

Medizinische Klinik für  
Hepatologie, Gastroenterologie und Stoffwechselerkrankungen der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin am  
Campus Virchow-Klinikum

DISSERTATION

Korrelation von *placental growth factor*,  
*vascular endothelial growth factor* und *soluble vascular endothelial  
growth factor receptor-1* im Serum  
mit Tumorstadien und Prognose des hepatozellulären Karzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Astrid Marthe Wendt

aus Berlin

Datum der Promotion: 21.06.2020

## Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	4
2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	5
3	TABELLENVERZEICHNIS .....	5
4	ZUSAMMENFASSUNG .....	7
4.1	ZUSAMMENFASSUNG .....	7
4.2	ABSTRACT .....	8
5	EINLEITUNG .....	9
5.1	GRUNDLAGEN.....	9
5.1.1	Das hepatozelluläre Karzinom.....	9
5.1.2	Die Leberzirrhose .....	17
5.1.3	Die Rolle der Angiogenese und deren Faktoren in der Entwicklung der Zirrhose und des HCC .....	20
5.2	ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	23
6	MATERIAL UND METHODEN.....	23
6.1	STUDIENDESIGN.....	23
6.2	PROBANDEN UND SEREN .....	24
6.3	LABOR .....	27
6.3.1	Grundprinzip enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	27
6.3.2	Prozedere .....	27
6.3.3	Materialien.....	28
6.4	STATISTISCHE METHODEN .....	29
7	ERGEBNISSE .....	31
7.1	PATIENTENEIGENSCHAFTEN.....	32
7.1.1	Kohorte der HCC-Patienten.....	32
7.1.2	Kohorte der Zirrhose-Patienten .....	32
7.1.3	Kohorte der gesunden Probanden.....	32
7.2	TUMOREIGENSCHAFTEN .....	34
7.3	THERAPIEARTEN.....	36
7.4	ÜBERLEBENSZEITANALYSEN.....	38
7.4.1	Gesamtüberleben .....	38
7.4.2	Überlebenszeitanalysen differenziert nach Patientencharakteristika.....	38
7.4.3	Überlebenszeitanalysen differenziert nach Zirrhose-Parametern .....	39
7.4.4	Überlebenszeitanalysen differenziert nach Tumorcharakteristika.....	39
7.4.5	Überlebenszeitanalysen differenziert nach PIGF, VEGF und sVEGFR-1 .....	40
7.4.6	Multivariate Analysen .....	43
7.5	ANALYSE DER SERUMMARKER .....	48

7.5.1	PIGF, VEGF, sVEGFR-1 und AFP als Marker für HCC und Zirrhose.....	49
7.5.2	PIGF, VEGF, sVEGFR-1 und AFP als Marker für Tumorcharakteristika .....	52
7.5.3	PIGF, VEGF, VEGFR-1 und AFP als Marker für Zirrhosestadien .....	56
7.5.4	Kombination der Marker .....	57
7.5.5	Korrelation von AFP, PIGF, VEGF und sVEGFR-1 .....	60
8	DISKUSSION .....	60
8.1	KOHORTENCHARAKTERISTIKA UND ÜBERLEBENS DATEN IM KONTEXT DER AKTUELLEN DATENLAGE .....	61
8.1.1	Patientencharakteristika.....	61
8.1.2	Tumoreigenschaften .....	62
8.1.3	Therapiearten .....	62
8.1.4	Überlebenszeitanalysen .....	63
8.2	ANALYSE DER SERUMMARKER .....	65
8.2.1	Das klinische Management des HCC und seine Grenzen.....	65
8.2.2	Angiogene Faktoren als diagnostische, prognostische und prädiktive Marker für das HCC in der Literatur.....	66
8.2.3	Angiogene Faktoren und AFP als diagnostische und prognostische Marker in unseren Kohorten.....	67
8.2.4	VEGF-Cut-off-Werte.....	68
8.2.5	VEGF-Werte bei HCC, Zirrhose und chronischer Lebererkrankung .....	68
8.2.6	PIGF- und VEGFR-1-Werte bei HCC, Zirrhose und chronischer Lebererkrankung.....	69
8.2.7	Faktoren der Angiogenese im Gewebe.....	70
8.2.8	Angiogene Faktoren unter Therapie .....	71
8.3	GRENZEN DER STUDIE .....	72
8.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN .....	73
9	LITERATURVERZEICHNIS .....	75
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....	85
11	LEBENS LAUF.....	86
12	DANKSAGUNG .....	87

## 1 Abkürzungsverzeichnis

AFLD: *alcoholic fatty liver disease*: alkoholische Fettlebererkrankung

AFP: Alphafetoprotein

AUC: *area under the curve*: Fläche unter der Kurve

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*

CLIP: *Cancer of the Liver Italian Program*

EASL: *European Association for the Study of the Liver*

ECOG: *Eastern Co-operative Oncology Group*

HBV: Hepatitis-B-Virus

HCC: hepatozelluläres Karzinom

HCV: Hepatitis-C-Virus

HKLC: *Hong Kong Liver Cancer*

LTX: Lebertransplantation

MELD: *Model of End-stage Liver Disease*

mRECIST: *modified response evaluation criteria in solid tumors*

NAFLD: *non-alcoholic fatty liver disease*: nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

PBC: primär biliäre Cholangitis

PEI: perkutane Ethanol-Injektionstherapie

PlGF: *placental growth factor*

PSC: primär sklerosierende Cholangitis

RFA: Radiofrequenzablation

ROC: *receiver operating characteristic*

SIRT: selektive interne Radiotherapie

TACE: transarterielle Chemoembolisation

TAE: transarterielle Embolisation

TARE: transarterielle Radioembolisation

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

sVEGFR: *soluble vascular endothelial growth factor receptor*

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modifiziertes BCLC Staging-System, modifiziert nach Galle PR et al. (1).....	16
Abbildung 2: Sequentielle Therapie des HCC, modifiziert nach Forner et al. (36) .....	17
Abbildung 3: Studiendesign .....	26
Abbildung 4: Gesamtüberleben der HCC-Patienten .....	41
Abbildung 5: Gesamtüberleben der HCC-Patienten, transplantierte Patienten ausgenommen .....	41
Abbildung 6: Überleben nach BCLC-Stadien.....	42
Abbildung 7: Überleben nach TNM-Stadien .....	42
Abbildung 8: Überleben nach Okuda-Stadien .....	42
Abbildung 9: Überleben nach CLIP-Stadien .....	42
Abbildung 10: Kurative versus lokale Therapie im BCLC Stadium B .....	42
Abbildung 11: Lokale Therapie versus Sorafenib im BCLC Stadium C und D .....	42
Abbildung 12: Überleben nach AFP (ng/mL).....	43
Abbildung 13: Überleben nach VEGF (pg/mL).....	43
Abbildung 14: Überleben nach sVEGFR-1 (pg/mL) .....	43
Abbildung 15: Boxplots von PIGF in den verschiedenen Kohorten .....	51
Abbildung 16: Boxplots von VEGF in den verschiedenen Kohorten .....	51
Abbildung 17: Boxplots von sVEGFR-1 in den verschiedenen Kohorten.....	51
Abbildung 18: Boxplot von AFP in den Kohorten HCC und Zirrhose .....	51
Abbildung 19: ROC-Kurve für sVEGFR-1 zur Differenzierung von HCC und Zirrhose .....	52
Abbildung 20: ROC-Kurve für AFP zur Differenzierung von HCC und Zirrhose .....	52

## 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Staging-System CLIP .....	13
Tabelle 2: Staging-System Okuda.....	13
Tabelle 3: Child-Pugh-Kriterien.....	20
Tabelle 4: Materialien für ein Assay .....	29
Tabelle 5: Patienteneigenschaften der HCC-Kohorte .....	34
Tabelle 6: Patienteneigenschaften der Zirrhose-Kohorte .....	34
Tabelle 7: Tumoreigenschaften .....	36
Tabelle 8: Therapiearten in absteigender Häufigkeit .....	37
Tabelle 9: Zusammenfassung der univariaten Überlebenszeitanalysen mit transplantierten Patienten	45
Tabelle 10: Zusammenfassung der univariaten Überlebenszeitanalysen ohne transplantierte Patienten	47
Tabelle 11: Cox-Regression .....	48
Tabelle 12: PIGF, VEGF und sVEGFR-1 in den verschiedenen Kohorten .....	50
Tabelle 13: AFP in den Kohorten HCC und Zirrhose.....	50
Tabelle 14: Vergleich von PIGF in verschiedenen Tumorstadien.....	53
Tabelle 15: Vergleich von VEGF in verschiedenen Tumorstadien.....	54
Tabelle 16: Vergleich von sVEGFR-1 in verschiedenen Tumorstadien .....	55
Tabelle 17: Vergleiche von AFP in verschiedenen Tumorstadien .....	56

