

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und  
Gastroenterologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Angiopoietin-2 als Serummarker zur Diagnostik des  
hepatozellulären Karzinoms und der Leberzirrhose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vanessa Annina Rehm

aus Pforzheim

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. E. Schott  
2. Prof. Dr. med. H. Witt  
3. Prof. Dr. C. Loddenkemper

1. Datum der Promotion: 30.1.2009



<b>1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>1</b>
1.1. EINLEITUNG	6
1.2. PROBLEMSTELLUNG	7
<b>2. GRUNDLAGEN</b>	<b>8</b>
2.1. ANGIOGENESE	8
2.1.1. PRINZIP	8
2.1.2. ROLLE DER ANGIOGENESE BEI BENIGNEN ERKRANKUNGEN	13
2.1.3. ANGIOGENESE BEI LEBERZIRRHOSE	16
2.1.4. ROLLE DER ANGIOGENESE BEI MALIGNEN ERKRANKUNGEN	19
2.1.5. ANGIOGENESE BEIM HEPATIZELLULÄREN KARZINOM	24
2.1.6. THERAPEUTISCHE OPTIONEN	25
2.2. DAS HEPATIZELLULÄRE KARZINOM	28
2.2.1. EPIDEMIOLOGIE	28
2.2.2. PATHOGENESE UND PATHOLOGIE	31
2.2.3. DIAGNOSE	33
2.2.4. SCREENING UND PRÄVENTION	36
2.2.5. THERAPIE	37
2.3. LEBERZIRRHOSE	40
2.3.1. EPIDEMIOLOGIE	40
2.3.2. ÄTIOLOGIE	40
2.3.3. KLINIK	41
2.3.4. DIAGNOSE	41
2.3.5. THERAPIE	44

<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>45</b>
<b>3.1. STUDIENDESIGN</b>	<b>45</b>
<b>3.2. PATIENTEN</b>	<b>45</b>
3.2.1. VERLÄUFE	47
<b>3.3. ARCHIVRECHERCHE</b>	<b>50</b>
<b>3.4. LABORTEIL</b>	<b>51</b>
3.4.1. GRUNDPRINZIP DES ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY	51
3.4.2. $\alpha$ -FETOPROTEIN ELISA	53
3.4.3. ANGIOPOIETIN-2 ELISA	54
<b>3.5. STATISTIK</b>	<b>56</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>4.1. ANG-2 ALS MARKER FÜR HCC</b>	<b>57</b>
<b>4.2. ANG-2 ALS MARKER FÜR ZIRRHOSE</b>	<b>60</b>
<b>4.3. VERGLEICH VON ANG-2 UND AFP ALS MARKER FÜR HCC</b>	<b>64</b>
<b>4.4. ANG-2/ TUMORSTADIUM/ GRADING/ CHILD</b>	<b>69</b>
<b>4.5. KOMBINATION VON ANG-2 UND AFP</b>	<b>71</b>
<b>4.6. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG INDIVIDUELLER VERLÄUFE</b>	<b>74</b>
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>77</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>88</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
<b>9. LEBENSLAUF</b>	<b>94</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>94</b>

## 2. Einleitung und Problemstellung

### 2.1. Einleitung

**Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) oder primäre Leberzellkarzinom ist die fünfthäufigste Krebserkrankung weltweit und die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache.**

Vierundachtzig Prozent der primären Lebertumore in den USA sind HCC [1]. Auf der ganzen Welt erkranken jährlich eine halbe Millionen Menschen an diesem Tumor und die Inzidenz steigt seit den 90er Jahren stetig an [2].

Die Prognose des HCC ist im Allgemeinen schlecht und abhängig von der Größe des Primärtumors und dem Stadium der zugrunde liegenden Leberzirrhose. Die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit frühen Stadien des hepatozellulären Karzinoms beträgt 50 bis 70%. Im Endstadium der Erkrankung beträgt die Lebenserwartung weniger als 6 Monate [2].

Die Therapie des hepatozellulären Karzinoms ist schwierig. Vor chirurgischen Interventionen wird die Größe des Primärtumors häufig unterschätzt, und es kommt postoperativ zu einem Tumorrezidiv. Die Möglichkeit der Anwendung von ablativen Verfahren ist bei Vorliegen einer Leberzirrhose oft begrenzt, da diese die Funktionsfähigkeit der Leber zusätzlich einschränken können. Eine wirksame, lebensverlängernde Chemotherapie des HCC existiert bisher nicht.

Ein Screening mit geeigneten Tumormarkern ist daher zur Früherkennung des HCC bei Risikopatienten von großer Wichtigkeit.

Ein Gebiet von besonderem Interesse ist das Gefäßwachstum in Tumoren. Sie benötigen eine ausreichende Vaskularisation zum Wachstum, zur Ausbreitung und zur Metastasenbildung. Bereits 1971 stellte J. Folkman die These auf, dass Tumorwachstum und Metastasenbildung von Angiogenese abhängig sind [3], und er sah darin das große therapeutische Potential, das dazu führte, dass derzeit zahlreiche antiangiogenetische Substanzen für den klinischen Alltag erprobt werden. Bis 2004 wurden circa 4 Milliarden US Dollar in die Angiogeneseforschung und in die Entwicklung antiangiogenetischer Substanzen investiert. Das HCC gehört zu den hochvaskularisierten Tumoren. Diese Eigenschaft kann möglicherweise zur Früherkennung des HCC genutzt werden.

## **2.2. Problemstellung**

**Gibt es außer dem Alpha-Fetoprotein (AFP) weitere Screeningmarker für das hepatozelluläre Karzinom?**

Mit zunehmendem Erfolg der Angiogeneseforschung wird eine Beteiligung proangiogenetischer Faktoren wie Angiopoietin-2 (Ang-2) bei der Entstehung und Ausbreitung des HCC deutlich.

AFP ist ein etablierter Marker in der Diagnostik des HCC. Er weist jedoch im klinischen Alltag Schwächen auf. Dreißig Prozent der Patienten mit HCC zeigen keine Erhöhung von AFP. Die Sensitivität von AFP bei der Detektion eines HCC beträgt 60%, die Spezifität 90% [4]. Weiterhin ist gesichert, dass 80% der HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose entstehen, die somit eine Präkanzerose darstellt.

Auf diesen Fakten begründet sich die Fragestellung dieser Arbeit:

Wie verhält sich Ang-2 im Serum von Patienten mit Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom, und ist Ang-2 zusätzlich zu AFP als Tumormarker für das hepatozelluläre Karzinom geeignet?

## 3. Grundlagen

### 3.1. *Angiogenese*

#### 3.1.1. Prinzip

**Neue Gefäße werden durch Vaskulogenese und Angiogenese gebildet.**

Um die vielfältigen Mechanismen, die bei der Entstehung von Gefäßen eine Rolle spielen zu verstehen, müssen zunächst zwei wichtige Grundbegriffe definiert werden: Vaskulogenese und Angiogenese.

Der Begriff *Vaskulogenese* beschreibt die Bildung von Gefäßen während der Embryonalentwicklung. Dieser Vorgang verläuft in mehreren Schritten: Angioblasten wandern in das Gewebe ein, entwickeln sich zu Endothelzellen, die dann proliferieren und röhrenartige Strukturen bilden. Um die Endothelzellen herum entsteht die Basalmembran, und schließlich werden die beiden inneren Schichten von einer Hülle aus Perizyten bzw. glatten Muskelzellen, umgeben. Am Ende des Reifungsprozesses ist ein primitives vaskuläres System mit einer gewissen Hierarchie entstanden. Je nach funktionellen Anforderungen wie hydrostatischem Druck, Gefäßpermeabilität und Gewebsperfusionrate ist es aus Arterien, Venen, Arteriolen, Venolen und Kapillaren zusammengesetzt [5].

Unter dem Begriff *Angiogenese* versteht man die Expansion dieses primitiven Gefäßnetzwerks unter dem Einfluss verschiedener stimulierender Faktoren [6]. Neue Gefäße sprossen aus den bereits bestehenden aus und wachsen in das umliegende Gewebe ein. Beim Erwachsenen werden neue Gefäße ausschließlich durch Angiogenese gebildet. Angiogenese spielt aber auch in der Embryonalentwicklung eine Rolle.

Angiogenese geschieht immer dann, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antiangiogenesefaktoren zugunsten der Proangiogenese herrscht. Dann kommt es zum „*Angiogenic switch*“ und somit zur Neubildung von Gefäßen. Dieser Vorgang ist bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Mechanismen zu beobachten.

Hypoxie im Gewebe wirkt proangiogenetisch, etwa beim Diabetes mellitus an der Retina oder bei Asthmaerkrankungen. Aber auch Gewebsazidose, z.B. bei der



Wundheilung, kann zur Proliferation von Gefäßen führen. Hypoglykämie, Immun- oder Entzündungsreaktionen sowie Genmutationen mit folgender Aktivierung von Onkogenen sind weitere Auslöser der Angiogenese.

### **Die Interaktion des Tie2 (tyrosine kinase with immunoglobuline and epidermal growth factor homology domains 2)-Rezeptors mit Angiopoietinen induziert und reguliert die Angiogenese.**

Bei der Entstehung neuer Gefäße oder dem Ausbau eines bestehenden Netzwerks spielt eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle. In dieser Arbeit soll besonders das Tie2-/Angiopoietin-System betrachtet werden. Es handelt sich dabei um eine Ligand/Rezeptor-Familie. Das System spielt eine wichtige Rolle bei der Ausreifung, beim Wachstum und der organisierten Anordnung von Gefäßneubildungen.

Der Rezeptor Tie2 ist eine transmembranär lokalisierte Tyrosinkinase [7]. Er befindet sich auf Endothelzellen und - während der Embryonalentwicklung - auf Frühstadien hämatopoetischer Zellen. Der Tie2-Rezeptor ist an Orten, an denen neue Gefäße gebildet werden lokalisiert, aber auch dort wo sich die Gefäße im Ruhestadium befinden. Normalerweise befinden sich 99.9% aller Endothelzellen im Ruhestadium [8]. Der Tie2-Rezeptor kann durch Hypoxie und proinflammatorische Zytokine in Endothelzellen stimuliert werden [7]. Um die Funktion von Tie2 genauer zu untersuchen, führten Sato et al. eine Studie mit Mausembryonen durch, bei denen aufgrund von gezielt ausgelösten Mutationen kein Tie2 exprimiert wurde. Daraufhin bildete sich ein abnormales vaskuläres Netzwerk, in dem gehäuft Vasodilatationen auftraten. Aussprossung, Verzweigung und Remodelling des primären Gefäßnetzwerks zu größeren oder kleineren Gefäßen, also Mechanismen, die typisch für Angiogenese sind, blieben aus [9]. Auch von Koh et al. wird beschrieben, dass Mausembryonen, die kein Tie2 exprimieren, zwischen Tag 9.5 und 10.5 der Embryonalphase sterben [10]. Die Ursache für die Instabilität von Gefäßen von Tie2-knock-out Mäusen basiert darauf, dass Tie2 die Fähigkeit von Endothelzellen kontrolliert, Stromazellen anzulocken, die dann die Endothelzellröhren umhüllen und stabilisieren [11].

Als Liganden des Tie2-Rezeptors fungieren die Angiopoietine, von denen bislang vier Isotypen bekannt sind. Sie befinden sich im Extrazellulärraum und binden an die extrazelluläre Domäne des Tie-2-Rezeptors.

Alle vier bisher identifizierten Angiopoietine bestehen aus drei Teilen: der N-terminalen Region, dem alpha-helikalen coiled-coil Segment und der Fibrinogen-ähnlichen Domäne. Letztere ist der Teil des Angiopoietins, der für die Bindung an den Tie2-Rezeptor zuständig ist. Sie wurde so benannt, weil diese Aminosäuresequenz zuerst bei Fibrinogen, dann aber bei vielen anderen Proteinen identifiziert wurde. Außerdem scheint die Information, ob ein Angiopoietin als Agonist oder Antagonist dient, in der Fibrinogen-ähnlichen Domäne kodiert zu sein [12].

Weiterhin ist für die Gruppe der Angiopoietine charakteristisch, dass sie in ihrer fibrinogenähnlichen Domäne eine Struktur von drei nahe beieinander liegenden („closely spaced“) Zysteinen aufweisen. Angiopoietin-1 (Ang-1) ist ein Glykoprotein und wurde erstmals 1996 als Ligand von Tie2 identifiziert [13]. Es ist spezifisch für den Tie2-Rezeptor und induziert dessen Autophosphorylierung und Dimerisierung. Die Ang-1 Moleküle von Maus und Mensch weisen eine Homologie von 97.6% auf. Biochemisch besteht Angiopoietin-1 aus 498 Aminosäuren und hat eine Größe von 70kDa. An seinem C-terminalen Ende befindet sich eine „fibrinogen-like“-Domäne, am N-terminalen Ende eine „coiled-coil“-Struktur.

Bei der Untersuchung der Megakaryopoese wurden insgesamt drei Splicevarianten der Ang-1 mRNA identifiziert. Das Angiopoietin-1 voller Länge besteht aus 1.5 Kilobasen (kb), außerdem existieren Varianten mit 1.3kb, 0.9kb und 0.7kb. Die Versionen, die aus 1.5 und 0.9 Kilobasen bestehen, binden an Tie2, die 1.3kb Isoform bindet hier jedoch nicht. Die Phosphorylierung von Tie2 wird nur durch Ang-1 der vollen Länge hervorgerufen, nicht aber durch die 1.3kb und 0.9kb Varianten [10].

Beim Mausembryo bewirkt Ang-1 eine normale Gefäßentwicklung. Wird Ang-1 nicht exprimiert, kommt es zu schweren Gefäßanomalien. Bei *in vivo* Versuchen mit transgenen Mäusen wurde festgestellt, dass eine Überexpression von Ang-1 zu Hypervaskularisation führt [14]. Beim Erwachsenen bewirkt Ang-1 eine Stabilisierung der Gefäße. Ang-1 verursacht Endothelzellmigration und -adhäsion. Es fördert die Ausreifung der Gefäße, indem es außerdem Perizyten und glatte Muskelzellen anlockt. Daher wird Ang-1 mRNA hauptsächlich in periendothelialen Zellen exprimiert.

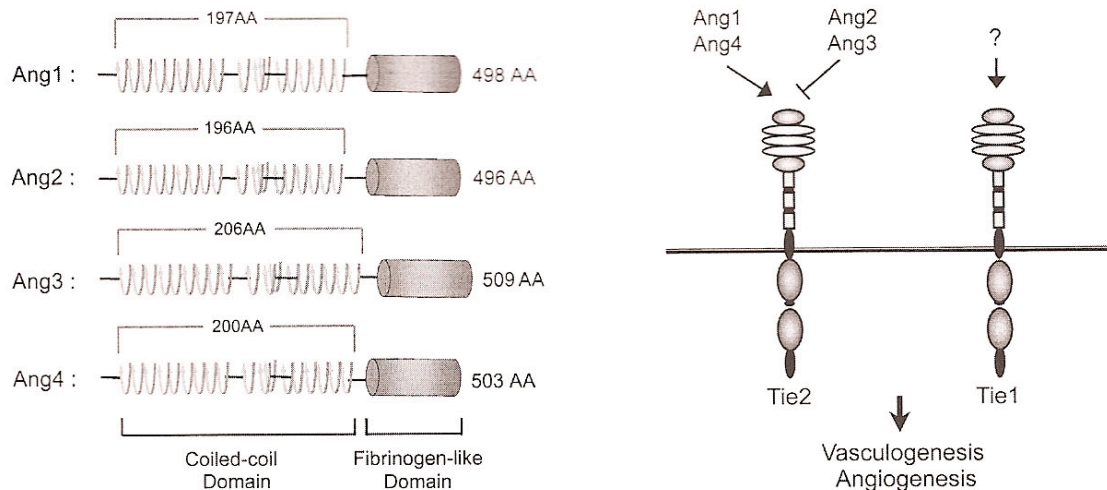
Eine besondere Rolle in dieser Arbeit spielt der natürliche Antagonist von Ang-1 am Tie-2 Rezeptor: Angiopoietin-2. Es bindet ebenfalls nur an den Tie2-Rezeptor. Ang-2 ist ein Protein, das aus 496 Aminosäuren besteht und in seiner Peptidstruktur zu 60% mit dem ihm verwandten Angiopoietin-1 übereinstimmt. In seinem Aufbau weist Ang-2

genau wie Ang-1 eine NH<sub>2</sub>-terminale „coiled-coil“- Domäne und eine COOH-terminale „fibrinogen-like“- Domäne auf. Seine Rolle in der Angiogenese wurde erstmals 1997 von Maisonpierre et al. beschrieben [15]. Durch alternatives „splicing“ von Ang-2 entsteht eine mRNA, die nur aus 443 Aminosäuren besteht. Diese Variante (Ang-2<sub>443</sub>) bindet an Tie2 und verursacht genau wie Ang-2 keine Phosphorylierung des Rezeptors. Ang-2<sub>443</sub> wird verstärkt in zwei Zervixkarzinomzelllinien und zeitweise bei der Differenzierung von Makrophagen exprimiert. Es könnte somit als Angriffspunkt bei der Therapie des Zervixkarzinoms und bei entzündlichen Prozessen dienen [10]. Eine dritte Ang-2-Isoform - Ang-2B - wurde identifiziert, bei der Exon 1 durch Exon 1B ersetzt ist. Die Rolle dieser Ang-2 Variante ist noch nicht bekannt [8].

Während Ang-1 den Tie2-Rezeptor durch Phosphorylierung aktiviert, bindet Ang-2 zwar an den Rezeptor, bewirkt aber keine Autophosphorylierung und aktiviert den Rezeptor somit nicht. *In vivo* Versuche an Mausembryonen haben gezeigt, dass eine Überexpression von Ang-2 eine Bildung instabiler Gefäße zur Folge hat [15]. Diese äußert sich durch Diskontinuität, Verlust des normalen dendritischen Musters und frühen embryonalen Fruchttod. In unreifem Endothel wird Ang-2 besonders an der Spitze von neuen Gefäßtrieben gebildet. Beim Erwachsenen wird Ang-2 in Endothelzellen an Orten der physiologischen Gefäßneubildung, wie z.B. den Ovarien, der Plazenta und dem Uterus exprimiert.

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Ang-/Tie2-System und dem vascular endothelial growth factor (VEGF). Es wurde festgestellt, dass Ang-2 auf zwei grundlegend unterschiedliche Arten eine Gefäßdestabilisierung verursachen kann: In Abwesenheit von VEGF verursacht Ang-2 eine Regression der Gefäße. Wenn Ang-2 und VEGF gemeinsam exprimiert werden, kommt es hingegen zu Neuaussprossung und Wachstum von Gefäßen [15].

Liegt Tie2 außerhalb des Gefäßsystems vor, z.B. an primitiven hämatopoetischen Zellen oder Fibroblasten, fungiert Ang-2 ebenso wie Ang-1 als Agonist.



**Abbildung 1:**

**Strukturelle Homologie der Angiopoietine (links); Angiogenese und Vaskulogenese werden durch Agonisten (Ang-1, Ang-4) und Antagonisten (Ang-2, Ang-3) am transmembranären Tie2-Rezeptor reguliert (rechts) [10].**

Im Jahr 1999 wurden zwei weitere Mitglieder der Tie2/Angiopoietin-Familie identifiziert: Angiopoietin-3 (Ang-3) in der Maus und Angiopoietin-4 (Ang-4) beim Menschen, die genetisch am gleichen Ort liegen. Ang-3 ist ein Antagonist an Tie2 während Ang-4 als Agonist fungiert [12]. Hohe Konzentrationen von Ang-4 wurden in der menschlichen Lunge gefunden. Dagegen wurde Ang-3 in vielen verschiedenen Geweben der Maus gefunden.

**Unter physiologischen Bedingungen verläuft Angiogenese kontrolliert.**

Die Angiogenese wird durch ein genaues und ausgewogenes Zusammenspiel der einzelnen Komponenten reguliert. Ang-2 bindet an den Tie2-Rezeptor, der im Beisein von VEGF die Entfernung der das Endothel umhüllenden Perizyten oder glatten Muskelzellen induziert. Dadurch sind die Gefäße weniger stabil, sie weiten sich und werden durchlässig. Proteasen und Gewebskomponenten können so aus dem Blut in das umgebende Gewebe austreten. Ang-2 und Proteasen führen zu einer weiteren Destabilisierung und Auflockerung der Gefäße, indem sie die Basalmembran und das interstitielle Gewebe auflösen. Schließlich liegen die Endothelzellen frei, so dass sie durch verschiedene Proangiogenesefaktoren wie VEGF oder PDGF stimuliert werden können. Es findet eine Migration, Proliferation, Zell-/Zellinteraktion und Neuf ormation von Endothezellen zu Gefäßen statt.

Die neuen Gefäße werden dann durch Ang-1/Tie2 und VEGF geschützt, indem diese die Basalmembran stabilisieren und die Umhüllung der Endothelzellen mit Perizyten festigen [7].

### **3.1.2. Rolle der Angiogenese bei benignen Erkrankungen**

#### **Das Ang-2/Tie2-System spielt eine Rolle bei der Entstehung benigner Erkrankungen.**

Basierend auf den Erkenntnissen der Angiogenese-Forschung bei malignen Erkrankungen, wurde in den letzten Jahren vermehrt untersucht, wie das Ang-/Tie2-System zur Entstehung benigner Erkrankungen beiträgt. Je nach Art der Erkrankung kann die Vaskularisierung eines Gewebes erwünscht sein, etwa bei der ischämischen Herzmuskelerkrankung nach einem Myokardinfarkt oder bei der Behandlung der arteriellen Verschlusskrankheit.

Überschießendes Gefäßwachstum kann aber auch Krankheiten verursachen. Die Bildung eines abnormen Gefäßsystems ist bei folgenden benignen Erkrankungen pathognomonisch: Diabetes mellitus, Makuladegeneration, Hämangiomen, Entzündungsreaktionen und Fehlbildungen von Gefäßen [5].

#### **Angiogenese spielt bei Erkrankungen eine Rolle, die durch ein pathologisches Gefäßsystem gekennzeichnet sind.**

Beim Diabetes mellitus sind die Gefäße häufig geschädigt, besonders wenn die Krankheitsdauer lang ist. Die Bestimmung von Ang-2 und VEGF im Plasma von Patienten mit Diabetes mellitus zeigt eine Erhöhung beider Parameter unabhängig davon, ob eine vaskuläre Begleiterkrankung im Rahmen des Diabetes besteht [16]. Ang-1 kommt bei der diabetischen Retinopathie eine Schutzfunktion zu, da es eine Leukozytenadhäsion am retinalen Gefäßsystem und somit seine Schädigung verhindert [8].

Bei Patienten mit Hypertonie ist ebenfalls eine Erhöhung von Ang-1, Ang-2 und VEGF im Plasma zu beobachten [17]. Das korreliert mit der Tatsache, dass bei Hypertonikern eine vermehrte Angiogenese stattfindet.

Auch im Plasma von Patienten mit akutem Koronarsyndrom kann eine Erhöhung von Ang-2, Tie2 und VEGF festgestellt werden. Diese Beobachtung kann darauf hindeuten, dass die Gewebekomponenten eine Rolle bei der Bildung myokardialer Kollateralen nach akutem Koronarsyndrom spielen [18].

Bei Patienten mit arteriovenösen Malformationen im Gehirn ist die Menge von Ang-1 im untersuchten Hirngewebe um 30% geringer als bei Kontrollen, die von Ang-2 dagegen acht Mal höher als bei Gesunden [10].

### **Ang-2 und Tie2 regulieren vaskuläre Permeabilität und Angiogenese bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.**

In einer Studie von Koutroubakis et al. wurden Ang-2 und lösliches Tie2 im Serum von Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn bestimmt. Der Tie2-Rezeptor kann sich von der Zellmembran der Endothelzellen ablösen und ist dann als lösliche Form im Serum mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) messbar. Diese lösliche Form fungiert als natürlicher Inhibitor von Ang-2 und ist somit antiangiogenetisch wirksam [19].

Im Vergleich zu Gesunden finden sich bei Patienten mit beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöhte Ang-2- und Tie2-Werte im Serum. Ein aktives Stadium der Erkrankung geht mit höheren Ang-2 Serumwerten einher als ein Ruhestadium. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass im frühen und aktiven Stadium der Krankheit Ang-2 vermittelt Angiogenese ausgelöst wird, diese aber im späteren Stadium vom antiangiogenetischen, löslichen Tie2 inhibiert wird. Ang-2 und Tie2 korrelieren allerdings nicht mit den etablierten Labormarkern für chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie CRP, Albumin, Leukozytenzahl oder Thrombozytenzahl [19].

### **Ang-2 spielt eine Rolle bei schweren entzündlichen Erkrankungen.**

Orfanos et al. untersuchten, ob Ang-2 eine Bedeutung bei Patienten mit schweren entzündlichen Erkrankungen hat. Es ist allgemein bekannt, dass das Gefäßsystem bei dieser Form von Erkrankungen in Mitleidenschaft gezogen ist. Es wurden die Serumspiegel von Ang-2 bei Patienten mit Sepsis, schwerer Sepsis, septischem Schock, sowie bei Patienten mit und ohne SIRS (severe inflammatory response syndrome) gemessen. Ang-2 ist im Serum von Patienten mit schwerer Sepsis signifikant erhöht, und es besteht ein Zusammenhang zwischen Ang-2 und der Schwere der Erkrankung. Eine leichte Erhöhung ist auch bei Patienten mit SIRS und

Sepsis festzustellen. Serumwerte von Ang-2 stehen in positivem Zusammenhang mit den Entzündungsparametern CRP und Procalcitonin [20].

Ang-2 könnte bei schweren entzündlichen Erkrankungen als prognostischer Faktor dienen, und eine Erhöhung im Verlauf könnte auf eine Verschlechterung der Erkrankung hindeuten.

Durch Studien an Zellkulturen wurde nachgewiesen, dass Ang-2 die Entzündungsreaktion fördert, indem es eine Adhäsion von Monozyten herbeiführt und die Endothelzellen gegenüber TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) sensibilisiert. Mäuse, die kein Ang-2 exprimieren, können keine normale inflammatorische Reaktion aufbauen [20].

