (Sturm et al. 2001; Mensel et al. 2005). Die Ergebnisse sind denen lokal ablativer Maßnahmen mindestens gleichwertig und versprechen durch eine stetige Verbesserung der Technik eine Erweiterung der Indikationsstellung (Nikfarjam und Christophi 2003).

1.2.4.3 Nicht-kurative Therapie

Die HCC-Diagnose wird oftmals spät gestellt. Bedingt ist dies durch die erst im fortgeschrittenen Stadium auftretenden Symptome wie Oberbauchschmerzen und Verschlechterung einer oft vorbestehenden Zirrhose. Dieser Umstand führt dazu, dass weniger als 20 % der Patienten chirurgisch-kurativ behandelt werden können (Borie et al. 2008; Livraghi et al. 2011). Für die restlichen Patienten existiert die palliative Therapie, deren Ziel es ist, den Progress zu verlangsamen, Symptome zu lindern und die Überlebenszeit zu verlängern. Zu den palliativen Therapieansätzen zählen die transarterielle Embolisation und Chemoembolisation, die selektive intraarterielle Radiotherapie, die Radiotherapie sowie die systemische medikamentöse Therapie. Sie werden im Folgenden vorgestellt.

Transarterielle Embolisation und Chemoembolisation

Zugänglich sind dieser Therapie (Abk. TAE/TACE) Tumore mit einer bestimmten Mindestgröße, da diese mit zunehmenden Wachstum ihren Blutzufluss über die A. hepatica gewährleisten. Das Ziel ist der selektive Verschluss der nutritiven Tumorgefäße mittels Kathetertechnik. Eine Embolisation der A. hepatica propria ist allerdings nur bei bilobulärem multiplen Befall indiziert, da der Verschluss dieses Hauptstammgefäßes negativen Einfluss auf die Gesamtleberleistung hat. Diese unselektive Embolisation hat bei Patienten mit einem Zirrhosegrad Child-C eine Letalität von 40 % zur Folge (Bismuth und Fecteau 1989). Bei den Tumoren führt außerdem eine Kollateralenausbildung zu einer Verringerung des Embolisationseffektes. Daher wird mit einer Angiographie (i. d. R. eine digitale Substraktionsangiographie) das zuführende Gefäß identifiziert und selektiv embolisiert (auch sog. segmentale Embolisation). Wird vor der eigentlichen Embolisation ein Zytostatikum injiziert (Doxyrubicin, Mitomycin oder Cisplatin), soll so ein additiver zytotoxischer Effekt im Tumor erzielt werden (Lencioni 2012). Als Trägerflüssigkeit dient eine röntgendichte Öl-Wasser-Emulsion (ein Ethylester der iodierten Fettsäuren aus Mohnöl). Neben der Röntgendarstellbarkeit des Gefäßes soll es einen passageren Gefäßverschluss bewirken, um die Zytostatikumwirkung durch Verlängerung der Kontaktzeit zu verstärken. Der anschließende dauerhafte Gefäßverschluss erfolgt dann mit Embolisaten, sog. Mikrosphären. Diese Partikel (~35 µm Partikelgröße) können u. a. aus Polyvenylalkohol, Gelatine oder resorbierbaren Zuckern bestehen, in Lösung vorliegen oder in Gelform appliziert werden. Ging man anfänglich davon aus, dass die TACE der TAE überlegen ist, so konnte dies in Metaanalysen nicht bestätigt werden (Marelli et al. 2007; Pleguezuelo et al. 2008). Die TACE als neoadjuvante Therapie vor LTX konnte jedoch eine reduzierte Rezidivrate aufzeigen, vor allem bei Patienten innerhalb der UCSF-Kriterien (Seehofer et al. 2012).

Selektive intraarterielle Radiotherapie

Diese Therapie (SIRT), auch Radioembolisation genannt, benutzt als Strahlenquelle Yttrium-90 beladene Mikrosphären aus dem Kunstharz Resin oder aus Glas. Damit soll zusätzlich zum Embolisationseffekt über die lokal begrenzte Strahlung eine direkte Wirkung auf den Tumor erzielt werden. Der Betastrahler Yttrium-90 hat mit seiner begrenzten Reichweite von durchschnittlich 2,5 mm und maximal 11 mm wenig unerwünschte Nebeneffekte auf gesundes Lebergewebe (Riaz et al. 2009).

Weiterhin ist durch die Halbwertszeit von 64 h bereits nach zehn Tagen über 90 % der Strahlendosis abgegeben. Der Vorteil dieser Therapiemaßnahme gegenüber der konventionellen perkutanen Bestrahlung ist das deutlich verringerte Risiko eines strahleninduzierten Leberversagens (*Radiation Induced Liver Disease*; RILD; s. u.) durch weitestgehende Schonung gesunden Lebergewebes. Der wissenschaftliche Vergleich der Wirksamkeit gegenüber der TACE/TAE ist noch nicht abgeschlossen, jedoch zeigte sich bisher ein geringes Risikoprofil bei der Anwendung bei Patienten mit Child-A und -B (Lambert et al. 2008).

Radiotherapie

Die Radiotherapie (als Form der Teletherapie) des HCC war lange Zeit in der Anwendung limitiert, da sich die Leber als ein sehr strahlensensibles Organ herausstellte, das mit RILD reagieren kann. Dessen Symptome sind anikterische Hepatomegalie, Aszites und steigende Leberenzymwerte im Serum als Zeichen der progredienten Dekompensation der Leberfunktionen. Diese Symptome können Wochen bis Monate nach der Bestrahlung auftreten (Guha et al. 2011). Bei einer fraktionierten Gesamtbestrahlung von 31 Gy liegt das Risiko einer RILD bei 5 %, bei 43 Gy bereits bei 50 % (Dawson et al. 2002).

Gegenüber der klassischen externen Bestrahlung gibt es Neuerungen, die diese Therapieform wieder in den Fokus rücken lassen. So gibt es die dreidimensional konformale Bestrahlungstechnik, bei der das Bestrahlungsfeld durch Fusion der vorhandenen Bilddaten (CT, MRT, PET) dreidimensional rekonstruiert wird. Anschließend wird die definierte Region rechnerisch in den Überschneidungsbereich verschiedener Strahlungsachsen gelegt, welche zusätzlich in unterschiedlichen Strahlungsintensitäten konfiguriert werden können, sodass der Wirkungsbereich möglichst genau auf das Interessenfeld begrenzt ist. Eine Erweiterung dieser Technik ist die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT), bei der zusätzlich innerhalb einer Bestrahlungsfeldfläche die Strahlendosis verändert werden kann. Eine weitere Innovation ist die stereotaktische Radiotherapie, bei der durch präinterventionelle Patientendurchleuchtung die Lagerung exakt reproduziert und die Bestrahlung zudem atemgesteuert abgegeben wird (Feng und Ben-Josef 2011). Der Vorteil dieser Techniken liegt in der Möglichkeit der Applikation höherer Strahlendosen, da das umgebende Gewebe weniger geschädigt wird.

Die Evaluation dieser verschiedenen Techniken - als Monotherapie sowie als Kombinationstherapie - steht noch am Anfang, kürzlich erschienene Metaanalysen beklagen daher den Mangel an klinischen Studien (Feng und Ben-Josef 2011; Lee und Seong 2012).

Die zur Partikeltherapie zählende Protonenbestrahlung ist aufgrund ihres hohen Kostenfaktors auf wenige Zentren limitiert. Der Unterschied dieser im Vergleich zu Elektronen und Photonen schwereren Teilchen liegt in dem eng begrenzten Wirkungsbereich (sog. Bragg-*Peak*). In diesem wird nach Abbremsung durch die verschiedenen Gewebeschichten die Strahlung lokal konzentriert abgegeben (Jiang 2012). Hierdurch kann nach Analyse des auf der Strahlenstrecke liegenden Gewebes, des Interessenbereiches und durch die Wahl der geeigneten Ionenenergie der Wirkbereich zielgenau in den Interessenbereich gelegt werden. Deshalb eignen sich Tumore, welche tief und in der Nähe sensibler Strukturen liegen, für diese Therapieform. In einer Phase-II-Studie zeigten 76 HCC-Patienten mit nicht-resektablem HCC nach Protonentherapie eine 3-Jahres-Überlebensrate von 60 %. In dieser Zeit waren alle Patienten progressionsfrei und kein Patient zeigte innerhalb von sechs Monaten nach Therapie Symptome einer RILD (Bush et al. 2011).

Systemische Therapiemöglichkeiten

Der Einsatz von Chemotherapeutika zur Behandlung nicht-resektabler HCC-Fälle wurde breit getestet und erhält mit jedem neuen Therapeutikum neue Chancen, welche laufend evaluiert werden. Es folgt ein chronologischer Überblick, nach Publikationsjahr geordnet.

Das Anthracyclin Doxorubicin, ein Hemmstoff der Topoisomerase II, welches u. a. zur Therapie von Mamma- und Bronchialkarzinomen eingesetzt wird, zeigte in einer prospektiven randomisierten Studie eine Ansprechrate von knapp 18 % bei Ausbleiben eines signifikanten Nutzens (Lai et al. 1988). Das Somatostatin-Analogon Octreotid wurde getestet, nachdem Somatostatinrezeptoren in HCC-Proben nachgewiesen wurden. Nach anfänglich erfolgsversprechenden Puplikationen wurde letztlich in einer doppelblinden, randomisierten und placebokontrollierten Studie keine Verbesserung im Vergleich zu der Placebotherapie festgestellt (Becker et al. 2007). Der Nachweis vermehrter Estrogenrezeptoren in HCC-Geweben (Ohnishi et al. 1986) führte zur Testung des selektiven Estrogenrezeptor-Modulators (SERM) Tamoxifen. Initial wurde

eine Erhöhung der Überlebensrate in der Tamoxifengruppe festgestellt: 22 % gegenüber 5 % nach 12 Monaten (Farinati et al. 1990). In einer anderen Studie war die mediane Überlebenszeit in der Tamoxifengruppe mit 74 Wochen erhöht im Vergleich zu der Placebogruppe mit 52 Wochen (Elba et al. 1994). In einer weiteren Studie standen 34 Wochen in der Tamoxifengruppe gegenüber 24 Wochen in der Placebogruppe (Martínez Cerezo et al. 1994). Abschließend konnte jedoch eine Metaanalyse, die 1709 Patienten einschloss, keinen Vorteil der Tamoxifeneinnahme gegenüber der Nicht-einnahme aufdecken (Nowak et al. 2004). Die antiproliferativen und antiangio-genetischen Effekte von Interferonen veranlasste die Evaluation der klinischen Wirkung bei nicht-resektablen HCC-Fällen. Es zeigte sich aber neben den starken Neben-wirkungen ein ausbleibender Nutzen (Llovet et al. 2000).

Das stetig wachsende Verständnis der molekularen Mechanismen im HCC führte zu gezielten pharmakologischen Therapiekonzepten (sog. *Targeted Therapy*) wie Antikörpern oder niedermolekularen Verbindungen (*Small Molecules*). Der rekombinante monoklonale Antikörper Bevacizumab, gerichtet gegen VEGF (V*ascular Endothelial Growth Factor*), einem Signalmolekül der Vaskulogenese, wurde in Kombinationstherapie mit den Zytostatika Gemcitabin und Oxaliplatin in einer Phase-II-Studie getestet. Die Patienten, alle mit nicht resektablen und/oder metastasierten HCC, zeigten Wirkungsraten von 20 % und ein medianes progressionsfreies Überleben von 5,3 Monaten (Zhu et al. 2006). Eine ähnlich aufgebaute Multicenter-Phase-II-Studie wurde mit den gleichen Zytostatika in Kombination mit dem chimären, monoklonalen Antikörper Cetuximab durchgeführt. Dieser Antikörper, gerichtet gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*Epidermal Growth Factor Receptor*; EGRF), erreichte in dieser Kombinationstherapie ein medianes progressionsfreies Überleben von 4,7 Monaten bei gleicher Wirkungsrate (Asnacios et al. 2008). Die niedermolekulare Verbindung Sorafenib ist ein Multikinaseinhibitor der die *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (Raf)-Kinase (Proliferationshemmung über Hemmung des Raf-Signalweges) und über verschiedene Tyrosinkinasen den VEGF-Signalweg hemmt. Eine Multicenter-Phase-III-Studie (doppelblind, randomisiert und placebokontrolliert) konnte für Patienten mit nicht-resektablen HCC in der Sorafenib-Gruppe, im Vergleich zur Placebotherapie, ein verlängertes medianes Überleben und einen Progres-sionsstopp von 3 Monaten feststellen (Llovet et al. 2008).

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob die Immunsuppressiva Sirolimus und MMF einen zytotoxischen Effekt auf die beiden hepatozellulären Karzinomzelllinien SKHEP1 und HEP3B haben. Evaluiert werden sollte neben der jeweiligen Monotherapie ein synergistischer Effekt durch die duale Anwendung dieser Antimetaboliten sowie die Möglichkeit einer Dosisreduktion bei gleichbleibender Wirksamkeit auf die beiden Karzinomzelllinien.

Die postoperative Immunsuppression nach LTX wird zentrenindividuell gehandhabt; es werden oft Medikamente aus der Klasse der CNI (Ciclosporin A und Tacrolimus) als Basisimmunsuppression in der Initialphase verwendet. Diese Medikamentenklasse hat als eine UAW Nephrotoxizität (Ziolkowski et al. 2003). Diese kann das an sich erhöhte Risiko für ein postoperatives Nierenversagen nochmals steigern, wobei Tacrolimus eine weniger starke Nephrotoxizität als Ciclosporin A aufweist (Lucey et al. 2005). Tritt dieses Ereignis ein, wird auf die Ersatzimmunsuppression mit den beiden Antimetaboliten Sirolimus oder MMF zurückgegriffen. Beide Medikamente zeichnen sich u. a. durch die ausbleibende Nephrotoxizität aus. Die Therapie mit MMF bietet sogar eine Verbesserung der Nierenfunktion nach Übernahme des Patienten aus der CNI-Therapie (Schmeding et al. 2006). Für Sirolimus konnte diese Verbesserung der Nierenfunktion bisher nicht nachgewiesen werden (Asrani et al. 2010).

Die immunsuppressive Wirksamkeit befindet sich mittlerweile in der Evaluation ihrer klinischen Anwendung. Die Wirkung von auf Sirolimus basierender Immunsuppression nach LTX zeigte vor allem im Hinblick auf die Nephrotoxizität vielversprechende Ergebnisse (Toso et al. 2007; Zimmermann et al. 2008).

Die MMF-Monotherapie und Kombinationstherapie mit Tacrolimus nach LTX wurde klinisch bereits bei Patienten mit postoperativem Nierenversagen evaluiert. Es konnte eine Verbesserung der Nierenfunktion gezeigt werden, jedoch waren in der MMF-Gruppe mehr Abstoßungen aufgetreten (Bilbao et al. 2006).

In einer randomisierten, prospektiven 5-Jahres-*Follow-up*-Untersuchung konnte die MMF-Monotherapie im Vergleich zu der CNI-Therapie ähnliche Ergebnisse zeigen: Patienten, welche aufgrund von Nierenversagen in die MMF-Gruppe wechselten,

zeigten daraufhin eine Verbesserung ihrer Nierenfunktionen. In dieser Untersuchung war die Inzidenz der akuten Abstoßung in beiden Gruppen gleich (Schmeding et al. 2011).

Im Hinblick auf die vorhandenen Rezidivraten und die Entstehung von *de novo*-Malignomen nach LTX sowie die Tatsache, dass für den überwiegenden Teil der erstdiagnostizierten HCC-Patienten keine kurative Therapie mehr möglich ist, lässt ein anderer Effekt dieser beiden Medikamente weitere Therapiestrategien annehmen:

Für Sirolimus und auch für MMF konnten verschiedene Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* einen antiproliferativen Effekt auf verschiedene Karzinomzelllinien nachweisen:

Für Sirolimus auf Osteosarkomzellen, Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und Nierenzellkarzinomzellen (Ogawa et al. 1998; Luan et al. 2003; Boffa et al. 2004).

Für MMF auf Adenokarzinomzellen des Kolons, Melanomzellen, Adenokarzinomzellen des Magens und des Pankreas, auf nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinomzellen, B-Zell-Lymphomzellen und auf T-Zell-Leukämiezellen (Tressler et al 1994; Koehl et al. 2007).

Über HCC-Zelllinien gibt es bisher nur wenige Arbeiten, die den antiproliferativen Effekt testeten: Eine hemmende Wirkung von Sirolimus ließ sich auf die HCC-Zelllinie H4IIEC und auf unspezifizierte HCC-Proben nachweisen (Price et al. 1992; Ribatti et al. 2007).

Für den Antimetaboliten MMF konnte eine antiproliferative Wirkung bisher lediglich auf die HCC-Zelllinie HEPG2 in Kombination mit Doxorubicin nachgewiesen werden (Chu et al. 2010).

Um die Evaluation der antiproliferativen Wirksamkeit auf das HCC fortzuführen, stellte sich deshalb zunächst die Frage, ob diese Medikamente allein eine Wirksamkeit auf die beiden HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B besitzen:

Fragestellung 1

Welchen zytotoxischen Effekt haben Sirolimus und MMF monotherapeutisch auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B?

Unterschiedliche Hemmungsmechanismen in der immunsuppressiven Wirkung werfen auch die Frage auf, ob dieser Hemmeffekt bei Tumorzellen durch den dualen Einsatz von Sirolimus und MMF zu einer synergistischen Wirkung im Sinne einer verbesserten Proliferationshemmung für die jeweilige Zelllinie führen würde:

Fragestellung 2

Kann durch die Kombination Sirolimus + MMF eine Wirksamkeitssteigerung im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien erreicht werden?

Sirolimus und MMF verfügen über eine Vielzahl an UAW. Für MMF wurden Diarrhoe, Erbrechen, Leukopenie, Sepsis und opportunistische Infektionen berichtet (Pichlmayer et al. 1995; Danesi und Del Tacca 2004). Für Sirolimus Hyperlipidämie, Myelosuppression (Thrombozytopenie und Leukopenie), verringerte Wundheilung, Proteinurie und interstitielle Pneumonie (Hong und Kahan 2000; Kuppahally et al. 2006; Hamdy et al. 2010; Pham et al. 2004). Es ist daher wünschenswert, mit einer Medikamentenkonzentration zu therapieren, die so effizient und dabei so wenig toxisch wie möglich ist. Es stellte sich daher die weitere Frage, ob diese beiden Immunsuppressiva durch Kombination miteinander eine Senkung der jeweiligen Medikamentenkonzentration bei mindestens gleichwertiger antiproliferativer Wirkung ermöglichen:

Fragestellung 3

Kann in der Kombinationstherapie die Wirksamkeit bei gleichzeitiger Dosisreduktion gehalten werden?

3. Material und Methoden

3.1 Medikamente

3.1.1 Mycophenolatmofetil

3.1.1.1 Eigenschaften

MMF ist ein Morpholinoethylester der Mycophenolsäure (MPA); siehe Abb. 3:

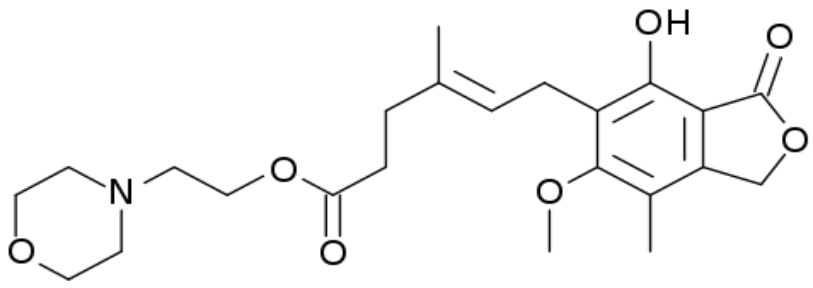

Abbildung 3: Strukturformel Mycophenolatmofetil

Die Herstellung erfolgt über die Gewinnung von MPA als Fermentationsprodukt verschiedener *Penicillium*-Gattungen. Die MPA wird anschließend verestert und für die verschiedenen Applikationsformen weiter verarbeitet. Nach erstmaliger Isolierung Ende des 19. Jahrhunderts (Gosio 1896) fand die medizinisch-wissenschaftliche Analyse von MPA durch eine *in vivo* Untersuchung der immunsuppressiven Wirkung in einem Tierversuch statt (Mitsui und Suzuki 1969). Um die spärliche Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe von MPA zu verbessern, wurde die Veresterung von MPA und somit MMF als Prodrug entwickelt (Lee et al. 1990). Nach enteraler Resorption bei oraler Gabe wird es unmittelbar zu MPA hydrolysiert und bietet eine Bioverfügbarkeit von 94 % (Bullingham et al. 1996). Es ist zu 97 % an Plasmaalbumin gebunden. MPA wird in erster Linie durch die Glucuronyltransferase in das MPA-Phenolglucuronid (MPAG) umgewandelt, welches einen inaktiven Metaboliten darstellt. Dessen Elimination erfolgt mit 87 % überwiegend renal (Fulton und Markham 1996). Das restliche MPAG wird biliär ausgeschieden und unterliegt dabei dem enterohepatischen Kreislauf, wo es durch Deglucuronidierung wieder zu MPA umgewandelt wird, weshalb 6 - 12 Stunden nach oraler Gabe ein zweiter Konzentrationsgipfel im Plasma messbar ist.