---

Tabelle 18: Vergleiche von PIGF, VEGF und sVEGFR-1 in verschiedenen Zirrhose-Stadien .....	57
Tabelle 19: AFP in verschiedenen Zirrhosestadien .....	57
Tabelle 20: Sensitivität der einzelnen Marker zur Differenzierung von HCC vs. Zirrhose .....	58
Tabelle 21: Sensitivität und Spezifität zur HCC-Diagnose vs Zirrhose bei Kombination von AFP mit PIGF, VEGF und sVEGFR-1 .....	59
Tabelle 22: Sensitivität und Spezifität zur HCC-Diagnose versus Zirrhose bei Kombination von PIGF mit VEGF und sVEGFR-1.....	59
Tabelle 23: Sensitivität und Spezifität zur HCC-Diagnose vs. Zirrhose bei Kombination von VEGF mit sVEGFR-1 .....	60

## 4 Zusammenfassung

### 4.1 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache weltweit und entsteht meist auf dem Boden einer Leberzirrhose oder anderer Risikofaktoren wie der chronischen Hepatitis-B-Infektion oder der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 15% ist die Mortalität hoch, da es oft erst in späten Stadien zur Diagnose kommt. Neben den bekannten Stadieneinteilungen haben sich für eine individuelle Behandlungsstrategie bisher wenig prognostische und prädiktive Marker durchgesetzt. Angiogene Faktoren sind potentiell nicht-invasive Marker für das HCC, die Zirrhose und deren Fortschreiten und gleichzeitig mögliche Therapieziele. In der vorliegenden monozentrischen retrospektiven Studie untersuchten wir an 263 Patienten mit HCC den Einfluss klinischer und paraklinischer Parameter auf das Überleben. Wir bestimmten und verglichen in drei Kohorten (HCC (n=263), Zirrhose (n=82) und gesunde Probanden (n=30)) drei Faktoren der Angiogenese: *placental growth factor* (PIGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1* (sVEGFR-1).

Der Überlebensmedian aller Patienten betrug 33 Monate. Transplantierte Patienten hatten das beste Outcome: Nach 20 Jahren Beobachtungszeit lebten noch über 60%. Patienten im Endstadium hatten ein Überlebensmedian von 4,5 Monaten. In der univariaten Analyse waren das höhere Alter, eine alkoholbedingte Lebergrunderkrankung, die Anzahl und Größe der Läsionen, höhere Tumorstadien nach BCLC<sup>1</sup>, CLIP<sup>1</sup>, Okuda<sup>1</sup> und TNM<sup>1</sup> sowie höhere Werte für Alpha-fetoprotein (AFP)<sup>1</sup>, VEGF und sVEGFR-1 signifikant mit einem kürzeren Überleben assoziiert. Patienten, die im Intermediärstadium aggressiver behandelt wurden, hatten ein signifikant längeres Überleben. VEGF hatte einen annähernd signifikanten unabhängigen Einfluss. Im Vergleich der drei Kohorten hatten gesunde Probanden höhere PIGF, VEGF und sVEGFR-1-Werte als HCC- und Zirrhosepatienten (Mittelwerte in pg/mL für PIGF: gesunde Kontrollen: 9,68/ Zirrhose: 3,48/ HCC: 5,26; für VEGF: gesunde Kontrollen: 300,36/ Zirrhose: 241,57/ HCC: 224,37; für sVEGFR-1: gesunde Kontrollen: 189,81/ Zirrhose: 60,27/ HCC: 122,32). Die PIGF-Werte fielen in allen Kohorten insgesamt sehr niedrig aus. Im Vergleich von Patienten mit HCC und Zirrhosepatienten konnte sVEGFR-1 signifikant zwischen beiden Gruppen unterscheiden (AUC: 0,78, p<0,0001). AFP schnitt mit einer Sensibilität und Spezifität von 73,8% und 90,2% besser ab. sVEGFR-1-Werte stiegen signifikant mit fortschreitendem Tumorstadium an, VEGF-Werte signifikant mit dem Zirrhosestadium. Eine starke Korrelation der Marker gab es nicht.

In unserer Studie hatten VEGF und sVEGFR-1 eine prognostische Aussagekraft. Wir konnten nicht bestätigen, dass die drei Marker zur Diagnose einer Zirrhose oder eines HCC geeignet

---

<sup>1</sup> Die Staging-Systeme und Tumormarker für das HCC werden im Kapitel 5.1.1.4 erläutert.

sind oder zusätzlichen Nutzen zu AFP bringen. Vielmehr könnten sie als individuelle, nicht-invasive Verlaufsparemeter zusätzlich zu bekannten klinischen und para klinischen Markern begriffen werden.

## 4.2 Abstract

*The hepatocellular carcinoma is the second most frequent cancer related cause of death worldwide. It is usually a complication of a cirrhosis of the liver or of other risk factors such as a chronic hepatitis B infection or the non-alcoholic fatty liver disease. Being often diagnosed only at a late stage, mortality is very high (15 % 5-year-survival-rate). Besides the common staging systems, no further prognostic or predictive markers for an individually adapted treatment have been established. Angiogenic factors are potentially non-invasive markers for (the progression of) HCC and cirrhosis and at the same time possible therapy objectives. The retrospective study at hand investigated a cohort of 263 HCC patients and the influence of clinical and paraclinical parameters on their survival. We determined and compared three factors of angiogenesis (PlGF, VEGF and sVEGFR-1) within the HCC cohort (n=263), a cohort of cirrhosis patients (n=82) and a cohort of healthy probands (n=30).*

*The overall median survival amounted to 33 months. Transplanted patients had the best outcome: more than 60% were still alive after 20 years of observation. End-stage patients had a median survival of 4.5 months. The univariate analysis showed that higher age, alcohol-related liver disease, number and size of lesions, higher tumor stage (with respect to BCLC, CLIP, Okuda and TMN staging systems) as well as higher values of AFP, VEGF and sVEGFR-1 were connected statistically significantly to shorter survival. Patients treated aggressively during intermediate stage survived statistically significantly longer. VEGF had an approximately independent influence on survival. Healthy probands had higher PlGF, VEGF and sVEGFR-1 values than HCC- and cirrhosis patients (mean values in pg/mL: for PLGF: healthy: 9,68/ cirrhosis: 3,48/ HCC: 5,26; for VEGF: healthy: 300,36/ cirrhosis: 241,57/ HCC: 224,37; for sVEGFR-1: healthy: 189,81/ cirrhosis: 60,27/ HCC: 122,32). PlGF values were overall very low. sVEGFR-1 distinguished significantly between HCC and cirrhosis patients (AUC: 0.78,  $p < 0.0001$ ). AFP performed better (sensitivity: 73.8%, specificity: 90.2%). sVEGFR-1 values significantly increased with higher tumor stage, VEGF with higher cirrhosis stage. The correlation between the markers was not strong.*

*Our study indicated a prognostic value of VEGF and sVEGFR-1. However, we could not confirm any further benefit for cirrhosis or HCC diagnosis particularly compared to and combined with AFP. They may rather be used as individual and non-invasive gradient parameters in addition to clinical and paraclinical markers.*

## 5 Einleitung

### 5.1 Grundlagen

#### 5.1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

##### 5.1.1.1 Epidemiologie

Als fünfthäufigste Tumorerkrankung und zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache weltweit ist das hepatozelluläre Karzinom (HCC) mit steigender Inzidenz und Mortalität (1) durch die weiterhin überwiegend späte Diagnose (2) für Kliniker eine große Herausforderung.

Das HCC ist der häufigste maligne Tumor der Leber. Der bedeutendste Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC ist die Leberzirrhose. Circa 90% entstehen auf dem Boden einer Zirrhose, umgekehrt entwickeln ein Drittel der Zirrhose-Patienten<sup>2</sup> ein HCC (1) (3). Die Inzidenz wird durch die zugrundeliegende Erkrankung beeinflusst: bei einer viral bedingten Zirrhose ist sie höher als bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) (4) (1). Zusätzliche Risikofaktoren sind unter anderem das höhere Alter, das männliche Geschlecht sowie eine zunehmende Verschlechterung der Leberfunktion (3). Das HCC-Risiko ist ebenfalls erhöht bei Patienten mit chronischer Hepatitis-B (HBV)-Infektion<sup>3</sup>, mit fortgeschrittener Fibrose und chronischer Hepatitis-C (HCV)-Infektion, mit NAFLD ohne Zirrhose und bei regelmäßiger Aufnahme von Aflatoxin-B1 (4) (5) (2) (6). Das individuelle HCC-Risiko ist somit schwer einzuschätzen.

Die unterschiedlichen und multiplen Risikofaktoren bedingen eine heterogene Verteilung der Inzidenz weltweit. So ist sie in Ostasien und Subsahara-Afrika durch die weit verbreitete chronische HBV-Infektion besonders hoch (über 80% der HCC-Fälle weltweit). Allein in China treten 50% der weltweiten HCC-Fälle auf. Insgesamt ist dort die Inzidenz durch die HBV-Infektion der Neugeborenen sinkend. In westlichen Ländern (Europa und Nordamerika) und Japan ist bisher die HCV-Infektion für die Entwicklung eines HCC führend, insgesamt treten dort aber weniger als 20% der Fälle weltweit auf (7) (1). Der zu erwartende positive Einfluss der neuen antiviralen Therapien der HCV-Infektion auf die Inzidenz muss gegen die älter werdende Population mit zunehmendem Risiko (1) und die stetige Zunahme des metabolischen Syndroms mit konsekutiver NAFLD aufgewogen werden. Insgesamt ist mit einer weiterhin steigenden HCC-Inzidenz in den westlichen Ländern zu rechnen (8), zumal die Inzidenz und der Einfluss der NAFLD und anderen Komorbiditäten möglicherweise unterschätzt werden (1).