Das ARDS (acute respiratory distress syndrome) stellt eine schwere Komplikation im Rahmen der Sepsis dar. Bei dieser Krankheit sind die Gefäße durch eine erhöhte Permeabilität gekennzeichnet. Das führt zum Austritt von Flüssigkeit aus den pulmonalen Kapillaren in die Alveolarsepten und die Luftwege. Die Flüssigkeit behindert den alveolaren Gasaustausch und verringert die Compliance der Lunge. Die Kontraktion des Endothels und somit die vaskuläre Permeabilität werden durch leichte Myosinketten (MLC=myosin light chain) und besonders deren phosphorylierte Form (MLC-p) vermittelt. Die Phosphorylierung wird durch das Enzym Rhokinase katalysiert. Erhöhte Kontraktilität geht mit erhöhter Permeabilität via MLC-p einher. Ang-2 erhöht die Konzentration von MLC-p [21].

Parikh et al. wiesen einen Zusammenhang zwischen dem Ang-2-Spiegel im Serum von Patienten mit Sepsis, der Schwere der Erkrankung und der Entwicklung eines ARDS nach [21]. Ang-2 Werte steigen bei Verschlechterung des Gesundheitszustandes und fallen bei dessen Verbesserung. Zum Zeitpunkt, an dem der Gasaustausch in der Lunge am schlechtesten ist, werden die höchsten Ang-2 Werte im Serum der Patienten beobachtet.

Durch Zugabe eines Serums mit erhöhter Ang-2 Konzentration, das von septischen Patienten stammt, zu HMVEC (human microvascular endothelial cells), vergrößern sich in Kultur die interzellulären Zwischenräume. Dieser Vorgang kann durch Zugabe von Ang-1 rückgängig gemacht werden. Die Behandlung von HMVEC mit rekombinantem Ang-2 führt ebenfalls zu erhöhter Durchlässigkeit des Endothels. Auch dieser Effekt kann durch Zugabe von Ang-1 antagonisiert werden [21]. Durch diese Beobachtungen erhärtet sich der Verdacht, dass Ang-2 über MLC-p zu einer Kontraktion von

Endothelzellen führt, wodurch die interendothelialen Räume erweitert werden und die Gefäßdurchlässigkeit erhöht wird.

Gesunde Mäuse, denen intravenös Ang-2 injiziert wird, entwickeln ARDS-ähnliche Symptome. Die Gefäßpermeabilität in der Lunge ist dreifach erhöht, die in der Leber zweifach [21].

Insgesamt betrachtet können diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass Ang-2 eine Schlüsselrolle bei der Entstehung des ARDS im Rahmen einer Sepsis zukommt. Daher könnte Ang-2 als Marker für eine Verschlechterung der Erkrankung und vermehrte Schädigung der Lunge dienen. Eine therapeutische Reduktion von Ang-2 könnte die Entstehung eines ARDS verhindern oder die Schwere des Krankheitsverlaufes mildern [21].

### **3.1.3. Angiogenese bei Leberzirrhose**

#### **Angiogenese findet bei gutartigen Erkrankungen der Leber statt.**

Allen chronischen Lebererkrankungen ist gemeinsam, dass das Gewebe dauerhaft schädigenden Einflüssen unterliegt. Das führt zu Entzündung, Fibrose und letztendlich zur Zirrhose des Organs. Entzündung und Hypoxie können bekanntermaßen Angiogenese induzieren. Dass diese stattfindet, konnte anhand von histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen mit Endothelzellmarkern bei folgenden Erkrankungen verifiziert werden: Chronische Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion, primär biliäre Zirrhose (PBC), fokal noduläre Hyperplasie (FNH), autoimmune Hepatitis und alkoholtoxische Lebererkrankung [22-26]. Angiogenese und Fibrose in der chronisch geschädigten Leber sind Teil der Wundheilung und der Regeneration.

Die Entstehung eines hochvaskularisierten Gefäßnetzwerkes, das die Regeneratknoten bei der Fibrose und Zirrhose umgibt, kann unter experimentellen Bedingungen durch Leberschädigung mit Diethylnitrosamin nachvollzogen werden [27]. Die Dichte der kleinen Gefäße ist bei Leberfibrose dreimal höher und bei Leberzirrhose siebenmal höher als in einer normalen Rattenleber. Die VEGF-Expression in der zirrhotischen Leber ist mit der Dichte der kleinen Gefäße assoziiert [27].

Hypoxie entsteht in der fibrotischen Leber dadurch, dass der erhöhte Widerstand im Gewebe den Blutfluss erschwert. Es kommt zum „Angiogenic switch“. Hypoxia inducible factor (HIF) führt dann zur vermehrten Bildung von VEGF. Dadurch kommt es zu einer



Erhöhung der vaskulären Permeabilität [26]. Eine VEGF-Produktion kann in der Leber in Sternzellen, Hepatozyten, Kupferzellen und Leukozyten nachgewiesen werden.

Bei entzündlichen Lebererkrankungen herrschen im Gewebe Azidose und Hypoxie. Auch hier stimuliert HIF die Synthese von VEGF. Bei der Entzündung tragen proinflammatorische Eikosanoide wie Cyclooxygenase-2 (Cox-2) zusätzlich zur Angiogenese bei. Ihre Blockade über Cox-2-Hemmer inhibiert Angiogenese in Tierversuchen und beim Menschen [26].

Die PBC ist eine Erkrankung, die unter anderem durch eine chronische Entzündung der Portalfelder gekennzeichnet ist. Bei der PBC finden sich in den sinusoidalen Endothelzellen eine vermehrte Expression von VEGF, Ang-1 und von Ang-2, sowie von deren Rezeptor Tie2 [22]. Diese Substanzen bewirken die Bildung einer erhöhten Anzahl von vaskulären portalen Strukturen.

Rosmorduc et al. zeigten, dass bei einer künstlich induzierten biliären Zirrhose Hypoxie und Angiogenese durch VEGF-Induktion in Zusammenhang stehen. Zwei Wochen nach Obstruktion des Gallenganges traten in 95% der Hepatozyten Hypoxie und eine vermehrte Expression von VEGF auf. Das ging mit einer erhöhten periportalen Endothelzellproliferation einher. Nach sieben Wochen der Obstruktion produzierten 100% der Hepatozyten VEGF, und es entwickelte sich eine biliäre Leberzirrhose [24]. Es ist wichtig hervorzuheben, dass Angiogenese und eine vermehrte VEGF-Expression in dieser Untersuchung bereits vor der Entstehung der Leberzirrhose stattfinden. Diese Feststellung ist besonders im Hinblick auf Angiogenesefaktoren als mögliche Serummarker von großer Wichtigkeit, da sie helfen könnten, die Leberschädigung in einem frühen Stadium auf nicht-invasive Weise zu diagnostizieren.

*In vitro* induziert Hypoxie auch die Kollagen-I-Produktion, wodurch die Fibrogenese der Leber unterstützt wird [27].

Im Serum von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Virusinfektion kann eine Erhöhung von Ang-2 und VEGF festgestellt werden. Nach Therapie mit Interferon alpha und Ribavirin sinken diese Marker ab. Dagegen ist nach Therapie der antiangiogenetisch wirksame lösliche Tie2 erhöht [28]. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass Ang-2 und VEGF bei der chronischen HCV Infektion die Angiogenese fördern und eine Therapie diese wiederum vermindert. Es kann weiterhin eine Korrelation zwischen der Höhe von VEGF im Serum und dem Entzündungsgrad der Leber und eine Assoziation zwischen den erhöhten Angiogenesemarkern und der Höhe der Leberenzyme nachgewiesen werden. Die Serumspiegel der VEGF-

Rezeptoren Flk-1 und Flt-1 sind bei chronischer HCV Infektion ebenfalls erhöht [25]. Die Schädigung der Leber, die durch die chronische Entzündung hervorgerufen wird, spiegelt sich also durch vermehrte Angiogenese wieder. Der Einsatz dieser und anderer Marker könnte daher in Zukunft eine Leberbiopsie zur Feststellung des Schweregrades der Erkrankung unnötig machen.

Hypoxie ist einer der wichtigsten Faktoren, der bei der alkoholtoxischen Lebererkrankung zur Schädigung der Leber beiträgt. Besonders ausgeprägt ist die Hypoxie beim Auftreten von Spitzenwerten von Alkohol im Serum des Patienten [26].

Hinsichtlich der Genese der fokalen nodulären Hyperplasie wird vermutet, dass ihr eine reaktive vaskuläre Malformation zugrunde liegt. Bei der FNH existiert ein charakteristisches morphologisches Gefäßmuster, das sich aus zahlreichen dystrophischen Gefäßen in fibrösen Strängen zusammensetzt. Diese Stränge umgeben Knoten aus regenerativen Hepatozyten. Anhand von quantitativen Genexpressionsstudien konnte eine Beteiligung von Ang-1 und Ang-2 bei der Entstehung der FNH bestätigt werden. Die Expressionshöhe von Ang-1 ist im Vergleich zu anderen Lebererkrankungen signifikant erhöht. Ebenfalls aussagekräftig ist die Ang-1-/Ang-2-Ratio, die bei der FNH im Vergleich zur gesunden Leber und zu anderen Lebererkrankungen spezifisch erhöht ist [23]. Die erhöhte Expression von Ang-1 kann auch das pathologische Gefäßmuster bei der FNH erklären: Ang-1 zieht Perizyten und glatte Muskelzellen an und führt zu unregelmäßiger Verdickung der Gefäßwand und zur Entstehung dystrophischer Gefäße.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Angiogenese bei einer Reihe gutartiger Erkrankungen der Leber eine wichtige Rolle spielt. VEGF ist der am genauesten untersuchte proangiogenetische Faktor, die Angiopoietine lassen noch viel Raum für weitere Forschungen. Der Nachweis, dass sie eine Rolle bei Erkrankungen der Leber mit entzündlicher Komponente spielen, ist jedoch erbracht.

### **3.1.4. Rolle der Angiogenese bei malignen Erkrankungen**

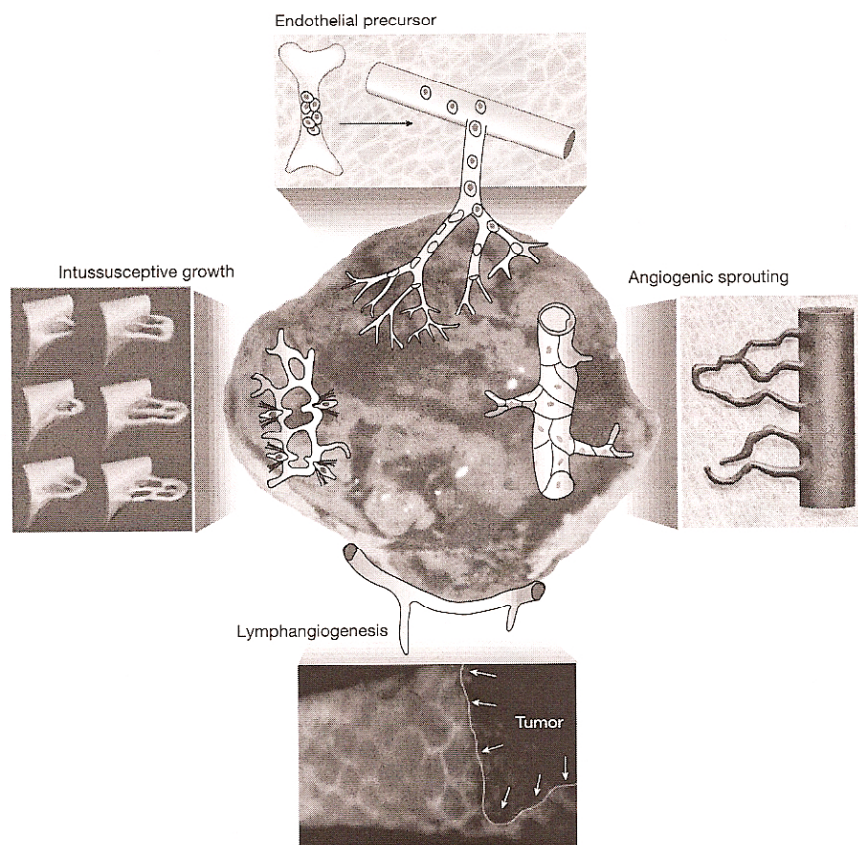
#### **Tumorgefäße unterscheiden sich in einigen Merkmalen von normalen Gefäßen.**

Sie haben schlechtere oder keine Schutzmechanismen und sind deshalb weniger widerstandsfähig z.B. im Bezug auf Veränderungen des Sauerstoffgehaltes oder auf Hormonschwankungen innerhalb des Gewebes. Häufig ist die Auskleidung der Gefäßinnenwand mit Endothelzellen inhomogen, oder sie wird nur von Tumorzellen bzw. einem Mosaik aus beiden Zelltypen gebildet. Das Netzwerk, das die Tumorgefäße bilden, ist desorganisiert, da die Gefäße häufig einen unregelmäßigen Durchmesser haben und sich verzweigen. Es finden sich stark gewundene neben dilatierten Bereichen. Außerdem bestehen oft Kurzschlussverbindungen zwischen einzelnen Gefäßabschnitten. In ihrer Feinstruktur sind sie durchlässig, da die Basalmembran nicht oder nur unvollständig ausgebildet ist. Aus hämodynamischer Sicht ist der Blutfluss unregelmäßig und im Gewebe entstehen Hypoxie und Azidose. Das erschwert einerseits die Therapie, da Medikamente nur in unzureichendem Maße das Tumorgewebe erreichen können. Andererseits werden so besonders maligne und widerstandsfähige Tumorzellen selektiert, die unter den schlechten Bedingungen überleben, welche die unzureichende Vaskularisierung mit sich bringt [6].

Die Instabilität der Tumorgefäße trägt zur Ausbreitung des tumoreigenen Gefäßbettes und somit zum Tumorwachstum bei. Endothelzellen liegen relativ frei im Gewebe und können so besser durch proangiogenetische Stimuli wie z.B. VEGF erreicht werden. Hingegen führt eine erhöhte Stabilität von Gefäßen zu verstärkter Tumornekrose, da die Tumorgefäße nicht so schnell wachsen wie der Tumor und die Blutversorgung so nicht ausreichend ist. Der Begriff „stabile Gefäße“ beschreibt Kapillaren, die eine vollständige Basalmembran besitzen und von einer kontinuierlichen Hülle aus Perizyten umgeben sind [5].

#### **Tumorgefäße weisen verschiedene Wachstumsmechanismen auf.**

Sie können aus bereits existierenden Gefäßen aussprossen oder in vorhandene Gefäße einwachsen. Endotheliale Vorläuferzellen, sogenannte Angioblasten aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut, können in den Tumor einwandern und zum Gefäßwachstum beitragen. Außerdem können Tumorzellen gesunde Gefäße befallen und zu ihrem eigenen Wachstum nutzen [6].



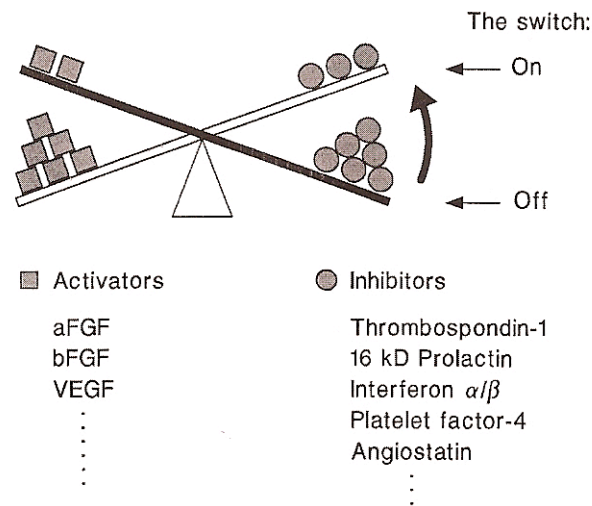
**Abbildung 2:**

**Wachstumsmechanismen von Tumorgefäßen: Einwandern von Angioblasten (oben), Einwachsen in vorhandene Gefäße (links), Aussprossung aus bestehenden Gefäßen (rechts). Den Tumor umgebende Lymphgefäße ermöglichen eine Metastasierung (unten) [6].**

**Die Induktion der Tumorangiogenese wird durch den „Angiogenic switch“ hervorgerufen.**

Dieser Begriff beschreibt die Tatsache, dass sich die Balance zwischen Pro- und Antiangiogenesefaktoren zugunsten der Proangiogenesefaktoren verändert.

### THE BALANCE HYPOTHESIS FOR THE ANGIOGENIC SWITCH



**Abbildung 3:**

**Im ruhenden Gefäßsystem halten sich pro- und antiangiogenetische Stimuli die Waage. Kommt es zum Überwiegen von pro- oder antiangiogenetischen Faktoren, wird der "Angiogenic switch" aktiviert oder inhibiert [29].**

Das Zusammenspiel von Ang-1, Ang-2, Tie2 und VEGF in der Tumorangiogenese unterscheidet sich nicht von den Mechanismen, die unter physiologischen Umständen beim Remodelling oder in der Embryonalentwicklung stattfinden. Eine Bindung von Ang-1 an Tie2 wirkt stabilisierend und antiangiogenetisch auf die Gefäße, indem die Bindung zwischen Endothelzellen und Perizyten, aber auch der Endothelzellen untereinander, gefestigt wird. Ang-2 verursacht in Abwesenheit von VEGF eine Regression der Gefäße. Das führt zu Hypoxie im Tumorgewebe. Dadurch wird vermehrt VEGF exprimiert. In Anwesenheit von VEGF verursacht Ang-2 eine Destabilisierung. Die Gefäßstruktur wird aufgelockert, indem durch Ang-2 die Perizyten von den Endothelzellen entfernt werden. Angiogenese wird letztendlich dadurch hervorgerufen, dass die freiliegenden Endothelzellen zugänglich für Proangiogenesefaktoren werden,

die sie zur Proliferation anregen. Es kommt zur Bildung von Gefäßknospen und schließlich zur Aussprossung neuer Tumorgefäße.

Anders als VEGF haben Angiopoietine aber keinen mitogenen Effekt auf die Endothelzellen, sondern sie sind vielmehr für die Stabilität der Gefäße verantwortlich. Diese Tatsache verdeutlicht die Notwendigkeit der Anwesenheit von VEGF im Tumorgewebe, damit Ang-2 zur Tumorangiogenese beitragen kann. Des Weiteren stellt VEGF einen Überlebensfaktor für die neu gebildeten Tumorendothelien dar. In hohen Konzentrationen wirkt Ang-2 *in vitro* ebenfalls antiapoptotisch auf Endothelien. Auch diese Erkenntnis unterstützt die These, dass VEGF und Ang-2 synergistisch wirken [30].

### **Können frühe Tumorstadien in einem avaskulären Zustand existieren?**

Zu dieser Frage finden sich in der Literatur unterschiedliche Theorien. Laut Tait et al. können solide Tumoren bis zu einer Größe von 2 Millimetern in einem avaskulären Stadium existieren. Danach beginnt mit dem „Angiogenic switch“ die Tumorangiogenese [31]. In dem Artikel von J. Holash et al. wird diese These für Gliome nicht bestätigt [32]. Es wird argumentiert, dass sie auf Beobachtungen in Versuchen basiert, bei denen Tumorzellen in avaskuläres Gewebe wie z.B. die Kornea verpflanzt wurden, oder dass diese Beobachtungen bei Versuchen mit epithelialen Tumoren gemacht wurden, die durch die Basalmembran von den umliegenden Gefäßen isoliert sind. Das Tumorstadium würde bei solchen Versuchen unter künstlich hergestellten Bedingungen statt und entspräche nicht der Realität.

Holash et al. fanden anhand von Untersuchungen an Gliomen, Glioblastomen, mammären Adenocarcinomen und Metastasen eines Lungenkarzinoms der Ratte heraus, dass in den ersten zwei Wochen der Tumorentwicklung noch keine sichtbare Angiogenese stattfindet. Vielmehr okkupiert der Tumor bereits vorhandene Gefäße und nutzt sie somit für sein Wachstum. Die Morphologie der vom Tumor befallenen Gefäße entspricht derjenigen normaler Hirngefäße. In den Endothelzellen der genutzten Gefäße wird in nur zwei Wochen alten Tumoren eine verstärkte Expression von Ang-2 nachgewiesen. Das führt im Zentrum des Tumors in Abwesenheit von VEGF zu einer Regression der Gefäße. Es resultieren ein massiver Untergang von Tumorzellen und Tumornekrose. Am Tumorrand wird eine erhöhte Angiogeneserate beobachtet. Diese geht mit einer gleichzeitigen Expression von Ang-2 und VEGF einher. Die Induktion von VEGF ist hypoxiebedingt. Da aus dieser Studie hervorgeht, dass Ang-2 bereits in sehr

frühen Tumorstadien in okkupierten Gefäßen exprimiert wird, könnte es als einer der frühesten Tumormarker überhaupt dienen.

### **Angiopoietin-2 spielt bei verschiedenen Tumorerkrankungen eine Rolle.**

Im Rahmen der Tumorangiogenese verschiebt sich der Ang-2/Ang-1-Quotient zugunsten von Ang-2. Diese Tatsache betrifft besonders hochvaskularisierte Tumore. Eine Ang-2 Expression wurde sowohl in den Tumorzellen als auch in den Endothelzellen beobachtet. Zu den untersuchten Tumoren zählen u.a. Glioblastom, Mamma- und Bronchialkarzinom. Im Glioblastom erhöhen sich die Ang-2 mRNA Expression mit zunehmender Ausdehnung des Tumors. Beim Mammakarzinom kann eine Erhöhung der Ang-2 Expression festgestellt werden. Eine vermehrte Ang-2 Bildung korreliert mit dem häufigeren Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Im Rahmen der Untersuchung von Bronchialkarzinomen zeigt sich eine Erhöhung von Ang-1, Ang-2 und Tie2 beim NSCLC (non small cell lung cancer). Die Höhe von Ang-2 korreliert mit der Malignität des Tumors und schlechterer Prognose.

Weitere Malignome, bei denen eine Erhöhung von Ang-2 gefunden wird, sind das Ovarialkarzinom, das Prostatakarzinom, das Plattenepithelkarzinom, das Kaposi-Sarkom, das klarzellige Nierenzellkarzinom, alle Malignome der Schilddrüse ausgenommen das vom papillären Typ und die akute myeloische Leukämie [31].

Ang-2 spielt auch bei gastrointestinalen Tumoren eine Rolle. Bei der Untersuchung des Einflusses von Ang-2 auf die Genese des Magenkarzinoms wurde herausgefunden, dass eine hohe Expression von Ang-2 mit häufigerer Gefäßinvasion, fortgeschrittenerem Tumorstadium und kürzerer Überlebenszeit einhergeht. Eine Ang-2-Bildung wurde in Endothelzellen und in Tumorzellen nachgewiesen. Es fand sich ein Zusammenhang zwischen Ang-2 mRNA und schlecht ausgereiften Gefäßen. Mäuse, denen Ang-2 in die Magenwand injiziert wird, entwickeln stark metastasierende, hochvaskularisierte Tumore [33].

Im Tierversuch an Mäusen, denen Zellen eines kolorektalen Karzinoms injiziert wurden, konnte man einen Zusammenhang zwischen Ang-2 Überexpression, erhöhter Wachstumsrate des Tumors, verstärkter Gefäßproliferation und -anzahl sowie erhöhter Metastasierungsrate nachweisen [34]. Anhand dieser Daten wird deutlich, wie Ang-2 die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum generell beeinflusst.

### **3.1.5. Angiogenese beim hepatozellulären Karzinom**

#### **Das hepatozelluläre Karzinom ist ein hochvaskularisierter Tumor.**

Er wird hauptsächlich über arterielle Gefäße mit Blut versorgt, während normales Lebergewebe sowie regenerative und dysplastische Knoten sowohl von den Portalvenen als auch von Leberarterien gespeist werden. Diese Erkenntnisse sind bei kontrastmittelverstärkten radiologischen Verfahren wichtig. Besonders hepatische Malignome vom mäßig und schlecht differenzierten Typ sind durch arterielle Hypervaskularität gekennzeichnet. Ebenso gilt Angiogenese im HCC als Marker für Invasivität und vermehrte Metastasenbildung [35]. Die Gefäßdichte kann einerseits radiologisch erfasst werden, oder die kleinen und kleinsten Gefäße (microvessel) können in Gewebeproben durch bestimmte Marker, wie z.B. anti-CD34 nachgewiesen werden.

Die Rolle von Ang-2 beim hepatozellulären Karzinom wurde mehrfach untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Ang-2-Überexpression alleine die Entwicklung des HCC nicht beschleunigt [30]. Hingegen führt die simultane Expression von Ang-2 und VEGF zu schnellerem Tumorwachstum und verstärkter Angiogenese [30]. Die Entwicklung des Tumors kann durch Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen VEGF gehemmt werden.

Ang-2-Proteine befinden sich im Zytoplasma von Tumorzellen und in angrenzenden Hepatozyten außerhalb des eigentlichen Tumorgewebes [36]. In einer Studie von Mitsuhashi et al. konnte eine Expression von Ang-2 in nur 2% der Zellen im normalem Lebergewebe von 20 Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms festgestellt werden. In 82% kann es im Zytoplasma von HCC-Zellen und in 52% in angrenzenden Hepatozyten bei Patienten mit HCC detektiert werden [37].

Ang-2 kommt häufiger in hypervaskularisierten und schlecht differenzierten HCC vor als in gut differenzierten Tumoren mit weniger stark ausgeprägtem Gefäßnetz [38]. Es wird stärker in den Randzonen des Tumors und in Regionen mit lymphozytärer Infiltration exprimiert als in den zentralen Zonen.

Eine höhere Ang-2-Expression geht mit der Ausbildung von zystischen, blutgefüllten Arealen einher [39]. Dieser Vorgang kann mit der erhöhten Fragilität der Tumorgefäße in Zusammenhang stehen. Eine Übertragung von Ang-2 in eine nicht-metastasierende Zelllinie führt zu aggressivem Tumorwachstum und ausgeprägten Hämorrhagien [35, 38].