3.1.1.2 Wirkmechanismus

Die Immunsuppression erfolgt über die reversible, nicht-kompetitive Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) in Lymphozyten (Halloran 1996). Dieses Enzym ist das Schlüsselenzym bei der *de novo*-Herstellung des Guanosin-Monophosphats (GMP), eines essentiellen Bausteins der Nukleinsäuresynthese und somit der Zellproliferation. Durch die IMPDH-Hemmung kommt es zu einer Reduktion des GMP in der Zelle und zu einem Überwiegen der Adenosin-Phosphate, wodurch eine allosterische Inhibition des Purinstoffwechsels erfolgt. Eine zusätzliche Purinsynthese über den Wiederverwertungsstoffwechsel (sog. *Salvage Pathway*) steht den Lymphozyten im Gegensatz zu den restlichen kernhaltigen Zellen nicht zur Verfügung, wodurch die Lymphozyten selektiv beeinflusst werden. Dass andere Zellen, die ebenfalls die Purinsynthese absolvieren, nicht auch in diesem Maße in ihrer Proliferation gehemmt werden, liegt an der Existenz zweier Isoformen der IMPDH:

- IMPDH-I wird in den meisten Zellen sowie in nicht aktivierten Lymphozyten exprimiert
- IMPDH-II wird in aktivierten Lymphozyten exprimiert

Die Inhibition dieser beiden Isoformen durch MPA ist ungleich: IMPDH-II wird im Vergleich zu IMPDH-I ca. 5 mal mehr gehemmt, was die stärkere Hemmung der Lymphozyten erklärt (Carr et al. 1993).

3.1.1.3 Experimentelle Erfahrungen mit Mycophenolatmofetil

Erste *in vitro* Versuche konnten die proliferationshemmende Wirkung von MPA auf mononukleäre Zellen nachweisen, welche gleichzeitig proliferationsstimulierende Proteine (sog. Mitogene) erhielten (Eugui et al. 1991). Die Evaluation immunsuppressiver Wirkungen von MPA/MMF erfolgte dann *in vivo* nach verschiedenen tierexperimentellen Organtransplantationen. Die Anwendung nach Nierentransplantationen (NTX) zwischen Ratten wurde u. a. von Heemann et al. evaluiert (Heemann et al. 1996). Die MMF-Immunsuppression nach Pankreas-Transplantation bei Ratten war u. a. Thema von Qi et al. (Qi et al. 1996). In einem caninen Tiermodell wurde von der Arbeitsgruppe um D`Alessandro die Wirksamkeit von MMF in Kombination mit Ciclosporin A und/oder Prednisolon als postoperative Immunsuppression nach Darmtransplantation getestet (D`Alessandro et al. 1993). Der Effekt auf das Transplantatüberleben durch eine Kombination mit Ciclosporin A nach intercaniner LTX

wurde ebenfalls erforscht (Bechstein et al. 1993). Aktueller Gegenstand der Forschung ist die Leber-Xenotransplantation vom Schwein auf den nicht-humanen Primaten. Diesbezüglich wurde die Immunsuppression durch eine kombinierte Gabe von Tacrolimus und MMF zuletzt getestet (Ekser et al. 2010). Hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum konnte bei Adenokarzinomzellen des Kolons, Melanomzellen, Adenokarzinomzellen des Magens, Adenokarzinomzellen des Pankreas, Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, B-Zell-Lymphomzellen und auf T-Zell-Leukämiezellen gezeigt werden (Tressler et al 1994; Koehl et al. 2007). Die Hemmung der Proliferation bei der HCC-Zelllinie HEPG2 in Dualtherapie mit Doxorubicin konnte kürzlich nachgewiesen werden (Chu et al. 2010).

3.1.1.4 Klinische Erfahrungen mit Mycophenolatmofetil

Die klinische Erprobung begann in einer doppelblinden Studie über die orale Therapie der Psoriasis (Gomez et al. 1979). Eine erste klinische Phase-I-Studie wurde von Sollinger et al. erfolgreich an nierentransplantierten Patienten durchgeführt (Sollinger et al. 1992). In der Kombination mit Tacrolimus nach Pankreas-Transplantation (alleine und in Kombination mit NTX) wurde das Medikament nachfolgend evaluiert (Gruessner et al. 1998). Eine Kombinationstherapie mit Ciclosporin A zur prophylaktischen und zur *Rescue*-Therapie an lebertransplantierten Patienten wurde ebenfalls getestet (Mc Diarmid 1996). Die Wirksamkeit in Kombination mit Tacrolimus im Vergleich zu der Kombinationstherapie mit Ciclosporin A wurde mehrfach untersucht (Klupp et al. 1999; Glanemann et al. 2001).

Erste Langzeitergebnisse konnten bei diesen Kombinationen mit MMF keinen Nutzen zeigen (Langrehr et al. 2006). Ein Vergleich zu der Wirkung von Azathioprin (je in Kombination mit Ciclosporin) wurde von Wiesner et al. durchgeführt, welche eine verringerte Inzidenz der akuten Transplantatabstoßung unter MMF-Therapie feststellten mit 48 % der Azathioprin-Gruppe gegenüber 39 % in der MMF-Gruppe (Wiesner et al. 2001). Eine randomisierte prospektive 5-Jahres-Untersuchung konnte in der MMF-Monotherapie im Vergleich zur CNI-Therapie keinen Unterschied in der Inzidenz der akuten Abstoßung feststellen (Schmeding et al. 2011).

3.1.1.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

In der klinischen Anwendung zeigt MMF ein Nebenwirkungsprofil in Form von Diarrhoe, Erbrechen, Leukopenie, Sepsis und opportunistischen Infektionen. Die UAW gastrointestinaler Art (Diarrhoe, Nausea, Emesis) sind ein häufiges Symptom nach Organtransplantation (Schmidt und Brockmann 2007). Da MMF diese Problematik zusätzlich verstärken kann, ging man von einem physikalischen Effekt während der oralen Einnahme aus. Es zeigte sich jedoch, dass die gastrointestinalen Nebenwirkungen von MMF dosisabhängig sind und es keinen Unterschied zwischen den Applikationsformen oral/intravenös gibt (Pescovitz et al. 2000). Dennoch wurde eine magensaftresistente Applikation auf den Markt gebracht: EC-MPS (*Enteric Coated* MPS; Myfortic®) mit der These, dass durch die resorptionslose Magenpassage die physikalischen Effekte umgangen würden und unerwünschte gastrointestinale Effekte im Vergleich zur klassischen Anwendung *per os* reduziert werden. Diese These ist jedoch umstritten und Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen (vgl. Salvadori et al. 2004 sowie Schmidt und Brockmann 2007). Eine weitere These zur möglichen Ursache der gastrointestinalen Nebenwirkungen führt das Metabolisationsprodukt Acyl-Glucuronid an, welches ein aktiver Metabolit mit direkter Wirkung auf Proteine und ein Zytokin-Induktor ist (Spahn-Langguth et al. 1992; Wieland et al. 2000; Shipkova et al. 2001). Die Leukopenie durch MMF wird auf die Suppression des Knochenmarks zurückgeführt (Danesi und Del Tacca 2004). Sepsis und opportunistische Infektionen sind zu erwartende Nebenwirkungen einer Immunsuppression.

In einer placebokontrollierten, doppelblinden Multicenter-Studie wurden unter MMF-Therapie vermehrt Herpes simplex-, Herpes zoster- und Cytomegalievirusinfektionen festgestellt (Pichlmayer et al. 1995).

3.1.2 Sirolimus

3.1.2.1 Eigenschaften

Sirolimus (auch Rapamycin) ist ein Fermentationsprodukt der Actinomyces-Art *Streptomyces hygroscopicus*, das in den 1970er-Jahren aus einer Bodenprobe der Osterinsel (Rapa Nui) isoliert und zunächst als Fungizid und Antibiotikum postuliert wurde (Vézina et al. 1975).

Die Biosynthese zum makrozyklischen Lacton (siehe Abb. 4) erfolgt zunächst über drei Polyketid-Synthasen (RapA, RapB, RapC). Diese bestehen jeweils aus verschieden großen Enzymkomplexen (sog. Modulen), die die linearen Polyketide schrittweise verlängern. Abschließend erfolgt der Ringschluss über eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase (RapP) (Schwecke et al. 1995).

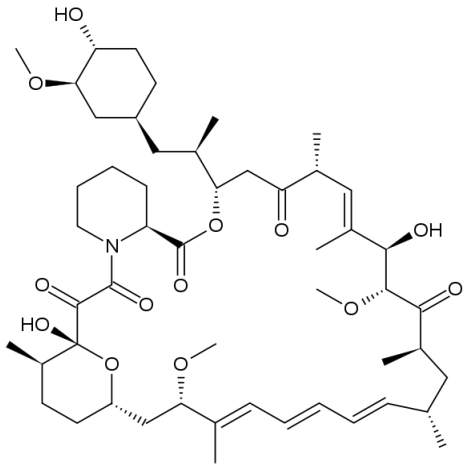

Abbildung 4: Strukturformel Sirolimus

3.1.2.2 Wirkmechanismus

Die immunsuppressive Wirkung zeigte sich erstmals bei *in vitro* Versuchen über eine antiproliferative Wirkung auf T-Zellen (Dumont et al. 1990). Weitere Arbeiten konnten zeigen, das Sirolimus mit der Serin-Threonin-Kinase mTOR (*Mammilian Target of Rapamycin*) einen Komplex bildet und so dessen Funktion inhibiert (Chen et al. 1995). Die Kinase mTOR ist ein ubiquitär im Zellplasma vorkommender Enzymkomplex, welcher zentrale Zellsteuerungsmechanismen wie Zellproliferation, Angiogenese und Regulation des Energiehaushalts absolviert (Wullschleger et al. 2006; Humar et al. 2002; Fingar et al. 2006). Bei vielen Tumorerkrankungen ist die Signalkaskade dieses Komplexes aufgrund von Mutationen gestört. Es kommt zu einer unkontrollierten Aktivierung des mTOR-Komplexes mit möglichen pathologischen Überregulierungen seiner Zellsteuerungsmechanismen (Shaw und Cantley 2003; Guertin und Sabatini 2005). Durch Hemmung dieser Überregulation kann Sirolimus den Tumorprogress mindestens verlangsamen (Bu et al. 2008).

3.1.2.3 Experimentelle Erfahrungen mit Sirolimus

Zunächst erforschte man die antimykotischen Eigenschaften im Vergleich zu den bestehenden Fungiziden Amphotericin B, Candicidin und Nystatin (Sehgal et al. 1975). Die immunsuppressive Wirkung konnte anhand der antiproliferativen Wirkung auf T- und B-Zell-Lymphozyten *in vitro* demonstriert werden (Kay et al. 1991). Später zeigte sich, dass Sirolimus die Zellzyklusprogression in der mittleren bis späten G1-Phase in T-Zell-Lymphozyten blockiert (Terada et al. 1993). Weitere *in vitro* Versuche konnten eine Blockierung verschiedener Interleukin-vermittelter Proliferationswege (IL-2, -4, -7, -12 und -15) von T- und B-Lymphozyten aufzeigen (Li et al. 1998; Bertagnolli et al. 1994; Strehlau et al. 1998). Weiterhin zeigte sich eine direkte Proliferationshemmung nicht-immuner Zellen wie Endothelzellen aus Rinderaorta und humaner Umbilikalvene sowie glatten Muskelzellen (Akselband et al. 1991; Cao et al. 1995). *In vivo* wurden vielfältige Transplantationsversuche durchgeführt: Nach heterotroper Herztransplantation zwischen Ratten wurde eine Proportionalität zwischen der Serumkonzentration von Sirolimus und dem Transplantatüberleben nachgewiesen (Di Joseph et al. 1996). Ein verlängertes Transplantatüberleben zeigte sich auch nach orthotroper NTX zwischen Schweinen (Granger et al. 1995). Die antiproliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen wurde genutzt, um die Re-Stenosierung von Herzkranzgefäßen nach Ballonkatheterdilatation zu reduzieren. Nach Dilatation erfolgt die systemische medi-kamentöse Therapie, wodurch lokal die Proliferation der glatten Muskelzellen in der Gefäß-Intima-Schicht, welche durch das Dilatationstrauma initiiert wurde, inhibiert wird. Dies wurde *in vivo* bei Ratten sowie Schweinen nachgewiesen (Gregory et al. 1995; Gallo et al. 1999). Durch Sirolimusbeschichtung eines Stents, welcher lokal nach Ballondilatation eingebracht wird, konnte dieser Effekt auch ohne systemische Anwendung von Sirolimus im Schwein gezeigt werden (Carter et al. 2000). Die Immunsuppression nach NTX wurde erfolgreich *in vivo* getestet an Hunden, Schweinen und Primaten (Collier et al. 1990; Almond et al. 1993; Collier et al. 1991). Die hemmende Wirkung auf Tumorzellen konnte u. a. auf die HCC-Zelllinie H4IIEC und auf unspezifische HCC-Proben, Osteosarkomzellen, Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und auf Nierenzellkarzinomzellen nachgewiesen werden (Price et al. 1992; Ribatti et al. 2007; Ogawa et al. 1998; Boffa et al. 2004; Luan et al. 2003).

3.1.2.4 Klinische Erfahrungen mit Sirolimus

Die klinische Anwendung beschichteter Stents nach Ballondilatation zur Reduktion der Re-Stenose wurde klinisch erfolgreich geprüft und wird mittlerweile standardmäßig verwendet (Sousa et al. 2000). Bezüglich der immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantation gab es zahlreiche Studien: Die klinische Testung in Kombination mit Ciclosporin A und Steroiden nach NTX wurde u. a. in Phase-II-Studien durchgeführt, denen wenig später Phase-III-Studien folgten (Kahan et al. 1999; Groth et al. 1999; Kahan et al. 2000; Mac Donald et al. 2001). Auch die Anwendung nach LTX wurde evaluiert (Kneteman et al. 2004; Toso et al. 2007). Mit der Idee, dass durch den zusätzlich antiproliferativen Effekt von Sirolimus das rezidivfreie Überleben nach LTX bei HCC-Patienten zusätzlich verlängert werden kann, wurde eine noch aktuell laufende Multicenterstudie begonnen, welche ein Sirolimus-negatives Therapieregime zur Immunsuppression nach LTX mit einem Sirolimus-positiven Regime vergleicht (Schnitzbauer et al. 2010).

3.1.2.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Zu den UAW von Sirolimus zählen Hyperlipidämie, Myelosuppression (Thrombozytopenie und Leukopenie), verringerte Wundheilung, Proteinurie und interstitielle Pneumonie.

Die Hyperlipidämie unter Sirolimus kommt durch eine Herabregulierung des LDL-Rezeptors zustande. Dieser Membranrezeptor bindet an die Apolipoproteineinheit B- 100 des LDL (*Low Density Lipoprotein*), einem Serumtransportprotein für Nahrungsfette (v. a. Cholesterin) mit der physiologischen Aufgabe, diese Fette in den extrahepatischen Geweben zu verteilen (Olofsson und Borèn 2005). Durch die verminderte LDL-Rezeptorpräsenz kommt es zu einer verminderten Endozytose des LDL und somit seiner Transportfette in die Zellen - es resultiert eine Hyperlipidämie bzw. Hyperlipoproteinämie (Sharpe und Brown 2008).

Myelosuppressive Effekte wie Thrombozytopenie und Leukopenie werden ebenfalls beobachtet. In einer Kohortenstudie zur vergleichenden Therapie mit Ciclosporin A nach NTX traten in der Sirolimus-Gruppe Thrombozytopenien in der ersten Woche bei 63 % der Patienten auf und Leukopenien bei 61 %. Diese Effekte zeigten keinen Zusammenhang zwischen der Schwere der Ausprägung und der Dosis und in 89 % der Fälle war der Effekt selbstlimitierend (Hong und Kahan 2000).

Wundheilungsstörungen wurden in mehreren klinischen Studien beobachtet und konnten in tierexperimentellen Wundheilungsmodellen bestätigt werden (Gillingham et al. 2001; Langer und Kahan 2002; Kuppahally et al. 2006; Schäffer et al. 2007; Weinreich et al. 2011). Die Proteinurie als UAW des Sirolimus wird gehäuft bei Patienten nach NTX beobachtet, der Pathomechanismus ist aber noch ungeklärt (Hamdy et al. 2010). Experimentell konnten spezifische Metaboliten im Urin von Ratten als Frühmarker für die Nephrotoxizität gemessen werden (Schmitz et al. 2009). Da dieser Effekt nach anderen Organtransplantationen nicht zu beobachten ist, wird Sirolimus als nicht-nephrotoxische Alternative zur Immunsuppression mit Ciclosporin A angewendet. Bei der UAW interstitielle Pneumonie ist der pathophysiologische Mechanismus noch nicht geklärt (Morelon et al. 2001; Pham et al. 2004).

3.2 Zelllinien

Die Experimente wurden mit den humanen HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B durchgeführt. SKHEP1 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland; siehe Abb. 5) ist eine Zelllinie, die 1971 aus dem Aszites eines an HCC erkrankten Kaukasiers etabliert wurde. Diese Zelllinie ist epithelialen Ursprungs und eignet sich für *in vitro* sowie für *in vivo* Experimente (Heffelfinger et al. 1992; Fogh et al. 1977).

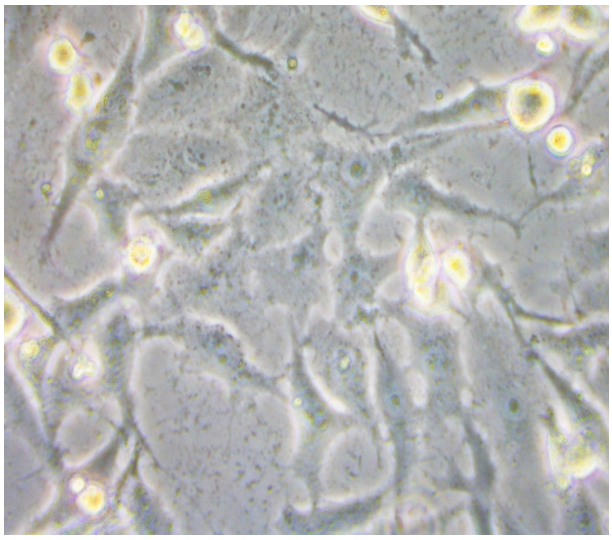

Abbildung 5: SKHEP1-Zellen unter lichtmikroskopischer 40-facher Vergrößerung

Die Zelllinie HEP3B (siehe Abb. 6) ist eine 1976 durch Biopsie aus einem Leberteilresektat nach Lobektomie eines achtjährigen Jungen aus den USA gewonnene Zelllinie, welche ein Hepatitis-B-Virus-Genom integriert hat (Aden et al. 1979). Auch diese Zelllinie wurde für experimentelle Tumorforschung erfolgreich evaluiert (Hahn et al. 1982; Darlington et al. 1987).

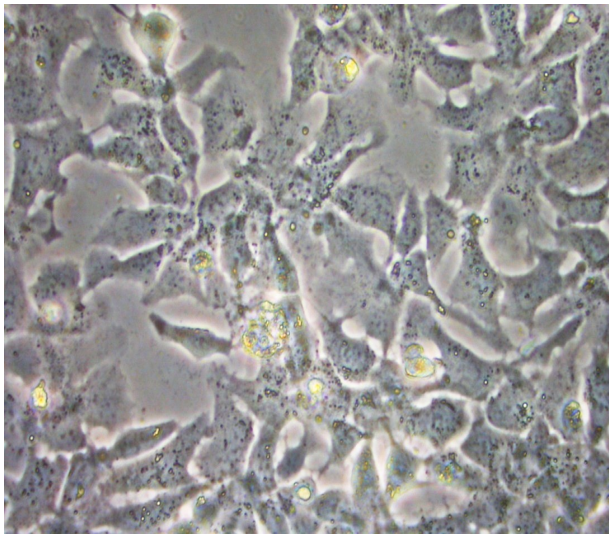

Abbildung 6: HEP3B-Zellen in lichtmikroskopischer 40-facher Vergrößerung

3.3 Zellkultur

Beide Zelllinien wurden als subkonfluente adhärente Monolayerkulturen im Kulturmedium RPMI 1640 (PAA, Österreich) kultiviert, welches folgende Zusätze enthielt: 10 % fetales Kälberserum (*Fetal Bovine Serum Dialysed*, Gibco, USA), 1 % L-Glutamin (Gibco, USA), 1 % Penicillin (10 000 IU/ml)-Streptomycin (10 000 µg/ml) (Biochrom, Deutschland), 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, USA) und 1 % Sodiumpyruvat (Biochrom, Deutschland). Die Lagerung fand im Brutschrank (Binder, Deutschland) bei 37° C, 5 % CO^2 und 95 % O^2 in 75 cm^2 großen Zellkulturflaschen statt (BD Falcon, USA). Die Zellkulturen wurden abwechselnd mit frischem Medium versorgt oder passagiert. Zum Mediumwechsel wurde das alte Medium abgesaugt und ein Waschgang mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PAA, Österreich) durchgeführt, bevor frisches Medium in die Flaschen gefüllt wurde.