---

<sup>2</sup> Obwohl aus Gründen der Lesbarkeit im Text die männliche Form gewählt wurde, beziehen sich die Angaben auf Angehörige beider Geschlechter.

<sup>3</sup> Im folgenden Text stehen die Abkürzungen HBV und HCV jeweils für die chronische Hepatitis-B- und die chronische Hepatitis-C-Infektion.

Trotz standardisierter Vorsorgeuntersuchungen für bestimmte Risikopatienten kommt es durch meist asymptomatische Anfangsstadien in vielen Fällen erst in fortgeschrittenen Stadien mit schlechter Prognose ohne kurative Therapieoptionen zur Diagnose (2). Die sichere Identifikation von Hochrisiko- bzw. Risikopatienten sowie effektives Screening zur frühen Diagnose des HCC sind daher neben Primär- und Sekundärmaßnahmen wie HBV-Impfung, antivirale Therapie und Lebensstiländerungen nach wie vor von Bedeutung (8) (6).

#### 5.1.1.2 Hepatokarzinogenese

Das HCC entwickelt sich im Laufe von vielen Jahren aus dysplastischen Knoten bei chronischem Leberschaden. Neben Ätiologie-spezifischen molekularen Mechanismen kommt es in der entzündeten oder bereits fibrotischen/zirrhotischen Leber zur Überexpression von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und Interferon (INF)- $\gamma$ , zu einem Nitritoxid (NO)-Anstieg und dadurch zu DNA-Schädigung sowie zu Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Protoonkogenen (9). Aus einem dysplastischen Fokus mit zunehmend entdifferenzierten und funktionslosen Hepatozyten und Regenerationsarealen entsteht ein dysplastischer Knoten und anschließend ein frühes differenziertes Karzinom, welches sich zu einem fortgeschrittenen, wenig differenzierten Karzinom mit Tendenz zu weiterem Wachstum, Metastasierung und Invasion entwickelt (10). Die Dysregulierung von Wachstumsfaktor-Signalwegen wie *insuline-linker growth factor* (IGF), *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *fibroblast growth factor* (FGF) und das komplexe Zusammenspiel der Tumorzellen mit dem umliegenden Gewebe spielen dabei eine große Rolle. Das HCC kann anhand der betroffenen Signalwege und Gendysregulationen in viele verschiedene, heterogene Subklassen eingeteilt werden (11). Auf die spezifische Rolle des VEGF-Signalweges und der Angiogenese wird in Kapitel 5.1.3 näher eingegangen.

#### 5.1.1.3 Überwachung und Diagnostik

Gemäß den aktuellen Richtlinien der *European Association for the Study of the Liver* (EASL) 2018 (1) sollten folgende Patienten engmaschig überwacht werden: Patienten mit einer Leberzirrhose Child A und B sowie Child C-Patienten (Kapitel 5.1.2), die auf eine Lebertransplantation warten; Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion und einem intermediären Risiko für die Entwicklung eines HCC sowie, basierend auf einer individuellen Risikoabschätzung, Patienten mit einer fortgeschrittenen Leberfibrose. Ziel ist es, die HCC-bedingte Mortalität zu senken, indem Frühstadien erkannt und kosteneffizient behandelt werden. Es fehlen jedoch weiterhin etablierte Verfahren zur besseren Identifikation von Risikopatienten (3).

Bei Risikopatienten sollte alle 6 Monate eine Abdomensonographie erfolgen. Suspekte Läsionen unter 1cm sollten mindestens alle 4 Monate für 1 Jahr kontrolliert werden. Die Sonographie ist bezüglich der HCC-Erkennung sehr sensitiv und spezifisch (Sensitivität 89%, Spezifität über 90%), aber stark untersucherabhängig. Auch werden Frühstadien nicht sicher erkannt (1).

Bei Läsionen über 1cm oder bei Veränderungen der Läsion besteht der Verdacht auf ein HCC, und es folgen gemäß den EASL-Richtlinien (1) weitere bildgebende Verfahren. Mit der Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT) erzielt man nahezu 100% Spezifität bei Läsionen über 1cm. Das HCC zeigt ein typisches Verhalten in der kontrastmittelgestützten Untersuchung: Durch die im Gegensatz zur restlichen Leber ausgeprägte arterielle Tumorversorgung kommt es zu einer starken Kontrastierung in der arteriellen Phase und zu einem frühen Auswaschen (*washout*) in der venösen oder späten Phase. Ferner wird der Tumor durch Größe und Infiltration der Pfortader charakterisiert.

Eine Biopsie wird durchgeführt, wenn die Läsion sich radiologisch mit zwei Verfahren (wobei hier auch die Kontrastmittel-Sonographie zum Einsatz kommt) nicht eindeutig einordnen lässt. Bei fehlender Zirrhose sollte sie grundsätzlich durchgeführt werden (1).

Sehr frühe Karzinome zeigen mitunter sowohl histologisch als auch radiologisch keine typischen Merkmale. Sie sind in der Regel hypovaskularisiert, fettreich, weisen keine Mikroinvasion der Gefäße auf und sind gut differenziert. Fortgeschrittene Karzinome sind arteriell gut vaskularisiert und weisen meist bereits eine Gefäßinvasion, eine Kapsel und eine schlechte Differenzierung auf. Aufgrund der starken Heterogenität des HCC auch innerhalb eines Tumors und zwischen zwei Läsionen innerhalb einer Leber hat sich bisher die molekulargenetische Analyse als diagnostische, prognostische und therapiestrategische Hilfe noch nicht durchsetzen können (3).

Mit einer Sensitivität von ca. 60% und einer geringen Spezifität wird der Tumormarker Alpha-fetoprotein (AFP) beim Staging nicht berücksichtigt (3) (8). Er ist aber ein guter prognostischer Marker für Überleben und Therapieergebnis, auch unabhängig von anderen bekannten prognostischen Markern wie der Gefäßinvasion oder der Anzahl und Größe der Läsionen (12). Ein erhöhter AFP-Wert ist zudem mit anderen Markern schlechter Prognose wie Größe und Invasivität des Tumors korreliert und kann die Prädiktivität der Milan-Kriterien (Kapitel 5.1.1.4) bei transplantierten Patienten verbessern (3). Zu weiteren Markern wie L3-Fraktion des glykosilierten AFP (L3-AFP), Des-gamma-carboxiprothrombin (DCP), Alpha-Fukosidase und Glypican gibt es bisher zu wenig belastbare Daten (1).

#### 5.1.1.4 Staging und Prognose

Die *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC)-Klassifikation (Abbildung 1) für das HCC basiert auf den wichtigsten bekannten prognostischen Faktoren des HCC: der Leberfunktion, der Tumormorphologie und dem *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) *Performance Status* (PS) des Patienten, der das Befinden und die Einschränkungen im Alltag des Patienten objektiviert (1). Die Leberzirrhose wird als Komorbidität mit ungünstiger Auswirkung berücksichtigt. Die klassische Tumorgröße-Lymphknoten-Metastasen (TNM)-Klassifikation der *Union for International Cancer Control* (UICC) erfasst keine klinischen Parameter und neuerdings die mikroskopische Gefäßinvasion, die nur histologisch aufzuarbeiten ist (13). Die BCLC-Kriterien werden in den Leitlinien der *American Association for the Study of Liver Diseases*

(AASLD) (14) und der EASL (1) sowie in den (sich in Überarbeitung befindenden) deutschen S3-Leitlinien zum HCC (6) bei der Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung berücksichtigt.

Die gesamte 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 15% (15). Ferner ergaben sich in einer multizentrischen Langzeitkohortenstudie, der sogenannten BRIDGE-Studie von 2015, Überlebensmediane von jeweils 80, 27, 15 und 4 Monaten für BCLC-Stadien A, B, C und D. Nach 96 Monaten lebten noch über 50% der Patienten im Stadium BCLC 0 (7).

Die tatsächliche Therapieentscheidung variiert individuell und geographisch erheblich, nicht zuletzt durch die unterschiedlich verteilten Ressourcen bei den Therapieoptionen, aber auch aufgrund von Unterschieden der Patientencharakteristika und der HCC-Ätiologie. In Asien wurde beispielsweise bei häufiger fehlender zugrundeliegender Leberzirrhose das *Hong Kong Liver Cancer* (HKLC)-Staging-System entwickelt, welches mit aggressiveren Therapiestrategien eine bessere Prädiktion in dortigen Kohorten erzielt (16) (17).

Ältere Klassifikationen wie die Staging-Systeme Okuda (A-C) (Tabelle 2) und *Cancer of the Liver Italian Program* (CLIP) (0-6) (Tabelle 1) basieren auf Leberfunktion, Tumormorphologie sowie auf dem AFP-Wert und dem Vorhandensein einer Gefäßinvasion (Pfortaderthrombose). Höhere Stadien korrelieren mit einer schlechteren Prognose: die Überlebensmediane reichen von 42,5 bei niedrigen zu 1 Monat bei hohen CLIP-Stadien (18) (19). Beide Klassifikationen weisen den erheblichen Nachteil auf, dass sie kleine Tumore nicht erfassen oder weiter differenzieren können. Der CLIP-Score wurde zudem in einer Kohorte mit mehrheitlich lokal behandelten Patienten validiert und ist bei operablen Patienten nicht ohne Weiteres anwendbar (20).