Die rezidivfreie Überlebensrate von Patienten mit hohen Ang-2 Werten im Tumor ist kürzer als die von Patienten mit geringerer Expression von Ang-2 [36]. Eine hohe Ang2/Ang1-Ratio ist mit häufigerer Invasion der Portalvene assoziiert, außerdem mit größerem Tumordurchmesser, erhöhter Dichte von „Microvessels“ und einer schlechteren Prognose [37].

Im HCC werden Angiopoietine unabhängig vom Sauerstoffangebot gebildet. VEGF wird dagegen im HCC nur unter hypoxischen Umständen vermehrt gebildet [40].

Festzuhalten ist, dass eine vermehrte Expression von Ang-2 und VEGF im Tumor in positivem Zusammenhang mit Vaskularität und Entdifferenzierung des HCC steht. Ang-2 trägt wesentlich zur Ausbreitung des HCC bei. Daraus resultieren schlechtere prognostische Kriterien für den Patienten aber auch die Möglichkeit, durch eine Ang-2-Messung im Serum die Prognose und Früherkennung dieses malignen Tumors zu verbessern.

### **3.1.6.            Therapeutische Optionen**

#### **Das Verständnis der Angiogenese eröffnet vielfältige Therapieoptionen.**

Die Entwicklung einer antiangiogenetischen Therapie wurde in den letzten 15 Jahren intensiv vorangetrieben. Die ständig neuen Erkenntnisse bezüglich der Physiologie und Pathologie angiogenetischer Vorgänge eröffnen immer mehr Optionen für antiangiogenetische Therapieansätze. Sie zielen auf das Gefäßsystem ab, welches bei den Erkrankungen pathologisch verändert ist, und nicht auf ein spezifisches Tumorgewebe. Von Vorteil ist dabei, dass Endothelzellen ein niedriges mutagenes Potential aufweisen und somit keine wesentliche Resistenzentwicklung gegen antiangiogenetische Substanzen zu erwarten ist. Resistenzen entstehen dagegen häufig bei konventionellen Chemotherapien, weil viele Tumorzellen eine hohe Teilungsrate haben und häufig Mutationen auftreten.

Wenn der „Angiogenic switch“ verhindert würde, könnte die Tumorentwicklung bereits im frühen Stadium inhibiert werden. Mit Hilfe antiangiogenetischer Therapie kann erreicht werden, dass ein Tumor im fortgeschrittenen Stadium nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird. Dadurch werden sein Wachstum und seine Ausbreitung behindert. Durch eine antiangiogenetische Therapie kann ein Rezidiv

verhindert werden, indem Tumorzellen erfasst werden, die nach erfolgreicher Operation im Körper verbleiben und sich mit Hilfe erneuter Angiogenese ausbreiten [29].

Ang-2 gilt als wichtiger Initiator des „Angiogenic switch“. Da es in Tumoren weitaus stärker exprimiert wird als in normalem Gewebe, stellt es einen interessanten Ansatzpunkt zur antiangiogenetischen Therapie von Tumorerkrankungen dar. Mit Ang-2 als Angriffspunkt kann das gesunde Gewebe geschont und das Tumorgewebe gezielt angegriffen werden.

In einer Studie von Oliner et al. wurden Antikörper und Fc-Peptid Fusionsproteine entwickelt, welche die Interaktion zwischen Ang-2 und dem Rezeptor Tie2 neutralisieren [41]. Die Wirkung auf zwei Tumorarten wurde untersucht: Epidermoidzelltumore und kolorektale Tumore, und die Wirkung war nicht tumorspezifisch. Es resultierte eine Stagnation des Tumorwachstums, und bei einigen Versuchstieren kam es sogar unter Langzeittherapie zu einer Verkleinerung des Tumors auf eine nicht mehr messbare Größe. Interessant ist dabei die Feststellung, dass die Ang-2-Inhibitoren das Wachstum von kultivierten Epidermoidtumorzellen *in vitro* nicht hemmen können. Das bestätigt die Annahme, dass die Effekte der antiangiogenetischen Substanzen *in vivo* durch mehrere ineinander greifende Mechanismen der Angiogenese zustande kommen und nicht durch direkte Wirkung auf Tumorzellen. Außerdem kann eine reduzierte Endothelzellproliferation nachgewiesen werden, die im Verlauf zu reduzierter Tumorzellproliferation führt. Resistenzentwicklungen gibt es auch nach Langzeittherapie nicht.

Auch in einem nicht tumorösem Gewebe, der Kornea der Ratte, wird durch eine Blockade der Ang-2-Funktion die VEGF-stimulierte Neovaskularisation gehemmt. Die einzige Nebenwirkung, die hierbei auftritt, ist eine Verdickung der Epiphysenplatte, eine Beobachtung, die auch bei Versuchen mit VEGF-Antikörpern gemacht werden kann. Diese Nebenwirkung betrifft allerdings erwachsene Tiere mit ausgereiftem Skelettsystem nicht [41].

Eine weitere therapeutische Option beruht auf der Erkenntnis, dass Cox-2 die Angiogenese fördern kann. Selektive Cox-2 Inhibitoren können zur antiangiogenetischen Therapie verwendet werden, da sie unter anderem dosisabhängig die hypoxische Induktion von Ang-2 reduzieren. In epidemiologischen Studien wurde herausgefunden, dass NSAID die Entstehung von kolorektalen Tumoren hemmen können [42].

VEGF ist ein wichtiger proangiogenetischer Faktor, dessen Blockade eine weitere Therapiemöglichkeit bietet. Schwartz et al. wiesen nach, dass die Gabe von 5 oder 10mg Bevacizumab pro kg Körpergewicht alle 14 Tage das Wachstum des nicht-metastasierten HCC hemmt [43]. Die Überlebenszeit der betroffenen Patienten verlängerte sich dabei. Voraussetzung für die Therapie mit Bevacizumab, einem rekombinanten, humanen, monoklonalen Antikörper gegen VEGF, ist eine erhaltene Leberfunktion bei bestehender Leberzirrhose und das Fehlen von Ösophagusvarizen.

In einer Phase III Studie wurden Patienten mit Bevacizumab behandelt, die an einem metastasierten kolorektalen Karzinom erkrankt sind. In Kombination mit einer auf Fluouracil basierenden Standardchemotherapie zeigten sich eine erhöhte Überlebensrate und eine Stagnation des Tumorwachstums. Die Ansprechrate auf die Chemotherapie erhöhte sich und die Ansprechdauer im Vergleich zu Standardchemotherapie allein verlängerte sich [44]. Der positive Effekt einer Therapie mit Bevacizumab konnte auch beim Mamma- und Bronchial-Carcinomen nachgewiesen werden [45].

Der Multikinase-Inhibitor Sorafenib hat antiangiogenetische, proapoptotische und Raf-kinase-inhibitorische Eigenschaften. Aus einer randomisierten Phase III Studie (SHARP Studie) mit Sorafenib vs. Plazebo, die 602 Patienten mit fortgeschrittenem HCC einschloß, resultierte ein signifikanter Überlebensvorteil der Patienten, die mit Sorafenib behandelt wurden (10,7 vs. 7,9 Monate) [46]. Die guten Ergebnisse führten zum vorzeitigen Abbruch der Studie und etablieren Sorafenib als Therapie der Wahl bei der Behandlung des HCC.

In einer Arbeit von Huitzil-Melendez et al. wurde gezeigt, dass es unter Therapie mit Sorafenib bei HCC-Patienten mit chronischer HCV-Infektion länger dauert, bis sich der Tumor weiter ausbreitet als bei HCC-Patienten, die unter einer chronischen HBV-Infektion leiden [47]. Erstere profitieren also möglicherweise stärker von der Therapie mit dem Multikinase-Inhibitor.

Bei der Therapie von malignen Tumoren ist es sinnvoll, Therapeutika mit verschiedenen Wirkmechanismen zu kombinieren. Das Wachstum des Malignoms kann so auf verschiedene Arten verhindert werden, und es wird eine größere Angriffsfläche genutzt.

Der Idealvorstellung würde entsprechen, die Ausbreitung des Tumors am Tumorrand z.B. mit Hilfe antiangiogenetischer Therapie zu verhindern. Das Innere des Tumors könnte gleichzeitig mit lokal applizierten Chemotherapeutika oder Radiatio behandelt werden.

Um die Entwicklung antiangiogenetischer Therapieoptionen weiter voranzutreiben, sind Untersuchungen nötig, bei denen die genaue Funktionsweise einzelner Substanzen besser definiert wird.

## **3.2. Das Hepatozelluläre Karzinom**

### **3.2.1. Epidemiologie**

#### **Die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms steigt besonders in den westlichen Ländern.**

Die altersadaptierte Neuerkrankungsrate der Weltbevölkerung variiert zwischen 5.5 bis 14.9 pro 100 000 Einwohner jährlich. In Europa und den USA erkrankten 5 pro 100 000 Einwohner pro Jahr an einem HCC, dagegen erreicht die Inzidenz in manchen Regionen Asiens und Afrikas südlich der Sahara bis zu 500/100 000 pro Jahr. Die großen geographischen Unterschiede in den Erkrankungshäufigkeiten lassen sich im Wesentlichen auf eine höhere Durchseuchungsrate mit Hepatitisviren zurückführen, da sie die Entstehung eines HCC begünstigen. In Asien und Afrika ist das HCC häufiger mit HBV und der Aflatoxin B<sub>1</sub>-Aufnahme assoziiert, in den westlichen Ländern liegt jedoch in den meisten Fällen eine HCV-Infektion oder ein Alkoholabusus vor. Auf der ganzen Welt sind ca. 350 Millionen Menschen mit HBV infiziert. Circa 170 Millionen sind mit HCV infiziert [2]. Das Hepatitis B Virus wird in den Entwicklungsländern oft bereits bei der Geburt oder in den ersten Lebensjahren durch schlechte Hygienestandards übertragen. Das HCC tritt daher bei den Menschen aus diesen Regionen etwa ein bis zwei Dekaden früher auf als bei Patienten aus westlichen Ländern. Dort infizieren sich die Patienten meist erst im Erwachsenenalter mit HBV oder HCV durch Übertragung von Blut- und Blutprodukten oder ungeschützten Geschlechtsverkehr.

In den letzten Jahrzehnten wird zunehmend deutlich, dass die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms auch in Ländern mit niedriger Durchseuchungsrate einer chronischen Virushepatitis weiter zunimmt. Die Inzidenz des HCC stieg in den USA von 1.4 pro 100 000 Einwohner zwischen 1976 und 1980 auf 2.4 pro 100 000 Einwohner zwischen 1991 und 1996 an [48]. Auch die Mortalitätsrate von primären Lebertumoren stieg in den USA an. Im Jahr 1997 starben 2.8 pro 100000 an HCC, 2001 dagegen 4.7 pro 100 000 [1].

Das Hepatitis-C-Virus-assoziierte HCC verzeichnete den höchsten Inzidenzanstieg zwischen 1993 und 1998. Das ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass in den USA zwischen 1960 und 1980 eine HCV-Epidemie ausbrach. Menschen, die damals zwischen 20 und 30 Jahre alt waren, hatten das höchste Erkrankungsrisiko. Eine HCV-Infektion führt in 20 bis 30% der Fälle innerhalb von 20-30 Jahren zu einer Leberzirrhose. Bei diesen Patienten mit HCV-assoziiierter Zirrhose entsteht mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 bis 6% pro Jahr ein HCC. In Europa gehen 63% des Risikos, aufgrund einer chronischen Hepatitis an einem HCC zu erkranken, auf das 1988 erstmals identifizierte Hepatitis-C-Virus zurück.

Basierend auf diesen Daten kann damit gerechnet werden, dass der Gipfel der Erkrankungshäufigkeit HCV-assoziiertes HCC um 2010 erreicht sein wird. Insgesamt werden in Zukunft bis zu 250 HCC-Fälle pro 100 000 Einwohner pro Jahr in den westlichen Ländern erwartet. Ob das tatsächlich der Fall sein wird, hängt auch von anderen Faktoren, etwa der erfolgreichen Behandlung der HCV- und HBV-Infektion, der Schwere der Leberzirrhose und den Möglichkeiten zur Früherkennung eines HCC ab [1].

Aufgrund der weltweiten Verbreitung des HB-Virus ist eine HBV-Infektion die häufigste Ursache für die Entstehung eines HCC. Es kann auf dem Boden einer HBV-assoziierten Leberzirrhose entstehen, vierzig Prozent der HBV-assoziierten HCC entstehen aber in einer nicht-zirrhotosen Leber [49]. Die Wahrscheinlichkeit bei chronischer HBV-Infektion an einem HCC zu erkranken, beträgt 0.5% pro Jahr und steigt mit zunehmendem Alter an. Das Risiko, an einem HCC zu erkranken, kann für Patienten mit chronischer HBV-Infektion 100mal höher sein als bei Gesunden. Wenn eine Zirrhose bekannt ist, steigt die Inzidenz sogar auf 2.5% pro Jahr an. In den USA war der Gipfel der HBV-Infektionen mit 11.5 pro 100000 im Jahr 1985 erreicht [48]. 1992 infizierten sich nur noch 6.3 pro 100000 Einwohner mit dem Virus, so dass eine Abnahme von HBV-assoziierten HCC erwartet werden kann. Insgesamt wird der größte Inzidenzanstieg des HCC in den 90er Jahren verzeichnet.

In Europa und den USA tritt das HCC mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr auf. Mit steigendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit, an einem HCC zu erkranken, da die Leberzirrhose auf dem Boden einer chronischen Hepatitis weiter fortschreitet. Die Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit Leberzirrhose ermöglichen ein längeres Überleben mit dieser Grunderkrankung. Gleichzeitig steigt aber das Risiko der Karzinomentstehung.

Neben geographischen und altersspezifischen Unterschieden sind auch geschlechtsbezogene Unterschiede beim Auftreten des hepatozellulären Karzinoms zu erwähnen. Männer sind dreimal häufiger betroffen als Frauen [1].

Anhand dieser Daten wird deutlich, dass eine Infektion mit HBV und HCV als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines HCC angesehen werden muss. Das konnte auch in einer Studie der medizinischen Hochschule Hannover bestätigt werden. Es wurden die Daten von 268 Patienten mit HCC retrospektiv untersucht. Nicht wie bislang angenommen ist Alkoholabusus und die darauf folgende C2-toxische Leberzirrhose der häufigste ätiologische Faktor für die Hepatokarzinogenese, sondern dass vielmehr in 51.9% eine chronische HBV- oder HCV-Infektion vorliegt. Nur bei 36.1% liegt ein Alkoholabusus als Risikofaktor vor [50]. In den USA sinken Inzidenz und Mortalität der alkoholtoxischen Leberzirrhose seit den frühen 70er Jahren langsam ab. Fünfundvierzig Prozent des Risikos, an einem HCC zu erkranken, gehen dort auf C2-Abusus zurück [51].

Dennoch bleibt der Alkoholabusus ein wichtiger vermeidbarer ätiologischer Faktor bei der Entstehung des HCC. In den USA beträgt die Hospitalisationsrate für HCC bedingt durch alkoholtoxische Leberzirrhose 8 bis 9 pro 100 000 Einwohner pro Jahr [51].

Die Erkenntnis, dass die Inzidenz des HCC weiter ansteigen wird, verdeutlicht die Notwendigkeit, sich mit der Erforschung dieses Tumors intensiv zu beschäftigen, um Früherkennung zu fördern, Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern und die Mortalität zu senken.

### 3.2.2. Pathogenese und Pathologie

**In über 80% der Fälle entsteht ein HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose.**

Die karzinogene Wirkung von HBV beruht vermutlich darauf, dass die HBV-DNA in das Genom des Wirtes integriert wird. Aflatoxin kann eine G- nach T-Mutation am Codon 249 des Tumor-Suppressor-Gens p53 verursachen und somit zur Tumorentstehung beitragen. Eine Exposition gegenüber Aflatoxin B<sub>1</sub> erhöht das Risiko, an einem primären Leberzellkarzinom zu erkranken, um das Dreifache.

HCV-RNA wird dagegen nicht ins Wirts-Genom eingebaut. Wiederholte Reparaturvorgänge in der zirrhotischen Leber können als Ursache für die Entstehung von malignen Zellklonen angesehen werden.

Fünfzehn bis 50% aller Fälle mit HCC lassen sich nicht auf eine virale Hepatitis oder chronischen C2-Abusus zurückführen [1]. Sie entstehen auf dem Boden zahlreicher anderer Grunderkrankungen.

Dazu zählen die Hämochromatose, bei der die jährliche Inzidenz eines HCC 3 bis 4% beträgt,  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel, Tyrosinämie, Autoimmunhepatitis, Morbus Wilson, primäre biliäre Leberzirrhose und primäre sklerosierende Cholangitis. Zu erwähnen sind außerdem Langzeitabusus androgener Steroidhormone und möglicherweise die Einnahme von Östrogenen in Form oraler Kontrazeptiva [49]. Patienten, die gleichzeitig mit einem Hepatitis-Virus und HIV infiziert sind, haben ein weiter erhöhtes Risiko für die Entstehung eines HCC. Außerdem gehen höheres Lebensalter, männliches Geschlecht und Nikotinabusus mit einem erhöhten Risiko einher, an einem primären Leberzellkarzinom zu erkranken.

Ein Faktor, der in jüngster Zeit an Bedeutung zunimmt, ist das Insulinresistenz-Syndrom, welches durch Diabetes mellitus und Adipositas manifest wird [1]. Frauen sind davon häufiger betroffen als Männer. Zuckerkrankheit und Fettleibigkeit können über die Entstehung einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) zu einer Leberzirrhose und schließlich zu einem HCC führen. Insulin und „insulin-like growth factors“ wirken zusätzlich potentiell karzinogen. Einer kryptogenen Leberzirrhose liegt häufig eine NASH zugrunde, die aber retrospektiv oft nicht mehr eindeutig diagnostiziert werden kann, wenn bereits eine Leberzirrhose und eventuell ein HCC vorliegen.

### **Das hepatozelluläre Karzinom zeigt verschiedene Wachstumsformen.**

Es kann als solitärer Knoten vorkommen, in 20 bis 60% wächst es jedoch multizentrisch. Das HCC breitet sich diffus infiltrierend aus [49]. Histologisch wird der Tumor in unterschiedliche Differenzierungsgrade eingeteilt. Man unterscheidet zwischen gut, mäßig und schlecht differenzierten, sowie undifferenzierten Tumoren. Je höher der Differenzierungsgrad, desto besser ist die Prognose und desto weniger aggressiv ist der Tumor.

Anhand von Staging-Systemen können die Patienten in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, bei denen Prognose und Therapieoptionen weitgehend einheitlich sind. Das Okuda-System z.B. berücksichtigt Tumorlast und Leberfunktion. Es existieren außerdem ein japanisches System, ein französisches System, das Cancer of the Liver Italian Program, das Barcelona-Clínic Liver Cancer Staging System und der Chinese University Prognostic Index Score [2]. Bisher wurde noch kein Konsens darüber gefunden, welches Staging-System universell angewendet werden soll.

In dieser Arbeit wurde das TNM-System (Tumor-lymphnode-metastasis-System) verwendet. Dabei wird die Ausbreitung des Tumors bestimmt, die Leberfunktion wird bei diesem System nicht berücksichtigt.

Die Metastasierung des HCC erfolgt frühzeitig, bevorzugt in Lunge, Gehirn, Knochen und Nebenniere [49].



### 3.2.3. Diagnose

**Zur Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms werden hauptsächlich labormedizinische und bildgebende Verfahren verwendet.**

Da der Tumor meist auf dem Boden einer Leberzirrhose oder einer chronischen Lebererkrankung entsteht, ist zunächst eine gründliche Anamnese notwendig, um bereits bestehende Risikofaktoren zu eruieren. Es sollte festgestellt werden, ob bei dem Patienten eine HBV- oder HCV-Infektion vorliegt oder bereits eine Leberzirrhose besteht.

Nach internationalem Konsens sollte bei Patienten mit Leberzirrhose alle 6 Monate eine Ultraschalluntersuchung der Leber und eine Bestimmung des AFP im Serum vorgenommen werden. Das Zeitintervall von 6 Monaten wurde anhand der Tumorverdopplungszeit festgelegt [52]. Mit Hilfe des Screenings von Patienten mit Zirrhose auf das Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms erhofft man sich, den Tumor in einem frühen Stadium zu entdecken und so durch adäquate Behandlung eine Heilung oder eine Verlängerung der Überlebenszeit zu erreichen.

Alpha-Fetoprotein wird primär in der fetalen Leber gebildet. Aber auch die Zellen des hepatozellulären Karzinoms können dieses Glykoprotein bilden. Mehr als 70% der Patienten mit HCC weisen eine erhöhte AFP-Konzentration im Serum auf [53], dagegen produzieren bis zu 20% der Patienten mit HCC kein AFP [53]. In Deutschland gilt ein AFP-Wert bei Erwachsenen von unter 15 µg/l als normal. Wird der Grenzwert von 20 µg/l überschritten, liegt der Verdacht eines HCC nahe.

Patienten mit deutlich erhöhten AFP-Konzentrationen im Serum haben in der Regel einen größeren Tumor, beide Leberlappen sind vom Tumor befallen, es liegt eher ein diffuses Wachstum vor, häufiger ist die Portalvene thrombosiert und die mittlere Überlebensrate muss niedriger veranschlagt werden [53]. Das Ziel eines diagnostischen Tests soll aber sein, einen Tumor eindeutig und in einem frühen Stadium auffindig zu machen. Eine bestimmte Glykoform von AFP geht mit einer schlechteren Prognose einher. AFP kann je nach Bindungskapazität an „lectin lens culinaris agglutin“ (LCA) in drei verschiedene Glykoformen unterteilt werden: AFP-L1, AFP-L2 und AFP-L3. AFP-L3 ist die dominierende Glykoform im Serum von Patienten mit HCC, und es kann bei ca. 35% von Patienten mit einem HCC kleiner als 3cm nachgewiesen werden. Ein hoher Anteil an AFP-L3 korreliert mit einem schlechten Differenzierungsgrad und besonders malignen Tumorkriterien wie der Invasion der

Portalvene. Allein der Nachweis von AFP-L3 kann auf eine schlechtere Leberfunktion, schlechtere Histologie und erhöhter Tumorgröße hindeuten [53].

Bei der Verwendung von AFP in der Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms muss berücksichtigt werden, dass durch seine Bestimmung nicht mit absoluter Sicherheit eine benigne von einer malignen Lebererkrankung unterschieden werden kann. AFP kann auch bei einer akuten oder chronischen Hepatitis im Serum ansteigen. Eventuell ist also die Wahrscheinlichkeit höher, bei Patienten mit nicht-viraler Ätiologie anhand eines erhöhten AFP-Wertes ein HCC zu diagnostizieren.

Sensitivität und Spezifität von AFP variieren stark und sind abhängig vom jeweiligen Grenzwert, der international nicht einheitlich ist. Sherman et al. fanden in drei Studien, in denen die AFP-Bestimmung als Screeningmethode für das HCC verwendet wurde, eine Sensitivität zwischen 39 und 64%, eine Spezifität zwischen 76 und 91% und einen positiv prädiktiven Wert von 9 bis 32% [54]. Diese Werte verdeutlichen, dass es allein durch die AFP-Bestimmung in den meisten Fällen nicht möglich ist, den Tumor eindeutig zu identifizieren.

Sherman geht in einem Artikel sogar so weit zu fordern, AFP als Screeningmethode für das HCC nicht länger anzuwenden, wenn Ultraschall und CT oder MRT zur Verfügung stehen [55]. Durch die zunehmend erfolgreicher werdende Anwendung dieser bildgebenden Verfahren können bereits kleine Tumorknoten erkannt werden. Hohe AFP-Konzentrationen treten bei diesen kleinen Tumoren aber nur sehr selten auf. Die Kombination von AFP und Ultraschall führt häufiger (7.5%) zu falsch-positiven Ergebnissen beim HCC-Screening als der Ultraschall allein (3%). Die Anwendung beider Verfahren erhöht zusätzlich die Kosten [56].

Die AFP-Bestimmung kann den bildgebenden Verfahren überlegen sein, wenn der Tumor so klein ist, dass er sich nicht darstellen lässt, oder wenn er ein diffuses Wachstum und nicht die typische noduläre Struktur aufweist. Treten diese beiden Fälle ein, ist eine kurative Therapie aber ohnehin nicht möglich und somit kein klarer Vorteil durch die AFP-Bestimmung entstanden.

Der Stellenwert der AFP-Bestimmung sollte daher weniger hoch gesehen werden und hauptsächlich zur Überwachung von Hochrisikopatienten eingesetzt werden, wenn bereits ein Leberrundherd gesichert ist oder wenn ein Rezidiv vermutet wird.

Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie (MRT) sind etablierte Mittel zur Diagnose des HCC. Bewährt haben sich besonders kontrastmittelverstärkte Verfahren. Dabei macht man sich die vaskulären Eigenschaften

des HCC zu Nutze. Es wird in erster Linie von der Leberarterie mit Blut versorgt und reichert daher in der arteriellen Phase, d.h. in den ersten 2 bis 40 Sekunden nach Applikation, Kontrastmittel an. Das normale Leberparenchym reichert bevorzugt in der portalvenösen Phase Kontrastmittel an. Dabei stellt sich das HCC kontrastmittelarm dar. Bei einem so genannten triphasischen CT werden drei Aufnahmen angefertigt: eine ohne Kontrastmittel, dann wird Kontrastmittel gegeben, und es erfolgt eine Aufnahme in der arteriellen, der portalvenösen und der venösen Phase. Dieses Verfahren ist weit verbreitet und lässt sich auch mit einer MRT und dem entsprechenden Kontrastmittel durchführen. In der MRT stellt sich das HCC ohne Kontrastmittel in T1 hypointens, in T2 hyperintens dar.

Die Diagnose „hepatozelluläres Karzinom“ gilt als gesichert, wenn sie durch Feinnadelbiopsie bestätigt wurde. Die Rate der falsch-negativen Ergebnisse bei diesem Verfahren beträgt jedoch zwischen 30 und 40 Prozent. Mit einer Stichkanalmetastasierung muss in 1 bis 2% gerechnet werden. Die Biopsie wird meist unter radiologischer Kontrolle durchgeführt.