Das Passagieren wurde enzymatisch mit 2 ml 0,25-prozentigem Trypsin (Biochrom, Deutschland) durchgeführt. Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde das Lösen der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und anschließend der Flascheninhalt in Kulturröhrchen (BD Falcon, USA) überführt und das vorhandene Trypsin durch Mediumzugabe inaktiviert. Zum Passagieren und zur Verwendung in einem Experiment wurden die Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer unter Gebrauch von Trypanblau (Biochrom, Deutschland) unter einem Durchlichtmikroskop (Olympus, Deutschland) gezählt.

Um die Medikamententestung durchzuführen, wurden 2000 Zellen in je einen Napf einer 96-well-Mikrotiterplatte (*Flat-Bottom*; BD Falcon, USA) überführt und mit jeweils 100 µl Medium versorgt. Pro Versuchsreihe gab es drei Platten (24 h, 72 h und 120 h). Nach 24 h Ruhezeit im Inkubator wurden die Medikamente in der entsprechenden Konzentration in die zugehörigen Plattenvertiefungen gegeben (Zeitpunkt 0). Die Kontrollgruppen erhielten medikamentenfreies Medium. Die Proliferationsmessung erfolgte nach 24, 72 und 120 Stunden. Alle Arbeiten an oder mit den Zellen wurden unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Heraeus, Deutschland) durchgeführt. Die Endversuche nach Identifizierung der relevanten Medikamentenkonzentrationen wurden je dreimal unter identischen Bedingungen wiederholt. Es bestanden folgende sechs Versuchsgruppen; siehe Tab. 10:

SKHEP1	+	MMF		
HEP3B	+	MMF		
SKHEP1	+	Sirolimus		
HEP3B	+	Sirolimus		
SKHEP1	+	MMF	+	Sirolimus
HEP3B	+	MMF	+	Sirolimus

Tabelle 10: Übersicht der Versuchsgruppen

3.4 XTT-Proliferationstest

Das Testprinzip beruht auf der Tatsache, dass es bei avitalen Zellen zu einem Verlust ihrer mitochondrialen Aktivität kommt. Durch das von Mosman etablierte Testprinzip kann man diesen Aktivitätsverlust durch die Umsatzrate eines Substrates nachweisen (Mosman 1983). Das farblose Tetrazoliumsalz XTT (*2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid*) kann unter Zugabe des intermediären Elektronenüberträgers PMS (Phenazinmethosulfat) in seinen reduzierten Zustand (Formazan; siehe Abb. 7) gebracht werden (Scudiero et al. 1988).

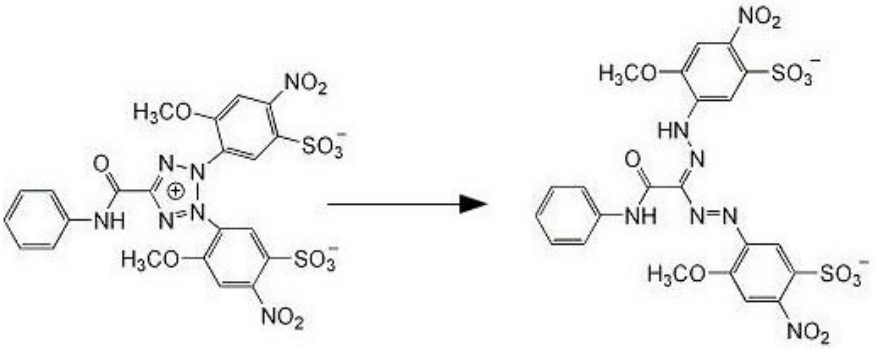

Abbildung 7: Strukturformel von XTT und seiner Reduktionsform Formazan

Formazan ist farbig und über ein Spektralphotometer messbar. Über den genauen biochemischen Vorgang gab es verschiedene Lehrmeinungen. Man nahm zum einen an, dass die in den Mitochondrien vorhandenen Dehydrogenasen den Prozess direkt intrazellulär katalysieren (Scudiero et al. 1988), zum anderen schrieb man dem mitochondrialen Enzym Cytochrom C, einem Elektronentransporter in der inneren Mitochondrienmembran, eine wichtige Rolle bei der intrazellulären XTT-Reduktion zu (Nosaka et al. 1999). Mittlerweile ist erwiesen, dass XTT die Zellmembran nicht durchdringen kann, an der Zellmembranaußenseite reduziert wird und dem transmembranären Elektronentransport eine Schlüsselrolle zuzuschreiben ist (Berridge et al. 2005).

Zur Testdurchführung wurde die 96-well-Mikrotiterplatte dem Inkubator entnommen und das Medium-Medikamentengemisch mit einer Mikropipette abgesaugt. Anschließend wurden die Vertiefungen einmal behutsam mit PBS gespült und danach wurde jede zu

messende Plattenvertiefung mit der XTT-Test-Lösung (Roche, Schweiz) gefüllt - je 49 µl XTT-Lösung und 1 µl PMS. Es folgte für 4 h bei normaler Atmosphäre die lichtlose Lagerung. Die kolorimetrische Messung durch das Spektralphotometer (FLUOstar, BMG Labtechnologies, Deutschland) erfolgte danach bei einer Wellenlänge von λ = 492 nm gegen eine Referenzwellenlänge von λ = 650 nm; siehe Abb. 8:

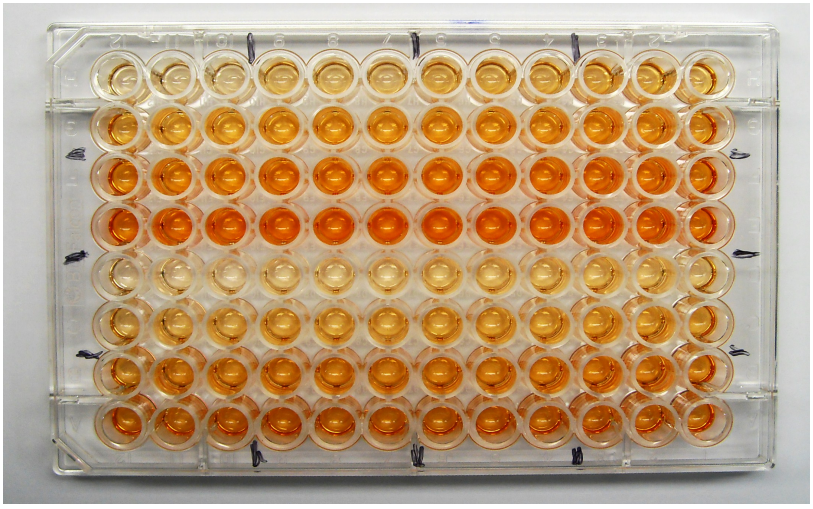

Abbildung 8: XTT-Test-Platte mit unterschiedlich starker Vitalitätsfärbung in Abhängigkeit der Zellvitalität. Je höher die Vitalität, desto stärker die Farbintensität.

3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wurde als Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*; SEM) berechnet. Zur Ermittlung einer statistischen Signifikanz wurde bei zwei Vergleichsgruppen der nicht-parametrische Rangtest nach Mann und Whitney durchgeführt (Mann und Whitney 1947). Die asymptotische Signifikanz beträgt bei diesem Test 5 %. Getestet wurden alle Behandlungsgruppen jeder Zelllinie untereinander, um eine Signifikanz zu differenzieren. Als Vorgabe für eine bestehende Signifikanz wurde eine Irrtums-wahrscheinlichkeit von 0,05 für die Signifikanz gesetzt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software SPSS (Version 19.0, IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Die grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm Calc Apache Open Office (Version 3.4, Oracle, Silicon Valley, Kalifornien).

4. Ergebnisse

4.1 SKHEP1 + MMF

In der Testgruppe SKHEP1 + MMF zeigte sich in der Proliferationsanalyse ein für die verschiedenen Medikamentenkonzentrationen unterschiedlich stark vermindertes Wachstum im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Letztere ergab zu den Zeitpunkten 24 h, 72 h und 120 h die Absorptionswerte 317 nm, 704 nm bzw. 1034 nm. Im Vergleich hierzu zeigten sich in der Gruppe der MMF-Konzentration 125 ng/ml die Absorptionswerte 308 nm (24 h), 590 nm (72 h) und 877 nm (120 h). Eine deutlich geringere Wachstumskurve präsentierten die Konzentrationen 750 ng/ml und 1000 ng/ml. Bei ersterer zeigten sich zu den drei Zeitpunkten die Werte 265 nm (24 h), 375 nm (72 h) sowie 405 nm (120 h). Die Messwerte für die MMF-Konzentration 1000 ng/ml zeigten hierzu nur geringe Abweichungen: 272 nm, 358 nm bzw. 362 nm für 24 h, 72 h bzw. 120 h (siehe Abb. 9).

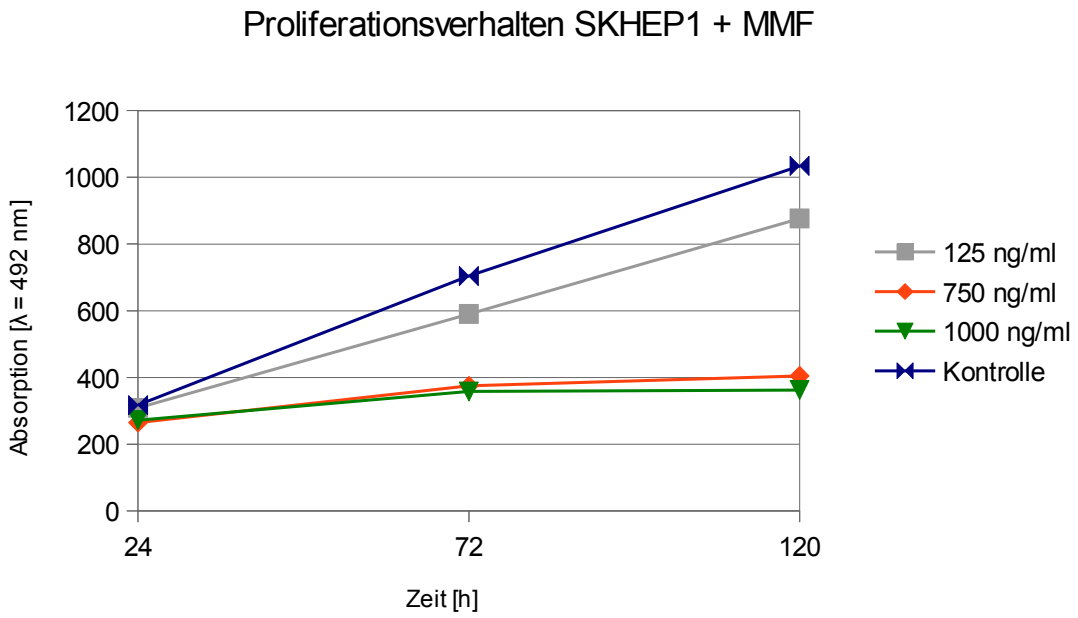

Abbildung 9: Proliferationsverhalten SKHEP1 + MMF. Mittelwerte

Wurden die Medikamentenkonzentrationen mit der Kontrollgruppe verglichen und diese 100-Prozent gewichtet, so stellen sich folgende prozentuale Werte für die Zellviabilität in den einzelnen Konzentrationsgruppen dar (siehe Abb. 10): Die Gruppe mit der Konzentration von 125 ng/ml MMF erreichte einen Anteil von 97,2 % (24 h), 83,8 % (72 h) und 84,8 % (120 h; p = 0,006). Die MMF-Konzentration von 750 ng/ml ergab die Werte 83,4 % (24 h), 53,3 % (72 h) und 39,2 % (120 h; p = 0,004). Die MMF-Konzentration von 1000 ng/ml erreichte noch geringere Zellviabilitäten mit den Werten 85,7 % (24 h), 50,8 % (72 h) und 35,1 % (120 h; p = 0,004). Der Unterschied der Zellviabilität zwischen den MMF-Konzentrationen 750 ng/ml und 1000 ng/ml hat nach 120 h die Signifikanz von p = 0,037. Zum gleichen Zeitpunkt beträgt die Signifikanz zwischen der Gruppe 125 ng/ml zu den Gruppen 750 ng/ml und 1000 ng/ml jeweils p = 0,004.

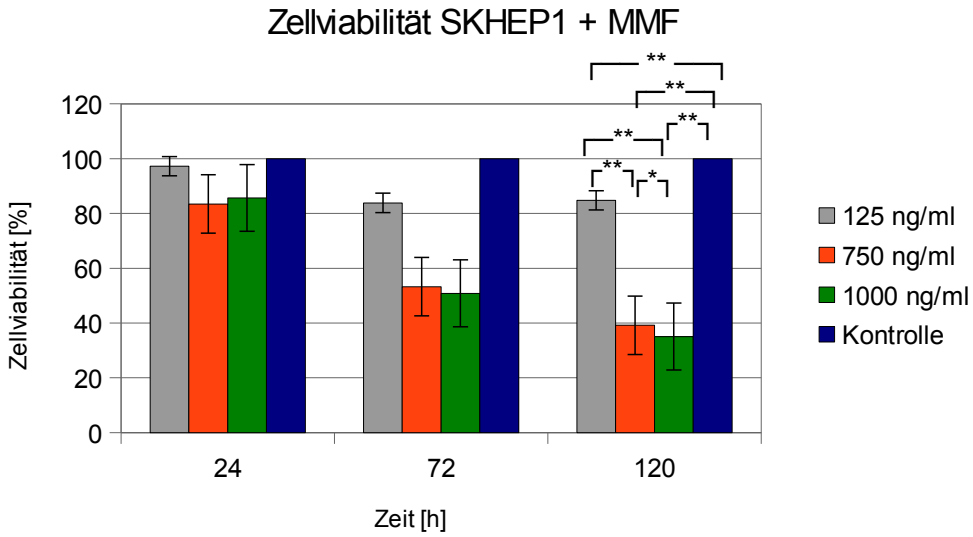

Abbildung 10: Zellviabilität SKHEP1 + MMF. Mittelwerte ± SEM; * = p < 0,05; ** = p < 0,01

4.2 HEP3B + MMF

In der Testgruppe HEP3B + MMF kam es in der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 24 h, 72 h und 120 h zu den Absorptionswerten 252 nm, 498 nm bzw. 807 nm. Im Vergleich hierzu zeigten sich in der Gruppe der MMF-Konzentration 125 ng/ml die Absorptionswerte 276 nm (24 h), 452 nm (72 h) und 687 nm (120 h). Eine erneut deutlich geringer ausgeprägte Wachstumskurve präsentierten die MMF-Konzentrationen 750 ng/ml und 1000 ng/ml. Bei ersterer zeigten sich zu den drei Zeitpunkten die Werte 251 nm (24 h), 309 nm (72 h) sowie 271 nm (120 h). Die Messwerte für die MMF-Konzentration 1000 ng/ml zeigten hierzu nur geringe Abweichungen: 257 nm, 292 nm bzw. 250 nm für 24 h, 72 h bzw. 120 h (siehe Abb. 11).

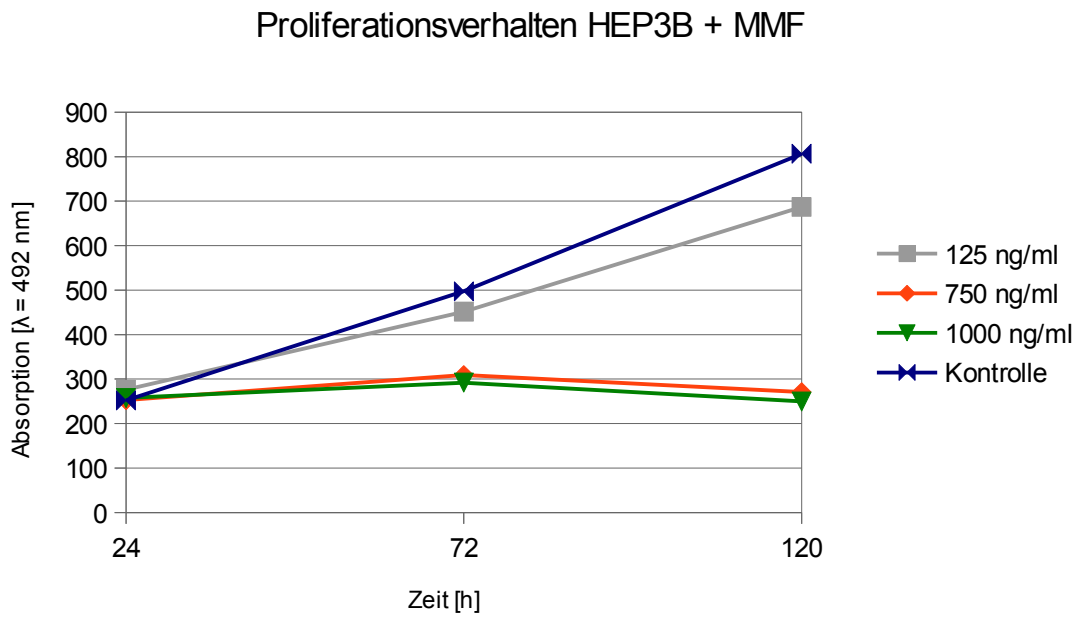

Abbildung 11: Proliferationsverhalten HEP3B + MMF. Mittelwerte

Im Vergleich zu der 100-Prozent gewichteten Kontrollgruppe stellen sich folgende prozentuale Werte für die Zellviabilität bei unterschiedlichen Medikamenten-konzentrationen dar (siehe Abb. 12): Die Gruppe mit der Konzentration von 125 ng/ml MMF erreichte einen Anteil von 109,5 % (24 h), 90,8 % (72 h) und 85,2 % (120 h; p = 0,078). Die MMF-Konzentration von 750 ng/ml zeigte die Werte 100,2 % (24 h), 62,2 % (72 h) und 33,6 % (120 h; p = 0,004). Die MMF-Konzentration 1000 ng/ml erreichte Zellviabilitäten mit den Werten 102,1 % (24 h), 58,7 % (72 h) und 31 % (120 h; p = 0,004). Der Unterschied der Zellviabilität zwischen den Konzentrationen 750 ng/ml und 1000 ng/ml ist zum Zeitpunkt 120 h nicht signifikant bei p = 0,065. Zum Zeitpunkt 120 h beträgt die Signifikanz zwischen der Gruppe 125 ng/ml zu den Gruppen 750 ng/ml und 1000 ng/ml jeweils p = 0,004.

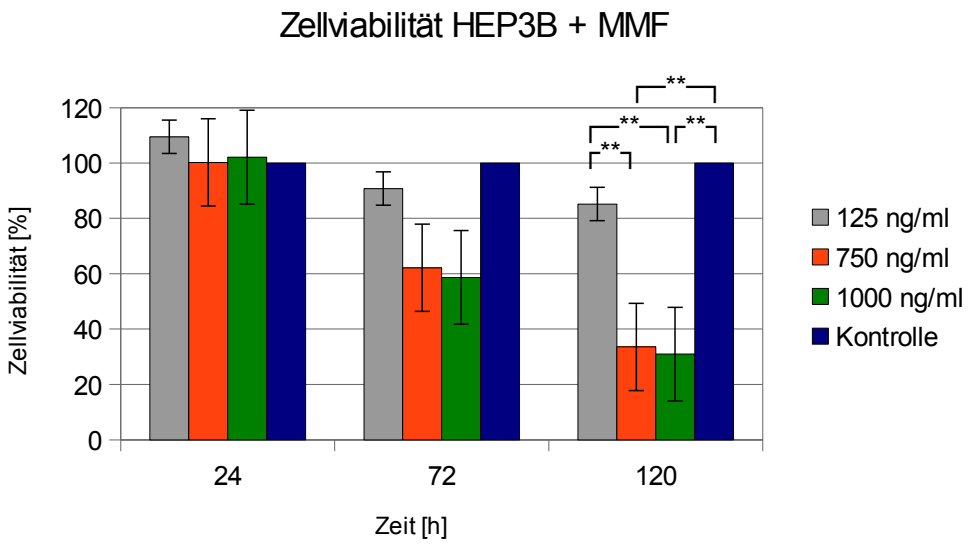

Abbildung 12: Zellviabilität HEP3B + MMF. Mittelwerte ± SEM; ** = p < 0,01

4.3 SKHEP1 + Sirolimus

In der Testgruppe SKHEP1 + Sirolimus zeigte sich ein deutlich unterschiedliches Proliferationsverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese präsentierte die Absorptionswerte 292 nm (24 h), 729 nm (72 h) und 1040 nm (120 h). Die Gruppe der Sirolimus-Konzentration 7,5 ng/ml zeigte die Absorptionswerte 231 nm (24 h), 406 nm (72 h) und 608 nm (120 h). Eine schwächere Wachstumskurve präsentierten die Konzentrationen 12,5 ng/ml und 15 ng/ml. Bei 12,5 ng/ml zeigten sich zu den drei Zeitpunkten die Werte 130 nm (24 h), 108 nm (72 h) sowie 100 nm (120 h). Die Messwerte für die Sirolimus-Konzentration 15 ng/ml ergab die Absorptionswerte 107 nm, 99 nm bzw. 91 nm für 24 h, 72 h bzw. 120 h (siehe Abb. 13).