Eine genauere prädiktive und prognostische Einschätzung ist schwierig. Es gibt vielfach Ansätze, die gängigen Staging-Systeme zu verbessern. Der *hepatoma arterial-embolization prognostic* (HAP)-Score (basierend auf dem Albuminwert, dem AFP, der Tumorgroße und dem Bilirubin) hat sich beispielsweise bereits zur Verbesserung der individuellen Therapiestrategie bei bestimmten Patienten bewährt, wurde aber noch nicht in allgemeine Empfehlungen übernommen (13). Andererseits werden beim Staging aber noch nicht systematisch alle klinischen Hinweise auf eine fortschreitende Leberdysfunktion erfasst. Die Zuverlässigkeit anderer Serummarker wie angiogene Faktoren, verschiedene Interleukine und FGF (21) oder Angiopoetin 2 (22) wird in Studien untersucht.

Die folgenden Tabellen erläutern die Staging-Systeme CLIP und Okuda.

Punkte	Child-Pugh-Stadium <sup>4</sup>	Tumormorphologie	AFP (ng/mL)	Pfortaderthrombose
0	A	Unifokal, ≤50% der Leber	<400	Nein
1	B	Multifokal, ≤ 50% der Leber	≥400	Ja
2	C	Massiv, >50% der Leber		

Tabelle 1: Staging-System CLIP (23) (AFP: Alphafetoprotein)

Punkte	Tumorgröße	Aszites	Albumin (g/dL)	Bilirubin (mg/dL)
0	≤50%	Nein	≥3	<3
1	>50%	Ja	<3	≥3
Stadium I: 0 Punkte ; Stadium II: 1-2 Punkte; Stadium III: 3-4 Punkte				

Tabelle 2: Staging-System Okuda (24)

#### 5.1.1.5 Therapie

Die Therapieoptionen ergeben sich aus den EASL-Richtlinien gemäß der modifizierten BCLC Klassifikation (1).

Für Patienten, die mit kleiner Tumorlast und erhaltener Leberfunktion ohne Aszites als **BCLC-Stadium 0 oder A** (ein Herd unter 2cm für Stadium 0 und ein Herd oder bis zu drei Herden unter 3cm für Stadium A) eingestuft werden, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate jeweils 89-90% und 50-70%. Diese Patienten können kurativ durch lokale Ablation, Resektion oder Lebertransplantation behandelt werden. Die Radiofrequenzablation und die Resektion werden als gleichwertig eingestuft. Die Resektion sollte bei nicht-zirrhotischen Patienten bevorzugt werden. Bei Patienten mit Zirrhose sollte sie denjenigen mit solitärer Läsion und ohne portale Hypertension und normalem Bilirubin vorbehalten sein. Es zeigt sich leider eine hohe Rezidivrate (70% innerhalb der ersten 5 Jahre nach Resektion (8)) durch bereits bestehende Mikrometastasierung oder neue Tumore in der fortbestehenden Zirrhose. Bei frühen Rezidiven sollte die Möglichkeit einer Lebertransplantation geprüft werden. Diese ist innerhalb der Milan-Kriterien (ein Herd unter 5cm oder bis zu drei Herden unter 3cm, keine makroskopische Gefäßinvasion und keine extrahepatische Manifestation) aufgrund der geringen Rezidivrate von 15% in 5 Jahren (8) Therapie der Wahl bei Patienten mit Leberzirrhose und HCC im Stadium BCLC A, insbesondere bei dekompensierter Leberzirrhose und/oder mehreren Läsionen. Demensprechend erhalten Patienten mit Leberzirrhose und HCC innerhalb der Milan-Kriterien auf der Eurotransplant-Liste für das HCC zusätzliche Punkte unabhängig von der Leberfunktion. Um der Progression des HCC entgegenzuwirken werden Patienten mit einer

<sup>4</sup> Siehe Tabelle 3

voraussichtlichen Wartezeit von über 6 Monaten einer sogenannten Bridging-Therapie (Resektion oder lokale Ablation) unterzogen. Die Heterogenität des HCC und des Therapieansprechens in diesem Stadium kann für die Priorisierung auf der Transplantationsliste problematisch sein (25). Für Patienten im Frühstadium mit portaler Hypertension oder assoziierten Erkrankungen und somit hohem Operationsrisiko und Patienten im Stadium A, die für eine Transplantation nicht in Frage kommen, stehen mehrere Verfahren der lokalen Ablation zur Verfügung. Am häufigsten wird die Radiofrequenzablation (RFA) mit Induktion einer Tumornekrose durch Hyperthermie angewendet. Voraussetzung ist prinzipiell eine Herdgröße unter 4cm. Ansonsten sollte eine Chemoembolisation nachgeschaltet werden. Vor allem bei kleinen Herden unter 2cm ist die Effektivität der RFA bei niedrigerem Operationsrisiko derjenigen der Resektion gleichzusetzen. Die RFA ersetzt mittlerweile weitgehend die perkutane Ethanolinjektion (PEI). Am Campus Virchow Klinikum steht als weiteres lokalablatives strahlentherapeutisches Verfahren das Afterloading (*CT-high dose radiation brachytherapy*) zur Verfügung, mit ähnlichen Indikationen wie die RFA. Weitere Verfahren sind die Mikrowellenablation (MWA) und die irreversible Elektroporation (IRE), bei der auch gefäßnahe Tumore behandelt werden können. Die stereotaktische Bestrahlung hat sich bisher noch nicht etabliert (1), wird aber zunehmend diskutiert (26).

Ab dem Intermediärstadium **BCLC B** (asymptomatische Patienten mit erhaltener Leberfunktion und einer Tumorausdehnung außerhalb der Milan-Kriterien aber ohne makroskopische Gefäßinvasion und extrahepatische Tumormanifestation) liegt die 2-Jahres-Überlebensrate bei 49%. Hier wird der kurative Ansatz den Empfehlungen nach verlassen. Bei vitalem Tumorgeewebe werden repetitiv anwendbare, gleichwertige, transarterielle Verfahren wie die konventionelle transarterielle Chemoembolisation (TACE), die *drug-eluting beads*-TACE (DEB-TACE) durchgeführt oder seltener die einfache transarterielle Embolisation (TAE). In die tumorversorgenden Arterien werden Chemotherapeutika (Doxorubicin, Cisplatin oder Mitomycin) appliziert und im Falle der konventionellen TACE zusätzlich embolisiert. Zur Reduzierung der Toxizität wurde das DEB-TACE Verfahren mit doxorubicinbeladenen Mikrosphären entwickelt. Die radiologischen *modified response evaluation criteria in solid tumors* (mRECIST)-Kriterien dienen der Messung des Therapieerfolgs unter TACE. Bei Therapieversagen (fehlendes Ansprechen oder Progress nach zwei Sitzungen) sollte die Behandlung abgebrochen werden. Eine Pfortaderthrombose, arteriovenöse Fisteln und eine fortgeschrittene Zirrhose sind relative Kontraindikationen. Die Chemoembolisation ist auch für Patienten in Frühstadien eine Therapieoption, wenn die empfohlenen Verfahren kontraindiziert sind (1).

Eine Kombinationstherapie von TACE und RFA für Tumore über 3cm zeigt einen Überlebensvorteil, ist jedoch sehr aufwendig. Die Kombination von TACE mit einer systemischen Therapie zeigte bisher keinen Vorteil (1).

Bei der Radioembolisation, auch selektive interne Radioembolisation (SIRT) genannt, werden (meist mehrfach) radioaktive Substanzen in die Leberarterie gegeben. Diese wandern vornehmlich in die Gegend des gut vaskularisierten Tumors ein und strahlen dort hochdosiert mit kleiner

Eindringtiefe. Die Voraussetzung ist der Ausschluss von Shunts besonders zur Lunge. Eine der Komplikationen ist dabei die strahleninduzierte Leberzellschädigung. Sie kann auch bei Pfortaderthrombose oder diffusem Tumorwachstum durchgeführt werden, da die radioaktiv beladenen Partikel die Gefäße nicht komplett okkludieren. Sie wird derzeit an spezialisierten Zentren in den Stadien A, B (27) und C, oft auch in Kombination mit anderen Therapien, im Rahmen von Studien (28) (29) (30) angewandt. Ein Überlebensvorteil bei HCC im fortgeschrittenen Stadium gegenüber der Standardtherapie wurde bisher nicht nachgewiesen (31).

Es ist zu bemerken, dass Patienten mit einem solitären Tumor über 5cm möglicherweise noch von einer Resektion profitieren könnten. Auch kann bei Patienten, deren Tumor die Milan-Kriterien noch erfüllt, die aber in der BCLC-Klassifikation aufgrund der schlechten Leberfunktion bereits als fortgeschritten gelten, noch eine Transplantation in Betracht gezogen werden (1) (7). Die Klassifikation als Intermediärstadium sollte somit der individualisierten Therapie nicht im Wege stehen.