Außerdem gilt die Diagnose des HCC als gesichert, wenn zwei unterschiedliche bildgebende Verfahren einen Rundherd in der Leber darstellen, der größer als 2cm ist und der eine arterielle Hypervaskularisation aufweist, oder wenn ein bildgebendes Verfahren diesen Hinweis gibt und zusätzlich die AFP-Konzentration im Serum höher als 400µg/l ist [2].

Besonders Tumoren, die kleiner als 10mm sind, werden zu 20-30% nicht anhand bildgebender Verfahren diagnostiziert, sondern erst intraoperativ festgestellt. Daher ist wie oben erwähnt die Verwendung verschiedener Verfahren sinnvoll, um den Tumor so früh wie möglich zu erkennen und Sensitivität und Spezifität zu erhöhen.

Eine extrahepatische Ausbreitung des HCC wird anhand von Thorax-CT und Skelettszintigraphie verifiziert.

### 3.2.4. Screening und Prävention

#### **Prävention und Früherkennung des HCC sind von besonderer Bedeutung.**

Der Tumor ist schwierig zu therapieren, und die Rezidivraten sind hoch. Früherkennung kann meist nur in den reicheren Ländern ermöglicht werden, da sie teilweise kostenintensiv ist und besondere Geräte wie z.B. Ultraschall oder ein medizinisches Labor zur Verfügung stehen müssen. Prävention spielt daher eine besondere Rolle, um die Inzidenz des HCC zu senken. Da die Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC hinreichend bekannt sind, ist eine primäre Prävention sehr gut möglich.

In Afrika und Asien muss zur Prävention des HCC besonders die Ausbreitung von HBV verhindert werden, und die Kontamination von Lebensmitteln mit Aflatoxin B<sub>1</sub> durch bessere Aufbewahrungsmöglichkeiten muss eingeschränkt werden. In den westlichen Ländern und in Japan ist HCV und dessen Ausbreitung ein wesentlicher ätiologischer Faktor. Durch diätetische Maßnahmen und Änderung der Lebensgewohnheiten können der Missbrauch von Nikotin, Alkohol und die Entstehung von Adipositas eingeschränkt werden, welche ebenfalls Ursachen für die Entstehung eines HCC darstellen. Screening von Blutprodukten auf Hepatitis und HI-Viren und das praktizieren von „safer sex“ führt zu einem Rückgang der Neuinfektionen mit HBV und HCV in den Industrienationen. Auch die Impfung von Neugeborenen gegen HBV wird von der STIKO (ständige Impfkommission) empfohlen.

In Taiwan wurde 1984 ein HBV-Impfprogramm gestartet, bei dem alle Neugeborenen des Landes erfasst werden sollten. Daraufhin sank die Rate von HBV-infizierten Jugendlichen von 7 auf 0.7%. Es wird erwartet, dass die Inzidenz des HCC in Taiwan innerhalb von drei bis vier Jahrzehnten um 80% absinkt [57].

In den ärmsten Ländern dieser Welt stellen Impfung und Überprüfung von Blutprodukten auch ein finanzielles Problem dar. Jährlich erhalten 25 Millionen Neugeborene keine Impfung gegen HBV. In den Entwicklungsländern sind bis zu 45% der Blutkonserven nicht auf Hepatitis und HIV getestet [57].

Auch das Risiko der Entstehung eines HCC durch Exposition mit Aflatoxin kann vermindert werden. Die antischistosomal Substanzen Oltipraz und Chlorophyllin können die Wirkung von bereits aufgenommenem Aflatoxin hemmen, indem sie in seinen Metabolismus eingreifen. Eine Exposition mit Aflatoxinen erhöht die Inzidenz für HCC bei Personen mit chronischer HBV-Infektion zusätzlich. Die mittlere toxische Dosis

des von *Aspergillus flavi* produzierten Toxins für den Menschen beträgt 132µg/kg KG pro Tag [57].

Eine weitere Möglichkeit der Prävention stellt die Verzögerung des Fortschreitens einer Leberzirrhose dar. Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung profitieren von Alkoholabstinenz. Patienten mit chronischer Hepatitis können von einer Behandlung mit Interferon alpha profitieren. Interferon Alpha hat antivirale, antiinflammatorische und antiproliferative Eigenschaften. Bei ca. 50% der Patienten mit HCV-Infektion kann die Entwicklung einer Zirrhose durch eine Therapie mit Interferon verhindert werden [2]. Eine chronische HBV-Infektion kann mit Polymeraseinhibitoren wie Lamivudin oder Adefovir oder mit Interferon alpha behandelt werden. Das Potential von Interferon, die Entstehung von HCC bei Patienten mit LZ zu verhindern muss jedoch noch weiter untersucht werden.

### **3.2.5. Therapie**

**Bei der Therapie des hepatozellulären Karzinoms lassen sich kurative und palliative Methoden unterscheiden.**

Welcher Ansatz gewählt wird ist abhängig vom Tumorstadium, vom allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten und insbesondere von der Leberfunktion bei bestehender Leberzirrhose. Zu den kurativen Therapien zählen Resektion, Lebertransplantation (LTX) und perkutane Ablationsverfahren. In nur 10% der Fälle kann jedoch eine kurative chirurgische Therapie in Erwägung gezogen werden. Eine Resektion kommt in den westlichen Ländern nur bei 5% der Patienten mit HCC in Frage [58]. Die Resektion ist das Verfahren der Wahl für Patienten mit noch ausreichender Leberfunktion im Stadium Child A. Außerdem sollte ein solitärer Tumorherd vorliegen. Bei strenger Indikationsstellung kann durch Resektion des Tumors eine 5 Jahres Überlebensrate von über 70% erreicht werden. In 10-15% findet jedoch ein präoperatives „Understaging“ statt [52]. Daher tritt in 70-80 % der Fälle innerhalb von 5 Jahren nach Resektion ein Rezidiv bzw. ein neues HCC auf.

Durch eine Transplantation können Leberzirrhose und Tumor gleichzeitig geheilt werden. Sie sollte besonders bei allen Patienten mit einem HCC in Zirrhose angestrebt werden. Ob eine LTX als Therapie in Frage kommt, wird nach den Milan-Kriterien

beurteilt. Danach ist eine Transplantation sinnvoll, wenn ein solitäres HCC von bis zu 5cm vorliegt oder wenn drei Tumorknoten, die jeweils kleiner als 3cm sind, vorliegen. Werden diese Kriterien erfüllt, können eine 5 Jahres Überlebensrate von bis zu 70% und eine Rezidivrate kleiner als 15% erreicht werden [2]. Eine Gefäßinvasion stellt den wichtigsten Faktor für Überleben und Rezidiv dar. Ein kritischer Punkt bei der LTX ist aber die Knappheit der Spenderorgane.

Perkutane Therapieverfahren sind besonders bei nicht resektablen, frühen HCC-Stadien Erfolg versprechend. Durch Applikation von 95prozentigem Alkohol in den Tumor kommt es zur Denaturierung von Proteinen und zur Thrombose kleinster Gefäße. Es werden Ansprechraten von bis zu 100% bei einem HCC kleiner als 2cm, 70% bei einer Tumorgröße von 3cm und 50% bei einer Tumorgröße von 5cm erreicht. Die 5 Jahres Überlebensrate, die durch Ethanolinjektion erzielt werden kann, beträgt bis zu 50%. Das Verfahren ist billig, einfach anwendbar und sehr gut verträglich. Dennoch können direkt nach der Therapie Schmerzen und Vergiftungserscheinungen auftreten. Einige Tage später kann der Patient aufgrund des Zerfalls nekrotischen Tumorgewebes Fieber entwickeln.

Bei der Radiofrequenzablation wird mit Wärme eine Koagulationsnekrose des Tumors verursacht. Hepatozelluläre Karzinome bis zu einer Größe von 5cm können in einer Sitzung zerstört werden. Es wird eine 1cm größer Ablationsring um den Tumor herum hergestellt, um Satellitentumore zu erreichen. Eine komplette Tumornekrose kann in bis zu 90% der Fälle ausgelöst werden. Die 5 Jahres Überlebensrate bei diesem Verfahren beträgt jedoch nur 33-40%. Das Ansprechen des Tumors auf die Therapie wird nach einem Monat mittels CT verifiziert. Nimmt der Tumor kein Kontrastmittel mehr auf, gilt das als Beweis dafür, dass er zerstört ist. Bei der Radiofrequenzablation treten häufiger Nebenwirkungen auf und das Verfahren ist teurer als die Ethanolinjektion. In fast 10% kommt es zu pleuraler Effusion und Hämoperitoneum [52]. Außerdem besteht die Gefahr der Stichkanalmetastasierung.

Ein weit verbreitetes palliatives Verfahren ist die transarterielle Chemoembolisation (TACE). Die TACE ist die einzige nicht-kurative Therapieform, für die eine verlängerte Überlebenszeit nachgewiesen wurde [52]. Sie dient der Therapie von großen, nicht-resektablen hepatozellulären Karzinomen. Die Tumormasse wird reduziert, und die Ausbreitung des Tumors wird verzögert. Es wird ein Gemisch aus einem Chemotherapeutikum, z.B. Doxorubicin oder Cisplatin und Lipiodol in den Gefäßast injiziert, welcher den Tumor versorgt. Lipiodol ist ein öliges Kontrastmittel, das zur

intratumoralen Retention des Chemotherapeutikums führt. Danach wird das Gefäß mit Hilfe von Gelschaum oder anderen Agenzien verschlossen. Das Resultat ist wie bei der Radiofrequenzablation eine Tumornekrose. Die Vorteile der TACE liegen darin, dass eine hohe Konzentration des Chemotherapeutikums am Tumor erreicht wird und dieses mit maximaler Verweildauer in direktem Kontakt mit den Tumorzellen verbleibt.

Sorafenib und Bevacizumab haben sich in Phase III Studien zur Therapie des HCC als geeignet erwiesen [43, 46].

Systemische Chemotherapien des HCC haben sich als wenig effektiv erwiesen, da die Nebenwirkungen schwer sind und das Überleben nicht verlängert wird. Der Stellenwert der Strahlentherapie ist unklar.

### **3.3. Leberzirrhose**

#### **Leberzirrhose und HCC stehen in engem Zusammenhang.**

Unter einer Leberzirrhose versteht man die irreversible chronische Schädigung des Lebergewebes unterschiedlicher Ätiologie mit folgender Fibrose und Ausbildung von regenerativen Knoten. Die normale Läppchen- und Gefäßstruktur ist nicht mehr vorhanden. Das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch Leberinsuffizienz, portale Hypertension und Bildung intrahepatischer, portoportal- und portosystemischer Shunts.

#### **3.3.1. Epidemiologie**

**Die Inzidenz der Leberzirrhose in Europa und den USA beträgt etwa 250 pro 100 000 Einwohner pro Jahr.**

Männer sind zweimal häufiger betroffen als Frauen [59]. Im Jahr 1998 starben in den USA 25 000 Personen an den Folgen einer Leberzirrhose, 373 000 Patienten mussten aufgrund einer Zirrhose in diesem Jahr stationär behandelt werden [59]. In Deutschland wurden im Jahr 2005 etwa 21 600 Patienten aufgrund einer Leberzirrhose in einem Krankenhaus behandelt [60].

#### **3.3.2. Ätiologie**

**Eine Leberzirrhose kann auf dem Boden vieler verschiedener Grunderkrankungen und chronischer Schädigungen der Leber entstehen.**

In Europa und den USA ist chronischer Alkoholabusus mit circa 60% der häufigste Grund für die Entstehung einer Leberzirrhose [59]. An zweiter Stelle der ätiologischen Faktoren stehen mit etwa 30% Infektionen mit HBV, HCV und HDV. Die restlichen 10% setzen sich aus zahlreichen anderen ätiologischen Faktoren zusammen. Dazu gehören, z.B. NASH, primäre biliäre Leberzirrhose, autoimmune Hepatitis, Hämochromatose, Morbus Wilson, medikamententoxische Leberschäden, Budd-Chiari-Syndrom und kardiale Leberzirrhose.



### 3.3.3. Klinik

**Der Allgemeinzustand des Patienten mit Leberzirrhose ist eingeschränkt.**

Häufig treten Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Leistungsminderung, Anorexie oder Gewichtsverlust auf. Patienten können über Druckgefühl im Oberbauch, Übelkeit und Meteorismus klagen. Bei der Inspektion der Kutis fallen Lebezeichen auf. Diese Zeichen sind allerdings nicht krankheitsspezifisch. Bei der körperlichen Untersuchung kann eine höckrige Leberoberfläche und feste Konsistenz der Leber palpirt werden, eventuell auch eine Splenomegalie. Die Ausbildung eines Caput medusae auf der vorderen Bauchwand ist ein Zeichen für portale Hypertension. Im dekompensierten Stadium macht sich die eingeschränkte Leberfunktion anhand der Symptome Ikterus, Aszites, Blutung aus Ösophagusvarizen, SBP (spontane bakterielle Peritonitis) und hepatische Enzephalopathie bemerkbar [59].

### 3.3.4. Diagnose

**Schweregrad und Ätiologie einer Leberzirrhose lassen sich durch radiologische, histologische und klinische Verfahren ermitteln.**

Aus der Kenntnis über Art und Schweregrad der Schädigung des Lebergewebes resultieren therapeutische und weitere diagnostische Maßnahmen, sowie ein Hinweis auf die Prognose der Erkrankung.

Eine invasive Methode ist die Feinnadelbiopsie der Leber, anhand derer die Schwere der Lebererkrankung und manchmal auch deren Ätiologie diagnostiziert werden kann. Besonders Hämochromatose, Morbus Wilson, Alpha-1-Antitrypsinmangel und NASH weisen eine spezifische histologische Morphologie auf. Die Sensitivität einer Biopsie bei der Diagnose einer Leberzirrhose beträgt zwischen 80 und 100% [59] und ist abhängig von dem gewählten Verfahren und der Menge des gewonnenen Gewebes. In weiter fortgeschrittenen Stadien der Leberzirrhose ist die Komplikationsrate nach einer Biopsie erhöht.

Es existieren auch einige nicht-invasive Marker, die auf das Vorliegen einer Leberfibrose hindeuten. Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten Markern der Leberfibrose: Direkte Marker basieren auf biochemischen Parametern, die direkt mit

der Fibrogenese in Zusammenhang stehen. Dazu gehören z.B. Hyaluronsäure, Laminin und Typ IV Kollagen.

Eine Kombination dieser direkten Marker kann in Abhängigkeit von der Ätiologie der Fibrose die diagnostische Genauigkeit erhöhen. Von Nachteil ist, dass diese Marker nicht in allen Krankenhäusern zur Verfügung stehen und somit im klinischen Alltag nicht routinemäßig eingesetzt werden können.

Als indirekte Marker bezeichnet man verschiedene Parameter, die mit dem Stadium der Leberfibrose korrelieren. Dazu gehört der „AST to platelet ratio index“ (APRI), welcher die Diagnose einer Leberzirrhose ermöglicht. Die AUC (area under the curve), die durch den APRI-Score in verschiedenen Studien erreicht wird, reicht von 0.77 bis 0.94. Werden ALT (Alanin-Amino-Transferase) und INR (international normalized ratio) zusätzlich zu den Parametern des APRI-Scores bestimmt, kann die Genauigkeit des Tests bei der Diagnose einer Zirrhose weiter erhöht werden.

Der Fibrotest besteht aus einer Kombination von Messwerten verschiedener Parameter im Blut. Dazu gehören:  $\gamma$ -GT (Gamma-Glutamyltranspeptidase), Bilirubin, Haptoglobin, Apolipoprotein A1 und  $\alpha$ 2-Makroglobulin. Durch den Fibrotest lassen sich vor allem leichte von schweren Formen der Leberfibrose unterscheiden. Durch Kombination mehrerer indirekter Marker kann eine diagnostische Genauigkeit von 90-95 % erreicht werden, so dass weniger häufig eine Leberbiopsie angewendet werden muss [61].

Unter den radiologischen Verfahren in der Diagnostik der Leberzirrhose ist die Sonographie am weitesten verbreitet und am besten etabliert. Mit Hilfe der Sonographie können auch Komplikationen der Leberzirrhose wie Aszites, Splenomegalie, erhöhter Durchmesser der Portalvene bei portaler Hypertension, Portalvenenthrombose und HCC diagnostiziert werden.

Allerdings sollte die Sonografie der Leber von einem erfahrenen Untersucher vorgenommen werden, da insbesondere die Unterscheidung von benignen und malignen Knoten sehr schwierig ist und nur Geübten gelingt. Hilfreich kann die Verwendung von Kontrastmitteln in der Sonographie sein.

Mit einer neueren sonographischen Methode, dem „Fibroscan“, kann anhand der Ausbreitung einer elastischen Welle die Steifheit des Lebergewebes gemessen werden, welche mit fortschreitender Fibrose zunimmt und somit einen Hinweis auf den Schweregrad der Erkrankung geben kann. Aus einer Studie mit 711 Patienten resultiert eine AUC von 0.8 für die Diagnose einer Fibrose und von 0.98 für die Diagnose einer Zirrhose [62]. Bisher liefert der „Fibroscan“ die besten Ergebnisse bei der

Unterscheidung zwischen Patienten mit Zirrhose und solchen, die bei einer chronischen Lebererkrankung noch keine Zirrhose entwickelt haben [63]. Die Methode kann außerdem zur Überwachung des Therapieerfolges bei HCV-Patienten angewendet werden, die eine antivirale Therapie erhalten [64].

Mit Hilfe der MRT lassen sich besonders gut Eisenablagerungen in der Leber darstellen, was der Diagnose der Hämochromatose dienen kann. Das Angio-MRT ermöglicht es festzustellen, ob eine Portalvenenthrombose vorliegt.

Eine Möglichkeit, den Schweregrad einer Leberzirrhose zu definieren, ist die Einteilung nach den Child-Pugh-Kriterien, die auch in dieser Arbeit verwendet werden. Dabei werden klinische und laborchemische Parameter berücksichtigt: Albumin im Serum, Bilirubin im Serum, Quick, Aszites und Enzephalopathie.

**Tabelle 3-1:**

**Einteilung des Schweregrades einer Leberzirrhose nach den Child-Pugh-Kriterien anhand klinischer und laborchemischer Parameter [65].**

<b>Klinische und biochemische Parameter</b>	<b>Punkte für den Grad der Abweichung vom Normalwert</b>		
	1	2	3
Grad der Enzephalopathie*	Keine	1 und 2	3 und 4
Aszites	Abwesend	Leicht	Mittelgradig
Bilirubin (mg, pro 100 ml)	1-2	2-3	>3
Albumin (g, pro 100 ml)			
Prothrombinzeit (Verlängerung in Sek.)	1-4	4-6	>6
Für primäre biliäre Zirrhose: Bilirubin (mg, pro 100 ml)	1-4	4-10	>10

\* Nach der Einteilung von Trey, Burns und Saunders (1966)

### **3.3.5. Therapie**

**Die Therapie der Leberzirrhose setzt sich abhängig von der Grunderkrankung aus allgemeinen und speziellen Maßnahmen zusammen.**

Es gibt keine spezifische Therapie für die Leberzirrhose, sondern es müssen die zugrunde liegende Erkrankung und deren Symptome behandelt werden. So kann versucht werden, ein Fortschreiten der Krankheit und die Entstehung eines HCC zu verhindern.

Außerdem müssen die Komplikationen der Leberzirrhose wie Ösophagusvarizen, Aszites, SBP, etc. behandelt werden, wenn sie auftreten.

Die Möglichkeit der Lebertransplantation kann im Stadium Child B und C in Betracht gezogen werden.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Studiendesign**

**Die Rolle von Angiopoietin-2 und Alpha-Fetoprotein beim hepatozellulären Karzinom und bei der Leberzirrhose wurde in einer retrospektiven Kohortenstudie untersucht.**

Die Studienpopulation bestand aus drei Kohorten: 131 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom, 180 Patienten mit Leberzirrhose ohne Nachweis eines HCC und 40 gesunden Probanden. Es sollte erforscht werden, ob Angiopoietin-2 und Alpha-Fetoprotein im Serum dieser Patienten erhöht sind und wie sie sich in Abhängigkeit von der Schwere und dem Stadium der Erkrankung verhalten. Aus den Patientenakten wurden zu diesem Zweck Daten erhoben, welche die Einteilung der Krankheit ermöglichen. Hierzu zählten das Tumorstadium, das histologische Grading und das Child Stadium. Anschließend wurden Angiopoietin-2 und Alpha-Fetoprotein im Serum der Patienten mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden statistisch ausgewertet.

### **4.2. Patienten**

**Patienten mit HCC oder Leberzirrhose und Gesunde bildeten die drei Kohorten der Studie.**

Von insgesamt 131 archivierten Fällen mit HCC, von denen Serumproben zur Verfügung standen, konnten in 93 Fällen Patientenakten eingesehen und Daten zur genaueren Untersuchung von Ang-2 z.B. bezüglich der Tumorkriterien erhoben werden. Die Diagnose des hepatozellulären Karzinoms basierte bei den einzelnen Patienten auf eindeutigen CT- oder MRT-Bildern, histologischen Befunden und erhöhten AFP-Serumwerten. Bei der Datenerhebung wurden das Tumorstadium und das histologische Grading ermittelt. Außerdem wurden Datum und Art der Therapie des Tumors erhoben. Auch die Grundkrankheit, aus der häufig eine Leberzirrhose, und dann ein HCC resultierten, floss in die Datensammlung ein. Dabei handelte es sich um Alkoholabusus, Virushepatitis, kryptogene Leberzirrhose, Hämochromatose, primäre sklerosierende Cholangitis und Alpha-1-Antitrypsinmangel. Das Child-Pugh-Stadium zur Einteilung des Schweregrades der Leberzirrhose wurde ebenfalls dokumentiert.

Im Folgenden wird die Kohorte mit hepatozellulärem Karzinom detailliert beschrieben: Von den 93 Patienten mit HCC waren 20 weiblich und 73 männlich. Der Alters-Median lag bei 65 Jahren, der jüngste Patient war 44, der älteste 82 Jahre alt.

Insgesamt hatten 97.8 % der Patienten eine Leberzirrhose, davon 44 im Stadium Child A. In 26 Fällen lag ein Stadium Child B und 11 Fällen ein Stadium Child C vor. Bei 12 Personen konnten keine Child-Pugh-Kriterien erhoben werden.

Bei dem größten Teil der Patienten (n=39) war die Ursache der Leberzirrhose eine chronische HCV-Infektion. Andere Ursachen waren Alkoholabusus (n=23) oder chronische HBV-Infektion (n=16). Zu den selteneren Grundkrankheiten gehörten kryptogene Leberzirrhose (n=5), Hämochromatose (n=2), primäre sklerosierende Cholangitis (n=1) und Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (n=1). Bei sechs Patienten wurde keine Ursache der Leberzirrhose dokumentiert.

Die Einteilung des Tumors nach dem TNM-System konnte in 88 Fällen vorgenommen werden. Dazu dienten die vorliegenden Patientenakten. Die Tumorgöße (T) vor Beginn einer Therapie oder einer Lebertransplantation, bzw. die postoperativ durch histologische Aufarbeitung ermittelte Größe des Tumors waren dabei von Interesse. Bei 13 Personen lag ein HCC im Stadium T1 vor. Sechszwanzig Patienten hatten einen Tumor im Stadium T2, 29 Personen einen Tumor im Stadium T3. Bei 10 Patienten hatte das Malignom bereits das Stadium T4 erreicht. In 5 Fällen lieferten die Akten keine Informationen über die Tumorgöße.

Die Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Metastasen (M) gingen aus den Unterlagen in den meisten Fällen nicht hervor und wurden daher in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Das histologische Grading lag in 57 Fällen vor. Sechs Patienten hatten einen Tumor Grad 1 (gut differenziert). Bei 35 Patienten lag ein Grad 2 (mäßig differenziert) und bei 16 Patienten lag ein Grad 3 (schlecht differenziert) vor.

Eine weitere Kohorte bestand aus 180 Patienten mit Leberzirrhose. Bei ihnen lag kein Hinweis auf das Bestehen eines hepatozellulären Karzinoms vor.

Die Gruppe bestand aus 108 Männern und 72 Frauen. Der Median lag bei 57 Lebensjahren. Die jüngste Person war 30, die älteste 79 Jahre alt.

Sechzig Patienten hatten eine Leberzirrhose im Child-Pugh-Stadium A. Bei 65 Personen lag ein Stadium B und bei 55 Personen ein Stadium C vor.

In dieser Kohorte wurden ebenfalls die möglichen Ursachen für die Entstehung einer Leberzirrhose identifiziert. Bei 49 Fällen entstand die Zirrhose auf dem Boden von chronischem Alkoholabusus. In 44 Fällen war die Ursache eine chronische HCV-Infektion, bei 38 Personen war es eine chronische HBV-Infektion. Bei 19 Patienten konnte als Ursache eine primäre biliäre Leberzirrhose festgestellt werden. Zu den selteneren Gründen für eine Zirrhose gehörten bei 16 Personen eine autoimmune Hepatitis, und bei 14 Personen eine kryptogene Leberzirrhose.

Die Kontrollgruppe fügte sich aus 40 gesunden Probanden zusammen. Sie waren Studenten und Labormitarbeiter der Klinik, die sich dazu bereit erklärten, eine Serumprobe zur Bestimmung von Ang-2 und AFP abzugeben.

#### **4.2.1. Verläufe**

##### **Angiopietin-2 und Alpha-Fetoprotein wurden bei 4 Patienten im Verlauf der Erkrankung beobachtet.**

Es wurden 4 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom identifiziert, deren Seren über einen Zeitraum von bis zu zehn Jahren in der Serumbank der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Virchow Klinikums Berlin verfügbar waren. Ang-2 und AFP wurden im Verlauf und in Abhängigkeit von therapeutischen Maßnahmen untersucht.