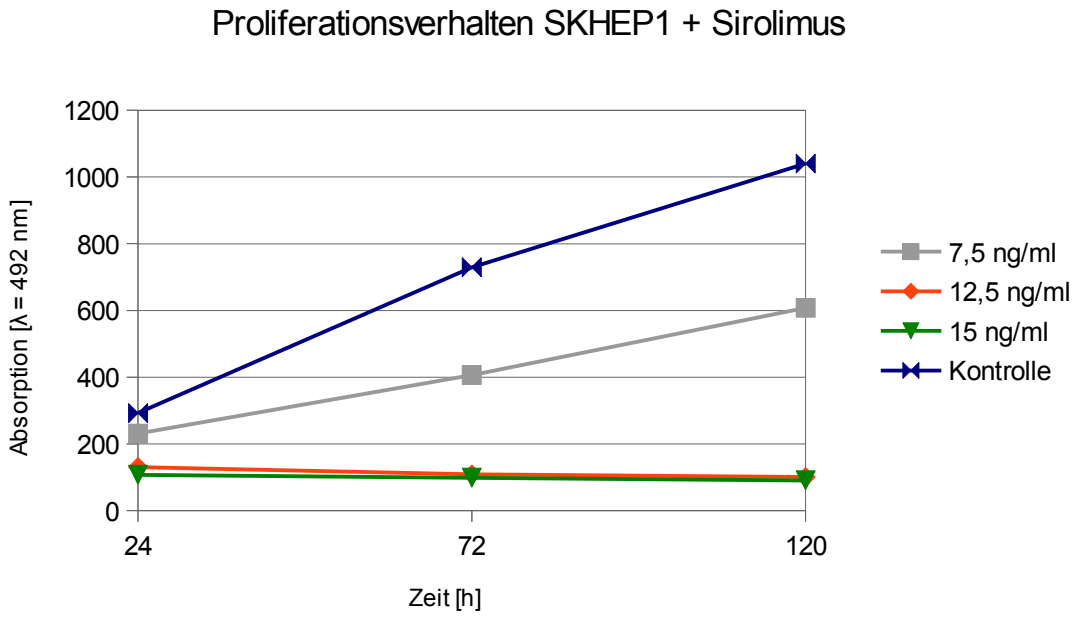

Abbildung 13: Proliferationsverhalten SKHEP1 + Sirolimus. Mittelwerte

Im Vergleich der Medikamentenkonzentrationen mit der 100-Prozent gewichteten Kontrollgruppe präsentierten sich folgende prozentuale Werte für die Zellviabilität (siehe Abb. 14): Die Gruppe mit der Sirolimus-Konzentration von 7,5 ng/ml erreichte einen Anteil von 78,9 % (24 h), 55,7 % (72 h) und 58,4 % (120 h; p = 0,004). Die Sirolimus-Konzentration von 12,5 ng/ml ergab die Werte 44,6 % (24 h), 14,9 % (72 h) und 9,7 % (120 h; p = 0,004). Die Sirolimus-Konzentration von 15 ng/ml erreichte Zellviabilitäten mit den Werten 36,7 % (24 h), 13,5 % (72 h) und 8,7 % (120 h; p = 0,004). Der Unterschied der Zellviabilität zwischen den Konzentrationen 12,5 ng/ml und 15 ng/ml hat zum Zeitpunkt 120 h keine Signifikanz mit p = 0,109. Zum Zeitpunkt 120 h beträgt die Signifikanz zwischen der Gruppe 7,5 ng/ml zu den Gruppen 12,5 ng/ml und 15 ng/ml jeweils p = 0,004.

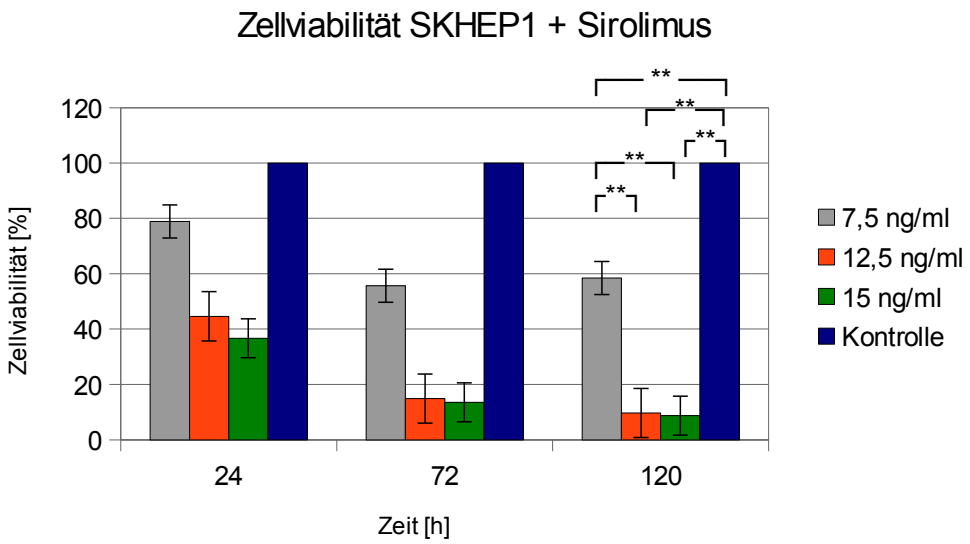

Abbildung 14: Zellviabilität SKHEP1 + Sirolimus. Mittelwerte ± SEM; ** = p < 0,01

4.4 HEP3B + Sirolimus

In der Testgruppe HEP3B + Sirolimus zeigte die Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 24 h, 72 h und 120 h die Absorptionswerte 252 nm, 473 nm bzw. 777 nm. In der Gruppe der Sirolimus-Konzentration 0,00025 ng/ml zeigten sich die Absorptionswerte 238 nm (24 h), 443 nm (72 h) und 747 nm (120 h). Eine ähnliche Wachstumskurve präsentierten die Konzentrationen 0,0005 ng/ml und 0,0025 ng/ml. Bei ersterer zeigten sich zu den drei Zeitpunkten die Werte 227 nm (24 h), 426 nm (72 h) sowie 648 nm (120 h). Die Messwerte für die Sirolimus-Konzentration 0,0025 ng/ml zeigte die Absorptionswerte 232 nm, 367 nm bzw. 551 nm für 24 h, 72 h bzw. 120 h (siehe Abb. 15).

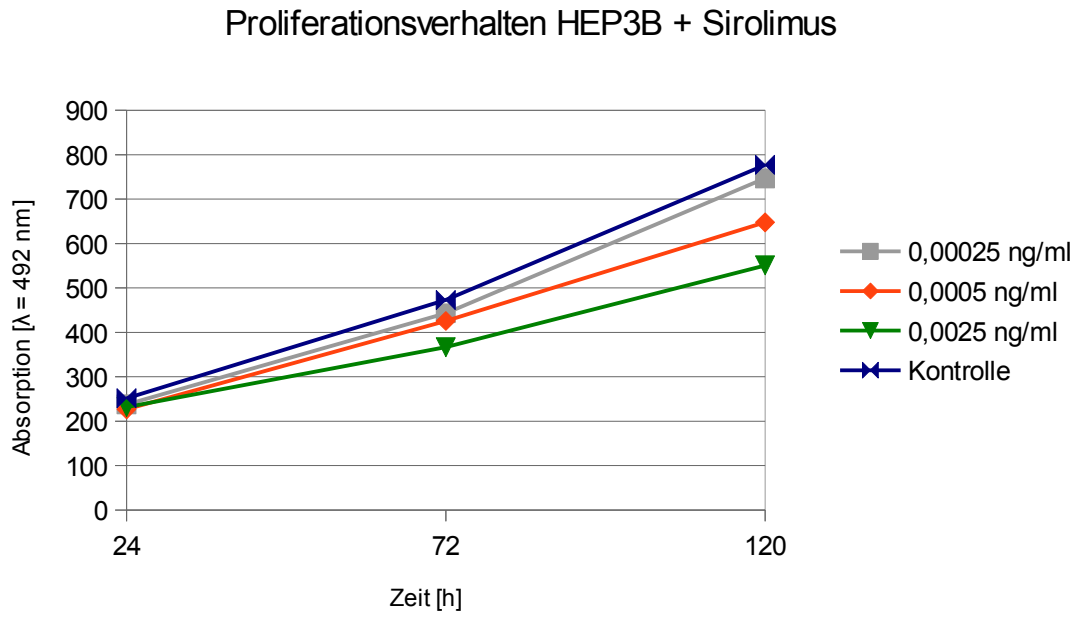

Abbildung 15: Proliferationsverhalten HEP3B + Sirolimus. Mittelwerte

Der Vergleich der Medikamentenkonzentrationen mit der Kontrollgruppe (100-Prozent gewichtet) zeigte folgende Werte für die Zellviabilität (siehe Abb. 16): Die Gruppe mit der Sirolimus-Konzentration von 0,00025 ng/ml erreichte einen Anteil von 94,6 % (24 h), 93,7 % (72 h) und 96,1 % (120 h; p = 0,337). Die Sirolimus-Konzentration von 0,0005 ng/ml ergab die Werte 90,1 % (24 h), 90 % (72 h) und 83,3 % (120 h; p = 0,055). Die Sirolimus-Konzentration von 0,0025 ng/ml erreichte Zellviabilitäten mit den Werten 92,2 % (24 h), 77,5 % (72 h) und 70,9 % (120 h; p = 0,037). Der Unterschied der Zellviabilität zwischen den Konzentrationen 0,0005 ng/ml und 0,0025 ng/ml hat zum Zeitpunkt 120 h die Signifikanz von p = 0,004. Zum Zeitpunkt 120 h beträgt die Signifikanz zwischen der Gruppe 0,00025 ng/ml zu den Gruppen 0,0005 ng/ml und 0,0025 ng/ml jeweils p = 0,004.

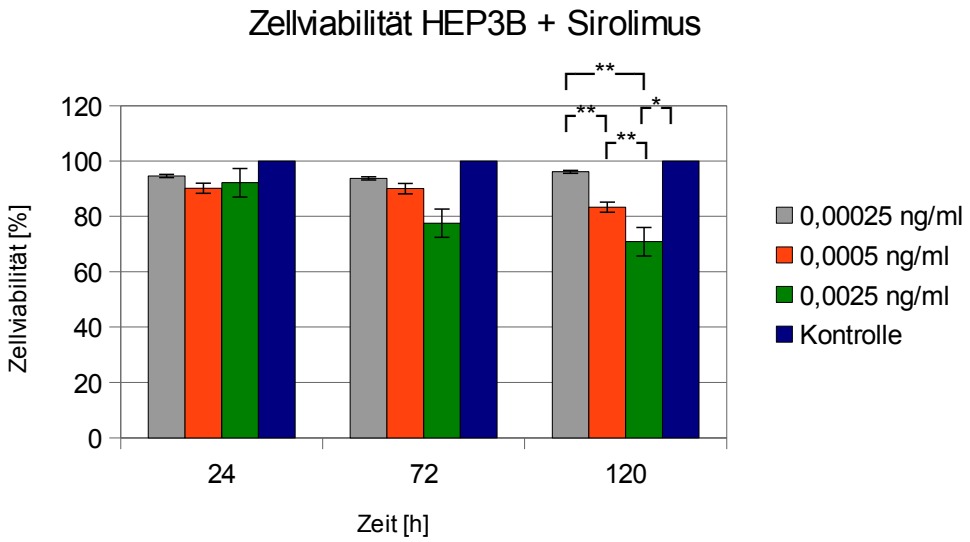

Abbildung 16: Zellviabilität HEP3B + Sirolimus. Mittelwerte ± SEM; * = p < 0,05; ** = p < 0,01

4.5 SKHEP1 + MMF + Sirolimus

In der Testgruppe SKHEP1 + MMF + Sirolimus zeigte der Vergleich der Proliferationen bei den verschiedenen Medikamentenkonzentrationen ein unterschiedliches Wachstum im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Letztere zeigte zu den Zeitpunkten 24 h, 72 h und 120 h die Absorptionswerte 126 nm, 285 nm bzw. 398 nm. Die Gruppe der Dualkonzentrationen MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 4,5 ng/ml ergab die Absorptionswerte 91 nm (24 h), 115 nm (72 h) und 107 nm (120 h). Eine dazu geringere Wachstumskurve präsentierten die Dualkonzentrationen MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 6,5 ng/ml und MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 7,5 ng/ml. Bei ersterer zeigten sich zu den drei Zeitpunkten die Werte 69 nm (24 h), 50 nm (72 h) sowie 44 nm (120 h). Die Messwerte für die Dual-Medikamentenkonzentration MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 7,5 ng/ml zeigte hierzu nur geringe Abweichungen: 66 nm, 51 nm bzw. 47 nm bei 24 h, 72 h bzw. 120 h (siehe Abb. 17).

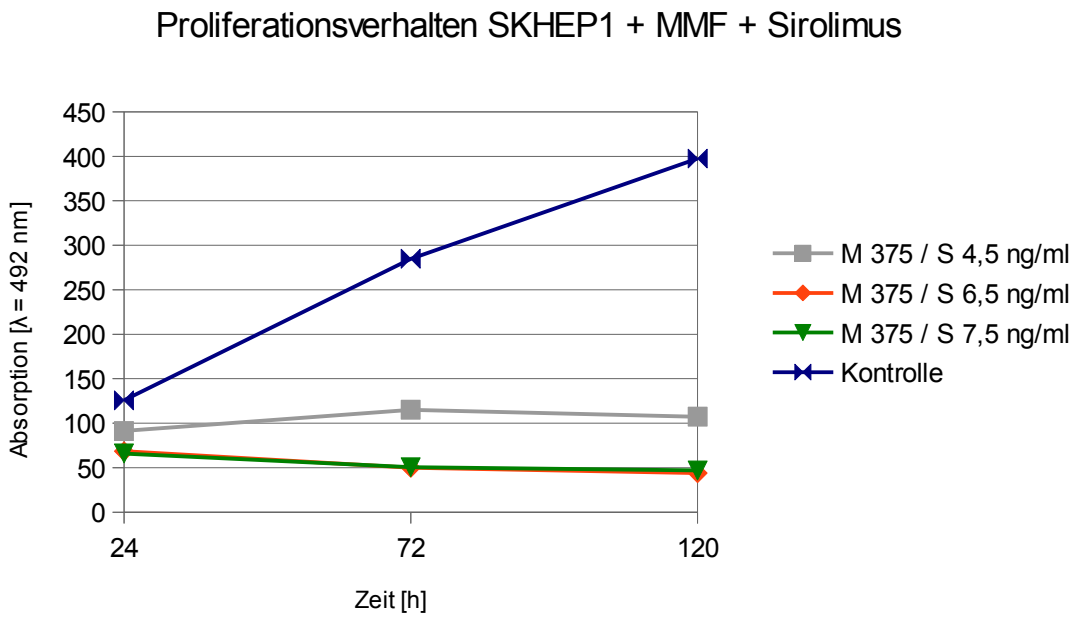

Abbildung 17: Proliferationsverhalten SKHEP1 + MMF (M) + Sirolimus (S). Mittelwerte

Im Vergleich mit der 100-Prozent gewichteten Kontrollgruppe zeigten sich folgende prozentuale Werte für die Zellviabilität bei den einzelnen Dualkonzentrationen (siehe Abb. 18): Die Gruppe mit der dualen Konzentration von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 4,5 ng/ml erreichte einen Anteil von 72,6 % (24 h), 40,4 % (72 h) und 27 % (120 h; p = 0,004). Die Dualkonzentration von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 6,5 ng/ml ergab die Werte 54,5 % (24 h), 17,5 % (72 h) und 11,1 % (120 h; p = 0,004). Die Dualkonzentration von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 7,5 ng/ml erreichte Zellviabilitäten mit den Werten 52,4 % (24 h), 17,8 % (72 h) und 11,8 % (120 h; p = 0,004). Der Unterschied der Zellviabilität zwischen den letztgenannten Dualkonzentrationen ist am Zeitpunkt 120 h nicht signifikant mit p = 0,297.

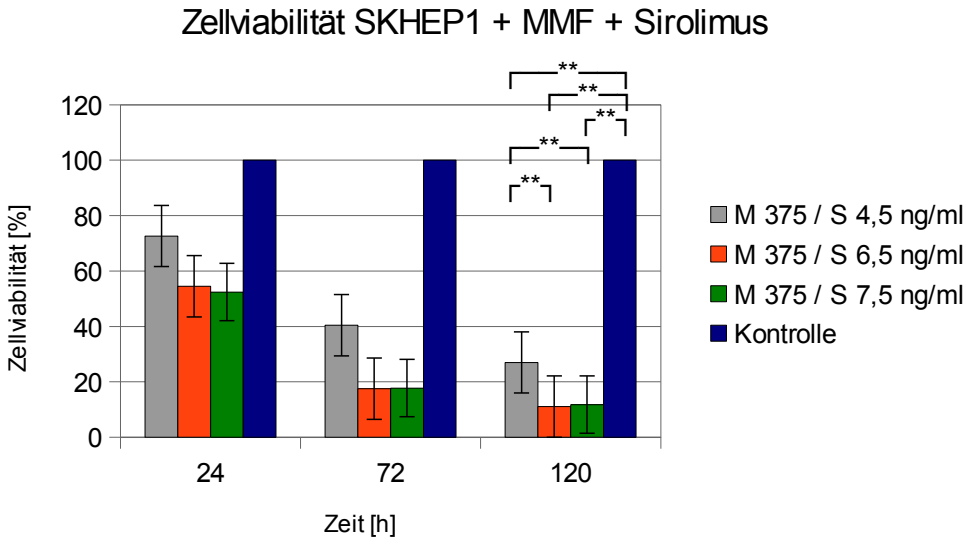

Abbildung 18: Zellviabilität SKHEP1 + MMF (M) + Sirolimus (S)
Mittelwerte ± SEM; ** = p < 0,01

4.6 HEP3B + MMF + Sirolimus

In der Testgruppe HEP3B + MMF + Sirolimus zeigten sich folgende Absorptionswerte in der Proliferationsanalyse: Die Kontrollgruppe zeigte zu den Zeitpunkten 24 h, 72 h und 120 h die Absorptionswerte 84 nm, 160 nm bzw. 263 nm. Die Gruppe mit der Dualkonzentration MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,000005 ng/ml zeigte die Absorptionswerte 78 nm (24 h), 76 nm (72 h) und 77 nm (120 h). Eine hierzu ähnliche Wachstumskurve präsentierten die Dualkonzentrationen MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,00005 ng/ml und MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,0005 ng/ml. Bei ersterer zeigten sich die Werte 83 nm (24 h), 79 nm (72 h) sowie 69 nm (120 h). Die Messwerte für die Dual-Medikamentenkonzentration MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,0005 ng/ml waren 85 nm, 74 nm bzw. 71 nm für 24 h, 72 h bzw. 120 h (siehe Abb. 19).

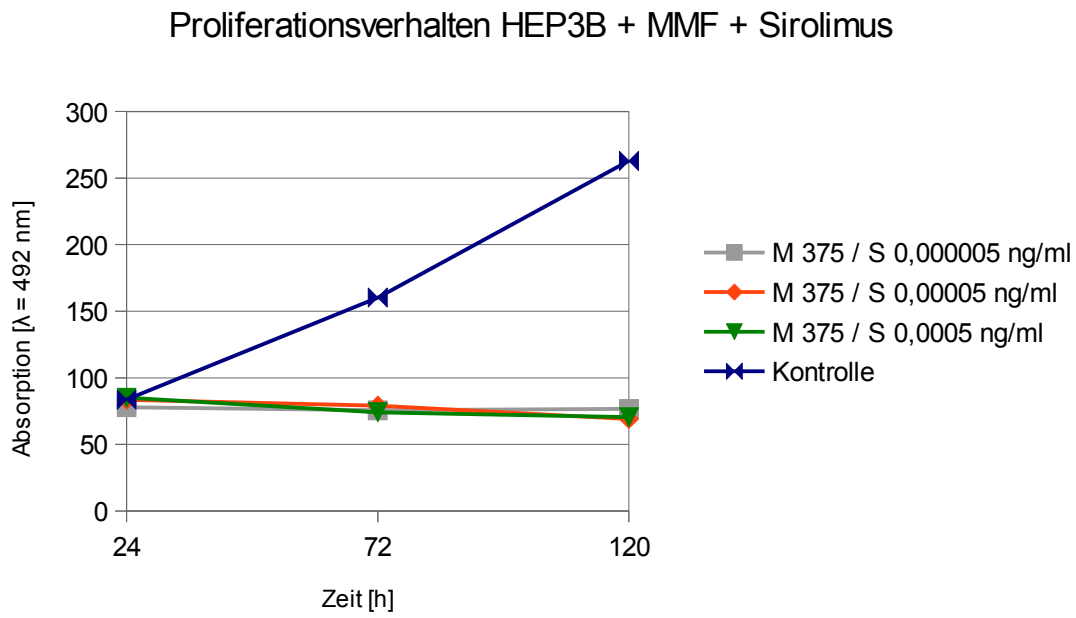

Abbildung 19: Proliferationsverhalten HEP3B + MMF (M) + Sirolimus (S). Mittelwerte

Wurden die Medikamentenkonzentrationen mit der Kontrollgruppe verglichen und letztere 100-Prozent gewichtet, so zeigten sich folgende prozentuale Werte für die Zellviabilität (siehe Abb. 20): Die Gruppe mit der dualen Konzentration von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,000005 ng/ml erreichte einen Anteil von 93,2 % (24 h), 47,2 % (72 h) und 29,1 % (120 h; p = 0,004). Die Dualkonzentration von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,00005 ng/ml ergab die Werte 99,8 % (24 h), 49,4 % (72 h) und 26,3 % (120 h; p = 0,004). Die Dualkonzentration von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,0005 ng/ml erreichte Zellviabilitäten mit den Werten 101,7 % (24 h), 46,3 % (72 h) und 26,8 % (120 h; p = 0,004). Der Unterschied der Zellviabilität zwischen den Dualkonzentrationen MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,000005 ng/ml zu MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,00005 ng/ml zu dem Zeitpunkt 120 h ist mit p = 0,004 signifikant. Erstere Dualkonzentration ist zu der Dualkonzentration MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,0005 ng/ml mit p = 0,004 ebenfalls signifikant. Der Unterschied zwischen MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,00005 ng/ml und MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,0005 ng/ml ist nicht signifikant mit p = 0,260.