Im fortgeschrittenen Tumorstadium **BCLC C** liegt die 1-Jahres-Überlebensrate bei 25% (Tumor mit makroskopischer Gefäßinvasion oder extrahepatischer Manifestation sowie bei Therapieversagen lokoregionaler Verfahren). Bei Patienten mit einer erhalten Leberfunktion kommt seit 2007 der Tyrosinkinasehemmer Sorafenib zum Einsatz. Allerdings ist der Überlebensvorteil gering und bereits bei Child-Pugh-Stadium B minimal (32). Neben den modifizierten RECIST-Kriterien ist vor allem das klinische Ansprechen und die Toleranz für das Therapiemanagement ausschlaggebend (8). Der Wirkmechanismus führt über Hemmung der B-Raf- und Raf-1-Kinase sowie der Tyrosinkinasen des *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) und des *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) zu einer Hemmung der Angiogenese (Kapitel 5.1.3), der Zellproliferation und zu einer Reduktion der Tumormasse (33). Die wichtigsten Nebenwirkungen sind das Hand-Fuß-Syndrom, gastrointestinale Beschwerden und arterieller Hypertonus. Bis zu 30% der Patienten müssen aufgrund der schlechten Toleranz die Therapie abbrechen (34). Lenvatinib inhibiert VEGF-R1-3, *fibroblast growth factor receptor* 1-4 (FGF-R1-4), *platelet-derived growth factor receptor alpha* (PDGFR- $\alpha$ ) und die Wachstumsfaktor-Rezeptoren RET und KIT und wird neuerdings ebenfalls als Erstlinientherapie eingesetzt. Seit Kurzem gibt es mit Regorafenib, einem oralen Multikinaseinhibitor mit ähnlichem Wirkmechanismus, eine Zweitlinientherapie bei Therapieversagen unter Sorafenib. Cabozantinib hemmt die Tyrosinkinasen MET, RET und VEGF-R2 und wurde ebenfalls als Zweitlinientherapie bei erfolgloser oder nicht vertragener Therapie mit Sorafenib zugelassen (1). Neuerdings wurde zudem Ramucirumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGFR-2, als Zweitlinientherapie bei erhöhtem AFP zugelassen (35).

Neben dem Ausbau lokoregionaler Therapien werden auch antiangiogene Wirkstoffe weiterhin als systemische Therapieoptionen und potentielle Kombinationspartner getestet (31). Bisher zeigte jedoch Linifanib, ein oraler Tyrosinkinasehemmer, genauso wenig einen Vorteil wie die Kombinationen von TACE und Brivanib oder Orantinib (1).

Checkpoint-Inhibitoren gelten auch beim HCC als vielversprechende Therapieoptionen. Für Nivolumab und Pembrolizumab könnte es als Erst- beziehungsweise Zweitlinientherapie möglicherweise eine Indikation geben. Durvalumab oder Tremelimumab werden aktuell als Alternative zu Sorafenib getestet. Das Gleiche gilt für Kombinationen von Immuntherapien mit zugelassenen Tyrosinkinasehemmer oder lokoregionalen Therapien (31). Die Abbildung 2 zeigt einen Überblick über eine mögliche sequentielle Therapie des HCC.

Im fortgeschrittenen Stadium gibt es für das HCC keinen etablierten Biomarker zur individuellen Prädiktion und zur Prognoseabschätzung.

Im Endstadium **BCLC D** mit einer hohen Tumorlast beziehungsweise deutlich eingeschränkter Leberfunktion oder einem Performance Status über 2 und einem Überlebensmedian von 3-4 Monaten wird lediglich eine supportive Therapie durchgeführt (1).

In den zwei folgenden Abbildungen wird die BCLC-Klassifikation der EASL Richtlinien 2018 dargestellt und ein möglicher sequentieller Therapieansatz gezeigt.

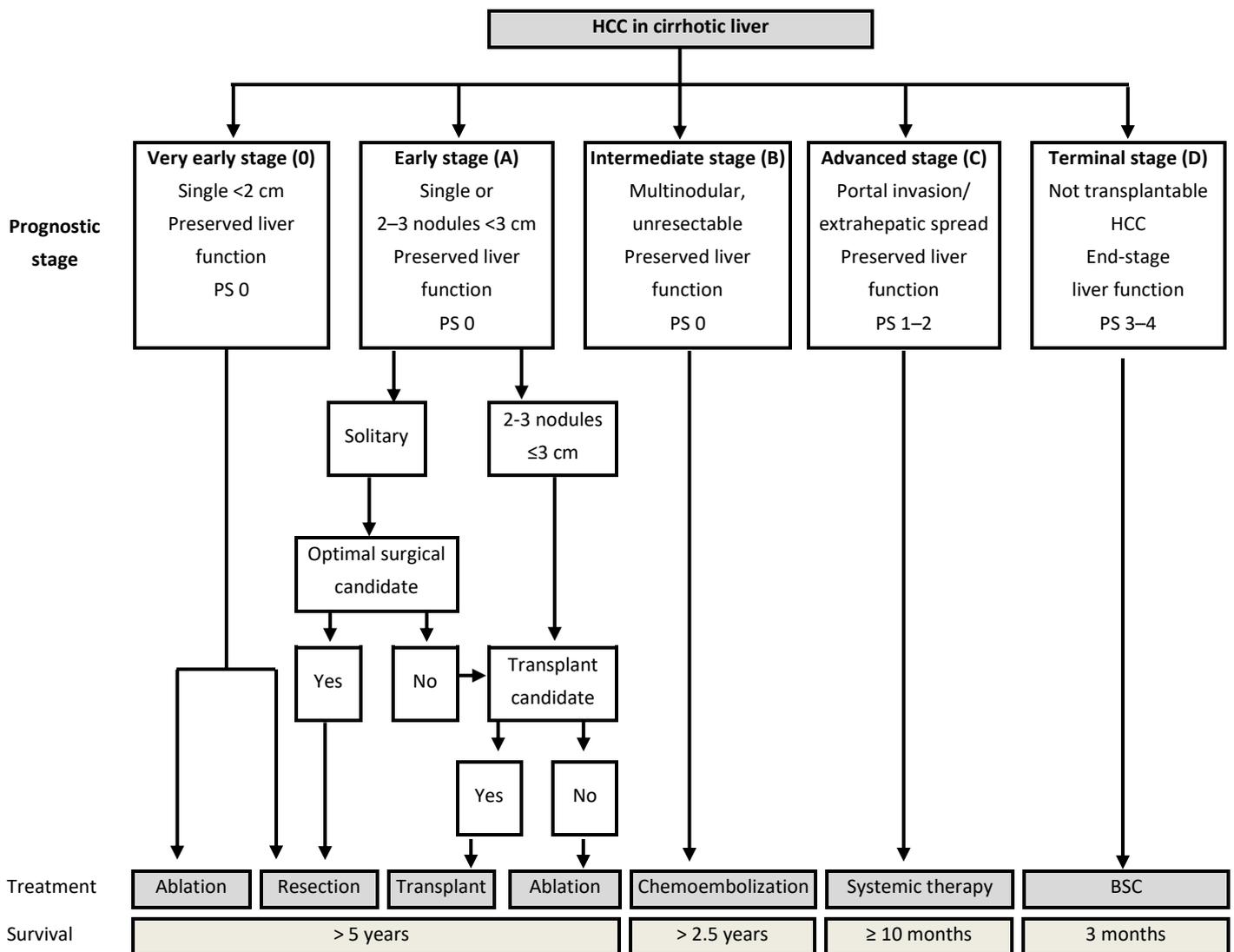


Abbildung 1: Modifiziertes BCLC Staging-System, modifiziert nach Galle PR et al. (1)