Im Folgenden werden diese Patienten näher beschrieben, und mit A bis D bezeichnet. Patient A wurde 1945 geboren. Es standen 13 Proben als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Im Juli 2002 wurde aufgrund eines HCC (T4, G1) eine Leberteilresektion vorgenommen. Der Zeitraum, in dem die Proben abgenommen wurden, erstreckte sich von Mai 1995 bis September 2004. Bei diesem Patienten lag als Grunderkrankung eine HCV-induzierte Leberzirrhose im Stadium Child B vor.

Über den längsten Zeitraum, von Juni 1995 bis Juni 2005, konnten Proben von Patient B des Jahrgangs 1937 untersucht werden. In diesem Fall eines HCC im Stadium T2, G2 wurden im November 1994 eine Leberteilresektion, und im Juli 1995 eine Lebertransplantation als therapeutische Maßnahme ergriffen. Es lag eine HCV-induzierte Leberzirrhose im Stadium Child A als Grunderkrankung vor.

Bei Patient C, geboren 1937, wurde im Rahmen der Tumorthherapie (Stadium T2, G2) im Jahr 2003 ein Afterloading, und 2005 eine Lebertransplantation durchgeführt. Im Verlauf konnten die Seren von 2001 bis 2005 untersucht werden. Als Grundkrankheiten wurden eine chronische HCV-Infektion und eine Leberzirrhose im Stadium Child A identifiziert.

Insgesamt 9 Seren mit Abnahmedaten zwischen Juli 1997 und Mai 2003 waren für Patient D, geboren 1950, verfügbar. Der Patient hatte ein HCC im Stadium T3, G2 und im Endstadium der Erkrankung eine HBV-induzierte Leberzirrhose Child C. Als therapeutische Maßnahme waren im August 2001 und im März 2002 eine Leberteileresektion vorgenommen worden.



Patient Nr.	Geb. Datum	Grunderkrankung	Child	T	G	Therapie	Abnahme des Serums
A	1945	HCV LZ	B	4	1	LTR 07/2002	05/1995 06/1996 07/1997 10/1998 11/1999 11/2000 02/2001 08/2001 03/2002 07/2002 09/2002 09/2003 09/2004
B	1937	HCV LZ	A	2	2	LTR 11/1994, LTX 07/1995	06/1995 01/1996 06/1996 06/1997 05/2001 07/2002 07/2003 06/2004 06/2005
C	1937	HCV LZ	A	2	2	AL 2003, LTX 04/2005	09/2001 03/2002 09/2002 02/2003 04/2005 05/2005 06/2005
D	1950	HBV	C	3	2	LTR 08/2001, LTX 03/2002	07/1997 07/1998 07/1999 07/2000 11/2000 03/2001 07/2001 08/2002 05/2003

**Tabelle 4-1:**

**Krankheitsverläufe der Patienten A bis D einschließlich Geburtsjahrgang, Grunderkrankung, Zirrhosestadium nach Child-Pugh, Tumorstadium (T), Tumor-Grading (G), therapeutischen Maßnahmen und Abnahmedaten der Serumproben.**

### **4.3. Archivrecherche**

**Durch Archivrecherche konnten Daten von Fällen mit HCC retrospektiv ermittelt werden.**

Das Patientenkollektiv setzte sich folgendermaßen zusammen: Aus den Datenbanken der Lebersprechstunde und der Serumbank der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Campus Virchow Klinikum der Charité Berlin wurden Patienten mit der Diagnose HCC identifiziert. Bekannt waren Name, Vorname und Geburtsdatum. Die Patienten waren zwischen 1992 und 2005 stationär behandelt oder diagnostiziert und dann im Rahmen der Nachsorge in der Lebersprechstunde oder der LTX Ambulanz des Hauses weiter betreut worden.

Die Seren dieser Patienten wurden in der Serumbank der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie gelagert. Jedes Patientenserum war unter einer bestimmten Serumnummer archiviert und konnte dem genauen Abnahmedatum zugeordnet werden.

Das Ziel der Archivrecherche war, die Akten von 131 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom zu identifizieren und darin die Daten ausfindig zu machen, welche für diese Arbeit von Interesse waren. Es wurden folgende Parameter erhoben: Name, Vorname und Geburtsdatum sowie Grunderkrankung des Patienten. Ebenso wurde das Child-Stadium zur Einteilung der Leberzirrhose dokumentiert. Der Tumor wurde nach dem TNM-System klassifiziert, wobei nur die Tumorgöße „T“ berücksichtigt wurde. Der Lymphknotenstatus (N), sowie das Vorhandensein von Metastasen (M) gingen nur aus wenigen Akten hervor. Soweit aus der Patientengeschichte ersichtlich, wurde auch das histologische Grading mit einbezogen. Datum und Art der Therapie des Tumors wurden bei der Datenrecherche ebenfalls erfasst.

In den Fällen, in denen keine Akte auffindbar war, wurde mit Hilfe des Programms MedVision in der Datenbank des Virchow Klinikums recherchiert. Die Informationen, die für diese Arbeit benötigt wurden, konnten aus den Arztbriefen, aus radiologischen, pathologischen, laborchemischen und virologischen Befunden entnommen werden.

Das histologische Grading war häufig nicht in den Akten zu finden. Um diese Information zu erhalten, wurde in der Datenbank der Befundauskunft der Pathologie der Charité auf dem Campus Mitte recherchiert.

Insgesamt konnten die Akten von 93 Patienten eingesehen werden. Diejenige Serumprobe, die möglichst kurzzeitig vor einer Therapie des Tumors abgenommen

wurde, diente der Bestimmung von Angiopoietin-2 und Alpha-Fetoprotein mittels ELISA im Laborteil der Arbeit. Wenn keine Therapie durchgeführt wurde, wurde die Probe benutzt, deren Abnahmedatum möglichst zeitnah zur Erstdiagnose des HCC lag.

#### **4.4. Laborteil**

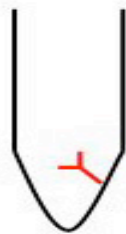
##### **4.4.1. Grundprinzip des Enzyme-linked-immunosorbent-assay**

**Das Grundprinzip des Sandwich-ELISA besteht in Antigen/Antikörper-Reaktionen.**

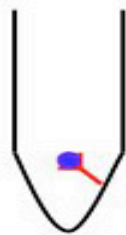
Bei dieser quantitativen Nachweismethode bindet das jeweilige Antigen an einen Antikörper, der an einer Mikrotiterplatte haftet. Dann wird ein weiterer Antikörper hinzugegeben, der das Antigen „sichtbar“ machen soll. Das geschieht folgendermaßen: An den Antikörper ist das Enzym HRP (Meerrettich Peroxidase) gebunden. Dieses wandelt das beigegefügte Substrat chemisch um. Die Reaktion wird durch Farbumwandlung der Proben sichtbar. Die Intensität der Farbreaktion und die Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe verhalten sich proportional zueinander.

Mit Hilfe von Standardproben werden für jeden Versuch Eichkurven erstellt. Auf der X-Achse wird die Konzentration der zu messenden Substanz (AFP in  $\mu\text{g/l}$  oder Ang-2 in  $\text{pg/ml}$ ), auf der y-Achse die vom Photometer gemessene optische Dichte aufgetragen. Die Konzentration von AFP oder Ang-2 in den Patientenseren wird an der Eichkurve abgelesen.

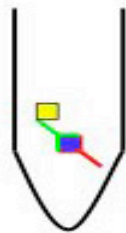
In dieser Arbeit wurden industriell gefertigte Versuchskits verwendet. Die Kits enthalten alle Reagenzien, die für den Versuch benötigt werden. Das Experiment wurde wie in Kapitel 3.4.2 und 3.4.3 anhand der genauen Anleitung des Herstellers durchgeführt.



Die Mikrotiterplatte ist mit Antikörpern beschichtet.



Das Antigen bindet an den Antikörper.



Der an HRP gekoppelte Antikörper bindet an das Antigen, und macht es somit sichtbar.

---

**Abbildung 4:**  
**Grundprinzip des Sandwich-ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)**

#### 4.4.2. $\alpha$ -Fetoprotein ELISA

**Der quantitative Nachweis von  $\alpha$ -Fetoprotein im Serum der Patienten wurde mittels ELISA durchgeführt.**

Der Hersteller des Tests ist die Firma CanAg® Diagnostics AB (REF 600-10, 41455 Gothenburg, Schweden).

Bei diesem nicht kompetitiven Sandwich-ELISA ist die feste Phase (Mikrotiterplatte) bereits mit Streptavidin beschichtet.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine mitgelieferte Standardreihe mit 500, 250, 100, 25, 5 und 0  $\mu$ l AFP pro Liter verwendet. Außerdem beinhaltete das Kit zwei Kontrollen a 0.75ml. Standards und Kontrollen enthielten menschliches AFP in einer Tris-HCl Pufferlösung, bovines Serumalbumin, inaktiven gelben Farbstoff und 0.01% Methyl-Isouthiazolon zur Konservierung.

Als erstes wurde die Mikrotiterplatte einmal mit Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer wurde aus 50ml Waschkonzentrat (Tris-HCl Pufferlösung, Tween 20, Germall II als Konservierungsmittel) und 1200ml destilliertem Wasser gemischt. Es musste beim Waschvorgang stets darauf geachtet werden, dass keine Flüssigkeit in den Vertiefungen der Platte verblieb.

In jede Vertiefung der Platte wurden 25  $\mu$ L Standardlösung, Kontrolle oder Patientenserum und 100  $\mu$ L Antikörperlösung gegeben. Die Antikörperlösung setzte sich aus monoklonalem Biotin-AFP-Antikörper von der Maus und an Meerrettichperoxidase (=HRP, horseradish-peroxidase) gebundenem AFP-Antikörper von der Maus zusammen.

Anschließend wurden die Proben eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken inkubiert. Es folgte ein sechsmaliger Waschgang mit Waschpuffer, um die überschüssigen Reagenzien zu entfernen.

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Tetramethylbenzidin HRP- Substrat gestartet. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten entstand eine blaue Farbe. Um die Enzymreaktion zu stoppen, wurden in jede Vertiefung 100  $\mu$ l Stop-Lösung pipettiert. Diese bestand aus 0.12 M Hydrochloridsäure. Es entstand eine grüne Farbe.

Die AFP-Konzentration wurde innerhalb von 15 Minuten in einem Photometer (Typ EL 800Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc.) bei 450nm gemessen. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm KC Junior (Bio-Tek Instruments Inc. 1998-2001, Version 1.31.5) ausgewertet.

Da die AFP Konzentration im Serum der Patienten mit HCC anfangs häufig oberhalb des messbaren Bereichs lag, wurden die Serumproben teilweise mit Kälberserum verdünnt. Die Verdünnung lag zwischen 1:10 und 1:1000. Bei der Berechnung der Endwerte wurde die Verdünnung berücksichtigt.

AFP wurde bei allen 93 Patienten aus der gleichen Serumprobe bestimmt wie Ang-2, außerdem bei den Patienten, bei denen der Krankheitsverlauf beobachtet werden sollte. Außerdem wurde die AFP Konzentration im Serum der 180 Kontrollen und der 40 Gesunden gemessen.

#### **4.4.3. Angiotensin-2 ELISA**

**Der quantitative Nachweis von Angiotensin-2 im Serum der Patienten wurde mittels ELISA durchgeführt.**

Dafür wurde der Quantikine® enzyme-linked immunoassay (ELISA) von R&D Systems GmbH (Wiesbaden) verwendet.

Der Versuch dauerte 4.5 Stunden.

Bei diesem quantitativen Sandwich-ELISA ist die feste Phase (Mikrotiterplatte) mit monoklonalem Ang-2-Antikörper von der Maus beschichtet.

Zu Beginn wurden die Standardproben hergestellt. Diese dienten der Erstellung der Eichkurve. Angiotensin-2-Standardlösung, bestehend aus rekombinantem humanen Ang-2, wurde mit 1ml destilliertem Wasser versetzt. Es entstand ein Ansatz von 30.000pg Ang-2 pro Milliliter. Die Lösung wurde fünfzehn Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch Mischen mit Calibrator-Diluent RD5-5 (21ml gepufferte Proteinbase mit Konservierungsmittel) wurde eine Standardreihe mit 3000pg/ml, 1500pg/ml, 750pg/ml, 375pg/ml, 187.5pg/ml, 93.7pg/ml und 46pg/ml erzeugt.

Die Serumproben wurden 1:3 verdünnt. Jeweils 100 µl Verdünner (RD1-76) wurden in die Vertiefungen pipettiert, und mit 50µl einer Standardprobe oder 50µl Serumprobe versetzt. Der Verdünner bestand aus gepufferter Protein-Base mit blauem Farbstoff und Konservierungsmittel. Die Proben wurden abgedeckt und bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken inkubiert. Wenn in der Probe Ang-2 enthalten ist, bindet es dabei an den wandständigen Antikörper. Nach zwei Stunden wurden die ungebundenen Substanzen durch viermaliges Waschen entfernt. Der Waschpuffer wurde aus Konzentrat (25fach konzentrierte gepufferte Surfactantlösung und

Konservierungsmittel) und 480ml destilliertem Wasser hergestellt. Es musste darauf geachtet werden, dass am Ende des Waschvorganges keine Flüssigkeit in den Vertiefungen blieb.

Dann wurden 200  $\mu$ l eines an Meerrettichperoxidase gebundenen monoklonalen Ang-2-Antikörpers hinzugefügt. Die Proben wurden weitere 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein weiterer viermaliger Waschvorgang mit Waschpuffer. Dadurch wurde ungebundenes Antikörper-Enzym-Reagenz entfernt.

Durch Zugabe von 200  $\mu$ l Substrat-Lösung (12.5 ml stabilisiertes Hydrogenperoxid und 12.5 ml stabilisiertes Tetramethylbenzidin) entstand eine blaue Farbreaktion. Die Proben wurden unter Lichtschutz für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 50  $\mu$ l Stop-Lösung in die Proben pipettiert. Es entstand eine grüne Farbreaktion. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration von Angiopoietin-2 in den Proben.

Innerhalb von 30 Minuten wurde die Messung mit dem Photometer (Typ EL 800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc.) bei 450nm durchgeführt und mit dem Programm KC Junior (Bio-Tek Instruments Inc. 1998-2001, Version 1.31.5) ausgewertet.

Die Messung wurde mit 131 Seren von Patienten mit HCC durchgeführt, außerdem im Serum von 180 Patienten mit Leberzirrhose sowie im Serum von 40 gesunden Probanden bestimmt.

## **4.5. Statistik**

### **ROC-Analyse, ungepaarter t-Test und Varianzanalyse dienen der statistischen Auswertung der Ergebnisse.**

Die Mittelwerte für AFP und Ang-2 der Kohorten (HCC, Zirrhose, Gesund) wurden mit Hilfe des ungepaarten t-Tests unter Verwendung von Graph Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) verglichen. Dieser Test kann bei einer Normalverteilung angewendet werden. Der Test dient der Beantwortung der Frage, ob die Populationsmittelwerte zweier Gruppen (z.B. Ang-2 bei HCC und Zirrhose) unterschiedlich sind.

Der Varianzanalyse, welche die Mittelwerte von mehr als zwei verschiedenen Gruppen miteinander vergleicht, (z.B. Ang-2 bei Patienten mit Leberzirrhose Child A, B, und C) diente der einseitige ANOVA (analysis of variance). Diese Analyse wurde ebenfalls mit Graph Pad Prism durchgeführt.

Um mit Hilfe von Sensitivität und Spezifität die Qualität diagnostischer Methoden zu ermitteln, wurde auch die ROC- Analyse (receiver operating curves) mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism durchgeführt. Dabei werden auf der y-Achse Sensitivität, und auf der x-Achse 1-Spezifität gegeneinander aufgetragen. Sensitivität und Spezifität sind dabei abhängig von den jeweiligen Schwellenwerten (cut-off-values), welche die Grenze zwischen „erkrankt“ und „nicht erkrankt“ markieren. So entsteht eine Kurve und eine Fläche unter dieser Kurve. Je größer diese Fläche ist, desto besser unterscheidet der Test zwischen Erkrankten und Nichterkrankten, d.h. desto zuverlässiger ist der diagnostische Test.



## 5. Ergebnisse

### 5.1. *Ang-2 als Marker für HCC*

**Angiopoietin-2 ist im Serum von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom im Vergleich zu Patienten mit Leberzirrhose und mit Gesunden deutlich erhöht.**

Das hepatozelluläre Karzinom ist ein hochvaskularisierter Tumor. Im Tumorgewebe wurde wiederholt eine Überexpression von Angiopoietin-2 nachgewiesen [37-40].

In dieser Studie wurde Ang-2 im Serum von Patienten mit HCC (n=131), von Patienten mit Leberzirrhose ohne Nachweis eines HCC (n=180) und von gesunden Kontrollen (n=40) gemessen. Es wurde untersucht, ob Ang-2 im Serum dieser Patienten erhöht ist und so als Tumormarker fungieren kann.

Als erstes sollte analysiert werden ob, es möglich ist anhand der Konzentration von Ang-2 im Serum zwischen Patienten mit HCC und Gesunden zu unterscheiden. Der Mittelwert von Ang-2 bei Patienten mit HCC lag mit  $12320 \mu\text{g/l} \pm 952.3$  deutlich höher als bei Gesunden. Diese wiesen einen Mittelwert von  $2820 \mu\text{g/l} \pm 144.1$  Ang-2 im Serum auf (Tab 4-1, Abb. 5A).

Wenn man die Messung von Ang-2 als diagnostischen Test zur Differenzierung zwischen Gesunden und Patienten mit HCC anwendete, zeigte sich anhand der ROC-Analyse eine Sensitivität von 92.5% und eine Spezifität von 91.6% (AUC 0,96,  $p < 0.0001$ ) (Tab. 4-2, Abb. 5B).

Das hepatozelluläre Karzinom entwickelt sich jedoch in über 80% der Fälle auf dem Boden einer Leberzirrhose. Daher war es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob durch Bestimmung von Ang-2 im Serum zwischen Patienten mit Leberzirrhose und Patienten mit HCC unterschieden werden kann.

Der Mittelwert von Ang-2 bei Patienten mit Leberzirrhose lag bei  $6526 \mu\text{g/l} \pm 447.5$ , also deutlich niedriger als bei Patienten mit HCC, bei denen der Mittelwert wie oben beschrieben fast doppelt so hoch war (Tab. 4-1, Abb. 4A). In der ROC-Analyse stellte sich heraus, dass eine Unterscheidung zwischen Fällen mit HCC und Fällen mit Zirrhose ohne Nachweis eines HCC mit einer Sensitivität von 70.56% und einer Spezifität von 73.28% (AUC 0.77,  $p < 0.0001$ ) gemacht werden konnte (Tab. 4-2, Abb. 5C).

Durch Bestimmung von Ang-2 im Serum ließ sich also sowohl zwischen Patienten mit HCC und Gesunden als auch zwischen Patienten mit HCC und solchen mit

Leberzirrhose unterscheiden. Von allen drei Kohorten zeigte die HCC Kohorte die höchsten Ang-2 Werte im Serum.

**Tabelle 5-1:**

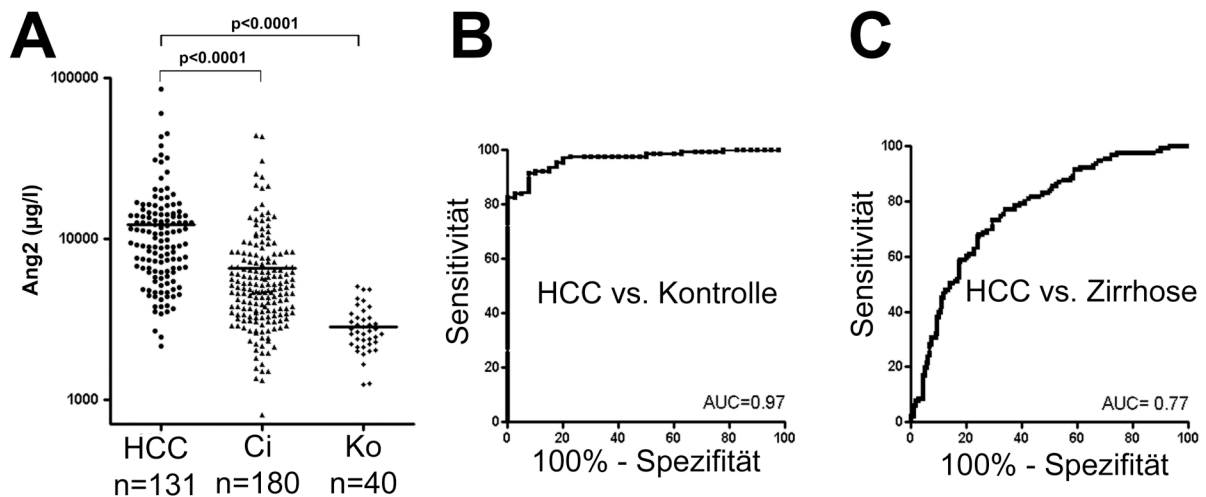
**Der Mittelwert von Ang-2 im Serum von Patienten mit HCC ist im Vergleich zu dem von Patienten mit Leberzirrhose und von Gesunden deutlich erhöht.**

	<b>HCC</b>	<b>Zirrhose</b>	<b>Kontrollen</b>
<b>Ang-2</b>			
Mittelwert	12320	6526	2820
Standardabweichung	952.3	447.5	144.1
Median	9700	4850	2650
Niedrigster Wert	2650	800	1240
Höchster Wert	85750	43650	5060

**Tabelle 5-2:**

**Testmerkmale von Ang-2 Serumspiegeln für die Unterscheidung von Patienten mit HCC und Gesunden sowie von Patienten mit HCC und solchen mit Zirrhose.**

<b>Parameter</b>	<b>Unterscheidung zwischen</b>	<b>AUC</b>	<b>Schwellenwert</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>	<b>P-Wert</b>
<b>Ang-2</b>	Zirrhose und Kontrolle	0.83	3213	77.50	78.33	<0.0001
	CHILD A	0.79	3045	70.00	78.33	<0.0001
	CHILD B	0.82	3213	77.50	78.46	<0.0001
	CHILD C	0.89	3425	80.00	81.82	<0.0001
	HCC und Kontrolle	0.96	4305	92.50	91.60	<0.0001
	HCC und Zirrhose	0.77	6525	70.56	73.28	<0.0001
	CHILD A	0.73	6600	68.33	66.07	0.0002
	CHILD B	0.82	7294	76.92	76.92	<0.0001
	CHILD C	0.75	6375	72.73	72.73	0.0089



**Abbildung 5:**

**A** Ang-2 wurde im Serum von 180 Patienten mit Zirrhose (Ci), 131 Patienten mit HCC und 40 Kontrollen (Ko) bestimmt. Die Patienten mit HCC zeigten die höchsten Serumlevel von Ang-2 im Vergleich zu denen mit Leberzirrhose ohne Nachweis eines HCC und im Vergleich zu Gesunden.

**B** Die ROC-Analyse wurde für Patienten mit HCC versus Gesunde und

**C** für Patienten mit HCC versus Leberzirrhose durchgeführt.

## 5.2. Ang-2 als Marker für Zirrhose

### Angiopietin-2 ist im Serum von Patienten mit Leberzirrhose erhöht.

Die Leberzirrhose ist eine Präkanzerose für das hepatozelluläre Karzinom. Die vaskulären Umbauvorgänge in der Leber wurden bereits beschrieben [26].

Es sollte untersucht werden, ob die Höhe von Ang-2 von der Art oder dem Schweregrad der Zirrhose abhängt und ob der Ang-2 Serumspiegel als Marker einer Zirrhose verwendet werden kann.

Ang-2 wurde im Serum von 180 Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie bestimmt. Der Mittelwert dieser Kohorte lag bei 6526  $\mu\text{g/l} \pm 447.5$ . Der Mittelwert der 40 gesunden Kontrollen lag mit 2820  $\mu\text{g/l} \pm 144.1$  deutlich niedriger ( $p=0.0001$ )(Tab. 4-3, Abb. 6A).

Mit Hilfe der ROC-Analyse sollte die Möglichkeit überprüft werden, Ang-2 als Serummarker für die Unterscheidung zwischen Patienten mit Leberzirrhose und Gesunden zu verwenden. Es zeigte sich eine Sensitivität von 77.5% und eine Spezifität von 78.33% (AUC 0.83,  $p<0,0001$ ) (Tab. 4-4, Abb. 6D)

#### Tabelle 5-3:

**Der Mittelwert von Ang-2 im Serum von Patienten mit Leberzirrhose ist im Vergleich zu Gesunden erhöht.**

	HCC	Zirrhose	Kontrolle
<b>Ang-2</b>			
Mittelwert	12320	6526	2820
Standardabweichung	952.3	447.5	144.1
Median	9700	4850	2650
Niedrigster Wert	2650	800	1240
Höchster Wert	85750	43650	5060

**Tabelle 5-4:**

**Testmerkmale von Ang-2 Serumspiegeln für die Unterscheidung zwischen Patienten mit Leberzirrhose und Gesunden.**

Parameter	Unterscheidung zwischen	AUC	Schwellenwert	Sensitivität	Spezifität	P-Wert
<b>Ang-2</b>	Zirrhose und Kontrolle	0.83	3213	77.50	78.33	<0.0001
	CHILD A	0.79	3045	70.00	78.33	<0.0001
	CHILD B	0.82	3213	77.50	78.46	<0.0001
	CHILD C	0.89	3425	80.00	81.82	<0.0001
	HCC und Kontrolle	0.96	4305	92.50	91.60	<0.0001
	HCC und Zirrhose	0.77	6525	70.56	73.28	<0.0001
	CHILD A	0.73	6600	68.33	66.07	0.0002
	CHILD B	0.82	7294	76.92	76.92	<0.0001
	CHILD C	0.75	6375	72.73	72.73	0.0089

Bei näherer Betrachtung der Patienten mit Leberzirrhose fiel weiterhin auf, dass der Schweregrad der Leberzirrhose, welcher nach dem Child-Pugh Score eingeteilt wurde, keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe von Ang-2 im Serum hatte ( $p=0.592$ ). Der Mittelwert aller Patienten lag um  $7500 \mu\text{g/l}$  (Tab. 4-5, Abb. 6B).