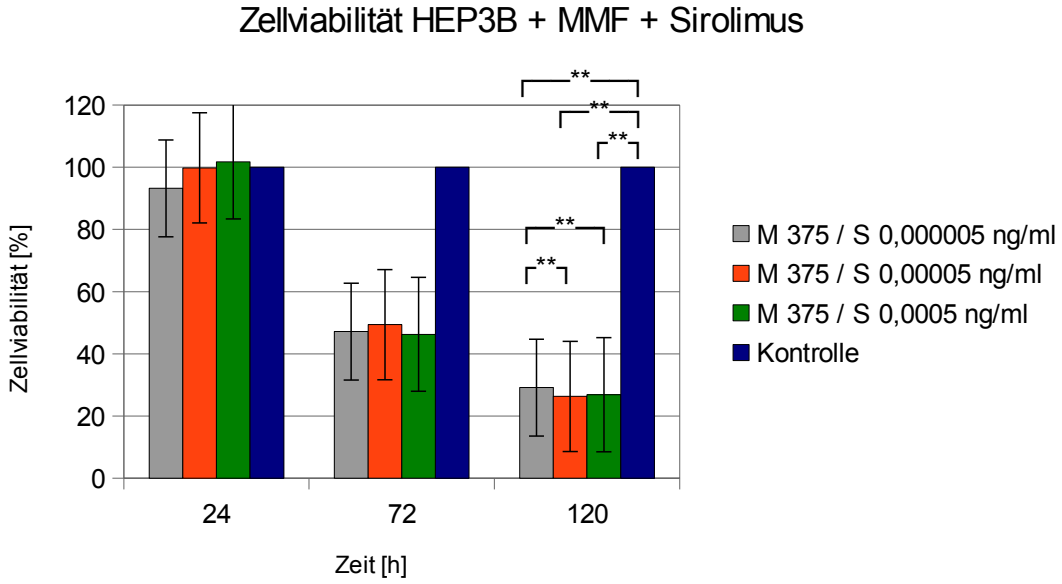

Abbildung 20: Zellviabilität HEP3B + MMF (M) + Sirolimus (S).
Mittelwerte ± SEM; ** = p < 0,01

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation des antiproliferativen Effektes der in klinischen Einsatz befindlichen Immunsuppressiva Sirolimus und MMF auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B. Zur Testung der monomedikamentösen und synergistischen Wirkungen wurden sechs Testgruppen verwendet (siehe Tab. 11). In jeder Testgruppe wurden zur Ermittlung der endgültigen Konzentrationen verschiedene Versuchsreihen getestet. Da es zu Beginn keinen Anhaltspunkt gab, wurde in großen Abständen getestet und bei Nachweis einer Wirksamkeit die Reihe so lange verdünnt, bis eine Reduktion der Wirkung einsetzte. Anschließend wurden Konzentrationen ausgewählt, die einen signifikanten Unterschied zu der Konzentration mit der maximalen Wirkung hatten und diese miteinander getestet. Diese Testungen wurden dann dreifach unter identischen Bedingungen wiederholt.

SKHEP1	+	MMF		
HEP3B	+	MMF		
SKHEP1	+	Sirolimus		
HEP3B	+	Sirolimus		
SKHEP1	+	MMF	+	Sirolimus
HEP3B	+	MMF	+	Sirolimus

Tabelle 11: Versuchsgruppenaufbau

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass beide Immunsuppressiva einen hemmenden Effekt auf die Zelllinien SKHEP1 und HEP3B haben. Die Proliferations-hemmung ist dabei abhängig von der applizierten Dosis des jeweiligen Medikamentes. Konnte bei SKHEP1 die stärkste Proliferationshemmung in der Monotherapie mit einer Sirolimus-Konzentration von 12,5 ng/ml erreicht werden, so war dies bei der Zelllinie HEP3B durch eine MMF-Konzentration von 750 ng/ml möglich.

Durch eine duale Anwendung von Sirolimus und MMF konnte ein synergistischer Effekt bei beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie SKHEP 1 wurde zwar keine stärkere Hemmwirkung erzielt, jedoch konnte bei ähnlicher Proliferations-hemmung (9,7 % Monotherapie vs. 11,7 % Dualtherapie) eine Reduktion der Medikamentenkonzentrationen erreicht werden: Bei Sirolimus von 12,5 ng/ml auf

6,5 ng/ml und bei MMF von 1000 ng/ml auf 375 ng/ml. Bei der Zelllinie HEP3B konnte eine verstärkte Hemmwirkung im Vergleich zu den Monotherapien erzielt werden. Durch die duale Anwendung von MMF 375 ng/ml und Sirolimus 0,00005 ng/ml konnte die Zellviabilität von 33,6 % auf 26,3 % im Vergleich zu der 100-Prozent gewichteten Kontrollgruppe reduziert werden, bei gleichzeitiger Reduktion beider Konzentrationen im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien (Sirolimus von 0,0025 ng/ml auf 0,00005 ng/ml und MMF von 750 ng/ml auf 375 ng/ml).

Zunächst ließ sich über das allgemeine Wachstumsverhalten der unbehandelten Kontrollgruppen feststellen, dass SKHEP1-Zellen im Vergleich zu den HEP3B-Zellen über ein schnelleres Wachstum verfügen. Erkennbar war dies bereits am Absorptionsverhalten im zeitlichen Verlauf, am deutlichsten jedoch an dem letzten Wert der Absorption nach 120 h. Zu diesem Zeitpunkt war die Absorption der SKHEP1-Zelllinie immer mit einem deutlichen Abstand zu derjenigen der HEP3B-Zelllinie messbar: Die Endwerte betrugen als Mittelwerte in der SKHEP1-MMF-Gruppe 1034 nm im Vergleich zu der HEP3B-MMF-Gruppe mit 807 nm. In den Versuchsreihen mit dem Medikament Sirolimus zeigten die Kontrollgruppen die Endwerte 1040 nm (SKHEP1) und 777 nm (HEP3B). Die Versuchsreihen der Dualkonzentrationen zeigen im Vergleich zu den Versuchsreihen der Monotherapien insgesamt geringere Absorptionswerte der Kontrollgruppen. Dies erklärt sich dadurch, dass die Zelllinien für diese späteren Versuchsreihen andere Auftau-Chargen der ursächlichen Zellen darstellten. In den Wiederholungen der einzelnen Versuche zeigten die Zellen einen gleichartigen Wachstumsverlauf und plausible Ergebnisse in den Medikamentengruppen. Auch in diesen Versuchsreihen zeigte die Zelllinie SKHEP1 zum Zeitpunkt 120 h mit einer Absorption von 398 nm einen deutlichen Abstand zu der Kontrollgruppe der HEP3B-Zelllinie mit 263 nm. Die Wirkungen der Medikamente auf die einzelnen Zelllinien stellten sich folgendermaßen dar:

SKHEP1 + MMF

In der Testgruppe SKHEP1 + MMF zeigten die Konzentrationen 750 ng/ml und 1000 ng/ml mit 39,2 % nach 120 h bzw. 35,1 % eine deutlichere Verringerung der Zellviabilität als 125 ng/ml, welche bei 120 h noch eine Zellviabilität von 84,8 % erreichte. Da der Unterschied zwischen den Konzentrationen 750 ng/ml und 1000 ng/ml eine Signifikanz von $p = 0,037$ erreicht, war die in dieser Testgruppe wirksamste Konzentration 1000 ng/ml.

HEP3B + MMF

Hier zeigte die MMF-Konzentration 125 ng/ml die geringste Hemmung der Zellviabilität mit einer Reduktion auf 85,2 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Konzentration 750 ng/ml erreichte dahingegen eine Reduktion auf 33,6 % nach 120 h. Die höhere Konzentration 1000 ng/ml zeigte hier keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,065$), sodass in dieser Testgruppe die MMF-Konzentration 750 ng/ml die höchste Hemmwirkung auf die Zelllinie HEP3B hatte.

SKHEP1 + Sirolimus

Die Sirolimus-Konzentration von 7,5 ng/ml hatte die schwächste Hemmwirkung in dieser Testgruppe mit einer Zellviabilität von 58,4 % nach 120 h im Vergleich zur Kontrollgruppe (diese 100-Prozent gewichtet). Die Konzentration von 12,5 ng/ml erreichte eine Reduktion der Zellviabilität auf 9,7 % nach 120 h. Eine nochmalige Erhöhung der Medikamentenkonzentration auf 15 ng/ml zeigte keine Steigerung der Hemmwirkung, hier war der Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen mit $p = 0,109$ nicht mehr signifikant. In dieser Testgruppe stellte sich deshalb die Sirolimus-Konzentration von 12,5 ng/ml als die wirksamste heraus.

HEP3B + Sirolimus

In dieser Gruppe konnte eine Hemmung der Zellviabilität auf 70,9 % nach 120 h mit der Sirolimus-Konzentration von 0,0025 ng/ml erreicht werden. Diese war den Konzentrationen 0,00025 ng/ml (96,1 % nach 120 h) und 0,0005 ng/ml (83,3 % nach 120 h) signifikant überlegen ($p = 0,004$).

SKHEP1 + MMF + Sirolimus

Die Dualkonzentration von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 4,5 ng/ml erreichte in dieser Gruppe die geringste Hemmung der Zellviabilität mit 27 % nach 120 h. Durch eine Steigerung auf MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 6,5 ng/ml konnte eine stärkere Hemmung erreicht werden: Es zeigte sich nach 120 h eine auf 11,1 % reduzierte Zellviabilität im Vergleich zu der Kontrollgruppe (100-Prozent gewichtet). Eine nochmalige Steigerung der Dualkonzentration auf MMF 375 ng/ml und Sirolimus 7,5 ng/ml konnte keine signifikante Steigerung der Hemmung mehr erzielen ($p = 0,297$). Die Dualkonzentration von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 6,5 ng/ml war in dieser Testgruppe folglich die wirksamste.

HEP3B + MMF + Sirolimus

Die Dualkonzentration MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,000005 ng/ml konnte die Zellviabilität nach 120 h auf 29,1 % reduzieren. Eine Erhöhung dieser Konzentration auf MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,00005 ng/ml konnte die Zellviabilität nochmal reduzieren auf 26,3 % nach 120 h; dieser Unterschied war signifikant mit p = 0,004. Eine nochmalige Erhöhung der Dualkonzentration auf MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,0005 ng/ml konnte jedoch keine signifikante Steigerung der Hemmung mehr erreichen (p = 0,260). In dieser Testgruppe war folglich die Dualkonzentration MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,00005 ng/ml die wirksamste.

Im Folgenden werden die Ergebnisse unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit formulierten Fragestellungen analysiert und diskutiert.

Fragestellung 1

Welchen zytotoxischen Effekt haben Sirolimus und MMF monotherapeutisch auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Antimetaboliten Sirolimus und MMF separat betrachtet einen antiproliferativen Effekt auf die Zelllinien SKHEP1 und HEP3B besitzen. Beide Medikamente wirken in unterschiedlich starker Ausprägung auf die Zelllinien. So hat MMF mit der Konzentration von 1000 ng/ml eine Reduktion der Zellviabilität von SKHEP1 auf 35,1 % nach 120 h zur Folge. Ähnliche Wirkung hat es auf die Zelllinie HEP3B. Mit der geringeren Konzentration von 750 ng/ml erreichte es eine Reduktion auf 33,6 % nach 120 h im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Ein Blick auf die Ergebnisse von Sirolimus offenbart eine andere Wirksamkeit auf die Zelllinien im Vergleich zu MMF. So erreichte es mit einer Konzentration von 12,5 ng/ml eine Reduktion der Zellviabilität von SKHEP1 auf 9,7 % nach 120 h im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Auf die Zelllinie HEP3B ist ein vergleichsweise schwacher Hemmeffekt nachweisbar: Mit einer Konzentration von 0,0025 ng/ml erreichte Sirolimus nur eine Reduktion der Zellviabilität auf 70,9 %. Höhere Konzentrationen konnten keine stärkere Hemmwirkung erzielen.

Die monotherapeutischen Hemmwirkungen in abnehmender Stärke zeigt Tab.12:

Zelllinie		Medikament	Zellviabilität	Signifikanz
SKHEP1	+	Sirolimus 12,5 ng/ml	9,7 %	p = 0,004
HEP3B	+	MMF 750 ng/ml	33,6 %	p = 0,004
SKHEP1	+	MMF 1000 ng/ml	35,1 %	p = 0,004
HEP3B	+	Sirolimus 0,0025 ng/ml	70,9 %	p = 0,037

Tabelle 12: Zellviabilitäten der Zelllinien in Abhängigkeit des Medikamentes (in % zur Kontrolle; diese 100 % gewichtet)

Die Ergebnisse bestätigen die antitumorale Wirkung dieser Medikamente auf Tumorzellen und reihen sich ein in das Wirkspektrum gegenüber anderen Entitäten. Für Sirolimus wurde eine hemmende Wirkung auf HCC-Zellen (die Zelllinie H4IIEC und auf unspezifische HCC-Proben), Osteosarkomzellen, Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und auf Nierenzellkarzinomzellen nachgewiesen (Price et al. 1992; Ribatti et al. 2007; Ogawa et al. 1998; Boffa et al. 2004; Luan et al. 2003). Für MMF gibt es Nachweise für eine hemmende Wirkung auf Adenokarzinomzellen des Kolons, des Magens und des Pankreas, auf Melanomzellen, Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, B-Zell-Lymphom-Zellen und bei T-Zell-Leukämiezellen (Tressler et al. 1994; Koehl et al. 2007). Die Hemmung der Proliferation bei einer HCC-Zelllinie gelang bis dato in einer Dualtherapie mit Doxorubicin bei der Zelllinie HEPG2 (Chu et al. 2010). Demnach ist die hier gezeigte Wirkung mit den publizierten kompatibel.

Fragestellung 2

Kann durch die Kombination Sirolimus + MMF eine Wirksamkeitssteigerung im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien erreicht werden?

Durch die duale Anwendung von MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 6,5 ng/ml auf die Zelllinie SKHEP1 konnte nach 120 h eine im Vergleich zu der Kontrollgruppe (100 % gewichtet) auf 11,1 % reduzierte Zellviabilität gemessen werden. Die Dualkonzentration MMF 375 ng/ml mit Sirolimus 0,00005 ng/ml konnte auf die Zelllinie HEP3B nach 120 h eine Reduktion der Zellviabilität auf 26,3 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe erreichen. Bezogen auf die Zelllinie SKHEP1 konnte durch die Kombination der Antimetabolite MMF und Sirolimus keine Verbesserung der Hemmwirkung festgestellt werden. In Monotherapie ist diese Zelllinie am besten mit Sirolimus zu hemmen, es zeigte hier eine Zellviabilität von 9,7 % im Vergleich zu o.g. Dualkonzentration mit 11,1 % nach 120 h. Bei der Zelllinie HEP3B konnte durch die Wirkstoffkombination allerdings eine Verbesserung der Hemmwirkung erzielt werden. Zeigte sich in der Monotherapie eine Reduktion der Zellviabilität auf 33,6 % durch MMF, so wurde durch o. g. Kombinationstherapie nach 120 h eine Zellviabilitätsreduktion auf 26,3 % erreicht.

Den Vergleich der Medikamente nach Wirksamkeit zeigt Tab. 13:

Zelllinie		Medikamente			Zellviabilität	Signifikanz
SKHEP1	+	Sirolimus 12,5 ng/ml			9,7 %	p = 0,004
SKHEP1	+	MMF 375 ng/ml	+	Sirolimus 6,5 ng/ml	11,1 %	p = 0,004
HEP3B	+	MMF 375 ng/ml	+	Sirolimus 0,00005 ng/ml	26,3 %	p = 0,004
HEP3B	+	MMF 750 ng/ml			33,6 %	p = 0,004
SKHEP1	+	MMF 1000 ng/ml			35,1 %	p = 0,004
HEP3B	+	Sirolimus 0,0025 ng/ml			70,9 %	p = 0,037

Tabelle 13: Vergleichende Wirksamkeit der Mono- und Dualkonzentrationen auf die Zelllinien (Zellviabilität in % der 100 % gewichteten Kontrolle)

Dass die Dualtherapie eine synergistische Wirkung entfaltet, ist für Sirolimus bereits in Kombination mit anderen Medikamenten demonstriert worden. Experimentell wurde eine synergistische Wirkung von Sirolimus mit Doxorubicin, Bevacizumab und Sorafenib auf HCC-Zellen nachgewiesen (Piquet et al. 2008; Huynh et al. 2008; Wang et al. 2008). Der klinische Nachweis eines Synergismus mit Sorafenib ist jüngeren Datums (Wang et al. 2010; Kim und Aucejo 2011; Gomez-Martin et al. 2012).

Eine Kombinationstherapie mit MMF ist experimentell bisher mit Doxorubicin an HEPG2-Zellen demonstriert worden (Chu et al. 2010). Eine klinische Evaluation wurde in Kombination mit Everolimus geprüft (Alegre et al. 2013). Eine duale Anwendung von MMF und CNI konnte in einer retrospektiven Analyse eine Verbesserung der Überlebensrate nach LTX demonstrieren (Zahn et al. 2013). Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass der in dieser Arbeit demonstrierte synergistische Effekt von Sirolimus und MMF auch klinisch nutzbar wäre.

Fragestellung 3

Kann in der Kombinationstherapie die Wirksamkeit bei gleichzeitiger Dosisreduktion gehalten werden?

Durch die Kombination der Medikamente Sirolimus und MMF konnte bei der Zelllinie SKHEP1 keine Verbesserung der Hemmwirkung erzielt werden, jedoch ergaben sich ähnliche Werte für die Zellviabilität mit 9,7 % nach 120 h in der Monotherapie mit Sirolimus und 11,1 % nach 120 h in der Kombinationstherapie. Die Konzentration der beiden Medikamente konnte in dieser Dualtherapie jedoch deutlich gesenkt werden. Bei Sirolimus wurde die Konzentration verringert von 12,5 ng/ml auf 6,5 ng/ml. Für MMF konnte eine Reduktion von 1000 ng/ml auf 375 ng/ml erreicht werden.

Bei der Zelllinie HEP3B wurde neben der verbesserten Hemmwirkung auf das Zellwachstum (26,3 % nach 120 h im Vergleich zur wirksamsten MMF-Monotherapie mit 33,6 %) auch eine Reduktion der beiden Antimetabolite erreicht: Das Medikament Sirolimus konnte von 0,0025 ng/ml auf 0,00005 ng/ml reduziert werden. Bei MMF wurde die Konzentration von 750 ng/ml auf 375 ng/ml verringert (siehe Tab. 13, vorige Seite). Eine Dosisreduktion ist *in vitro* also in beiden Fällen möglich.

Betrachtet man die klinisch angewendeten Dosierungen des Medikamentes Sirolimus, wird eine *Loading-Dose* von 6 mg am ersten Tag empfohlen. Anschließend wird die Erhaltungstherapie mit 2 mg pro Tag angesetzt, wobei sich diese Tagesdosis individuell an den gemessenen Blutspiegeln orientiert (*Drug-Monitoring*). Angestrebt wird ein Talspiegel zwischen 4 - 12 ng/ml (Karow 2012). Mit der in dieser Arbeit erreichten Reduktion von Sirolimus auf 6,5 ng/ml befindet man sich in der unteren Hälfte des gewünschten Talspiegels. Mit dieser Konzentration ist auch die Wirksamkeit in der Zelllinie HEP3B abgedeckt, hier war nur ein Bruchteil der Konzentration von Sirolimus notwendig (0,00005 ng/ml). Die Anwendung könnte demzufolge ein verringertes Spektrum an UAW bei ausreichender Wirksamkeit versprechen.