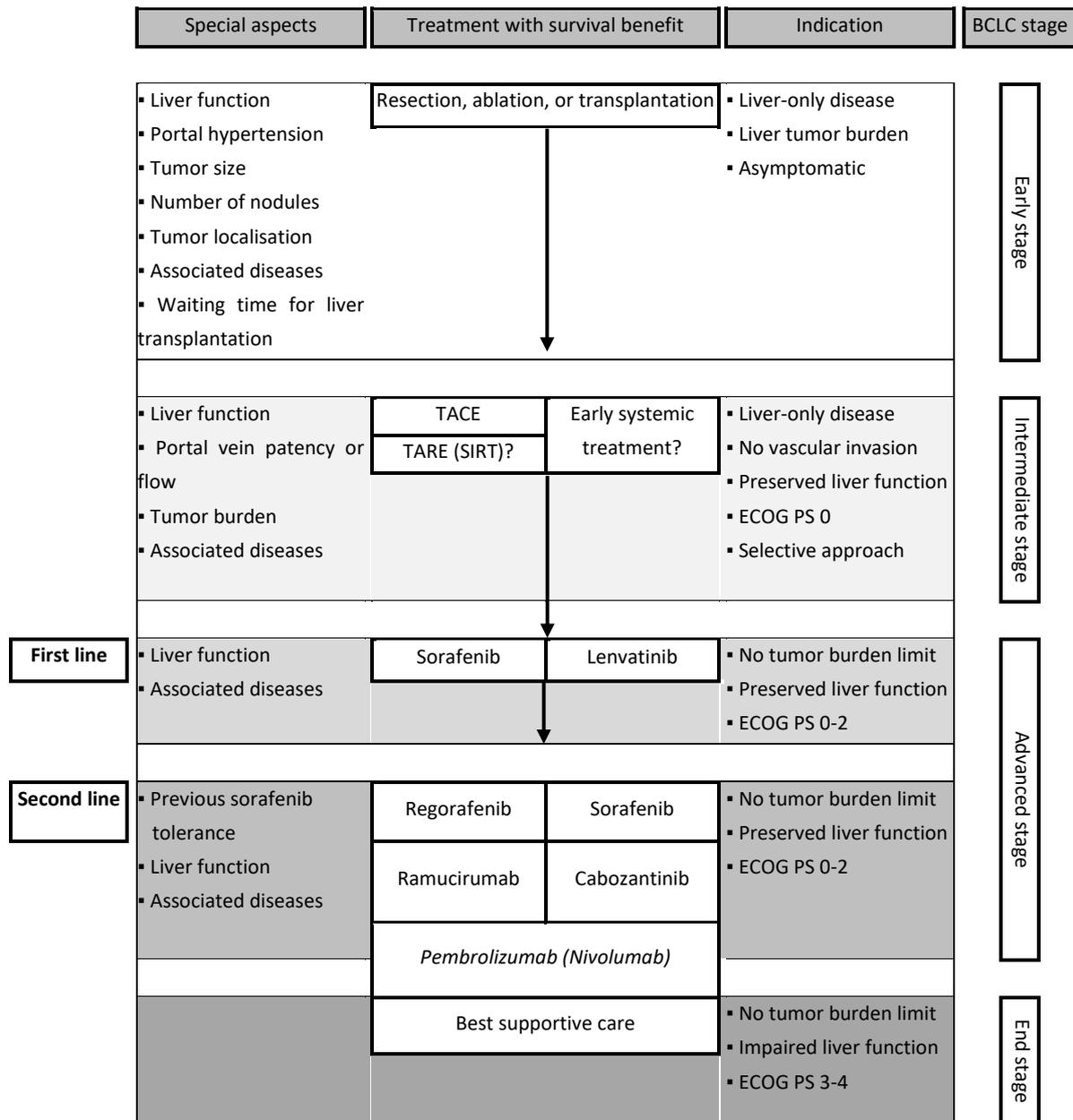


Abbildung 2: Sequentielle Therapie des HCC, modifiziert nach Forner et al. (36) (TACE: transarterielle Chemoembolisation; TARE: transarterielle Radioembolisation; SIRT: selektive interne Radiotherapie)

### 5.1.2 Die Leberzirrhose

#### 5.1.2.1 Epidemiologie

Die Leberzirrhose ist durch Komplikationen der portalen Hypertension in westlichen Ländern die vierthäufigste Todesursache bei Erwachsenen (37) und entsteht auf dem Boden eines chronischen und fortschreitenden Prozesses mit vielen möglichen Ursachen.

Die Fettlebererkrankung (alkoholisch und nichtalkoholisch) und die viralen Hepatitiden (B, C und D) sind in Europa die häufigsten Ätiologien (38). Weitere Ursachen sind Autoimmunerkrankungen (Autoimmunhepatitis, Primär biliäre Cholangitis (PBC), Primär sklerosierende

Cholangitis (PSC), IgG4-Cholangiopathie), Speicherkrankheiten (Hämochromatose, M. Wilson, Alpha-1-Antitrypsinmangel), vaskuläre Erkrankungen (Budd-Chiari-Syndrom, Rechtsherzinsuffizienz, M. Osler), chronische Gallenwegserkrankungen (Stenosen, rezidivierende bakterielle Cholangitiden). Selten sind Medikamente und Porphyrien ursächlich. Das Fortschreiten einer Fibrose und Zirrhose ist abhängig von der zugrundeliegenden Ursache und wird zudem durch das histologische Bild und durch Wirtsfaktoren wie höheres Alter, männliches Geschlecht oder genetische Faktoren beeinflusst. Kombinationen von Risikofaktoren beschleunigen den Prozess erheblich (39).

#### 5.1.2.2 Pathophysiologie und Klinik

Die Leberzirrhose wird über histologische Kriterien definiert und geht einher mit der zunehmenden Zerstörung der Läppchen- und Gefäßarchitektur durch Entstehung bindegewebiger Septen und knotiger Strukturen. Dauerhaft einwirkende Noxen rufen eine anhaltende Inflammation mit konsekutivem Zelluntergang und Reparaturmechanismen sowie Umbauvorgängen und Narbenbildung hervor.

Durch die Nekrosen kommt es zu einem Verlust funktionsfähiger Hepatozyten und zu fortschreitenden Bindegewebssträngen sowie zu portosystemischen Shunts. Durch perisinusoidale Ansammlung von extrazellulärer Matrix wird die Diffusion und somit die Entgiftungsfunktion gestört. Eine zunehmende Kapillarisation der Sinusoide erhöht schließlich den Gefäßwiderstand. Innerhalb von Regeneratknoten entstehen zunächst funktionsfähige Einheiten, die aber durch die gestörte Durchblutung oftmals atrophieren. Der Übergang einer Fibrose in eine Zirrhose zeichnet sich durch zunehmend zellarme Septen aus. Das histologische Schädigungsmuster bei aktiver Fibrose oder Zirrhose erlaubt Rückschlüsse auf die ursächliche Noxe (40). Die abnehmende Durchblutung und die zunehmende Verhärtung der Leber kommt in fortgeschrittenen Stadien durch klinische und funktionelle Symptome der zunehmenden Leberinsuffizienz und der portalen Hypertension zum Ausdruck. Typische Befunde sind neben Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit oder unspezifischen gastrointestinalen Beschwerden zunächst Leberhautzeichen (unter anderem Spider Nävi, Teleangektasien, Palmarerythem, Lacklippen) und eine palpatorisch verhärtete Leber. Neben endokriner Störungen zeigt sich die Synthesestörung durch ein erniedrigtes Albumin, eine erniedrigte Cholinesterase und einen erniedrigten Quick-Wert. Ferner kommt es zu einer Störung der hepatischen Entgiftung mit Ikterus und hepatischer Enzephalopathie. Die portale Hypertension führt zu Aszites, Splenomegalie mit Thrombopenie und Ösophagusvarizen. Weitere Komplikationen sind die spontan-bakterielle Peritonitis, das Auftreten von Ösophagusvarizenblutung, das hepatorenale Syndrom, das hepatopulmonale Syndrom und das HCC (39) (41). Von dekompensierter Zirrhose spricht man bei akuter Verschlechterung oder bei neuem Auftreten von Komplikationen.

### 5.1.2.3 Diagnostik

Bei Verdacht auf eine Lebererkrankung sollte die Ursache abgeklärt werden. Neben einer ausführlichen Anamnese und den oben genannten Parametern der Syntheseleistung wird die Bestimmung der Transaminasen, der  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), der alkalischen Phosphatase (AP), der  $\gamma$ -Globuline sowie eine Hepatitis-Serologie, eine Autoimmundiagnostik und gegebenenfalls die Diagnostik von metabolischen Erkrankungen wie der Hämochromatose empfohlen (41). Sonographisch zeigen sich eine inhomogene Struktur des Parenchyms mit unregelmäßiger Oberfläche und eine Vergrößerung des Lobus caudatus sowie eine Splenomegalie bei portaler Hypertension (39). Neben der Sonographie und dem Labor ist bei Hinweisen auf eine portale Hypertension eine Gastroskopie zur Evaluation möglicher Varizen indiziert. Die Leberbiopsie wird ausschließlich bei nicht eindeutigen nicht-invasiven Befunden eingesetzt und dient der Abklärung der Ätiologie (wenn es Konsequenzen für die Therapie hat) sowie der Abklärung des Stadiums. Nicht-invasive Tests umfassen laborchemische (z.B. *AST to platelet Ratio Index* (APRI-) Test) oder ultraschallbasierte Verfahren (Transiente Elastographie (TE), *acoustic radiation force impulse*- (ARFI-) Elastometrie) zur Abschätzung des Fibrorestadiums beziehungsweise dem Vorhandensein einer Zirrhose und einer portalen Hypertension mit dem Risiko einer Dekompensation (39). Diese Verfahren sind jedoch nur im klinischen, paraklinischen und ätiologischen Kontext zu werten. Sie sind relativ sensibel, jedoch auch in Kombination oftmals wenig spezifisch (42), und sie sollten vor allem zur Verlaufsbeobachtung eingesetzt werden.