**Tabelle 5-5:**

**Ang-2 Mittelwerte der Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie, der Patienten mit den Zirrhosestadien A bis B und gesunder Patienten**

	Zirrhose	Child A	Child B	Child C	Kontrollen
<b>Ang-2</b>					
<b>Mittelwert</b>	6526	7500	7500	7500	2820

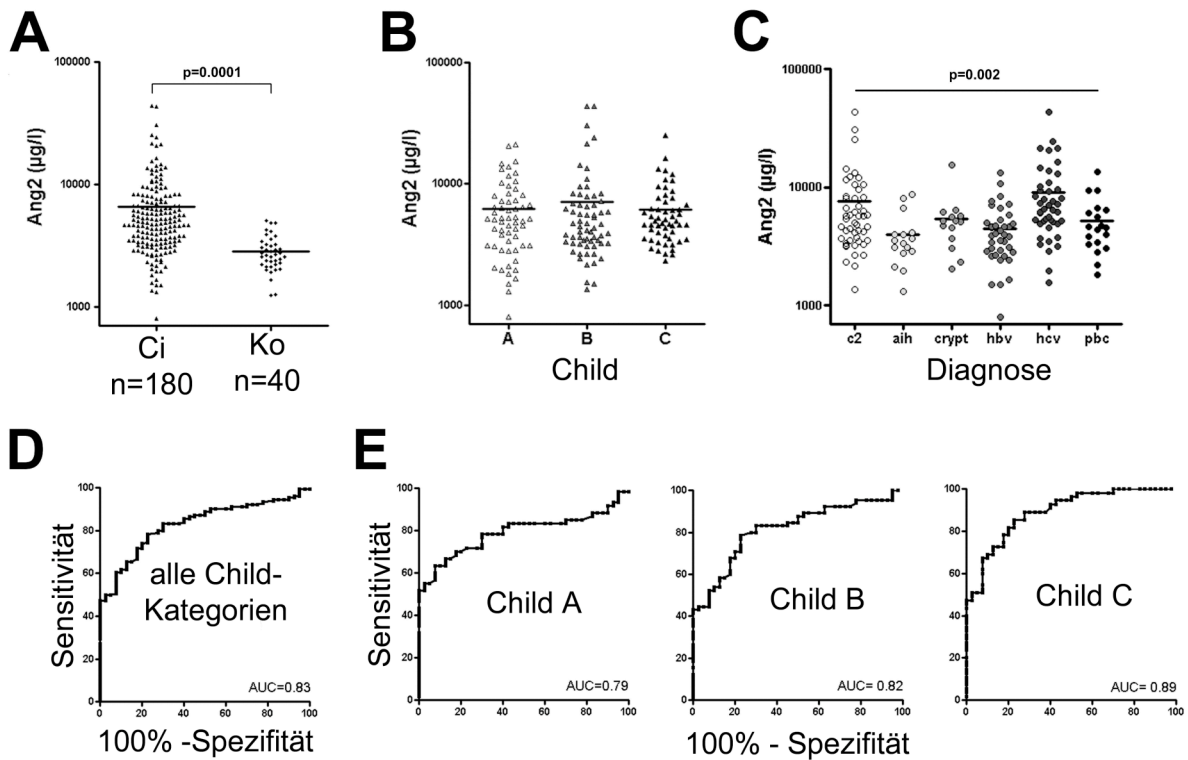
Im nächsten Schritt der Untersuchung wurde analysiert, ob bestimmte Grundkrankheiten, die zur Zirrhose führten mit unterschiedlichen Ang-2 Spiegeln einhergehen.

Abbildung 6C zeigt, dass die Werte von Angiotensin-2 grundsätzlich und unabhängig von der Krankheit, aus der die Leberzirrhose resultierte, erhöht waren, sich jedoch signifikant voneinander unterschieden ( $p=0.002$ ). Dabei zeigten Patienten mit C2-

Abusus und HCV-Infektion die höchsten Ang-2 Werte. Die niedrigsten Werte hatten Patienten mit autoimmuner Hämochromatose.

Im Anschluss wurde auch für diese Kohorte eine ROC-Analyse durchgeführt. Diese ergab, dass sich die Genauigkeit der Unterscheidung zwischen Zirrhotikern und Gesunden mit zunehmender Schwere der Leberzirrhose verbesserte. Für Patienten mit Leberzirrhose im Stadium Child A zeigte sich eine Sensitivität von 70.0% und eine Spezifität von 78.33% (AUC=0.79), für das Stadium Child B eine Sensitivität von 77.5% und eine Spezifität von 78.46% (AUC=0.82). Für Patienten mit einer Child C Zirrhose waren die Sensitivität (80.0%) und die Spezifität (81.82%) am höchsten (AUC=0.89)(Tab. 4-4, Abb. 6E).

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass bei Patienten mit Leberzirrhose, unabhängig von Krankheitsstadium und Grunderkrankung, Ang-2 im Serum erhöht war und somit als Marker geeignet war. Besonders gut gelang die Unterscheidung zwischen „gesund“ und „erkrankt“ bei weiter fortgeschrittenem Zirrhosestadium.



**Abbildung 6:**

**Ang-2 wurde im Serum von 180 Patienten mit Leberzirrhose (Ci) im Vergleich zu 40 Gesunden (Ko) bestimmt.**

**A Die Serumspiegel von Ang-2 sind bei Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zu Gesunden erhöht.**

**B Der Schweregrad der Zirrhose nach den Child-Pugh-Kriterien hat keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe des Ang-2 Serumspiegels.**

**C Ang-2 ist im Serum aller Patienten mit Leberzirrhose, unabhängig von der Grunderkrankung erhöht. Die höchsten Werte zeigen Patienten mit Alkoholabusus und chronischer Hepatitis C Infektion.**

**D Die ROC Analyse wurde für alle Patienten mit Zirrhose versus Gesunde und E für jeden Child-Pugh score (A-C) einzeln versus Gesunde durchgeführt.**

### **5.3. Vergleich von Ang-2 und AFP als Marker für HCC**

**Im Vergleich sind sowohl Ang-2 als auch AFP als Marker für das HCC geeignet.**

AFP ist der gebräuchlichste Serummarker für das hepatozelluläre Karzinom. Da sich eine Erhöhung von Ang-2 im Serum von Patienten mit HCC in unserer Kohorte bestätigt hat, sollte nun ein Vergleich von AFP und Ang-2 als Serummarker für diesen Tumor durchgeführt werden.

Dafür wurden die Werte von Ang-2 und AFP im Serum der 93 Patienten mit HCC, von denen klinische Daten vorlagen, mittels ELISA bestimmt.

Im Folgenden werden diese Marker zunächst für das HCC und die Zirrhose verglichen. Anschließend wird betrachtet, wie sie sich in Abhängigkeit vom Zirrhosestadium verhalten.

In unserer Messung waren Angiopoietin-2 Serumspiegel bei den Patienten, die an einem HCC litten, im Vergleich zu Patienten mit Leberzirrhose signifikant erhöht (12320  $\mu\text{g/l} \pm 952.3$  bei HCC vs. 6526  $\mu\text{g/l} \pm 447.5$  bei Zirrhose,  $p < 0.0001$ ) (Tab. 4-6, Abb. 7a).

Die ROC-Analyse zeigte eine Sensitivität von 70.56% und eine Spezifität von 73.28% für die Möglichkeit, anhand der Messung von Ang-2 im Serum zwischen HCC und Zirrhose zu unterscheiden (AUC 0.77,  $p < 0.0001$ ). Der Schwellenwert für Ang-2, der am besten zwischen HCC und Zirrhose unterscheidet, wurde mit Hilfe der ROC-Analyse ermittelt und lag bei 6525  $\mu\text{g/l}$  (Tab. 4-7, Abb. 7B).

Analog dazu war auch AFP mit einem Mittelwert von 11600  $\mu\text{g/l} \pm 6334$  bei den HCC-Patienten im Gegensatz zu den Fällen mit Zirrhose (5.85  $\mu\text{g/l} \pm 1.15$ ,  $p = 0.012$ ) (Tab. 4-6, Abb. 7A) deutlich erhöht. Die ROC-Analyse ergab für die Möglichkeit der Differenzierung zwischen Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom bei dem in unserer Klinik gültigen Schwellenwert für AFP von 10  $\mu\text{g/l}$  eine Sensitivität von 93.3% und eine Spezifität von 69.89% (AUC 0.84,  $p < 0.0001$ ) (Tab. 4-7, Abb. 7C).



**Tabelle 5-6:**

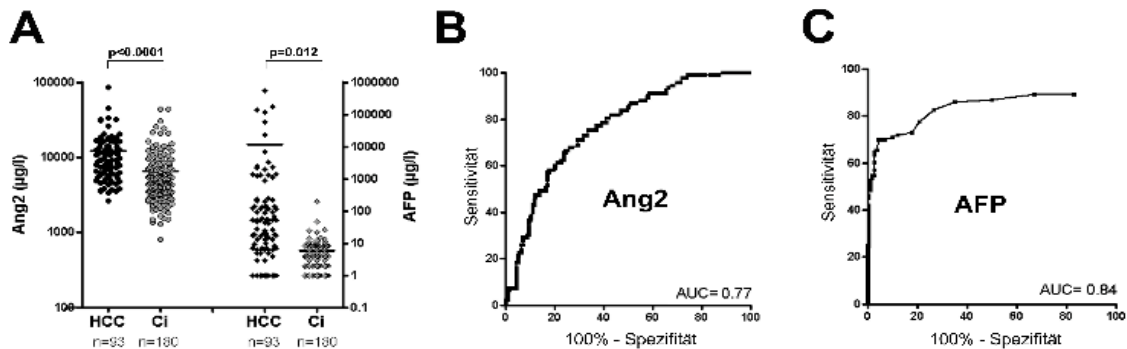
**Sowohl die Mittelwerte von Ang-2 als auch von AFP sind bei Patienten mit HCC im Vergleich zu Patienten mit Leberzirrhose erhöht.**

	<b>HCC</b>	<b>Zirrhose</b>
<b>Ang-2</b>		
Mittelwert	12320	6526
Standardabweichung	952.3	447.5
Median	9700	4850
Niedrigster Wert	2650	800
Höchster Wert	85750	43650
<b>AFP</b>		
Mittelwert	11600	5.85
Standardabweichung	6334	1.15
Median	43	4
Niedrigster Wert	1	1
Höchster Wert	537084	199

**Tabelle 5-7:**

**Testmerkmale von Ang-2 und AFP für die Unterscheidung zwischen Patienten mit HCC und Patienten mit Leberzirrhose**

<b>Parameter</b>	<b>Unterscheidung zwischen</b>	<b>AUC</b>	<b>Schwellenwert</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>	<b>P-Wert</b>
<b>Ang-2</b>	HCC und Zirrhose	0.77	6525	70.56	73.28	<0.0001
	CHILD A	0.72	6600	68.33	66.07	0.0002
	CHILD B	0.82	7294	76.92	76.92	<0.0001
	CHILD C	0.75	6375	72.73	72.73	0.0089
<b>AFP</b>	HCC und Zirrhose	0.84	10	93.30	69.89	<0.0001
	CHILD A	0.82	10	87.93	68.18	<0.0001
	CHILD B	0.86	10	93.85	69.23	<0.0001
	CHILD C	0.74	10	92.73	72.73	0.0129



**Abbildung 7:**

**A** Ang-2 und AFP wurden im Serum von 93 Patienten mit HCC und von 180 Patienten mit Leberzirrhose (Ci) gemessen.

**B** ROC-Analyse für die Unterscheidung zwischen HCC-Patienten und Patienten mit Leberzirrhose mittels Ang-2 im Serum.

**C** ROC-Analyse für die Unterscheidung zwischen HCC-Patienten und Patienten mit Leberzirrhose mittels AFP im Serum.

Anhand der vorhandenen Patientendaten konnte außerdem untersucht werden, wie sich Ang-2 und AFP bei Patienten mit unterschiedlichen Zirrhosestadien verhalten und ob sich durch den Schweregrad der Erkrankung die Qualität der Tests bei der Differenzierung zwischen HCC und Zirrhose verändert.

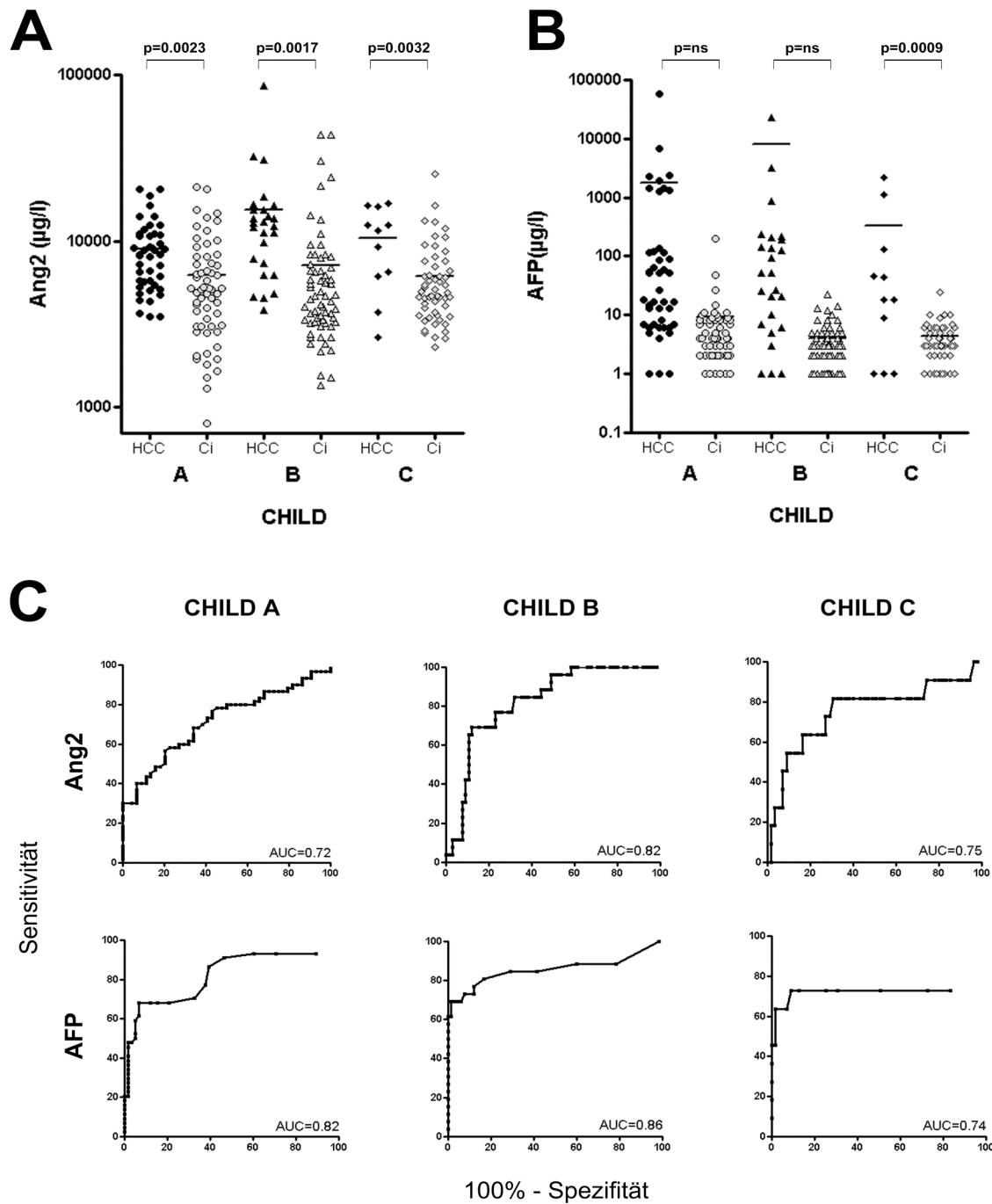
Das Ergebnis zeigt, dass mittels Ang-2 in allen Child-Stadien zwischen HCC und Zirrhose unterschieden werden kann (Abb. 8A). Für Child A ergab sich ein Ang-2-Mittelwert von  $8925 \mu\text{g/l} \pm 651.2$  bei Patienten mit HCC, und  $6203 \mu\text{g/l} \pm 571.5$  bei Patienten mit Leberzirrhose ( $p=0.0023$ ). Im Stadium Child B resultierte ein Mittelwert von  $15390 \mu\text{g/l} \pm 3127$  für HCC-Patienten, für Patienten mit Leberzirrhose waren es im

Mittel 7138  $\mu\text{g/l} \pm 1029$  ( $p=0.0017$ ). Bei Leberzirrhose im Stadium Child C lag der Mittelwert im Falle eines HCC bei 10380  $\mu\text{g/l} \pm 1532$  vs. 6156  $\mu\text{g/l} \pm 537.2$  im Falle einer Zirrhose ( $p=0.0032$ ).

Im Vergleich dazu konnte durch Bestimmung von AFP nur im Falle eines Child C Stadiums zwischen einem hepatozellulären Karzinom und einer Leberzirrhose unterschieden werden (Abb. 8B). Bei den Patienten, die auf dem Boden einer Child C Leberzirrhose ein HCC entwickelt hatten, lag der Mittelwert für AFP bei 327  $\mu\text{g/l} \pm 213$ . Bei Patienten mit Leberzirrhose Child C ohne Nachweis eines HCC lag der Mittelwert dagegen bei 4.3  $\mu\text{g/l} \pm 0.5$  ( $p=0.0009$ ). In den Stadien Child A und B war der Test nicht signifikant (Child A: 1786  $\mu\text{g/l} \pm 1331$  vs. 9.5  $\mu\text{g/l} \pm 3.5$ ,  $p=0.128$ ; Child B 7925  $\mu\text{g/l} \pm 6836$  vs. 4.0  $\mu\text{g/l} \pm 0.5$ ,  $p=0.068$ )(Abb. 8B).

Sowohl für Ang-2 als auch für AFP ergab die ROC-Analyse, dass der Test im Stadium Child B am besten geeignet ist, da in diesem Stadium die AUC den höchsten Wert erreichte (Tab. 4-7, Abb. 8C).

Wenn man Ang-2 und AFP als Serummarker für das HCC und die Leberzirrhose verglich, war festzuhalten, dass mit beiden Markern eine Differenzierung möglich war. Floss als zusätzlicher Parameter das Child Stadium in den diagnostischen Test mit ein, konnte mittels Ang-2 in allen Child-Stadien zwischen HCC und Zirrhose unterschieden werden, dagegen war die Unterscheidung mittels AFP nur im Stadium Child C signifikant.



**Abbildung 8:**

**A** Mittels Ang-2 Bestimmung im Serum ließ sich in allen Child-Stadien zwischen einem HCC und einer Leberzirrhose unterscheiden.

**B** Mittels AFP ließ sich nur im Stadium Child C zwischen einem HCC und einer Leberzirrhose unterscheiden.

**C** ROC-Analyse für die Unterscheidung zwischen einem HCC und einer Leberzirrhose in den Child-Stadien A-C durch Bestimmung der Serumspiegel von Ang-2 oder AFP.

#### **5.4. Ang-2/ Tumorstadium/ Grading/ Child**

**Ang-2 und AFP Spiegel wurden durch Enddifferenzierung des HCC, Ausbreitung des Tumors und Schwere der Leberzirrhose nicht beeinflusst.**

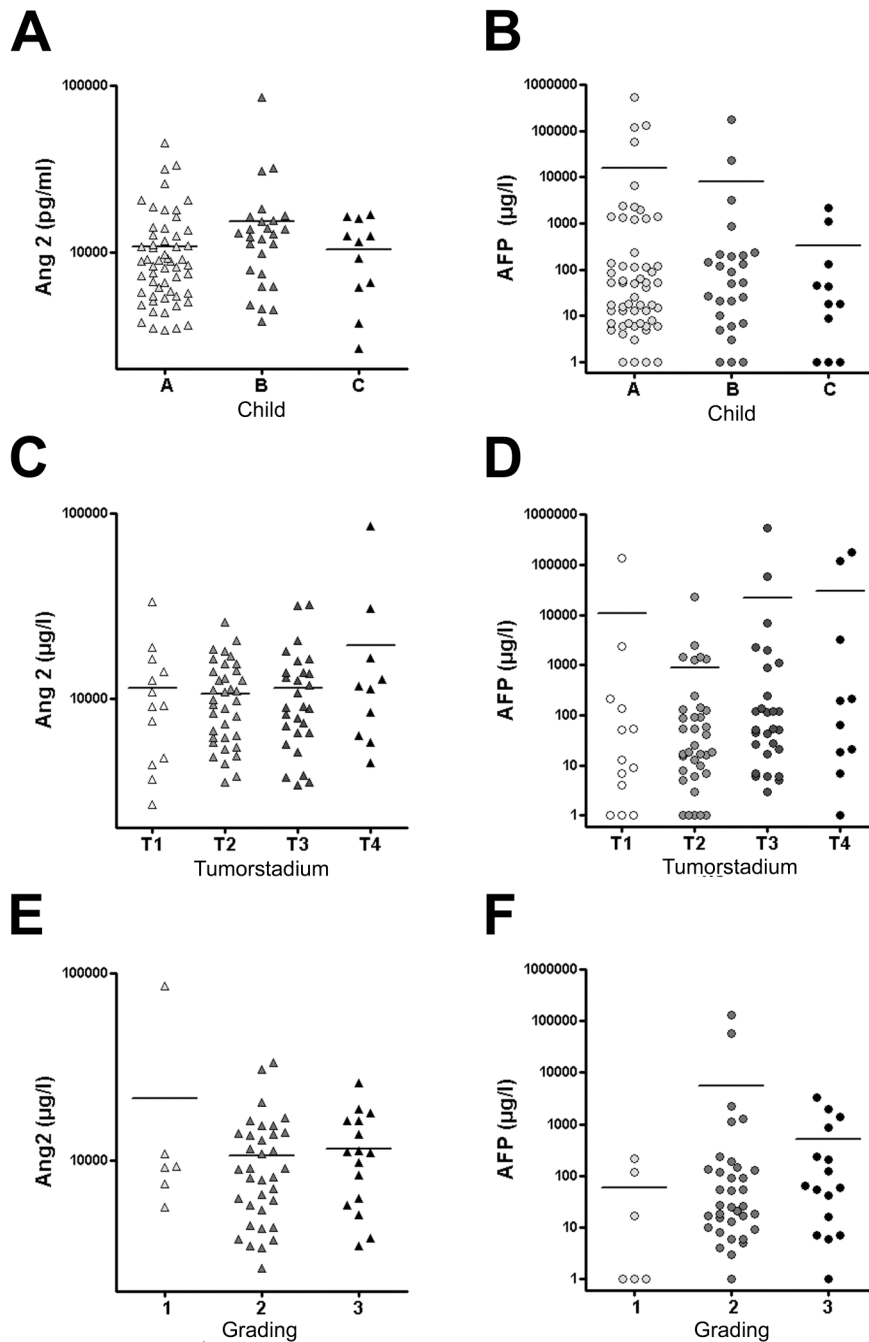
Die Ergebnisse der vorangehenden Abschnitte zeigten, dass Ang-2 sowohl im Serum von Patienten mit HCC als auch von Patienten mit Leberzirrhose erhöht war. Alpha-Fetoprotein ist der gebräuchlichste bereits etablierte Tumormarker für das hepatozelluläre Karzinom. Daher wird es routinemäßig im Serum von Patienten mit Leberzirrhose zum HCC-Screening bestimmt.

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, wie sich Ang-2 und AFP in Abhängigkeit vom Tumorstadium (T), histologischem Grading (G) oder der Schwere der Leberzirrhose (Child A, B, C) im Serum verhalten.

Die relevanten Patienten- und Tumordaten wurden durch Archivrecherche ermittelt. Die Konzentration von Ang-2 und AFP im Serum der Patienten wurde mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, dass weder das Stadium der Leberzirrhose ( $p=0.174$ , Abb. 9A), noch das Tumorstadium ( $p=0.121$ , Abb. 9C) oder das histologische Grading ( $p=0.118$ , Abb. 9E) einen signifikanten Einfluss auf die Höhe von Ang-2 im Serum der Patienten hatten. Parallel dazu veränderte sich auch AFP mit zunehmender Schwere der Leberzirrhose ( $p=0.709$ , Abb. 9B), fortgeschrittenem Tumorleiden ( $p=0.464$ , Abb. 9D) oder abnehmender Differenzierung des Tumorgewebes in Form eines höheren histologischen Gradings ( $p=0.607$ , Abb. 9F) nicht signifikant.

Es konnte also festgestellt werden, dass sich die hier untersuchten Parameter Ang-2 und AFP nicht entsprechend der fortschreitenden Schwere der Erkrankung erhöhten.



**Abbildung 9:**

Ang-2 und AFP wurden im Serum von 93 Patienten mit HCC gemessen.

**A** Das Stadium der Leberzirrhose hat keinen Einfluss auf die Höhe von Ang-2 im Serum ( $p=0.174$ ).

**B** Das Stadium der Leberzirrhose hat keinen Einfluss auf die Höhe von AFP im Serum ( $p=0.709$ ).

**C** Das Tumorstadium hat keinen Einfluss auf Ang-2 im Serum ( $p=0.121$ ).

**D** Das Tumorstadium hat keinen Einfluss auf den AFP Spiegel im Serum ( $p=0.464$ ).

E Das histologische Grading hat keinen Einfluss auf den Ang-2 Spiegel im Serum (p=0.118).

F Das histologische Grading hat keinen Einfluss auf den AFP Spiegel im Serum (p=0.607).

	AFP normal	AFP erhöht	
Ang-2 normal	10 (10.8%)	16 (17.2 %)	26 (28.0 %)

### 5.5. Kombination von Ang-2 und AFP

**Die Kombination von Ang-2 und AFP als Serummarker verringert die Fehlerquote bei der Detektion von Patienten mit HCC.**

Bisher wurde dargestellt und erläutert, wie gut AFP und Ang-2 einzeln und im Vergleich als Tumormarker für das hepatozelluläre Karzinom geeignet sind. In diesem Abschnitt sollte die Möglichkeit untersucht werden, beide Serummarker in einem Test zu kombinieren.