Drug-Monitoring für MMF wird nicht international durchgeführt. Von manchen Autoren wird für Patienten nach LTX ein Talspiegel von 1000 - 3500 ng/ml empfohlen (van Gelder 2009). Mit den in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen von 1000 ng/ml (SKHEP1) und 750 ng/ml (HEP3B) in der Monotherapie und einer Reduktion der Konzentration bei beiden Zelllinien auf 375 ng/ml in der Dualtherapie befindet man sich an der unteren Grenze dieses Bereiches.

Die vielfältigen und teilweise schweren UAW sind bei MMF Diarrhoe, Erbrechen, Leukopenie, Sepsis und opportunistische Infektionen (Pichlmayer et al. 1995; Danesi und Del Tacca 2004). Bei Sirolimus Hyperlipidämie, Myelosuppression (Thrombozytopenie und Leukopenie), verringerte Wundheilung, Proteinurie und interstitielle Pneumonie (Hong und Kahan 2000; Kuppahally et al. 2006; Hamdy et al. 2010; Pham et al. 2004). Durch die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen lässt sich ein geringeres Spektrum an UAW bei erhaltener antiproliferativer Wirksamkeit erwarten.

Eine weitergehende Untersuchung der molekularen Mechanismen dieser nachgewiesenen Hemmeffekte wäre der nächste Schritt, um eine umfassendere Erkenntnis über die zellspezifischen Wirkungsweisen zu erlangen, um so eine gezieltere Tumortherapie (*Targeted Therapy*) zu ermöglichen. Für beide Medikamente wurden bisher unterschiedliche Mechanismen der Wachstumsinhibition beobachtet: So kann Sirolimus z. B. die Proteinsynthese von T-Lymphozyten über die Inhibition der Aktivierung der p70S6-Kinase erreichen (Jefferies et al 1997). Weitere *in vitro* Versuche beobachteten eine Blockierung verschiedener Interleukin-vermittelter Proliferationswege (IL-2, -4, -7,-12 und -15) von T- und B-Lymphozyten (Li et al. 1998;

Bertagnolli et al. 1994; Strehlau et al. 1998). Durch eine Sirolimus-vermittelte Reduktion der VEGF-Synthese konnte auch eine antiangiogenetische Wirkung auf Kolonkarzinomzellen *in vivo* festgestellt werden (Guba et al. 2002).

Für MMF wurde die Wirkung auf Lymphozyten durch die Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase aufgezeigt (Halloran 1997). Antiproliferative Effekte konnten durch eine antiangiogenetische Wirkung sowie durch die Überführung von Epithelzellen in den Zellzyklusarrest erklärt werden (Chong et al. 2006).

Auch die Blockierung adhäsiver Rezeptoren, welche eine Adhäsion der Tumorzellen an Epithelzellen verhindert, konnte für MMF bei Kolon- und Prostatakrebszellen nachgewiesen werden (Engl et al. 2005). Für Sirolimus und MMF steht ein dementsprechender Nachweis des Wirkungsweges auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B gegenwärtig aus.

Bei der Frage nach der klinischen Anwendung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht:

Es wäre eine verstärkte Anwendung dieser beiden Antimetabolite posttransplantär bei Patienten denkbar, die eine LTX als kurative Therapie bei HCC erhielten. Da beide Medikamente einen antiproliferativen Effekt aufweisen, könnten diese durch ihre Anwendung einen hemmenden Einfluss auf evtl. verbliebene Tumorzellen haben und hierdurch die Rezidivfreiheit des Transplantatempfängers verlängern. In einer Fall-Kontroll-Studie wurde Sirolimus mit Tacrolimus + MMF verglichen und bot längere Rezidivfreiheit (Chinnakotla et al. 2009). Zur weiteren Evaluation müsste man klinische prospektive Vergleichsstudien etablieren, die Standardschemata mit der dualen Anwendung von Sirolimus und MMF vergleichen.

Die Rezidivraten nach LTX liegen, bezogen auf den Surrogatparameter *5-Year-Disease-Free Survival* (DFS), in einer Spanne von 29 - 48 % (sekundäre LTX nach HCC-Rezidiv) bis hin zu 64 - 80 % DFS bei LTX als primäre Therapie (Adam et al. 2003; Del Gaudio et al. 2008; Margarit et al. 2005; Bigourdan et al. 2003). In beiden Therapievarianten (primäre LTX und *Salvage* LTX) könnte die standardisierte Anwendung von Sirolimus und MMF die DFS-Perioden verlängern und so einen Benefit für diese Patienten erreichen. Dieser vermutete Effekt wird für Sirolimus aktuell in einer Multicenterstudie getestet: Evaluiert wird neben der immunsuppressiven Wirkung ein zusätzlicher antiproliferativer Effekt, welcher einen positiven Einfluss auf das rezidivfreie

Überleben nach LTX bei HCC-Patienten haben soll. Verglichen wird die Sirolimus-negative Immunsuppression nach LTX mit einem Sirolimus-positiven Therapieregime (Schnitzbauer et al. 2010). Für MMF gibt es diesen Studienansatz bislang nicht.

Obgleich für MMF über Einzelfälle einer Remission unter kombinierter Sirolimus/MMF-Therapie nach LTX berichtet wurde (Elsharkawi et al. 2005), gibt es bisher keine klinischen Studien über die antitumorale Wirkung von MMF bei HCC-Patienten. Ein Effekt durch MMF, wie in dieser Arbeit nachgewiesen, wäre klinisch zu erwarten und sollte wie bei Sirolimus ebenfalls durch Studien evaluiert werden. Da in dieser Arbeit ein synergistischer Effekt dieser beiden Medikamente nachgewiesen wurde - verbesserte Hemmwirkung auf HEP3 und Reduktion der Medikamentenkonzentration bei erhaltener Wirkstärke bei SKHEP1 und HEP3B - sollte nach Möglichkeit auch die klinische Evaluation eines dualen Therapieregimes erfolgen.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich noch weitere Anwendungsbereiche der Immunsuppressiva Sirolimus und MMF in Betracht ziehen. Neben der aktuellen Indikation der posttransplantären Ersatzimmunsuppression wären sie auch standardmäßig primär posttransplantär einsetzbar und könnten einen positiven Einfluss auf die Prognose nehmen. Eine additive Anwendung von MMF zusätzlich zu CNI konnte in einer retrospektiven Analyse eines Transplantationszentrums eine Verbesserung der Überlebensrate aufzeigen (Zahn et al. 2013). Dieser Surrogatparameter ist auch aus ökonomischer Sicht von Interesse: Die Transplantatabstoßung stellt bei den Kosten für eine LTX und ihren frühen und späten Komplikationen den Hauptkostenfaktor dar (Lock et al. 2010).

Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die *de novo*-Malignome nach erfolgter LTX unter Immunsuppression. Eine kürzlich veröffentlichte *Follow-up*-Untersuchung über 20 Jahre posttransplantär nach LTX zeigte, dass diese in 19,9 % der Fälle auftraten (Schöning et al. 2013). In dieser Gruppe sind die Plattenepithelkarzinome der Haut mit 39,5 % am stärksten vertreten. Für Sirolimus wird diesbezüglich ein protektiver Effekt diskutiert (Leblanc et al. 2011). Für MMF existieren diesbezüglich bislang keine klinischen Langzeitstudien. Da beide Immunsuppressiva tumorhemmende Wirkungen auf verschiedenste Zelltypen *in vitro* und *in vivo* demonstrierten, ist anzunehmen, dass durch eine verstärkte Anwendung dieser Medikamente ein positiver Effekt auf die *de novo*-Malignombildung nach LTX besteht.

In der Publikation von Schöning et al. zeigte sich, dass nach LTX Tumorrezidive mit 21,3 % für einen Großteil der Todesfälle verantwortlich sind (Schöning et al. 2013). Es ist denkbar, dass der hier demonstrierte antiproliferative Effekt von Sirolimus und MMF einen Beitrag zur Senkung dieses Sterberisikos nach LTX liefern und damit die Langzeitergebnisse der LTX verbessern könnte.

Nur die wenigsten der neu diagnostizierten HCC-Patienten können einer kurativen Therapie zugeführt werden, Schätzungen gehen von weniger als 20 % aus (Livraghi et al. 2011). Für den Großteil der Patienten besteht das Therapieziel folglich in Symptomkontrolle und Linderung der Beschwerden. Wie dargelegt, kann der Einsatz von Sirolimus und MMF *in vitro* eine antiproliferative Wirkung auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B erzielen. Es bestünde die Möglichkeit, diese Medikamente als Therapeutika in palliativen Situationen zu nutzen, um einen Tumorprogress zu verlangsamen oder zu stoppen. Die palliative Gabe von Chemotherapeutika bringt in ihrer kontinuierlichen Evaluation neuer Therapieansätze regelmäßig neue Behandlungsmöglichkeiten hervor. Getestet wurden bisher verschiedenste Medikamente - mit unterschiedlichen Erfolgen (s. a. Kapitel 1.2.4.3 Nicht-kurative Therapie). Getestet wurden u. a. Doxyrubicin, Octreotid, Tamoxifen, Interferone, Bevacizumab, Cetuximab und Sorafenib (Lai et al. 1988; Becker et al. 2007; Nowak et al. 2004; Llovet et al. 2000; Zhu et al. 2006; Asnacios et al. 2008; Llovet et al. 2008). Die in dieser Arbeit getesteten Antimetabolite Sirolimus und MMF mit ihren erarbeiteten Konzentrationen könnten aufgrund ihrer niedrigen Talspiegel eine nebenwirkungsarme und dabei wirksame palliative Therapieoption darstellen. Dies wird für mTOR-Inhibitoren bei palliativer Situation von Pankreastumoren sowie für Sirolimus bei Nierenzellkarzinomen bereits klinisch evaluiert (Mehta 2010; Brugarolas et al. 2008).

Um ein besseres Verständnis dieser antitumoralen Wirkung zu bekommen, müssten zusätzliche experimentelle Studien folgen. Die Kenntnis der molekularen Wirkmechanismen dieser Medikamente auf HCC-Zellen stellt eine Schlüsselvoraussetzung für die gezielte medikamentöse Therapie dar. Für eine Anwendung am Patienten mit dem Ziel einer antitumoralen Therapie - mit kurativem, rezidivprophylaktischem oder palliativem Ansatz - sollten die Effekte zudem *in vivo* durch den Einsatz standardisierter tierexperimenteller Modelle sowie *ex vivo* klinisch-experimentell reproduziert werden, um die Voraussetzungen für eine erfolgreiche klinische Evaluation zu schaffen.

6. Zusammenfassung

Unter den Malignomen befindet sich das HCC in der BRD an 6. und 10. Stelle bei der Anzahl an Krebssterbefällen bei Männern bzw. Frauen. Betrachtet man die globale Prävalenz, so steht das Lebermalignom - hierunter hat das HCC mit knapp 90 % den stärksten Anteil - an fünfter Stelle, wobei 85 % der Erkrankungen in den Entwicklungsländern anzutreffen sind.

Das HCC ist in Abhängigkeit der Tumorgröße momentan nur durch Radiofrequenzablation, chirurgische Resektion oder durch LTX kurativ zu therapieren. Die Prognose ist abhängig vom Erkrankungsgrad bei Diagnosezeitpunkt, vom Restleberzustand und vom Allgemeinzustand des Patienten. Unter dem Aspekt der Rezidivfreiheit und der Überlebenswahrscheinlichkeit fünf Jahre postoperativ präsentieren sich aktuell bei der LTX die besten Ergebnisse.

Die LTX ist aufgrund des Organmangels ein limitiertes Therapieverfahren, das wenigen spezialisierten Zentren vorbehalten bleibt. Unabhängig vom Spenderorgan, der immunologischen Kompatibilität des Transplantates und des Organempfängers, ist posttransplantär eine lebenslange Immunsuppression notwendig. Für die Initial- und Erhaltungstherapie dieser Immunsuppression werden CNI und/oder Antimetabolite wie Sirolimus und MMF angewendet. Deren Vorteil liegt in der geringeren Nephrotoxizität, die gerade bei den CNI eine in der Langzeitanwendung gefürchtete UAW ist.

Neben der immunsuppressiven Wirkung konnte für Sirolimus und MMF bisher in verschiedenen Experimenten *in vitro* und *in vivo* ein antiproliferativer Effekt auf Tumorzellen verschiedenster Genese nachgewiesen werden. Da auch für Patienten mit erfolgter LTX als HCC-Therapie ein Risiko für ein Rezidiv besteht, stellte sich die Frage, ob der antiproliferative Effekt von Sirolimus und MMF in mono- und dualtherapeutischer Anwendung auf verschiedene HCC-Zelllinien übertragbar ist. Durch die posttransplantäre Anwendung wäre hier neben der immunsuppressiven auch eine antitumorale Wirkung möglich, wodurch das Indikationsspektrum dieser Medikamente erweitert werden würde. Denkbar sind der Einsatz zur Rezidivprophylaxe, zur Reduzierung des Risikos für Zweitkarzinome, zur Verhinderung von *de novo*-Malignomen sowie als Therapeutika unter palliativen Aspekten.

Ziel dieser Arbeit war die Testung der Proliferationshemmung der Antimetabolite Sirolimus und MMF auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B. Es sollte untersucht werden, welchen zytotoxischen Effekt Sirolimus und MMF monotherapeutisch auf die HCC-Zelllinien SKHEP1 und HEP3B haben. Geprüft werden sollte zudem, ob durch die Kombination beider Medikamente eine Steigerung der Wirksamkeit im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien erreicht werden kann. Und weiterhin, ob in der Kombinationstherapie die Wirksamkeit bei gleichzeitiger Dosisreduktion gehalten werden kann.

Getestet wurde die Wirkung der Medikamente auf die Zelllinien *in vitro* durch den XTT-Proliferationstest, der die Absorption eines Farbstoffes misst, die sich in Abhängigkeit der Zellviabilität in den gemessenen Proben verändert. Verglichen wurden die jeweiligen Testgruppen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, die 100-Prozent gewichtet wurde. Die statistische Signifikanzprüfung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. Getestet wurden alle Behandlungsgruppen jeder Zelllinie untereinander, um eine Signifikanz zu differenzieren. Als Vorgabe für eine bestehende Signifikanz wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 für die Signifikanz gesetzt.

Die stärkste Hemmung der Zelllinie SKHEP1 erfolgte durch die Sirolimuskonzentration 12,5 ng/ml mit einer verbliebenen Zellviabilität von 9,7 % ($p = 0,004$). Die nachfolgende Hemmstärke bei Monotherapie kam durch MMF auf die Zelllinie HEP3B zustande: Mit einer Konzentration von 750 ng/ml konnte die Zellviabilität in dieser Testgruppe im Vergleich zu der 100-Prozent gewichteten Kontrollgruppe auf 33,6 % reduziert werden ($p = 0,004$). Ähnliche Ergebnisse erbrachte die monotherapeutische Anwendung von MMF auf die Zelllinie HEP3B. Mit einer Konzentration von 1000 ng/ml wurde die Zellviabilität auf 35,1 % reduziert ($p = 0,004$). Die schwächste monotherapeutische Hemmwirkung zeigte Sirolimus auf die Zelllinie HEP3B. Die hier stärkste Konzentration von 0,0025 ng/ml erreichte nur eine Reduktion der Zellviabilität auf 70,9 % ($p = 0,037$). Durch die duale Anwendung von Sirolimus/MMF wurde bei der Zelllinie SKHEP1 zwar keine verstärkte Hemmwirkung nachgewiesen, jedoch konnte bei ähnlicher Proliferationshemmung auf 11,1 % ($p = 0,004$) eine Reduktion der Medikamenten-konzentration bei Sirolimus auf 6,5 ng/ml und bei MMF auf 375 ng/ml erreicht werden. Eine stärkere Hemmung bei der Zelllinie HEP3B im Vergleich zu den beiden Monotherapien erzielte die duale Anwendung. Die Zellviabilität konnte auf 26,3 % reduziert werden ($p = 0,004$) bei gleichzeitiger Reduktion der Konzentrationen bei

Sirolimus auf 0,00005 ng/ml und bei MMF auf 375 ng/ml. Mit diesen ermittelten Konzentrationen ist man innerhalb der klinisch angewendeten Dosen, da diese für Sirolimus 4 - 12 ng/ml und für MMF 1000 - 3500 ng/ml betragen. Der Einsatz ist also unter pharmakologischen Aspekten möglich.

Die vorliegende Arbeit konnte den Nachweis erbringen, dass die Immunsuppressiva Sirolimus und MMF einen zytotoxischen Effekt auf die Zelllinien SKHEP1 und HEP3B haben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die kombinierte Anwendung von Sirolimus und MMF eine Wirksamkeitssteigerung bei der Zelllinie HEP3B erreicht wurde. Weiterhin konnte bei beiden Zelllinien eine Reduktion der einzelnen Medikamentenkonzentrationen in der dualen Anwendung gelingen.

Die hier präsentierten Ergebnisse liefern die Grundlage für eine weitere experimentelle und klinische Evaluation dieser Medikamente - mit dem Ziel einer effizienteren und gezielteren Therapie des hepatozellulären Karzinoms in den Anwendungsgebieten Kuration, Rezidivprophylaxe, *de novo*-Malignomprophylaxe und Palliation.

7. Literaturverzeichnis

Adam R, Akpinar E, Johann M et al. Place of cryosurgery in the treatment of malignant liver tumors. Ann Surg, **1997**; 225:39-48.

Adam R, Azoulay D, Castaing D et al. Liver resection as a bridge to transplantation for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: a reasonable strategy? Ann. Surg. Oct **2003**;238(4):508–518; discussion 518-519.

Aden DP, Fogel A, Plotkin S et al. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature. **1979** Dec 6;282(5739):615-6.

Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. Semin. Liver Dis. **2004**;24 Suppl 2:3-8.

Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor beta-stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. Transplant. Proc. **1991** Dec;23(6):2833-6.

Alegre C, Jiménez C, Manrique A, Abradelo M, Calvo J, Loinaz C, u. a. Everolimus monotherapy or combined therapy in liver transplantation: indications and results. Transplant Proc. Jun **2013**;45(5):1971–4.

Almond PS, Moss A, Nakhleh R et al. Rapamycin in a porcine renal transplant model. Transplant. Proc. **1993** Feb;25(1 Pt 1):716.

Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM et al. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. Hepatology. **2000** Mar;31(3):777-82.

Asnacios A, Fartoux L, Romano O et al. Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) combined with cetuximab in patients with progressive advanced stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter phase 2 study. Cancer. **2008** Jun 15;112(12):2733-9.

Asrani SK, Leise MD, West CP, Murad MH, Pedersen RA, Erwin PJ, u. a. Use of sirolimus in liver transplant recipients with renal insufficiency: a systematic review and meta-analysis. Hepatology. Oct **2010**;52(4):1360-70.

Azechi H, Nishida N, Fukuda Y et al. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. Oncology. **2001**;60(4):346-54.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J. Clin. Invest. **2005** Feb;115(2):209-18.

Becker G, Allgaier H-P, Olschewski M et al. Long-acting octreotide versus placebo for treatment of advanced HCC: a randomized controlled double-blind study. Hepatology. **2007** Jan;45(1):9-15.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. **2005**;11:127-52.

Bertagnolli MM, Yang L, Herrmann SH et al. Evidence that rapamycin inhibits interleukin-12-induced proliferation of activated T lymphocytes. Transplantation.**1994**Nov 27;58(10):1091-6.

Bigourdan J-M, Jaeck D, Meyer N et al. Small hepatocellular carcinoma in Child A cirrhotic patients: hepatic resection versus transplantation. Liver Transpl. May **2003**;9(5):513-20.

Bilbao I, Castells L, Rojas L et al. Immunosuppression based on mycophenolate mofetil in stable liver transplanted patients. Int Immunopharmacol. **2006** Dec 20; 6(13-14): 1977-83.

Bismuth H, Fecteau A. Combination therapy in oncology-hepatocellular carcinoma. Chirurg. **1998** Apr;69(4):360-5.

Boffa DJ, Luan F, Thomas D et al. Rapamycin inhibits the growth and metastatic progression of non-small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. **2004** Jan 1;10(1Pt1):293-300.

Borie F, Bouvier AM, Herrero A et al. Treatment and prognosis of hepatocellular carcinoma: a population based study in France. J Surg Oncol.**2008** Dec 1; 98(7): 505-9.

Brandt-Rauf PW, Li Y, Long C et al. Plastics and carcinogenesis: The example of vinyl chloride. J Carcinog. **2012** Mar 12;11.

Bressac B, Kew M, Wands J et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature. **1991** Apr 4;350(6317):429-31.

Breuhahn K, Vreden S, Haddad R et al. Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. Cancer Res. **2004** Sep 1;64(17):6058-64.

Brugarolas J, Lotan Y, Watumull L, Kabbani W. Sirolimus in metatastic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 10. Juli 2008;26(20):3457–60.

Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology. **2005** Nov;42(5):1208-36.

Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. Hepatology. **2011** Mar; 53: 1020-1022. doi: 10.1002/hep.24199.

Bruns C, Auernhammer C, Tumorzentrum. Gastrointestinale Tumoren. München; Wien; New York, NY: Zuckschwerdt; **2010**.