Gezielte Screenings, vor allem von Risikopatienten, sollten nach einem Stufenschema (körperliche Untersuchung, allgemeine Labordiagnostik, Sonographie, spezielle und schließlich molekulare und invasive Diagnostik) erfolgen und eine Diagnose im reversiblen Stadium ermöglichen (39). Mit dem Übergang einer Fibrose in eine Zirrhose ist oftmals ein Stadium erreicht, dessen Progression oder Dekompensation nur verlangsamt werden kann, wobei bei effektiver kausaler Therapie auch hier noch eine Regression erzielt werden kann (41). Die gängigsten nicht-invasiven Stadieneinteilungen der Zirrhose sind die Child-Pugh-Kriterien (Tabelle 3) und der MELD-Score (43). Patienten mit einer Zirrhose Child-Pugh A, B und C haben eine 1-Jahres-Überlebensrate von jeweils 100%, 80% und 45% (41). Eine bessere Stratifikation gelingt laut neuerer Daten jedoch möglicherweise mithilfe invasiver Strategien, die beispielsweise Ösophagusvarizen und Blutungen berücksichtigen (43). Durch die Symptomarmut der chronischen Lebererkrankung kommt es meistens erst im Stadium einer fortgeschrittenen Fibrose oder einer Zirrhose zu einer Vorstellung in einem spezialisierten Zentrum (39).

Die Child-Pugh-Kriterien werden in der Tabelle 3 dargestellt.

Punkte	Albumin (g/dL)	Bilirubin (mg/dL)	Quick (%)/ INR	Aszites	HE
1	>3,5	<2	>70/ <1,7	keine	keine
2	2,8-3,5	2-3	40-70/ 1,7-2,3	leichtgradig	I-II
3	<2,8	>3	<40/ >2,3	mittelgradig	III-IV

Stadium A: 5-6 Punkte; Stadium B: 7-9 Punkte; Stadium C: 10-15 Punkte
---

Tabelle 3: Child-Pugh-Kriterien (INR: *international normalized ratio*; HE: hepatische Enzephalopathie)

#### 5.1.2.4 Therapie

Die kausale Therapie und eine Anpassung der Ernährungs- und Lebensgewohnheiten sowie die Kontrolle von Komplikationen stehen im Vordergrund der Therapie. Die Therapie des Aszites beruht auf eiweißreicher und kochsalzärmer Kost sowie Flüssigkeitsrestriktion. In fortgeschrittenen Fällen werden Aldosteronantagonisten und schließlich Schleifendiuretika eingesetzt. Blutungsgefährdete Ösophagusvarizen können mittels Betablockern und Varizenligatur behandelt werden. Weitere Maßnahmen bei dekompensierter Zirrhose sind die Einlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS), eine antibiotische Prophylaxe und eine Albumintherapie (44). Als antifibrotische und antiangiogene Medikamente können Statine eingesetzt werden (37). Die Möglichkeit der Lebertransplantation sollte bei fortgeschrittener Leberzirrhose frühzeitig bedacht werden. Aktuell werden in Europa jährlich 5500 Lebertransplantationen durchgeführt, mit einem stetig besser werdenden Ergebnis von aktuell 83% Gesamtüberlebensrate nach einem Jahr (38). Die Teilleberspende spielt eine zunehmende Rolle mit einem Anteil von 5,6% in Deutschland im Jahr 2016, auch Splitleber und Dominospende werden durchgeführt. Die Zirrhose und die alkoholbedingte Leberkrankheit waren im Jahr 2016 einer der Hauptgründe für eine Anmeldung zur Lebertransplantation (45).

### 5.1.3 Die Rolle der Angiogenese und deren Faktoren in der Entwicklung der Zirrhose und des HCC

Die Angiogenese beschreibt das Entstehen neuer aus bereits existierenden Gefäßen in physiologischen und pathologischen Prozessen. In der Leber sind sowohl die chronische Inflammation, die fortschreitende Fibrose und die fortschreitende Zirrhose als auch das Auftreten von Komplikationen wie dem HCC stark mit einer pathologischen Angiogenese assoziiert (46). Eine chronische Inflammation aktiviert Hypoxie-induktible Faktoren (HIF), welche die Angiogenese auf unkontrollierte Weise in Gang setzen. Es kommt zu einer Störung des Gleichgewichts von anti- und proangiogenen Faktoren. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)-A<sup>5</sup>, -B, -C, -D, *fibroblast growth factor* (FGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder Angiopoietin 2 aktivieren Tyrosinkinasen, die unter anderem an Endothelzellen die Angiogenese stimulieren (47). Die komplexe und multifaktoriell regulierte Angiogenese umfasst folgende Schritte (46):

- Destabilisation und Permeabilität der Gefäßwand für intravasale Proteine als Gerüst und Signal für Endothelzellen (Angiopoietin 2- und VEGF-vermittelt)

---

<sup>5</sup> Wenn nicht anders gekennzeichnet bezieht sich in der gesamten Arbeit die Abkürzung VEGF stets auf VEGF-A

- Proliferation und Migration von Endothelzellen (VEGF-, *epithelial growth factor* (EGF)- und *fibroblast growth factor* (FGF)-vermittelt),
- Zellkontakte zwischen Endothelzellen (koordiniert durch membranständige Adhäsionsproteine VE-Cadherin- und Integrin)
- Gefäßformation (TNF- $\alpha$ - und FGF-vermittelt)
- mesenchymale Proliferation und Migration (VEGF- und *platelet-derived growth factor* (PDGF)-vermittelt)
- Differenzierung der Perizyten und Stabilisierung der neuen Gefäße (*transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ - und Angiopoietin 1-vermittelt)

VEGF-A als wichtigster Faktor bindet an drei Rezeptoren (*vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)-1,-2,-3). Über VEGFR-2 kommt es zu einer Stickstoffmonoxid (NO)-abhängigen Vasodilatation und einer gesteigerten Permeabilität (46). Über den *phosphatidylinositol-3-kinase/proteinkinase B/mammalian target of rapamycin* (PI3K/Akt/mTOR)-Signalweg oder über den *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Weg werden Endothelzellen aktiviert, migrieren und proliferieren. Es kommt zur Gefäßneubildung und Sprossung (47). Der Signalweg über VEGFR-1 (auch FLT-1, *Fms-like tyrosine kinase 1*) fällt schwächer aus, dieser Rezeptor wirkt möglicherweise in der Regulation der Angiogenese als „VEGF-A-Fänger“ (46). Die lösliche Form von VEGFR-1, sVEGFR-1 (*soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*), löst keinen intrazellulären Signalweg aus und wirkt somit ebenfalls negativ regulierend auf die Angiogenese (48).

*Placental growth factor* (PlGF) spielt in der physiologischen Angiogenese keine Rolle. In der Leber wird es von Hepatozyten und Sternzellen gebildet und bindet an VEGFR-1 sowie an seiner löslichen Form (49). Somit verdrängt er VEGF-A, das wiederum vermehrt für den VEGFR-2 Weg verfügbar ist (46) und trägt so zur pathologischen Angiogenese bei. Ferner wirkt PlGF während der Gefäßbildung aktivierend auf mesenchymale Fibroblasten, glatte Muskelzellen, myeloide Stammzellen und Makrophagen und stimuliert die Expression weiterer angiogener Faktoren. PlGF unterscheidet sich von VEGF durch seinen Wirkungsort (nur an Zellen mit hochregulierten VEGFR-1) aber auch durch die ausgelösten intrazellulären Signalwege über VEGFR-1. Bei PlGF-Überexpression in malignen Tumoren scheint durch die Bildung von VEGF:PlGF-Heterodimeren auch ein gewisser antiangiogener Effekt möglich zu sein (49).

Während der Entwicklung einer Fibrose und Zirrhose kommt es parallel zur Fibrogenese zur Ausbildung neuer, abnormer Gefäße, sinusoidalem Remodelling mit zunehmender Kapillarisation und intrahepatischen Shunts (50) (46). Neben den auch in anderen Geweben beobachteten Vorgängen sind leberspezifische Prozesse und Zellen wie die Kupffer-Zellen und die hepatischen Sternzellen beziehungsweise Myofibroblasten involviert. Diese modulieren als Antwort auf eine andauernde Leberzellschädigung eine starke Interaktion zwischen chronischer Entzündung, Angiogenese und Fibrogenese. Durch die abnorme Struktur und Funktion der neuen Gefäße, eine zunehmende Kapillarisation der Sinusoide sowie durch hypoxische Areale

innerhalb von Regenerationsknoten und fibrosierten Arealen werden die Hypoxie und somit die sich gegenseitig verstärkenden Angiogenese, Fibrogenese und chronische Entzündung aufrecht erhalten (40). Schließlich tritt die für eine Zirrhose charakteristische Gefäßarchitektur mit erhöhtem hepatischen Widerstand auf (46). Die Ätiologie der Fibrose beeinflusst möglicherweise vor allem im Anfangsstadium die Ausprägung der Angiogenese. Sie ist in chronischen Lebererkrankungen dominanter, bei denen eine durch Brückennekrose bedingte Fibrose entsteht, also in viralen und autoimmunen Prozessen. Bei von perisinusoidaler Fibrose gezeichneten Lebererkrankungen (AFLD und NAFLD) fällt sie diskreter aus (40).