Wurden AFP oder Ang-2 einzeln als Marker für das hepatozelluläre Karzinom angewendet, stellte sich heraus, dass der Tumor in zahlreichen der 93 untersuchten Fälle übersehen worden wäre. Die Ursache dafür ist, dass die Werte der Patienten im Serum unterhalb des Grenzwertes lagen (AFP=10 µg/l, Ang-2=6525 µg/l).

Insgesamt war AFP in 71% der Fälle erhöht, davon in 17.2% der Fälle ohne dass Ang2 gleichzeitig erhöht war. Wie Tabelle 4-8 zeigt, war AFP allein nur in 17.2% der Fälle erhöht. Ang-2 allein war in 18.3% der Fälle erhöht, insgesamt in 72% der Fälle. Bei 53.8% der Patienten waren sowohl AFP, als auch Ang-2 erhöht. In 10.8% waren beide Werte normal.

**Tabelle 5-8:**

**Verhalten der Serumwerte von Ang-2 und AFP bei Patienten mit HCC einzeln und in Kombination**

Ang-2 erhöht	17 (18.3%)	50 (53.8 %)	67 (72.0 %)
	27 (29.0 %)	66 (71.0 %)	93 (100 %)

Bei der Kombination von AFP und Ang-2 als Serummarker für das hepatozelluläre Karzinom würden hingegen 89.3% der Fälle ermittelt. Diese Zahl setzt sich aus allen Fällen zusammen, bei denen entweder AFP oder Ang-2 erhöht ist, sowie aus allen Fällen bei denen beide Parameter erhöht sind. Die Anzahl der Fälle mit HCC, die bei Kombination von Ang-2 und AFP als Serummarker übersehen würden, wäre also niedriger als bei der Messung von AFP oder Ang-2 allein.

Für die Möglichkeit, anhand beider Marker das Vorhandensein eines HCC zu ermitteln, wurde die folgende Formel erstellt:

**Formel 1:**

$$D=0.719*\ln(\text{Ang-2})+0.367*\ln(\text{AFP})-6.964$$

Das Ergebnis der Formel ist negativ, wenn kein HCC vorausgesehen wird und positiv, wenn ein HCC vorausgesehen wird. Der Mittelwert für Patienten mit HCC lag bei  $1.053 \pm 0.143$ . Für Patienten mit Leberzirrhose ohne Nachweis eines HCC lag der Mittelwert bei  $-0.537 \pm 0.055$  ( $p<0.0001$ ).

Mit Hilfe der ROC-Analyse konnte für die Möglichkeit der Differenzierung zwischen Patienten mit HCC und Patienten mit Leberzirrhose anhand der Kombination von Ang-2 und AFP als Serummarker eine Sensitivität von 82.3% und eine Spezifität von 80.65% (AUC 0.86,  $p<0.0001$ ) (Tab. 4-9) ermittelt werden.

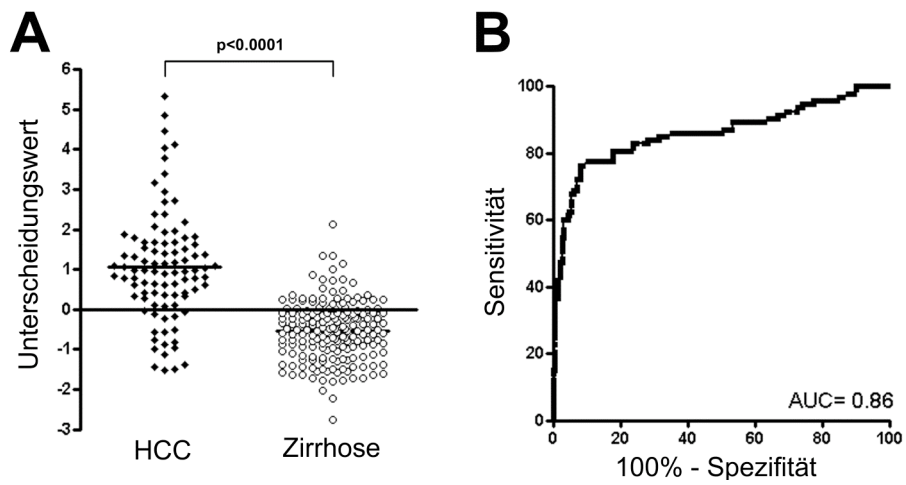
**Tabelle 5-9:**

**Testmerkmale der Kombination von Ang-2 und AFP als Serummarker für die Unterscheidung zwischen Patienten mit HCC und Patienten mit Leberzirrhose**

Parameter	Unterscheidung zwischen	AUC	Schwelle wert	Sensitivität	Spezifität	P-Wert
Ang-2/AFP	HCC und Zirrhose	0.86	0.065	82.32	80.65	<0.0001

Durch Kombination beider Marker in einem diagnostischen Test erniedrigt sich also das Risiko, Patienten mit einem HCC zu übersehen, weil einer der beiden Parameter unterhalb des Schwellenwertes liegt.





**Abbildung 10:**

**A** Graphische Darstellung der Möglichkeit der Unterscheidung zwischen einem HCC und einer Leberzirrhose ohne Nachweis eines HCC durch Bestimmung von Ang-2 und AFP als Serummarker.

**B** ROC-Analyse für die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen HCC und Leberzirrhose anhand der Kombination von Ang-2 und AFP als Serummarker.

## **5.6. Ergebnisse der Untersuchung individueller Verläufe**

**Die Messung von Ang-2 und AFP im Verlauf einer HCC-Erkrankung spiegelt nicht eindeutig den Therapieerfolg wieder.**

Bei vier Patienten (A bis D) wurden die Serumspiegel von Ang-2 und AFP im Verlauf gemessen. Es sollte untersucht werden, wie sich die beiden Serummarker in Abhängigkeit vom Verlauf der Erkrankung und von der jeweiligen Therapie verhalten.

Bei Patient A war in den ersten 4 Jahren vor der Therapie ein flacher, paralleler Anstieg von AFP und Ang-2 zu verzeichnen. Diese Beobachtung deutet auf das Vorliegen und die Ausbreitung eines HCC hin. Danach stieg Ang-2 im Serum steil an und erreichte seinen Spitzenwert circa fünfeinhalb Jahre nach Abnahme der ersten Serumprobe. Der Anstieg von AFP verlief im Vergleich verzögert, sein Spitzenwert war zu dem Zeitpunkt der Leberteilresektion 7 Jahre nach Abnahme der ersten Serumprobe erreicht. Unterschiedliche Sekretionsmechanismen der beiden Proteine erklären möglicherweise die Tatsache, dass beide Marker zu unterschiedlichen Zeitpunkten anstiegen. Der frühere Anstieg von Ang-2 im Vergleich zu AFP könnte das Gefäßwachstum widerspiegeln, welches dem Wachstum des Tumors zeitlich vorausgeht. Direkt nach Leberteilresektion fielen beide Serummarker bis in den Normbereich ab. Das lässt auf einen Therapieerfolg schließen (Abb. 11A).

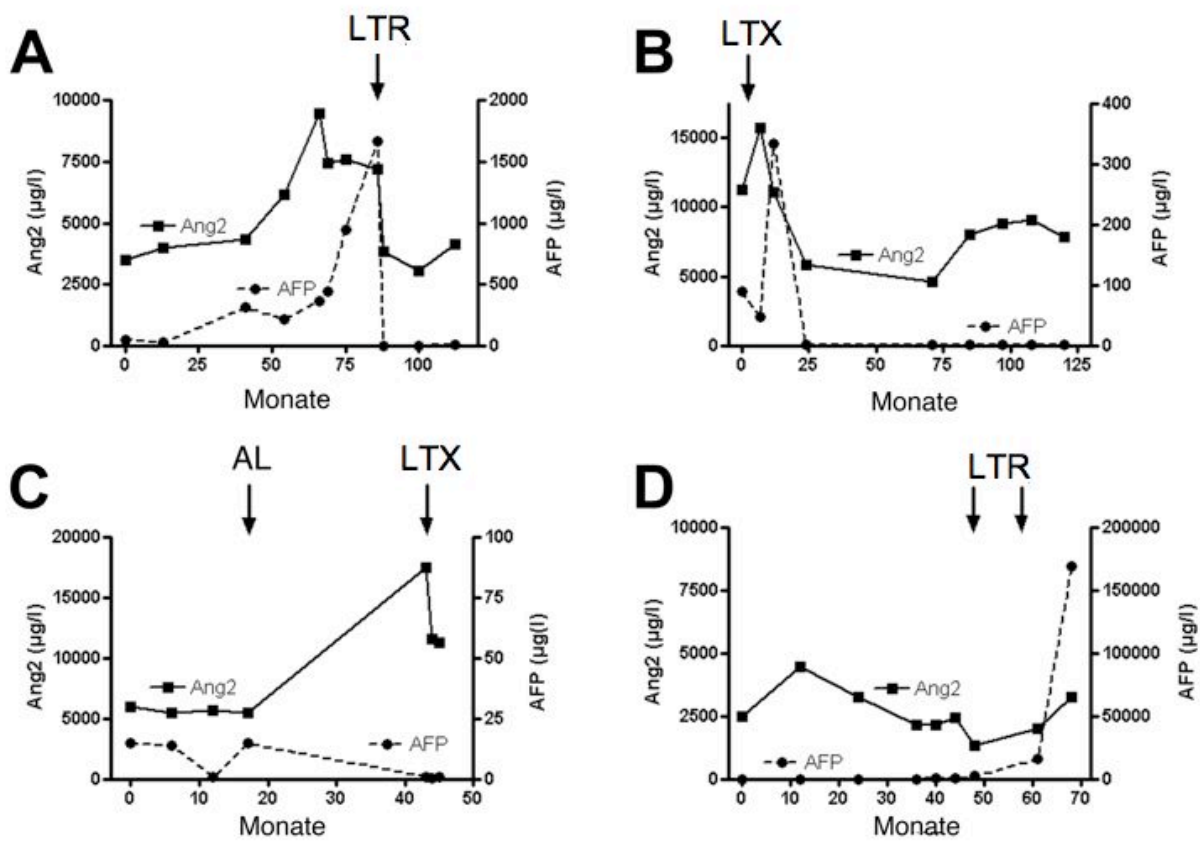
Im Fall von Patient B wurde die erste Serumprobe einen Monat vor Lebertransplantation abgenommen. Zu diesem Zeitpunkt waren sowohl Ang-2 als auch AFP im Serum erhöht und weisen somit auf das Vorliegen eines HCC hin. Nach der Therapie stieg Ang-2 im Serum steil an, was durch postoperative, vaskuläre Reparaturvorgänge erklärt werden könnte. Alpha-Fetoprotein fiel postoperativ kurz ab und verzeichnete danach wieder einen steilen Anstieg. Elf Monate nach LTX war Ang-2 im Serum bereits abgefallen und AFP erreichte seinen höchsten Wert. Wie im Fall von Patient A spiegelt AFP auch bei Patient B den Krankheitsverlauf im Vergleich zu Ang-2 verzögert wieder. Dreiundzwanzig Monate nach Therapie lag die Konzentration von AFP im Serum unterhalb der Nachweisgrenze und die Ang-2-Konzentration sank ebenfalls (Abb. 11B).

Während der ersten zwei Jahre vor Beginn der Therapie deuten die Serumwerte von Ang-2 und AFP bei Patient C nicht auf das Vorliegen eines HCC hin. Sie lagen unterhalb des jeweiligen Schwellenwertes. Nach der Afterloading-Therapie verhielten sich beide Marker gegensinnig. Ang-2 stieg bis zu dem Zeitpunkt der

Lebertransplantation stetig an. Diese Beobachtung deutete auf eine Ausbreitung des HCC hin. Dagegen fiel AFP unter die Nachweisgrenze ab und gab somit keinen Hinweis auf das Fortschreiten der Tumorerkrankung. Nach LTX fiel Ang-2 im Serum vereinbar mit einem Therapieerfolg steil ab, die AFP-Spiegel blieben weiterhin im Normbereich (Abb. 11C). Bei diesem Patienten lassen sich anhand von AFP keine Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf machen. Dagegen war der Verlauf von Ang-2 im Serum mit dem Krankheitsverlauf vereinbar.

Bei Patient D zeigt sich kein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der Serummarker, dem Vorliegen eines HCC und einem Therapieerfolg. Sowohl der Serumspiegel von Ang-2 als auch der von AFP liegen über den gesamten Zeitraum der Untersuchung im Normbereich. Lediglich der Anstieg von AFP nach der zweiten LTR lässt ein Tumorrezidiv vermuten (Abb. 11D).

Anhand der Untersuchung des Krankheitsverlaufes dieser vier HCC-Patienten ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Verhalten der Serummarker Ang-2 und AFP feststellen. Festzuhalten ist, dass Ang-2 im Serum die Ausbreitung des Tumors oder einen Therapieerfolg tendenziell schneller anzeigt als AFP. Eine Studie mit größeren Patientenzahlen ist notwendig, um diesen Zusammenhang zu untersuchen.



**Abbildung 11:**

Die Serumspiegel von Ang-2 und AFP wurden bei Patient A bis D im Verlauf der Erkrankung gemessen. AL=Afterloading, LTX=Lebertransplantation, LTR=Lebeteilresektion.

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Spiegel von Ang-2 und AFP im Serum von 180 Patienten mit Leberzirrhose und 131 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom sowie 40 Gesunden untersucht.

**Die Leberzirrhose ist das Endstadium von Erkrankungen vielfältiger Ätiologie. Entzündung und Regeneration finden dabei im Lebergewebe statt.**

Ang-2 ist im Serum von Patienten mit schweren chronischen Entzündungen erhöht [20, 21]. Es ist auch bekannt, dass eine Gefäßneubildung bei entzündlichen Vorgängen auftritt. Ebenso ist erwiesen, dass in der zirrhotischen Leber Angiogenese stattfindet [22, 24, 27]. Bereits im Jahr 1863 postulierte Virchow, dass eine Entzündung und die Entwicklung von Tumoren miteinander verknüpft sein können. Im Fall der Leberzirrhose ist der Zusammenhang zwischen Zirrhose und der Entstehung eines HCC von besonderer Wichtigkeit.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bei Patienten mit Leberzirrhose erhöhte Ang-2-Spiegel im Serum zu messen sind. Ang-2 ist im Serum von Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zu Gesunden erhöht. Die Ang-2 Serumspiegel sind unabhängig vom Stadium der Zirrhose und von der Grunderkrankung erhöht. Die höchsten Ang-2-Werte zeigten allerdings Patienten mit chronischer HCV-Infektion und alkoholbedingter Leberzirrhose. Eine chronische HCV-Infektion zeichnet sich durch hohe entzündliche Aktivität und aggressiven Krankheitsverlauf aus. Die erhöhten Ang-2-Spiegel im Serum der Patienten mit chronischer HCV-Infektion könnten auf diese entzündliche Aktivität und auf eine Beteiligung des Gefäßsystems im erkrankten Lebergewebe hinweisen. Ähnliche Beobachtungen wurden von Salcedo et al. gemacht [25, 28]. Sie wiesen eine Korrelation zwischen dem Grad der Entzündung und erhöhten Ang-2-Werten im Serum nach. Nach erfolgreicher Therapie sanken die Ang-2 Spiegel im Serum. Außerdem fand sich eine Korrelation zwischen der Höhe der Leberenzyme und Ang-2. Bei den Patienten der beiden Studien von Salcedo et al. lag jedoch keine Leberzirrhose vor, wie es in unserer Studie der Fall war.

Die ROC-Analyse verdeutlicht, dass die Unterscheidung zwischen Zirrhose und Gesunden durch Ang-2-Bestimmung im Serum umso besser gelingt, je höher das Child-Stadium ist. Das heißt, dass Sensitivität und Spezifität für Patientengruppen mit Stadien Child A bis Child C ansteigen. Die höhere Sensitivität und Spezifität mit

ansteigendem Child-Stadium lässt sich mit der Vorstellung vereinbaren, dass die Rate der Gefäßneubildungen aufgrund verstärkter Hypoxie mit zunehmender Leberschädigung ansteigt [27]. Durch die Gefäßneubildungen wird die Funktion des Lebergewebes aufrecht erhalten. Eine antiangiogenetische Therapie mit Ang-2 als Angriffspunkt hätte bei Patienten mit Leberzirrhose einerseits den Vorteil, die Entstehung eines HCC zu verhindern, andererseits könnte sich durch eine solche Therapie die Leberfunktion weiter verschlechtern.

Die im Vergleich zu anderen Grunderkrankungen höheren Ang-2-Werte bei alkoholtoxischer Leberzirrhose, die wir in unserer Arbeit festgestellt haben, lassen sich möglicherweise ebenfalls durch Stimulation der proangiogenetischen Faktoren aufgrund von Sauerstoffmangel erklären. Die Hypoxie im Lebergewebe ist besonders ausgeprägt, wenn Spitzenwerte von Alkohol im Serum des Patienten nachweisbar sind [26]. Daher ist Hypoxie ein wesentlicher schädigender Faktor bei der Entstehung der alkoholtoxischen Leberzirrhose.

Die Studie untersuchte ein Patientenkollektiv mit Lebererkrankungen unterschiedlichster Pathologie und Ätiologie. Das ist einerseits hilfreich, um eine Erhöhung von Ang-2 grundsätzlich im Serum von Patienten mit Leberzirrhose nachzuweisen zu können, andererseits kann so eine „selection bias“ weitgehend ausgeschlossen werden. Eine systemische Verzerrung wurde verhindert, da nicht bevorzugt Patienten mit einer bestimmten Grundkrankheit in die Kontrollgruppe aufgenommen wurden. Die Patienten wurden zufällig ausgewählt. Die Verteilung der unterschiedlichen Grunderkrankungen in unserer Studie ist repräsentativ, da sie die Häufigkeit der unterschiedlichen Ätiologien einer Leberzirrhose in den westlichen Ländern widerspiegelt. In Europa und den USA ist chronischer Alkoholabusus mit circa 60% der häufigste Grund für die Entstehung einer Leberzirrhose. An zweiter Stelle der ätiologischen Faktoren stehen mit etwa 30% Infektionen mit HBV, HCV und HDV [59].

Da sich aber in allen Untergruppen der Patienten mit Leberzirrhose eine Erhöhung von Ang-2 im Serum findet, können keine genauen Rückschlüsse darüber gemacht werden, worauf die Erhöhung von Ang-2 zurückzuführen ist: Entzündung, Regeneration oder Remodelling des chronisch geschädigten Lebergewebes. Außerdem kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass in der Kohorte von Patienten mit Leberzirrhose einige doch bereits an einem HCC erkrankt waren, dieses aber zu dem Zeitpunkt der Datenerhebung nicht diagnostiziert worden war.

### **Die Bestimmung von Ang-2 im Serum von Patienten kann eine Leberbiopsie nicht ersetzen.**

Anhand einer Leberbiopsie lässt sich in einigen Fällen die Ätiologie der Zirrhose feststellen, was durch Messung von Ang-2 nicht möglich ist. Wie bereits in der Einführung erläutert wurde, lassen sich die besten Ergebnisse in der Diagnostik der Leberzirrhose durch Kombination mehrerer Parameter erzielen. Fibrotest und APRI-Score sind nicht-invasive Methoden, die zur Diagnostik der Leberzirrhose angewendet werden und verschiedene Parameter in einem Test vereinen. Es ist denkbar, in Zukunft auch Ang-2 als Teil einer solchen diagnostischen Palette in eines dieser Modelle zu integrieren. Es bleibt zu untersuchen, in welcher Kombination mit Ang-2 die höchste diagnostische Sicherheit gewährleistet werden kann.

### **Ein HCC entsteht in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle auf dem Boden einer Leberzirrhose.**

Sie ist ein Risikofaktor für die Entstehung eines HCC. Daher ist es möglich, dass auch die in der Zirrhose nachgewiesene Angiogenese einen Risikofaktor für die Entstehung eines HCC darstellt. Die Bildung eines dichten Gefäßnetzwerkes kann es kleinsten Tumoren erleichtern, diese zu okkupieren und zu ihrer Versorgung und Ausbreitung zu nutzen. Dieser Mechanismus würde einen stärkeren Anstieg der Serummarker erst bei weiter fortgeschrittenen Tumoren erklären, d.h. wenn die Gefäßressourcen aus der vorangegangenen entzündlichen Erkrankung erschöpft sind und der Tumor eine Größe überschreitet, bei der er zusätzliche Gefäßversorgung benötigt.

Dem widerspricht ein weiteres Teilergebnis dieser Arbeit. Es wurde herausgefunden, dass die Erhöhung von Ang-2 und AFP im Serum von Patienten mit HCC unabhängig vom Tumorstadium ist. Außerdem zeigte sich keine Korrelation mit dem Tumorgrading. Im Gegensatz dazu resultierte aus mehreren anderen Studien, dass eine höhere Ang-2 Expression im Tumor mit schlechter differenzierten und stärker vaskularisierten HCC assoziiert ist [38-40]. Eine hohe Ang-2/Ang-1-mRNA-Rate ist außerdem mit häufigerer Invasion der Portalvene, größerem Tumordurchmesser, höherer Gefäßdichte und kürzerem rezidivfreiem Überleben assoziiert [35, 37]. Eine hohe Gefäßdichte ist also ein Marker für Invasivität und Metastasenbildung des HCC. Diese Eigenschaft wird aber von Ang-2 im Serum nicht widergespiegelt. Daher muss in weiteren Studien untersucht werden, ob die Expressionshöhe von Ang-2 im Tumor mit der zu messenden Konzentration im Serum korreliert. Der Sekretionsmechanismus von Ang-2 im HCC und

Faktoren, die diesen beeinflussen können, müssen untersucht werden. Es muss festgestellt werden, wie groß der Anteil des im Tumor gebildeten Ang-2 ist, der ins Serum abgegeben wird. Außerdem ist es wie im Fall von AFP möglich, dass ein Teil der HCC gar kein Ang-2 sezerniert. Im Falle des proangiogenetischen Faktors VEGF wurde dieser Nachweis schon erbracht. Die Tumorexpression von VEGF korreliert mit dem Serum-VEGF. Eine höhere Konzentration von VEGF korreliert mit einem weiter fortgeschrittenen Tumor, am höchsten ist sie bei Patienten mit Metastasen. Es wurde auch ein Zusammenhang zwischen VEGF im Serum und dem Auftreten eines postoperativen Rezidivs, dem Fehlen einer Tumorkapsel, dem Vorhandensein intrahepatischer Metastasen und einer mikroskopisch venösen Infiltration gesehen [66]. Ein Grund für die Tatsache, dass in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Ang-2 im Serum nachgewiesen werden konnte, kann im Studiendesign liegen. Durch die retrospektive Datenanalyse war Information über einzelne Charakteristika des Tumors bei den jeweiligen Patienten nur in begrenztem Umfang verfügbar. Die Gefäßdichte der HCC wurde bei der pathologischen Untersuchung nicht bestimmt und konnte somit auch nicht in diese Studie einfließen. Diese und andere wichtige Kriterien zur genaueren Einteilung der Patienten mit HCC ließen sich anhand einer prospektiven Studie besser untersuchen.

### **Serummarker können einen wichtigen Teil zur Diagnostik eines malignen Tumors beitragen.**

Hintergrund dieser Arbeit ist das Wissen um die Rolle der Angiogenese beim HCC und der Beteiligung von Angiopoietin-2 dabei. Eine verstärkte Expression von Ang-2 im HCC geht mit erhöhter Gefäßdichte und invasiverem Wachstum einher. Die oben beschriebenen Versuche wurden mit der Absicht durchgeführt festzustellen, ob sich Ang-2 auch als Serummarker für das hepatozelluläre Karzinom und die Leberzirrhose eignet. Unsere Ergebnisse wurden mit dem bereits etablierten Serummarker für das HCC - dem AFP -verglichen.

Durch die Ang-2-Bestimmung im Serum können sowohl Patienten mit HCC von Gesunden als auch Patienten mit HCC von solchen mit Leberzirrhose aber ohne HCC abgegrenzt werden.

Der Marker Ang-2 erreichte bei HCC-Patienten im Vergleich zu Zirrhotikern und Gesunden einen höheren Mittelwert. Es muss aber bedacht werden, dass von den 88 Patienten dieser Studie, bei denen das Tumorstadium (T) ermittelt werden konnte, bei



nur 13 Personen ein Tumor im Stadium T1 vorlag. In den anderen Fällen war der Tumor weiter fortgeschritten. Die relativ guten Testvariablen könnten also darauf zurückzuführen sein, dass hauptsächlich fortgeschrittene Tumorstadien in die Studie einfließen.

Erhöhte Ang-2 Werte im Serum können zwar auf das Vorliegen eines HCC hindeuten, ein eindeutiger Hinweis auf das Tumorstadium ergibt sich anhand der Werte aber nicht. Der Überlappungsbereich der einzelnen Tumorstadien ist groß. Das gilt auch für die Unterscheidung zwischen Patienten mit Leberzirrhose und Patienten mit HCC. Wie sich die Ang-2 Werte z.B. beim Übergang einer Leberzirrhose zu der Entstehung eines HCC im frühen Stadium verhalten, bleibt unklar. Es ist nicht sicher, wie das gleichzeitige Vorliegen einer Leberzirrhose und eines HCC die Höhe von Ang-2 im Serum beeinflusst. Von Interesse wäre eine Studie mit HCC-Patienten, bei denen keine Leberzirrhose vorliegt. Das ist in Asien bei Patienten mit chronischer Hepatitis B Infektion häufiger der Fall als in westlichen Ländern.