Bu X, Le C, Jia F. Synergistic effect of mTOR inhibitor rapamycin and fluorouracil in inducing apoptosis and cell senescence in hepatocarcinoma cells. Cancer Biol. Ther. Mar **2008**;7(3):392–6.

Bullingham R, Monroe S, Nicholls A et al. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. J Clin Pharmacology. **1996**, 36:315-324.

Bush DA, Kayali Z, Grove R et al. The safety and efficacy of high-dose proton beam radiotherapy for hepatocellular carcinoma: a phase 2 prospective trial. Cancer. **2011** Jul 1;117(13):3053-9.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. N. Engl. J. Med. **2003** Apr 24;348(17):1625-38.

Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R et al. Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. Transplantation. **1995** Feb15;59(3):390-5.

Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. J. Biol. Chem. 268,**1993**; 27286-272902.

Carter AJ, Bailey LR, Llanos G et al. Stent based sirolimus delivery reduces neointimal proliferation in a porcine coronary model of restenosis. J Am Coll Cardiol.**2000**;35:1041-84.

Chen J, Zheng XF, Brown EJ et al. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci USA. **1995** May 23; 92(11): 4947-51.

Chinnakotla S, Davis GL, Vasani S, Kim P, Tomiyama K, Sanchez E, u. a. Impact of sirolimus on the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. Liver Transpl. Dec **2009**;15(12):1834–42.

Chong CR, Qian DZ, Pan F et al. Identification of type 1 inosine monophosphate dehydrogenase as an antiangiogenic drug target. J. Med. Chem. 4. **2006**;49(9):2677-80.

Chu Y-K, Liu Y, Yin J-K et al. Effect of mycophenolate mofetil plus adriamycin on HepG-2 cells. World J Hepatol. Aug **2010**;2(8):311-7.

Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML et al. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. N Engl J Med. **2007** Apr 12; 356(15):1545-59.

Collier DS, Calne R, Thiru S et al. Rapamycin in experimental renal allografts in dogs and pigs. Transplant. Proc. **1990** Aug;22(4):1674-5.

Collier DS, Calne RY, Pollard SG et al. Rapamycin in experimental renal allografts in primates. Transplant. Proc. **1991** Aug;23(4):2246-7.

de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 21. Jul **1998**;95(15):8847-51.

Danesi R, Del Tacca M. Hematologic toxicity of immunosuppressive treatment. Transplant Proc. **2004** Apr; 36(3): 703-4.

D'Alessandro AM, Rankin M, McVey J et al. Prolongation of canine intestinal allograft survival with RS-61443, cyclosporine, and prednisone. Transplantation. **1993** Apr;55(4): 695-700; discussion 700-1.

Darlington GJ, Kelly JH, Buffone GJ. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. In Vitro Cell. Dev. Biol. **1987** ;23(5):349-54.

Dawson LA, Normolle D, Balter JM et al. Analysis of radiation-induced liver disease using the Lyman NTCP model. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **2002** Jul 15;53(4):810-21.

Del Gaudio M, Ercolani G, Ravaioli M et al. Liver transplantation for recurrent hepatocellular carcinoma on cirrhosis after liver resection: University of Bologna experience. Am. J. Transplant. Jun **2008**;8(6):1177-85.

Denoix PF. Enquete permanent dans les centres anticancereaux. Bull Inst Nat Hyg. **1946**;1:70-5.

Di Joseph JF, Fluhler E, Armstrong J et al. Therapeutic blood levels of sirolimus (rapamycin) in the allografted rat. Transplantation. **1996** Oct 27;62(8):1109-12.

DSO, Leitfaden für die Organspende, Deutsche Gesellschaft für Organspende, Frankfurt/Main **2011** Okt.

Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL et al. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. J Immunol. **1990** Jan 1; 144(1): 251-8.

Ekser B, Long C, Echeverri GJ et al. Impact of thrombocytopenia on survival of baboons with genetically modified pig liver transplants: clinical relevance. Am J Transplant. **2010** Feb ; 10(2): 273-85.

Elba S, Giannuzzi V, Misciagna G et al. Randomized controlled trial of tamoxifen versus placebo in inoperable hepatocellular carcinoma. Ital J Gastroenterol. **1994** Mar;26(2):66-8.

El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. **2004** Feb;126(2):460-8.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology. **2007** Jun;132(7):2557-76.

Elsharkawi M, Staib L, Henne-Bruns D et al. Complete remission of postransplant lung metastases from hepatocellular carcinoma under therapy with sirolimus and mycophenolate mofetil. Transplantation. 15. Apr **2005**;79(7):855-7.

Engl T, Makarević J, Relja B et al. Mycophenolate mofetil modulates adhesion receptors of the beta1 integrin family on tumor cells: impact on tumor recurrence and malignancy. BMC Cancer. 11. Jan **2005**;5:4.

Eugui FM, Almquist S, Muller CD et al. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenoiic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. Scand. J- Immunot-, **1991**; 33. 161.

Eurotransplant. Annual report **2010**. http://www.eurotranplant.org. Abgerufen am 12.11.2012.

Evans AA, Chen G, Ross EA et al. Eight-year follow-up of the 90,000-person Haimen City cohort: I. Hepatocellular carcinoma mortality, risk factors, and gender differences. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **2002** Apr;11(4):369-76.

Faber W, Seehofer D, Neuhaus P, Stockmann M, Denecke T, Kalmuk S, Warnick P, Bahra M. Repeated liver resection for recurrent hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol. Jul **2011**;26(7):1189–94.

Faber W, Seehofer D, Puhl G, Guckelberger O, Bertram C, Neuhaus P, Bahra M. Donor age does not influence 12-month outcome after orthotopic liver transplantation. Transplant Proc. Dec **2011**;43(10):3789–95.

Faber W, Sharafi S, Stockmann M, Denecke T, Sinn B, Puhl G, Bahra M, Malinowski MB, Neuhaus P, Seehofer D. Long-term results of liver resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver. Surgery. 31. Oct **2012**.

Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R et al. A. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. Ann Surg. **2003** Feb; 237(2): 208-17.

Farinati F, Salvagnini M, de Maria N et al. Unresectable hepatocellular carcinoma: a prospective controlled trial with tamoxifen. J. Hepatol. **1990** Nov;11(3):297-301.

Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL et al. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. Am J Transplant. **2006** Apr; 6(4):783-90.

Feng M, Ben-Josef E. Radiation therapy for hepatocellular carcinoma. Semin Radiat Oncol. **2011** Oct;21(4):271-7.

Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in **2008**. Eur. J. Cancer. 2010 Mar;46(4):765-81.

Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; **2010**

Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. Oncogene. **2004**;23:3151-3171.

Freeman AJ, Dore GJ, Law MG et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. Hepatology. **2001** Oct;34(4 Pt 1):809-16.

Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil: a review of its pharmocodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. Drugs; **1996**, 51:278-298.

Gallo C et. al. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. Hepatology. **1998** Sep;28(3):751-5.

Gallo R, Padurean A, Jayaraman T et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. Circulation. **1999** Apr 27;99(16):2164-70.

Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E et al. Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. **2005** Nov;129(5):1375-83.

Gillingham KJ, Payne WD, Matas AJ: Are wound complications after a kidney transplant more common with modern immunosuppression? Transplantation **2001**; 72: 1920-1923.

Glanemann M, Klupp J, Langrehr JM Platz KP, Schröer G, Raakow R, Stange B, Settmacher U, Bechstein WO, Neuhaus P. Mycophenolate mofetil is superior in combination with tacrolimus compared to cyclosporine for immunosuppressive therapy after liver transplantation. Transplant Proc. **2001** Feb-Mar; 33(1-2): 1069-70.

Gluer AM, Cocco N, Laurence JM et al. Systematic review of actual 10-year survival following resection for hepatocellular carcinoma. HPB (Oxford). May **2012**;14(5):285-90.

Gomez EC, Menendez L, Frost P. Efficacy of mycophenolic acid for the treatment of psoriasis. J Am Acad Dermatol **1979**; 1:53.

Gomez-Martin C, Bustamante J, Castroagudin JF, Salcedo M, Garralda E, Testillano M, u. a. Efficacy and safety of sorafenib in combination with mammalian target of rapamycin inhibitors for recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. Liver Transpl. Jan **2012**;18(1):45–52.

Granger DK, Cromwell JW, Chen SC et al. Prolongation of renal allograft survival in a large animal model by oral rapamycin monotherapy. Transplantation. **1995** Jan 27;59(2):183-6.

Gregory CR, Huang X, Pratt RE et al. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. Transplantation. **1995** Mar 15;59(5):655-61.

Grdović N, Vidaković M, Mihailović M et al. Proteolytic events in cryonecrotic cell death: Proteolytic activation of endonuclease P23. Cryobiology. **2010** Jun;60(3):271-80.

Groth CG, Bäckman L, Morales JM et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. Transplantation. **1999** Apr 15;67(7):1036-42.

Gruessner RW, Sutherland DE, Drangstveit MB et al. Mycophenolate mofetil in pancreas transplantation. Transplantation. **1998** Aug 15; 66(3): 318-23.

Guba M, Von Breitenbuch P, Steinbauer M et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat. Med. Feb **2002**;8(2):128-35.

Guha C, Kavanagh BD. Hepatic radiation toxicity: avoidance and amelioration. Semin Radiat Oncol. Oct **2011**;21(4):256–63.

Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. Trends Mol Med. **2005** Aug;11(8):353-61.

Hahn EG, Gauss-Müller V, Hornberger M et al. Solide Tumoren menschlicher primärer hepatozellulärer Karzinomzelllinien in hypothymischen Mäusen: ein Modell für biochemische und therapeutische Studien. Z Gastroenterol. **1982** März;20(3):168-73.

Hahn WC, Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. Ann Med. Mar **2001**;33(2):123–9.

Halloran PF. Molecular mechanisms of new immunosuppressants. Clin Transplant. Feb **1996**;10(1 Pt 2):118-23.

Hamdy AF, Bakr MA, Ghoneim MA. Proteinuria among primarily sirolimus treated live-donor renal transplant recipients' long-term experience. Exp Clin Transplant. **2010** Dec;8(4):283-91.

Heemann U, Azuma H, Hamar P et al. Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. Transpl Immunol. **1996** Mar; 4(1): 64-7.

Heffelfinger SC, Hawkins HH, Barrish J et al. SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. In Vitro Cell. Dev. Biol. **1992** Feb;28A(2):136-42.

Herold G, Hrsg. **2011**. Innere Medizin. Herold G. Eigenverlag. Köln. S. 531-532.

Hoffmann NE, Bischof JC. Cryosurgery of normal and tumor tissue in the dorsal skin flap chamber: Part II--injury response. J Biomech Eng. **2001** Aug;123(4):310-6.

Holzhütter H-G, Lock JF, Taheri P, Bulik S, Goede A, Stockmann M. Assessment of hepatic detoxification activity: proposal of an improved variant of the (13)c-methacetin breath test. PLoS ONE. **2013**;8(8):e70780.

Hong JC, Kahan BD. Sirolimus-induced thrombocytopenia and leukopenia in renal transplant recipients: risk factors, incidence, progression, and management. Transplantation. **2000** May 27;69(10):2085-90.

Huynh H, Chow PKH, Palanisamy N, Salto-Tellez M, Goh BC, Lee CK, u. a. Bevacizumab and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. J Hepatol. Jul **2008**;49(1):52–60.

IARC. Hormonal contraception and post-menopausal hormonal therapy. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 72. Lyon: International Agency for Research on Cancer, **1999**.

Janssen MWW, Druckrey-Fiskaaen KT, Omidi L et al. Indocyanine green R15 ratio depends directly on liver perfusion flow rate. J Hepatobiliary Pancreat Sci. Mar **2010**;17(2):180–5.

Jiang G-L. Particle therapy for cancers: a new weapon in radiation therapy. Front Med. Jun **2012**;6(2):165–72.

Hu T-H, Huang C-C, Lin P-R et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. Cancer. 15. **2003**; 97(8):1929–40.

Humar R, Kiefer FN, Berns H et al. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. FASEB J. **2002** Jun;16(8):771-80.

Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB et al. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. EMBO J. 16. Jun **1997**;16(12):3693-704.

Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD et al. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. Rapamune Study Group. Transplantation. **1999** Nov 27;68(10):1526-32.

Kahan BD for The Rapmune US Study Group. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. Lancet. **2000** Jul 15;356(9225):194-202.

Kamath PS, Kim WR, Advanced Liver Disease Study Group. The model for end-stage liver disease (MELD). Hepatology. **2007** Mar ; 45(3): 797-805.

Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. Hepatology. **2001** Feb ; 33(2): 464-70.

Kaposi-Novak P, Lee J-S, Gòmez-Quiroz L et al. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. J. Clin. Invest. Jun **2006**;116(6):1582-95.

Karow T. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Eigenverlag. Köln **2012**.

Kay JE, Kromwel L, Doe SE et al. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. Immunology. **1991** Apr;72(4):544-9.

Kim RD, Kim JS, Watanabe G et al. Liver regeneration and the atrophy-hypertrophy complex. Semin Intervent Radiol. **2008** Jun;25(2):92-103.

Kim R, Aucejo F. Radiologic complete response with sirolimus and sorafenib in a hepatocellular carcinoma patient who relapsed after orthotopic liver transplantation. J Gastrointest Cancer. Mar **2011**;42(1):50–3.

Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K et al. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. World J Surg. **1986** Oct ; 10(5): 803-8.

Klupp J, Glanemann M, Bechstein WO Platz KP, Langrehr JM, Keck H, Settmacher U, Radtke C, Neuhaus R, Neuhaus P. Mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus versus Neoral after liver transplantation. Transplant Proc. **1999** Mar ; 31(1-2): 1113-4.

Kneteman NM, Oberholzer J, Al Saghier M et al. Sirolimus-based immunosuppression for liver transplantation in the presence of extended criteria for hepatocellular carcinoma. Liver Transpl. Oct **2004**;10(10):1301-11.

Koehl GE, Wagner F, Stoeltzing O et al. Mycophenolate mofetil inhibits tumor growth and angiogenesis in vitro but has variable antitumor effects in vivo, possibly related to bioavailability. Transplantation. **2007** Mar 15;83(5):607-14.

Koh W-P, Robien K, Wang R et al. Smoking as an independent risk factor for hepatocellular carcinoma: the Singapore Chinese Health Study. Br. J. Cancer. **2011** Oct 25;105(9):1430-5.

Kowdley KV. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. **2004** Nov;127(5 Suppl 1):S79-86.

Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). J Gastroenterol. **2003**; 38(3): 207-15.

Kuppahally S, Al-Khaldi A, Weisshaar D et al. Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients. Am J Transplant **2006**; 6: 986–992.

Lai CL, Wu PC, Chan GC et al. Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. Cancer. **1988** 1;62(3): 479-83.

Lambert B, Van Vlierberghe H, Troisi R et al. Radionuclide therapy for hepatocellular carcinoma. Acta Gastroenterol. Belg. **2010** Dec;73(4):484-8.

Lan X, Zhang M-M, Pu C-L, Guo C-B, Kang Q, Li Y-C, u. a. Impact of human leukocyte antigen mismatching on outcomes of liver transplantation: a meta-analysis. World J Gastroenterol. 21. Jul **2010**;16(27):3457–64.

Lang H. Liver resection: prt II. Operative procedure. Chirurg. **2007** Sep ; 78(9): 849-63.

Langer RM, Kahan BD. Incidence, therapy, and consequences of lymphocele after sirolimus-cyclosporine-prednisone immunosuppression in renal transplant recipients. Transplantation. **2002** Sep 27;74(6):804-8.

Langrehr JM, Neumann UP, Lang M, Müller AR, Jonas S, Settmacher U, Steinmüller T, Neuhaus P. First results from a prospective randomized trial comparing steroid-free induction therapy with tacrolimus and MMF versus tacrolimus and steroids in patients after liver transplantation for HCV. Transplant. Proc. Aug **2002**;34(5):1565-6.

Langrehr JM, Klupp J, Glanemann M, Junge G, Pfitzmann R, Bahra M, Radtke C, Neumann U, Neuhaus R, Neuhaus P. Long-term results of mycophenolate mofetil as part of immunosuppressive induction therapy after liver transplantation. Clin Transplant. Jun **2006**;20(3):272-83.

Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. J. Clin. Virol. **2005** Dec;34 Suppl 1:S1-3.

Leblanc KG Jr, Hughes MP, Sheehan DJ. The role of sirolimus in the prevention of cutaneous squamous cell carcinoma in organ transplant recipients. Dermatol Surg. Jun **2011**;37(6):744–9.

Lee IJ, Seong J. The optimal selection of radiotherapy treatment for hepatocellular carcinoma. Gut Liver. **2012** Apr;6(2):139-48.

Lefaux R. Chemie und Toxikologie der Kunststoffe. Krauskopf-Verlag, Mainz **1966**.

Lehmann C, Taymoorian K, Wauer H et al. Effects of the stable prostacyclin analogue iloprost on the plasma disappearance rate of indocyanine green in human septic shock. Intensive Care Med. Oct **2000**; 26 (10):1557–60.

Lencioni R. Chemoembolization in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Liver Cancer. Jun **2012**;1(1):41–50.

Li X, Zheng XX, Zand MS et al. IL-2 Dependent Rapamycin Resistent Signals Are Required for Tolerance Induction and T Cell Apoptosis. Transplantation. **1998** Jun; 65(12):169.

Lima EQ, Zanetta DMT, Castro I et al. Risk factors for development of acute renal failure after liver transplantation. Ren Fail. Jul **2003**;25(4):553-60.

Lin S-M, Lin C-J, Lin C-C et al. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma < or =4 cm. Gastroenterology. **2004** Dec;127(6):1714-23.

Livraghi T, Giorgio A, Marin G et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. Radiology. **1995** Oct;197(1):101-8.

Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? Hepatology **2008**;47:82-89.

Livraghi T, Mäkisalo H, Line P-D. Treatment options in hepatocellular carcinoma today. Scand J Surg. **2011**;100(1):22-9.

Lee WA, Gu L, Miksztal AR et al. Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivitization. Pharm Res, **1990**; 7:161.

Lee Y-CA, Cohet C, Yang Y-C et al. Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer. Int J Epidemiol. **2009** Dec;38(6):1497-511.

Llovet JM, C Brú, J Bruix. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. Seminars in Liver Disease 19, Nr. 3 (**1999**): 329-338.

Llovet JM, Sala M, Castells L et al. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. Hepatology. **2000** Jan;31(1):54-8.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med. **2008** Jul 24;359(4):378-90.

Lock JF, Schwabauer E, Martus P, Videv N, Pratschke J, Malinowski M, u. a. Early diagnosis of primary nonfunction and indication for reoperation after liver transplantation. Liver Transpl. Feb **2010**;16(2):172–80.

Lock JF, Reinhold T, Bloch A, Malinowski M, Schmidt S-C, Neuhaus P, Stockmann M. The cost of graft failure and other severe complications after liver transplantation - experience from a German Transplant Center. Ann Transplant. Sep **2010**;15(3):11–8.

Lock JF, Kotobi AN, Malinowski M, Schulz A, Jara M, Neuhaus P, Stockmann M. Predicting the prognosis in acute liver failure: results from a retrospective pilot study using the LiMAx test. Ann Hepatol. Aug **2013**;12(4):556–62.

Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. Dig Liver Dis. **2010** Apr;42(4):272-82.

Luan FL, Ding R, Sharma VK et al. Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis. Kidney Int. **2003** Mar;63(3):917-26.

Lucey MR, Abdelmalek MF, Gagliardi R et al. A comparison of tacrolimus and cyclosporine in liver transplantation: effects on renal function and cardiovascular risk status. Am. J. Transplant. May **2005**;5(5):1111-9.

MacDonald AS for the Rapamune Global Study Group. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. Transplantation. **2001** Jan 27;71(2):271-80.

Maheshwari S, Sarraj A, Kramer J et al. Oral contraception and the risk of hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. **2007** Oct;47(4):506–13.

Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD et al. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. Hepatology. **2000** 31(4): 864-71.

Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. Ann. Math. Statist. Mar **1947**;18(1):50-60.

Marelli L, Stigliano R, Triantos C. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. Cardiovasc Intervent Radiol. **2007** Feb;30(1):6-25.

Margarit C, Escartín A, Castells L et al. Resection for hepatocellular carcinoma is a good option in Child-Turcotte-Pugh class A patients with cirrhosis who are eligible for liver transplantation. Liver Transpl. Oct **2005**;11(10):1242-51.

Martínez Cerezo FJ, Tomás A, Donoso L et al. Controlled trial of tamoxifen in patients with advanced hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. **1994** Jun;20(6):702–6.

Mazzaferro V, Regalia E, Doci R et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. N Engl J Med. **1996** 14;334(11): 693-9.

Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R et al. Metroticket Investigator Study Group. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. Lancet Oncol. **2009** Jan ; 10(1): 35-43.

McDiarmid SV. Mycophenolate mofetil in liver transplantation. Clin Transplant. **1996** Feb; 10(1 Pt 2): 140-5.