Über die Frage, ab wann in einem Tumor neue Gefäße gebildet werden, gibt es keine eindeutigen Angaben. Es existiert die Vorstellung, dass Tumoren, die kleiner als 2mm sind in einem avaskulären Stadium existieren können [31] bzw. bereits bestehende Gefäße okkupieren und Ang-2 nur dazu beiträgt, diese „gesunden“ Gefäßstrukturen aufzulockern [32]. Die Verwendung von Ang-2 als Serummarker wäre besonders bei frühen Stadien des Tumors von Interesse, da diese durch andere diagnostische, meist radiologische Verfahren in der häufig zirrhotischen Leber schwierig zu detektieren sind. Gerade diese frühen Tumorstadien weisen bei adäquater Behandlung die beste Prognose auf. Es sollte anhand großer Fallzahlen und in einer prospektiven Studie untersucht werden, wie gut sich Ang-2 als Marker für frühe HCC-Stadien eignet. Es stellt sich die Frage, ob Patienten tatsächlich von der erweiterten Diagnostik mit Bestimmung der Ang-2 Plasmaspiegel profitieren würden. Unklar ist auch, ob mit Hilfe von Ang-2 als Serummarker die Prognose des HCC-Patienten tatsächlich verbessert werden könnte. Ang-2 ist nicht spezifisch für das Vorliegen eines HCC, und seine Erhöhung im Serum kann viele andere Gründe haben und somit irrtümlich den Verdacht auf eine Tumorerkrankung lenken.

Andererseits hat die Verwendung von Ang-2 als Serummarker den Vorteil, dass es die Tumorbilologie und insbesondere das maligne Gefäßwachstum widerspiegeln kann. Seine Anwendung bietet eine weitere Möglichkeit zur Therapiekontrolle und kann frühzeitig auf die Ausbreitung eines Tumorrezidives hinweisen. Außerdem besteht

grundsätzlich die Möglichkeit, mit Hilfe der Ang-2 Bestimmung im Serum zwischen unterschiedlichen Lebertumoren zu differenzieren.

### **Die Diagnose des HCC anhand des bisher etablierten Serummarkers weist große Schwächen auf.**

Die Messung von AFP im Serum von Patienten mit Leberzirrhose ist Teil des Screening-Verfahrens zur Früherkennung eines HCC.

Mehr als 70% der Patienten mit HCC weisen eine erhöhte Konzentration von AFP auf [53]. Das heißt, dass 30% der Patienten mit HCC durch AFP-Messung nicht diagnostiziert werden können. Die Sensitivität der AFP Bestimmung für das HCC beträgt 60-80% [66]. Die Anwendung von AFP zum Screening auf ein hepatozelluläres Karzinom ist nicht unumstritten. Besonders im asiatischen Raum ergab sich in prospektiven Studien ein Nutzen durch das Screening mit AFP, allerdings immer zusammen mit der Durchführung einer Ultraschalluntersuchung der Leber im Intervall von 6 Monaten. Yang et al. zeigten, dass durch halbjährliche Bestimmung von AFP im Serum und Ultraschall der Leber bei Hochrisikopatienten häufiger frühe Tumorstadien detektiert werden können. Außerdem wiesen sie eine Erhöhung der Resektionsrate und Überlebenszeit durch das Screening nach [67].

Es wird empfohlen, Patienten mit AFP-Serumspiegeln über 20ng/ml oder mit einem signifikanten Anstieg von AFP im Serum mittels Ultraschall zu untersuchen und sie als Hochrisikopatienten einzustufen [68]. Alpha-Fetoprotein dient somit nur als Hinweis und das Vorliegen eines HCC muss durch andere diagnostischer Verfahren verifiziert werden. Die Bestimmung von AFP alleine ist daher kein geeignetes Mittel zum HCC-Screening.

### **Die Schwellenwerte für AFP sind nicht einheitlich.**

In dieser Arbeit lag er bei 10 $\mu$ g/l, dem Schwellenwert unseres Referenzlabors. In anderen Studien lag der Referenzwert bei 15 $\mu$ g/l. Bei Serumwerten von mehr als 20 $\mu$ g/l wird empfohlen, das Vorhandensein eines HCC durch radiologische Verfahren auszuschließen. Wenn wie hier der Schwellenwert mit 10 $\mu$ g/l niedriger angelegt wird, ist es möglich, dass einerseits zu viele falsch-positive Ergebnisse durch AFP-Bestimmung entstehen oder sich die Diagnose doch nur auf eine Ang-2-Erhöhung stützt. Der ideale Schwellenwert von Ang-2 bleibt noch zu ermitteln, sollte die Kombination dieser beiden Proteine im Serum Eingang in die Routinediagnostik finden. Durch Erhöhung der

tumorspezifischen AFP-Untergruppen L3 und P4+P5 im Serum scheint ein HCC drei bis achtzehn Monate früher diagnostiziert werden zu können als anhand bildgebender Verfahren [69], da diese Untergruppen spezifischer für das HCC sind. Ob diese Erkenntnis von Vorteil für die Prognose des Patienten ist, ist fraglich. Eine kurative Tumorthherapie kann nur dort ansetzen, wo ein Tumor radiologisch sichtbar ist.

**Es ist fraglich, ob sich Studienergebnisse und Empfehlungen zum Screening aus Asien ohne weiteres auf Europa übertragen lassen.**

Die Patienten in Europa unterscheiden sich von asiatischen HCC-Patienten, da die Prävalenz von C2-Abusus höher ist, sie durchschnittlich älter sind, die Anzahl an kleinen singulären, eingekapselten Tumorknoten kleiner ist und sie häufiger an einer Leberzirrhose leiden.

In einer prospektiven Studie an 118 französischen Zirrhosepatienten im Stadium Child A und B war die Ultraschalluntersuchung das effektivste diagnostische Mittel für das HCC-Screening. Besonders kleine Tumore ließen sich durch Ultraschall besser diagnostizieren. Die Sensitivität von AFP lag bei nur 50%. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen anderer europäischer Studien [70].

Sherman et al. untersuchten die Qualität von AFP beim HCC-Screening in einer kanadischen Population von 1069 chronisch HBV-Infizierten [54]. Sensitivität und Spezifität von AFP mit einem Grenzwert von 20µg/L lagen bei 64,3% und 91,4%. Dagegen waren Sensitivität und Spezifität des Ultraschalls mit 78,8% und 93,8% deutlich höher. Insgesamt war AFP bei 111 Patienten im Verlauf erhöht. Davon hatten aber nur 11 Patienten tatsächlich ein HCC. Anders ausgedrückt lag bei 91% der Patienten, die eine AFP-Erhöhung im Serum aufwiesen, kein HCC vor. Bei 11 Frauen war der Grund für die AFP-Erhöhung im Serum eine Schwangerschaft, bei 47 Patienten war der Grund die Exazerbation einer chronischen Hepatitis. Bei 42 Patienten konnte kein Grund für eine AFP-Erhöhung gefunden werden, und die Werte waren im Verlauf wieder rückläufig. Ein Screening mittels AFP führt vor allem deshalb zu hohen Kosten, da die falsch-positiven Ergebnisse durch andere Untersuchungen wie Ultraschall oder CT überprüft werden müssen, außerdem werden die Patienten unnötig beunruhigt. Insgesamt waren mehr als 50% der diagnostizierten HCCs nicht resezierbar und somit der Nutzen für den Patienten begrenzt. Außerdem besteht auch nach Resektion ein hohes Rezidivrisiko.

Patienten mit chronischen Lebererkrankungen zeigen häufig eine AFP-Erhöhung im Serum. Bei Vorliegen einer solchen Erkrankung ist es daher wichtig, die Serumspiegel von AFP im Verlauf und im Bezug auf die Grunderkrankung zu beobachten, um einen fälschlichen Malignomverdacht zu vermeiden.

**Die Anwendung von AFP zur Diagnose des HCC etablierte sich, bevor Ultraschall und CT in der heutigen Qualität zur Verfügung standen.**

Durch die erfolgreiche Anwendung dieser bildgebenden Verfahren wurde erkannt, dass ein großer Teil der HCC nicht zur Erhöhung der Serumspiegel von AFP im diagnostischen Bereich führt. Bevor die AFP-Werte im Serum im Bereich von 20ng/ml liegen, wird der Tumor in der Regel bereits durch diese bildgebenden Verfahren detektiert, d.h. dass solche sehr hohen Werte oft gar nicht mehr auftreten und nicht für die Diagnosestellung notwendig sind. Es stellt sich also die Frage, unter welchen Umständen AFP im Serum erhöht ist, in der Bildgebung aber kein Tumor nachweisbar ist. Dafür kann es zwei Gründe geben, nämlich entweder, dass der Tumor sehr klein ist oder dass er diffus infiltrierend wächst und radiologisch keine Randzone sichtbar ist. Wenn der Tumor aber zu klein ist, um im Bild gesehen werden, ist er auch zu klein, um behandelt zu werden. Wenn der Tumor aber diffus infiltriert, dann ist auch keine kurative Therapie mehr möglich. Die Anwendung von AFP als diagnostisches Mittel kann daher nur noch unter folgenden Umständen empfohlen werden: Als Kontrollparameter bei Patienten mit asymptomatischer, chronischer Lebererkrankung und als Bestätigung bei Patienten, bei denen mittels Ultraschall bereits ein Tumor in der Leber vermutet wird. In Gegenden, in denen kein Ultraschall oder CT zur Verfügung steht ist die AFP-Bestimmung ebenfalls sinnvoll [55].

**Mit Hilfe der Ang-2-Bestimmung im Serum können HCC-Patienten von Zirrhotikern und Gesunden unterschieden werden.**

Daher liegt es nahe, Ang-2 und AFP als Tumormarker zu vergleichen. Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass durch Ang-2-Messung in allen Zirrhosestadien zwischen HCC und Zirrhose unterschieden werden kann. Durch AFP-Bestimmung ist diese Unterscheidung nur im Stadium Child C möglich. Dieses Ergebnis kann einerseits dadurch begründet werden, dass Ang-2 den Übergang zwischen benigner zu maligner Erkrankung besser markiert und die Neubildung von Tumorgefäßen besser widerspiegelt als AFP. Andererseits spricht das Ergebnis dafür, dass eine AFP-Erhöhung im Serum stärker

vom Stadium der Leberzellschädigung an sich abhängig ist. Entsprechend findet sich AFP häufig bereits bei Leberzirrhose alleine erhöht und der Anstieg bei Karzinomentstehung ist nicht mehr signifikant.

**Die Diagnose eines HCC kann sich nicht auf ein einzelnes diagnostisches Mittel stützen. Die Kombination mehrerer Verfahren ist hilfreich.**

Schließlich wurde daher ermittelt, wie sich eine Kombination von Ang-2 und AFP als Serummarker zu Diagnostik eines HCC eignet. Die Ergebnisse zeigten, dass sich eine Kombination der beiden Marker dadurch auszeichnet, dass weniger HCC übersehen werden würden, wenn beide Marker kombiniert würden. Sensitivität und Spezifität lagen bei 82,3% und 80,65% für die Kombination von Ang-2 und AFP als Serummarker. Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt eine AFP-Erhöhung bei insgesamt 71% der Patienten mit HCC und entspricht vorherigen oben erwähnten Angaben aus der Literatur. Bei der Kombination von AFP und Ang-2 als Serummarker würden 89,3% der Fälle ermittelt. Würde Ang-2 zusätzlich als Marker zur Diagnostik des HCC angewendet, könnte der Tumor bei mehr Patienten diagnostiziert werden als mit der Bestimmung von AFP allein.

**In dieser Arbeit konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Verlauf, Therapie und Ang-2 sowie AFP-Serumspiegeln nachgewiesen werden.**

Die Anzahl von vier Patienten ist für diese Untersuchung sicherlich zu klein. Es wäre sinnvoll, eine prospektive Studie zu planen, in der dieser Zusammenhang überprüft wird und bei der von Anfang an alle wichtigen Daten dokumentiert werden. Die retrospektive Datenerhebung ist hierfür nur begrenzt geeignet.

**Die Vor- und Nachteile der Anwendung von Tumormarkern müssen im Hinblick auf die Anwendung von Ang-2 abgewogen werden.**

Die Bestimmung des Ang-2-Serumspiegels ist nicht invasiv und kann im Rahmen von Blutentnahmen bei Vorsorgeuntersuchungen von Risikopatienten vorgenommen werden. Es ist grundsätzlich möglich, die Messung von Ang-2 im Serum laborchemisch zu standardisieren. Eine Erhöhung von Ang-2 kann wie die anderer Tumormarker als Hinweis auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung gesehen werden, wenn sich mit Hilfe anderer Mittel kein Verdacht ergibt. Die Bestimmung von Ang-2 könnte so ergänzend zur Diagnose des HCC oder der Leberzirrhose beitragen.

Von Nachteil ist, dass Ang-2 wie AFP nicht spezifisch für eine Zirrhose oder ein HCC ist. Eine Erhöhung dieses Proteins kann andere Ursachen wie Entzündungen oder Tumore anderer Lokalität oder Dignität haben [8, 17-19]. Die vermehrte Expression von Ang-2 kann in der chronisch geschädigten Leber ein Zeichen für Regeneration des Gewebes sein [71]. Es ist möglich, dass es durch die Ang-2-Bestimmung im Serum zu falsch-positiven Ergebnissen kommt und durch die Veranlassung weiterer diagnostischer Verfahren zusätzliche Kosten entstehen. Deshalb wird die Bestimmung von Ang-2 wahrscheinlich immer Teil einer Kombination aus diagnostischen Mitteln sein. Die Zuverlässigkeit von Ang-2 in der Diagnostik des HCC und der LZ muss anhand weiterer Studien überprüft werden.

Zusammenfassend ist mit der vorliegenden Studie die Möglichkeit eröffnet worden, Ang-2 gemeinsam mit AFP bei der Diagnostik des HCC und der Leberzirrhose als Serummarker zu etablieren.

## 7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Serumspiegel von Ang-2 als Tumormarker beim HCC untersucht. Es handelte sich um eine retrospektive Kohortenstudie an 131 Patienten mit HCC. Die Vergleichsgruppe bestand aus 180 Patienten mit Leberzirrhose und 40 gesunden Probanden. Es konnte erstmals eine Erhöhung von Angiopoetin-2 im Serum von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom und mit Leberzirrhose nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Ang-2-Bestimmung im Serum konnte sowohl zwischen Patienten mit HCC und Gesunden als auch zwischen solchen mit HCC und solchen mit Leberzirrhose unterschieden werden. Patienten mit HCC zeigten die höchsten Ang-2-Werte im Serum. Die Messung von Angiopoetin-2 im Serum eignet sich auch zur Unterscheidung zwischen Zirrhotikern und Gesunden. Obwohl sich bei Patienten mit Leberzirrhose jedweder Genese erhöhte Ang-2 Spiegel fanden, waren die Werte bei Patienten mit HCV-bedingter oder ethyltoxischer Zirrhose am höchsten.

Eine Kombination von Ang-2 und dem in der Diagnostik des HCC etablierten Tumormarker AFP zur Diagnose eines hepatozellulären Karzinoms erwies sich in dieser Studie als potentiell sinnvoll. Die gleichzeitige Verwendung beider Marker könnte künftig dazu beitragen, den Tumor früher zu diagnostizieren und weniger Tumore zu übersehen.

In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem Ang-2-Serumspiegel und dem Tumorstadium, bzw. dem histologischen Grading nachgewiesen werden. Auch ein fortgeschrittenes Child-Stadium bei Patienten mit HCC korrelierte nicht mit einer Erhöhung von Ang-2 im Serum. Die Ergebnisse untermauern die Rolle von Ang-2 bei der Genese und Ausbreitung des HCC und lassen es möglich erscheinen, Ang-2 künftig als Tumormarker für das HCC einzusetzen. Ein Anstieg von Angiopoetin-2 im Serum kann den Übergang von einer Leberzirrhose zu einem HCC oder ein Rezidiv nach Therapie markieren. Der Serummarker Ang-2 könnte außerdem das Ansprechen auf eine antiangiogenetische Therapie dokumentieren.

Die vorliegende Arbeit legt den Grundstein für eine weitere diagnostische Option- die Verwendung des Angiogenesemarkers Ang-2 zur Diagnostik eines weit verbreiteten, äußerst malignen Tumors- des hepatozellulären Karzinoms.

Die Ergebnisse dieser Studie sollten anhand einer prospektiven Studie überprüft werden.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

$\gamma$ -GT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
AFP	Alpha-Fetoprotein
AL	Afterloading-Therapie
ALT=GPT	Alanin-Amino-transferase
Ang-1	Angiopoetin-1
Ang-2	Angiopoetin-2
Ang-3	Angiopoetin-3
Ang-4	Angiopoetin-4
ANOVA	Analysis of variance
APRI	AST to platelet ratio index
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AST=GOT	Aspartat-Amino-transferase
AUC	Area under the curve
Ci	Cirrhose
Cox	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FNH	Fokal noduläre Hyperplasie
G	Grading
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
HIF	Hypoxia inducible factors
HIV	Human immunodeficiency virus
HMVEC	Human microvascular endothelial cells
HRP	Horseradish-peroxidase
INR	International normalized ratio



kb	Kilobasen
Ko	Kontrolle
LTX	Lebertransplantation
MLC	Myosin light chain
MRT	Magnetresonanztomographie
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NSAID	Non-steroidal antiinflammatory drugs
NSCLC	Non small cell lung cancer
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PSC	Primäre sklerosierende Cholangitis
ROC-Analyse	Receiver operating curves-Analyse
SBP	Spontane bakterielle Peritonitis
SIRS	Severe inflammatory response syndrome
STIKO	Ständige Impfkommission
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
Tie2	Tyrosine kinase with immunoglobuline and epidermal growth factor homology domains 2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TNM	Tumor-lymphnode-metastasis
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 9. Literaturverzeichnis

1. El-Serag, H.B., *Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S27-34.
2. Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2003. **362**(9399): p. 1907-17.
3. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
4. Trevisani, F., et al., *Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status*. J Hepatol, 2001. **34**(4): p. 570-5.
5. Ergun, S., et al., *Significance of vascular stabilization for tumor growth and metastasis*. Cancer Lett, 2006. **238**(2): p. 180-7.
6. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
7. Bach, F., F.J. Uddin, and D. Burke, *Angiopoietins in malignancy*. Eur J Surg Oncol, 2007. **33**(1): p. 7-15.
8. Jones, P.F., *Not just angiogenesis--wider roles for the angiopoietins*. J Pathol, 2003. **201**(4): p. 515-27.
9. Sato, T.N., et al., *Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 70-4.
10. Koh, G.Y., et al., *Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin*. Exp Mol Med, 2002. **34**(1): p. 1-11.
11. Hanahan, D., *Signaling vascular morphogenesis and maintenance*. Science, 1997. **277**(5322): p. 48-50.
12. Valenzuela, D.M., et al., *Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1904-9.
13. Davis, S., et al., *Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1161-9.
14. Suri, C., et al., *Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1*. Science, 1998. **282**(5388): p. 468-71.
15. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
16. Lim, H.S., G.Y. Lip, and A.D. Blann, *Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2005. **180**(1): p. 113-8.
17. Nadar, S.K., et al., *Abnormal angiopoietins 1&2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor levels in hypertension: relationship to target organ damage [a sub-study of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)]*. J Intern Med, 2005. **258**(4): p. 336-43.
18. Lee, K.W., G.Y. Lip, and A.D. Blann, *Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes*. Circulation, 2004. **110**(16): p. 2355-60.
19. Koutroubakis, I.E., et al., *Potential role of soluble angiopoietin-2 and Tie-2 in patients with inflammatory bowel disease*. Eur J Clin Invest, 2006. **36**(2): p. 127-32.
20. Orfanos, S.E., et al., *Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators*. Crit Care Med, 2007. **35**(1): p. 199-206.

21. Parikh, S.M., et al., *Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans*. PLoS Med, 2006. **3**(3): p. e46.
22. Medina, J., et al., *Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study*. J Hepatol, 2005. **42**(1): p. 124-31.
23. Paradis, V., et al., *A quantitative gene expression study suggests a role for angiopoietins in focal nodular hyperplasia*. Gastroenterology, 2003. **124**(3): p. 651-9.
24. Rosmorduc, O., et al., *Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis*. Am J Pathol, 1999. **155**(4): p. 1065-73.
25. Salcedo Mora, X., et al., *Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients*. Rev Esp Enferm Dig, 2005. **97**(10): p. 699-706.
26. Medina, J., et al., *Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1185-95.
27. Corpechot, C., et al., *Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1010-21.
28. Salcedo, X., et al., *The potential of angiogenesis soluble markers in chronic hepatitis C*. Hepatology, 2005. **42**(3): p. 696-701.
29. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
30. Yoshiji, H., et al., *Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice*. Gut, 2005. **54**(12): p. 1768-75.
31. Tait, C.R. and P.F. Jones, *Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch*. J Pathol, 2004. **204**(1): p. 1-10.
32. Holash, J., et al., *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF*. Science, 1999. **284**(5422): p. 1994-8.
33. Tsuyoshi Etoh, H.i., Shinji Tanaka, Graham F. Barnard, seigo Kitano and Masaki Mori, *Angiopoietin-2 Is Related to Tumor Angiogenesis in Gastric Carcinoma: Possible in Vivo Regulation via Induction of Proteases*. Cancer Research, 2001. **61**: p. 2145-2153.
34. Ahmad, S.A., et al., *The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1255-9.
35. Sun, H.C. and Z.Y. Tang, *Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives*. J Cancer Res Clin Oncol, 2004. **130**(6): p. 307-19.
36. Wada, H., et al., *Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1 alpha*. Liver Int, 2006. **26**(4): p. 414-23.
37. Mitsunashi, N., et al., *Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1105-13.
38. Tanaka, S., et al., *Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma*. J Clin Invest, 1999. **103**(3): p. 341-5.
39. Sugimachi, K., et al., *Angiopoietin switching regulates angiogenesis and progression of human hepatocellular carcinoma*. J Clin Pathol, 2003. **56**(11): p. 854-60.

40. Torimura, T., et al., *Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2004. **40**(5): p. 799-807.
41. Oliner, J., et al., *Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2*. Cancer Cell, 2004. **6**(5): p. 507-16.
42. Torimura, T., et al., *Gene transfer of krigle 1-5 suppresses tumor development and improves prognosis of mice with hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1301-10.
43. J.D. Schwartz, M.S., D. Lehrer, D. Coll, M. Kinkhabwala, M. Sung, S.B. Holloway, S. Wadler, *Bevacizumab in hepatocellular carcinoma (HCC) in patients without metastasis and without invasion of the portal vein*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**.
44. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
45. Carmeliet, P., *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 932-6.
46. J. Llovet, S.R., V. Mazzaferro, P. Hilgard, J. Raoul, S. Zeuzem, M. Poulin-Costello, M. Moscovici, D. Violitis, J. Bruix, For the SHARP Investigators Study Group, *Sorafenib improves survival in advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC): Results of a Phase III randomized placebo-controlled trial (SHARP trial)*. Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings, 2007. **25** (June 20 Supplement).
47. F.D. Huitzil-Melendez, L.B.S., J. Song, M. Capanu, G. Jacobs, J. Humphrey, G. K. Abou-Alfa, *Retrospective analysis of outcome in hepatocellular carcinoma (HCC) patients with hepatitis C versus B treated with sorafenib*. 2007, American Society of Clinical Oncology
48. El-Serag, H.B. and A.C. Mason, *Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States*. N Engl J Med, 1999. **340**(10): p. 745-50.
49. Jules L. Dienstag, K.I., *Hepatocellular Carcinoma*, in *Harrisons Internal Medicine Online*. 2007.
50. Kubicka, S., et al., *Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area*. Liver, 2000. **20**(4): p. 312-8.
51. Sherman, M., *Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening*. Semin Liver Dis, 2005. **25**(2): p. 143-54.
52. Bruix, J., et al., *New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2006. **25**(27): p. 3848-56.
53. Zhou, L., J. Liu, and F. Luo, *Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(8): p. 1175-81.
54. Sherman, M., K.M. Peltekian, and C. Lee, *Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population*. Hepatology, 1995. **22**(2): p. 432-8.
55. Sherman, M., *Alphafetoprotein: an obituary*. J Hepatol, 2001. **34**(4): p. 603-5.
56. Zhang, B. and B. Yang, *Combined alpha fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer*. J Med Screen, 1999. **6**(2): p. 108-10.
57. Colombo, M. and M.F. Donato, *Prevention of hepatocellular carcinoma*. Semin Liver Dis, 2005. **25**(2): p. 155-61.
58. Befeler, A.S. and A.M. Di Bisceglie, *Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment*. Gastroenterology, 2002. **122**(6): p. 1609-19.
59. Goldberg, E., Sanjiv, C., [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). 2007.
60. Bundesamt, S., *Gesundheitsbericht 2006*. 2006: [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de).

61. Sebastiani, G. and A. Alberti, *Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3682-94.
62. Guha, I.N., et al., *Non-invasive markers associated with liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease*. Gut, 2006. **55**(11): p. 1650-60.
63. Shaheen, A.A., A.F. Wan, and R.P. Myers, *FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(11): p. 2589-600.
64. Friedrich-Rust, M. and S. Zeuzem, *[Transient elastography (FibroScan) for the non-invasive assessment of liver fibrosis: current status and perspectives]*. Z Gastroenterol, 2007. **45**(5): p. 387-94.
65. Pugh, R.N., et al., *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices*. Br J Surg, 1973. **60**(8): p. 646-9.
66. Semela, D. and J.F. Dufour, *Angiogenesis and hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2004. **41**(5): p. 864-80.
67. Dörner, K., *Klinische Chemie und Hämatologie*. Vol. 3. 1999, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag. 572.
68. Yang, B., et al., *Prospective study of early detection for primary liver cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 1997. **123**(6): p. 357-60.
69. Oka, H., et al., *Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 1994. **19**(1): p. 61-6.
70. Sato, Y., et al., *Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein*. N Engl J Med, 1993. **328**(25): p. 1802-6.
71. Pateron, D., et al., *Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis*. J Hepatol, 1994. **20**(1): p. 65-71.
72. Sato, T., et al., *Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver*. J Hepatol, 2001. **34**(5): p. 690-8.

## **10. Lebenslauf**

Wird in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.

## **11. Danksagung**

Ich danke

Dr. Eckart Schott für seine stets zuverlässige Betreuung und seine konstruktive Kritik.

Dr. Arne Scholz, Prof. Dr. Thomas Berg, Prof. Dr. Bertram Wiedenmann, Dr. Perta Schulz, Dr. Katja Derkow, Sandra Vierich, Barbara Malik.

Meiner Familie und meinen Freunden.

## **Erklärung**

„Ich, Vanessa Annina Rehm, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Angiopoietin-2 als Serummarker zur Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms und der Leberzirrhose“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum 30.1.2009