Mensel B, Weigel C, Heidecke C-D, Stier A, Hosten N. [Laser-induced thermotherapy (LITT) of tumors of the liver in central location: results and complications]. Rofo. **2005** Sep;177(9):1267-75.

Mehta SP. Palliative chemotherapy for pancreatic malignancies. Surg Clin North Am. April **2010**;90(2):365–75.

Middleton PF, Duffield M, Lynch SV et al. Living donor liver transplantation-adult donor outcomes: a systematic review. Liver Transpl. **2006** Jan; 12(1): 24-30.

Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH et al. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. Hepatology.**2002**;36(5):1214-20

Mittler J, Pascher A, Jonas S et al. Adult living donor liver transplantation: living donation of the right liver lobe. Langenbecks Arch Surg. **2007** Nov;392(6): 657-62.

Mitsui A, Suzuki S. Immunosuppressive effect of mycophenolic acid. J Antibiot (Tokyo) **1969**; 22:358.

Morelon E, Stern M, Israël-Biet D et al. Characteristics of sirolimus-associated interstitial pneumonitis in renal transplant patients. Transplantation. **2001** Sep 15;72(5):787–90.

Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. **2004** Nov;127(5 Suppl 1):S87-96.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods **1983**; 65(1-2):55-63.

Nagasue N, Kohno H, Tachibana M et al. Prognostic factors after hepatic resection for hepatocellular carcinoma associated with Child-Turcotte class B and C cirrhosis. Ann Surg. **1999** Jan ; 229(1): 84-90.

Neumann UP, Guckelberger O, Langrehr JM, Lang M, Schmitz V, Theruvath T, Schonemann C, Menzel S, Klupp J, Neuhaus, P. Impact of human leukocyte antigen matching in liver transplantation. Transplantation. 15. Jan **2003**;75(1):132–7.

Ng S-A, Lee C. Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis. J. Gastroenterol. **2011** Aug;46(8):974-90.

Nikfarjam M, Christophi C. Interstitial laser thermotherapy for liver tumours. Br J Surg. **2003** Sep;90(9):1033-47.

Nosaka C, Kunimoto S, Takeuchi T. The decrease of cytochrome c oxidase activity by 15-deoxyspergualin results in enhancement of XTT reduction in cultured cells. J. Antibiot. **1999** Sep;52(9):803-8.

Nowak A, Findlay M, Culjak G, Stockler M. Tamoxifen for hepatocellular carcinoma. Cochrane Database Syst Rev. **2004**;(3):CD001024.

Oellerich M, Raude E, Burdelski M et al. Monoethylglycinexylidide formation kinetics: a novel approach to assessment of liver function. J Clin Chem Clin Biochem. **1987** Dec; 25(12): 845-53.

Ogawa T, Tokuda M, Tomizawa K et al. Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-like osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **1998** Aug 10;249(1):226-30.

Ohnishi S, Murakami T, Moriyama et al. Androgen and estrogen receptors in hepatocellular carcinoma and in the surrounding noncancerous liver tissue. Hepatology. **1986** Jun;6(3):440-3.

Oken MM, Creech RH, Tormey DC et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol. **1982** Dec; 5(6): 649-55.

Okuda K, Ohtsuki T, Obata H et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. Cancer. **1985** 15;56(4):918-28.

Olofsson S-O, Borèn J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. J Intern Med. Nov **2005**;258(5):395–410.

Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. Lancet. 30. Nov **1991**;338(8779):1356-9.

Paradis V, Youssef N, Dargère D et al. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. Hum. Pathol. **2001** Mar;32(3):327-32.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. Cancer Incidence in five continents. IARC scientific publications volume VIII [No. 155]. **2002**. Lyon: IARC Press.

Pescovitz M, Conti D, Dunn J et al. Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics. Clinical Transplantation. **2000**, 14: 179-188.

Pham P-TT, Pham P-CT, Danovitch GM et al. Sirolimus-associated pulmonary toxicity. Transplantation. **2004** Apr 27;77(8):1215-20.

Pichlmayer R for European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and cortico-steroids for prevention of acute rejection. Lancet. **1995** May 27; 345(8961): 1321-5.

Piguet A-C, Semela D, Keogh A, Wilkens L, Stroka D, Stoupis C, u. a. Inhibition of mTOR in combination with doxorubicin in an experimental model of hepatocellular carcinoma. J Hepatol. Jul **2008**;49(1):78–87.

Pleguezuelo M, Marelli L, Misseri M, Germani G, Calvaruso V, Xiruochakis E, u. a. TACE versus TAE as therapy for hepatocellular carcinoma. Expert Rev Anticancer Ther. **2008** Oct;8(10):1623-41.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Lancet. **1997** Mar 22;349(9055):825-32.

Poynard T, Mathurin P, Lai C-L, Guyader D, Poupon R, Tainturier M-H, u. a. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. J. Hepatol. **2003** Mar;38(3):257-65.

Price DJ, Grove JR, Calvo V et al. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. Science. **1992** Aug 14;257(5072):973-7.

Qi S,Chen H,Xu D et al. Prolongation of pancreas allograft survival by mycophenolate mofetil in the rat. Transplant Proc. **1996** Apr ; 28(2): 932-3.

Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H et al. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. J. Hepatol. **2010** Aug;53(2):372-84.

Reemstsma K, Hottinger GC, De Graaf AC et al. The estimation of hepatic blood flow using indocyanine green. Surg Gynecol Obstet. **1960** Mar ; 110: 353-6.

Rahbari NN, Mehrabi A, Mollberg NM et al. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future. Ann. Surg. Mar **2011**;253(3):453-69.

Riaz A, Lewandowski RJ, Kulik L, Salem R. Yttrium-90 radioembolization using TheraSphere in the management of primary and secondary liver tumors. Q J Nucl Med Mol Imaging. Jun **2009**;53(3):311–6.

Ribatti D, Nico B, Mangieri D et al. In vivo inhibition of human hepatocellular carcinoma related angiogenesis by vinblastine and rapamycin. Histol. Histopathol. **2007** ;22(3):285-9.

Richtlinien zur Feststellung des Hirntodes, 3. Fortschreibung 1997 mit Ergänzungen gemäß Transplantationsgesetz (TPG) [24.07.1998]. (Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 30 (24. 07.**1998**), Seite A-1861-1868.

RKI und GEKID. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, **2013**.

Rubtsova MP, Vasilkova DP, Malyavko AN, Naraikina YV, Zvereva MI, Dontsova OA. Telomere lengthening and other functions of telomerase. Acta Naturae. **2012**;4(2):44–61.

Rui R, Lou J, Zou L et al. Excess body mass index and risk of liver cancer: a nonlinear dose-response meta-analysis of prospective studies. PLoS ONE. **2012**;7(9):e44522.

Sala M, Llovet JM, Vilana R et al. Initial response to percutaneous ablation predicts survival in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology.**2004** Dec;40(6):1352-60.

Salvadori M, Holzer H, Mattos A et al. Enteric-Coated Mycophenolate Sodium is Therapeutically Equivalent to Mycophenolate Mofetil in de novo Renal Transplant Patients. American Journal of Transplantation. **2004**, 4: 231–-236.

Schäffer M, Schier R, Napirei M et al. Sirolimus impairs wound healing. Langenbecks Arch Surg. **2007** May;392(3):297-303.

Schlaeger C, Longerich T, Schiller C et al. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. Hepatology. Feb **2008**;47(2):511-20.

Schmeding M, Neumann UP, Neuhaus R, Neuhaus P. Mycophenolate mofetil in liver transplantation-is monotherapy safe? Clin Transplant. **2006**;20 Suppl 17:75-9.

Schmeding M, Kiessling A, Neuhaus R, Heidenhain C, Bahra M, Neuhaus P, Neumann UP. Mycophenolate mofetil monotherapy in liver transplantation: 5-year follow-up of a prospective randomized trial. Transplantation. 27 Oct **2011**;92(8):923-9.

Schmidt H, Brockmann J. Gastrointestinal aspects regarding treatment with mycophenolate mofetil. Z Gastroenterol. **2007** Oct ; 45(10): 1082-4 .

Schmidt H, Brockmann J. MMF to EC-MPS conversion: What makes the difference? Liver Transpl. **2007**, 13: 773-774.

Schmitz V, Klawitter J, Bendrick-Peart J, Schoening W, Puhl G, Haschke M, Klawitter J, Consoer J, Rivard CJ, Chan L, Tran ZV, Leibfritz D, Christians U. Metabolic profiles in urine reflect nephrotoxicity of sirolimus and cyclosporine following rat kidney transplantation. Nephron Exp. Nephrol. **2009**;111(4):e80-91.

Schnitzbauer AA, Zuelke C, Graeb C et al. A prospective randomised, open-labeled, trial comparing sirolimus-containing versus mTOR-inhibitor-free immunosup-pression in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. **2010**;10:190.

Schoening WN, Buescher N, Rademacher S, Andreou A, Kuehn S, Neuhaus R, Guckelberger O, Puhl G, Seehofer D, Neuhaus P. Twenty-year longitudinal follow-up after orthotopic liver transplantation: a single-center experience of 313 consecutive cases. Am J Transplant. September **2013**;13(9):2384–94.

Schriefer P. Quantitative Bestimmung der relativen Telomeraseaktivität (RTA) in malignem Lebergewebe [Dissertation]. Hamburg. **2011**. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Schwecke T, Aparicio JF, Molnár I et al. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. Proc Natl Acad Sci U S A. **1995** Aug 15; 92(17): 7839-43.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. **1988** Sep 1;48(17):4827-33.

Seehofer D, Nebrig M, Denecke T, Kroencke T, Weichert W, Stockmann M, Soma-sundaran R, Schott E, Puhl G, Neuhaus P. Impact of neoadjuvant transarterial chemo-embolization on tumor recurrence and patient survival after liver transplantation for hepato-cellular carcinoma: a retrospective analysis. Clin Transplant. Oct **2012**;26(5):764–74.

Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. J. Antibiot. **1975** Oct;28(10):727-32.

Sgourakis G, Radtke A, Fouzas I et al. Corticosteroid-free immunosuppression in liver transplantation: a meta-analysis and meta-regression of outcomes. Transpl. Int. Sep **2009**;22(9):892-905.

Sharpe LJ, Brown AJ. Rapamycin down-regulates LDL-receptor expression independently of SREBP-2. Biochem. Biophys. Res. Commun. **2008** Sep;373(4):670-4.

Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. Nature. **2006** May 25;441(7092):424-30.

Shipkova M, Strassburg CP, Braun F et al. Glucuronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes. Br J Pharmacol. **2001** Mar ; 132(5): 1027-34.

Sicklick JK, Li Y-X, Jayaraman A et al. Kannangai R, Qi Y, Vivekanandan P, u. a. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis. Apr **2006**;27(4):748-57.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition. **2009** Dec, Wiley-Blackwell.

Sollinger HW, Deierhoi MH, Belzer FO et al. RS-61443-a phase I clinical trial and pilot rescue study. Transplantation. **1992** Feb; 53(2): 428-32.

Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC et al. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. Circulation. **2001** Oct 23;104(17):2007-11.

Spahn-Langguth H, Benet LZ. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? Drug Metab. **1992**, Rev., 24, 5-48.

Szabo G, Wands JR, Eken A, Osna NA, Weinman SA, Machida K, u. a. Alcohol and Hepatitis C Virus -Interactions in Immune Dysfunctions and Liver Damage. Alcohol Clin Exp Res. Oktober **2010**;34(10):1675–86.

Statistisches Bundesamt, https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html;jsessionid=4102275ABCCFBEE91782AA448F0B6BBF.cae3; abgerufen am 11.02.2014.

Starzl TE, Iwatsuki S, Klintmalm G et al. Liver transplantation, 1980, with particular reference to cyclosporin-A. Transplant. Proc. Mar **1981**;13(1 Pt 1):281-5.

Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA et al. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. N. Engl. J. Med. Jul **1981**;305(5):266-9.

Starzl TE, Todo S, Fung J et al. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. Lancet. Oct **1989**;2(8670):1000-4.

Stern MC, Umbach DM, Yu MC et al. Hepatitis B, aflatoxin B(1), and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **2001**; 10(6):617-25.

Stockmann M, Malinowski M, Lock JF, Seehofer D, Neuhaus P. Factors influencing the indocyanine green (ICG) test: additional impact of acute cholestasis. Hepatogastro-enterology. Jun **2009**;56 (91-92):734–8.

Stockmann M, Lock JF, Riecke B, Heyne K, Martus P, Fricke M, Lehmann S, Niehues SM, Schwabe M, Lemke AJ, Neuhaus P. Prediction of postoperative outcome after hepatectomy with a new bedside test for maximal liver function capacity. Ann Surg. **2009**;250(1):119-25.

Stockmann M, Lock JF, Malinowski M, Niehues SM, Seehofer D, Neuhaus P. The LiMAx test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery. HPB (Oxford). Mar **2010**;12(2):139–46.

Stockmann M, Lock JF, Malinowski M, Seehofer D, Puhl G, Pratschke J, Neuhaus P. How to define initial poor graft function after liver transplantation? - a new functional definition by the LiMAx test. Transpl Int. Oct **2010**;23(10):1023–32.

Strehlau J, Maslinski W, Chae D et al. Adjusting immunosuppression to the identification of T-cell activating mediators in rejecting transplants: a novel approach to rejection diagnosis and treatment. Transplant. Proc. **1998** Aug;30(5):2389-91.

Strong RW, Lynch SV, Ong TH et al. Successful liver transplantation from a living donor to her son. N Engl J Med **1990**;322:1505-7.

Sturm JW, Keese MA, Bönninghoff RG et al. [Locally ablative therapies of hepatocellular carcinoma]. Onkologie. **2001** Sep;24 Suppl 5:35-45.

Sugiura N, Takara K, Ohto M et al. Percutaneous intratumoral injection of ethanol under ultrasound imaging for treatment of small hepatocellulan carcinoma. Acta Hepatol Jpn **1983**:24:920.

Sugiyama K, Hiraoka H, Sugita-Konishi Y. Aflatoxin M1 contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B1 in corn supplied to dairy cattle in Japan. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. **2008**;49(5):352-5.

Tan Y-J. Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma. World J. Gastroenterol. **2011** Nov 28;17(44):4853–7.

Tannapfel A, Busse C, Weinans L et al. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. Oncogene. 25. Oct **2001**;20(48):7104-9.

Terada N, Lucas JJ, Szepesi A et al. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. J. Cell. Physiol. **1993** Jan;154(1):7-15.

TPG. Transplantationsgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. September 2007 (BGBl. I S. 2206), das durch Artikel 3 des Gesetzes vom 17. Juli **2009** (BGBl. I S. 1990) geändert worden ist.

Toh YC. Effect of neonatal castration on liver tumor induction by N-2-fluoreny-lacetamide in suckling BALB/c mice. Carcinogenesis. **1981**;2(11):1219-21.

Toso C, Meeberg GA, Bigam DL et al. De novo sirolimus-based immunosuppression after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: long-term outcomes and side effects. Transplantation. May **2007**;83(9):1162-8.

Toso C, Mentha G, Kneteman NM et al. The place of downstaging for hepatocellular carcinoma. J Hepatol. **2010** Jun ; 52(6): 930-6.

Tressler RJ, Garvin LJ, Slate DL. Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors in vivo. Int. J. Cancer. **1994** May 15;57(4):568-73.

Tygstrup N. The galactose elimination capacity in control subjects and in patients with cirrhosis of the liver. Acta Med Scand. **1964** Mar ; 175: 281-9.

Usatoff V, Habib NA. Update of laser-induced thermotherapy for liver tumors. Hepatogastroenterology. **2001** Apr;48(38):330–2.

U.S. EPA. Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health. TEACH Chemical summary. Vinyl cloride (VC). U.S. Environmental Protection Agency. 10/**2007**.

van Gelder T. Mycophenolate blood level monitoring: recent progress. Am. J. Transplant. Jul **2009**;9(7):1495-9.

van Gijssel HE, Maassen CB, Mulder GJ et al. p53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumour promotion. Carcinogenesis. **1997** May;18(5):1027-33.

Vesselinovitch SD, Itze L, Mihailovich N et al. Modifying role of partial hepatectomy and gonadectomy in ethylnitrosourea-induced hepatocarcinogenesis. Cancer Res.**1980** May; 40(5):1538-42.

Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. J Antibiot (Tokyo). **1975** Oct ; 28(10): 721-6.

Walter J, Burdelski M, Bröring DC. Chances and risks in living donor liver transplantation. Dtsch Arztebl Int. **2008** Feb ; 105(6): 101-7.

Wang Z, Zhou J, Fan J, Qiu S-J, Yu Y, Huang X-W, u. a. Effect of rapamycin alone and in combination with sorafenib in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 15. Aug **2008**;14(16):5124–30.

Wang Y, Speeg KV, Washburn WK, Halff G. Sirolimus plus sorafenib in treating HCC recurrence after liver transplantation: a case report. World J Gastroenterol. 21. Nov **2010**;16(43):5518–22.

Weinreich J, Löb S, Löffler M et al. Rapamycin-induced impaired wound healing is associated with compromised tissue lactate accumulation and extracellular matrix remodeling. Eur Surg Res. **2011**;47(1):39-44.

WHO. Global status report on alcohol 2004. World Health Organization, Dept. of Mental Health and Substance Abuse, **2004**, Genf.

WHO. World Health Organization. Gender, women and the tobacco epidemic. Geneva, **2010;** http://www.who.int/tobacco/publications/gender/women_tob_epidemic/ en/index.html; abgerufen am 16.12.2012.

Wieland E, Shipkova M, Schellhaas U et al. Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? Clin Biochem. **2000** 33(2):107-13.

Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. FASEB J. **2002** Jul;16(9):935-42.

Wiesner R, Rabkin J, Klintmalm G et al. A randomized double-blind comparative study of mycophenolate mofetil and azathioprine in combination with cyclosporine and cortico-steroids in primary liver transplant recipients. Liver Transpl.**2001** May;7(5):442-50.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. Cell. **2006**; 124: 471-484.

Yamada T, De Souza AT, Finkelstein S et al. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **1997** Sep 16;94(19):10351-5.

Yao FY, Ferrell L, Bass NM et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: comparison of the proposed UCSF criteria with the Milan criteria and the Pittsburgh modified TNM criteria. Liver Transpl. **2002** Sep ; 8(9): 765-74.

Yip-Schneider MT, Doyle CJ, McKillop IH et al. Alcohol induces liver neoplasia in a novel alcohol-preferring rat model. Alcohol. Clin. Exp. Res. **2011** Dec;35(12):2216–25.

Yu M-W, Chang H-C, Chang S-C et al. Role of reproductive factors in hepatocellular carcinoma: Impact on hepatitis B- and C-related risk. Hepatology. **2003** ;38(6): 1393-400.

Zahn A, Mueller F, Hinz U et al. Mycophenolate mofetil combination therapy improves survival after liver transplantation. A single-center retrospective analysis. Ann Transplant. **2013**;18:525–32.

Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. Vaccine. **2008** Nov 18;26(49):6266-73.

Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ et al. The role of cryosurgery in the treatment of hepatic cancer: a report of 113 cases. J. Cancer Res. Clin. Oncol. **1993**;120(1-2):100-2.

Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP et al. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. J. Clin. Oncol. **2006** Apr 20;24(12):1898-903.

Zimmerman MA, Trotter JF, Wachs M et al. Sirolimus-based immunosuppression following liver transplantation for hepatocellular carcinoma. Liver Transpl. May **2008**;14(5):633-8.

Ziolkowski J, Paczek L, Senatorski G et al. Renal function after liver transplantation: calcineurin inhibitor nephrotoxicity. Transplant. Proc. Sep **2003** ;35(6):2307-9.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jan Langrehr und meiner Betreuerin Frau Dr. med. Sabine Presser für das Überlassen des Themas „Vergleichender Zytotoxizitätsnachweis der Immunsuppressiva Sirolimus und Mycophenolatmofetil auf die humanen hepatozellulären Karzinom-Zelllinien HEP3B und SKHEP1 *in vitro*“. Ich bedanke mich für ihre fortwährende Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit. Ich freue mich besonders über das mir entgegengebrachte Vertrauen und die sehr gute Zusammenarbeit. Sie fand ihren Ausdruck auch darin, auf meinen Gesprächsbedarf mir angesichts meiner zeitlichen Beanspruchung in der Studien- und Arbeitszeit stets mit flexiblen Sprechzeiten zu reagieren sowie alle meine Fragen geduldig zu beantworten und als Diskussionspartner zur Verfügung zu stehen. Des Weiteren danke ich Herrn MTLA Steffen Lippert für die Unterstützung und die wertvollen Ratschläge bei der Laborarbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Gedanken über die Arbeit hatten und mir bei der Umsetzung dieser Arbeit auch kritisch zur Seite standen. Abschließend danke ich Frau Sarah Steinbock für Ihre stetige Unterstützung, für ihr Kümmern und letztlich ihr Dasein.

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stefan Hartwig, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Vergleichender Zytotoxizitätsnachweis der Immunsuppressiva Sirolimus und Mycophenolatmofetil auf die humanen hepatozellulären Karzinom-Zelllinien HEP3B und SKHEP1 *in vitro"* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum Unterschrift

10. Curriculum Vitae

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