Das HCC entsteht meistens im Rahmen einer chronischen Lebererkrankung (8) und ist stark vaskularisiert. Aus kleinen dysplastischen Arealen bilden sich größere neoplastische Knoten, die für ein schnelles Wachstum Sauerstoff und Nährstoffe benötigen und die weitere Deregulierung der Angiogenese fördern. Die VEGF-Überexpression wirkt an Endothelzellen, aber auch an Tumorzellen mit hochregulierten Rezeptoren VEGFR-1 und 2 (51) und ist für den sogenannten *angiogenic switch* in der Hepatokarzinogenese ausschlaggebend (46). Der Tumor selbst bildet schließlich angiogene Faktoren und fördert das Gefäßremodelling mit Rekrutierung endothelialer Stammzellen. Das Fortschreiten der Vaskularisation im Sinne einer Kapillarisation und Arterialisierung korreliert mit der Progression (47) und führt in der Bildgebung zu der typischen Kontrastierung (3). Die unkontrollierte Proliferation und die atypische Morphologie der neuen Gefäße führt im Tumor zu einer abnormalen Gefäßhierarchie (52) und zu einer Endothelstruktur mit Störung der Durchblutung, Leckagen und einer Tendenz zur Hämorrhagie, so dass die Hypoxie nicht behoben wird und zu einer weiteren Stimulation der Angiogenese führt.

Die VEGF-Konzentration im Blut ist mit dem Fortschreiten einer Zirrhose und einem Tumorprogress sowie einer schlechten Prognose assoziiert (46) (53). In einer prospektiven Studie an 90 Patienten hatte VEGF als diagnostischer Marker für das HCC eine Sensitivität und Spezifität von 90% (54). Die Rolle von PlGF als wichtiger Faktor der pathologischen Neoangiogenese wurde in verschiedenen Tumorerkrankungen untersucht (49). Die PlGF-Expression beim HCC konnte mit fortschreitendem Tumorstadium und schlechterem Outcome korreliert werden (55). Bei chronisch entzündlichen Lebererkrankungen konnte PlGF im Serum nachgewiesen und mit verschiedenen Stadien der chronischen Lebererkrankung korreliert werden (42). Der lösliche VEGFR-1-Rezeptor wird bei pathologischer Angiogenese hochreguliert und wurde als möglicher prognostischer Marker für HCC identifiziert (56) (57). Der genaue Zusammenhang zwischen sVEGFR1 und PlGF bei Tumorpatienten ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (48).

Die Angiogenese und insbesondere die VEGF-Familie als wichtiger Faktor der Tumorprogression ist zudem bereits seit vielen Jahren ein Therapieziel. Angiogenesehemmer werden als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Therapien eingesetzt. Tyrosinkinasehemmer wie Sorafenib und Lenvatinib sind als Erstlinientherapie für das fortgeschrittene HCC zugelassen, Regorafenib und Cabozantinib werden als Zweitlinientherapien eingesetzt (1) (Kapitel 5.1.1.5). PlGF ist als rein pathologischer angiogener Faktor ebenfalls ein mögliches Therapieziel.

Moleküle wie Aflibercept werden bereits bei der altersabhängigen Makuladegeneration und beim kolorektalen Karzinom eingesetzt (49). Das klinische Ergebnis unter VEGF-Inhibition bei eher ungünstigem Nebenwirkungsprofil fiel bisher jedoch moderat aus. Etablierte prognostische und prädiktive nicht-invasive Marker vor und unter antiangiogener Therapie könnten bei der Selektion von geeigneten Patienten helfen (58).

## 5.2 Ziel der vorliegenden Arbeit

In Anlehnung an diese Ergebnisse und Fragestellungen wurden in der vorliegenden monozentrischen Langzeitstudie neben klinischen und paraklinischen prognostischen Faktoren des HCC bekannte (AFP) und neue potentielle Marker für Zirrhose und HCC im Serum in drei unterschiedlichen Kohorten untersucht: Wir bestimmten PlGF, VEGF und deren gemeinsamen Rezeptor sVEGFR-1 bei HCC- und Zirrhosepatienten und bei gesunden Probanden.

Unsere Studie reiht sich in neuere Bemühungen ein, innovative Biomarker für das HCC und die Zirrhose zu etablieren, um die Einschätzungen zur Prognose und die Prädiktion dieser heterogenen und multifaktoriellen Erkrankungen zu verbessern. Wir untersuchten den prognostischen Wert von PlGF, VEGF und sVEGFR-1 sowie den Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Zirrhose beziehungsweise eines HCC in allen Krankheitsstadien und dem Nachweis erhöhter Werte der genannten Serummarker. Schließlich testeten wir das diagnostische Potential der jeweiligen Marker für das HCC im Vergleich zu AFP einzeln und in Kombination miteinander.

# 6 Material und Methoden

## 6.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine retrospektive monozentrische Langzeitstudie an 263 HCC-Patienten aus dem Interdisziplinären Leberzentrum der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum. Wir setzten Patienten-, Zirrhose- und Tumoreigenschaften mit Überlebensdaten in Beziehung. Außerdem bestimmten und verglichen wir PlGF-, VEGF- und sVEGFR-1-Spiegel in der HCC-Kohorte und in zwei Vergleichskohorten: einer Kohorte von Patienten mit Zirrhose ohne HCC-Nachweis (n=82) und einer Kohorte von gesunden Probanden (n=30). Die Werte wurden parallel zu AFP den Überlebensdaten und den Parametern des Tumor- und Zirrhosestadiums gegenübergestellt. Ferner wurde für PlGF, VEGF und sVEGFR-1 im Vergleich zu AFP anhand der Kohorten das Differenzierungspotential zur Diagnose eines HCC oder einer Zirrhose getestet.

## 6.2 Probanden und Seren

Aus der Datenbank des Interdisziplinären Leberzentrums der Charité- Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum wurden 284 Patienten identifiziert, bei denen zwischen 1989 und 2015 stationär oder ambulant ein HCC diagnostiziert beziehungsweise behandelt wurde. Nach Identifizierung doppelter Fälle ( $n=11$ , beispielsweise bei Vorstellung mit Rezidiv; es wurde stets der spätere Kontakt als Fall eingeschlossen) konnten zu 263 Patienten klinische und paraklinische Daten sowie gegebenenfalls Überlebensdaten aus den Akten erhoben werden. Teilweise bereits vorhandene Daten aus zwei früheren Arbeiten (22) (59) wurden durch eine Archivrecherche (Zentralarchiv, Archiv des Leberzentrums samt Studienarchiv, SAP) vervollständigt. Patienten, zu denen in einer oder mehr Kategorien mehrfach Daten fehlten (Patientencharakteristika, Zirrhoseparameter oder Tumorparameter, insbesondere Daten zur Ermittlung der Tumorstadien und das AFP), wurden ausgeschlossen ( $n=10$ ). Folgende Daten erhoben wir zum Zeitpunkt der HCC-Diagnose: Geschlecht, Alter bei HCC-Diagnose, genaue Tumorcharakteristika (Größe und Anzahl der Herde, Nachweis einer Gefäßinvasion, Nachweis von Metastasen, TNM-Stadium, BCLC-Stadium), AFP-Wert, Vorhandensein einer Zirrhose, deren Ursache und Child-Pugh-Stadium, Vorhandensein eines Aszites, einer portalen Hypertension und einer hepatischen Enzephalopathie, Albumin, Bilirubin, Quick- bzw. INR-Wert, der Zeitpunkt und die Art der Therapien sowie Überlebensdaten. Bei Patienten, deren HCC bereits bekannt und gegebenenfalls schon therapiert worden war, diente als Grundlage der Datenerhebung der Zeitpunkt des ersten Kontaktes mit der Klinik.

Des Weiteren verfügten wir aus derselben Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie über eine Kohorte von 183 Patienten, bei denen zwischen 1992 und 2005 eine Zirrhose ohne Hinweis auf ein HCC diagnostiziert wurde. Bekannt waren neben Alter und Geschlecht das Zirrhosestadium nach Child-Pugh und die Ursache der Zirrhose. Der AFP-Wert zum Zeitpunkt der Erstvorstellung war in einer vorigen Arbeit ermittelt worden (22).

Alle HCC- und Zirrhose-Fälle wurden pseudonymisiert.

Schließlich verfügten wir über eine Kontrollgruppe aus 30 anonymen gesunden Probanden. Es handelt sich hier um Studenten und Labormitarbeiter der Klinik, bei denen kein Hinweis auf eine Erkrankung vorlag.

In der Serumbank der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie des Campus Virchow Klinikums werden Seren der ambulant und stationär betreuten Patienten pseudonymisiert aufbewahrt und können einem genauen Abnahmedatum zugeordnet werden. Wir fanden zu insgesamt 97 unserer HCC-Patienten Seren, die zum Zeitpunkt des ersten Kontaktes abgenommen wurden. 82 Patienten mit Zirrhose konnte ein Serum zugeordnet werden, das dem Datum der Erhebung der klinischen Daten entsprach. Überschneidungen mit der HCC-Kohorte gab es nicht. Die Seren der gesunden Probanden stammten aus dem Zentrallabor des Campus Virchow Klinikum.

Mittels eines ELISA-Verfahrens wurden aus diesen Seren die Spiegel von PlGF, VEGF und deren gemeinsamem Rezeptor sVEGFR-1 ermittelt (Kapitel 6.3).

In der folgenden Abbildung wird das Studiendesign dargestellt.

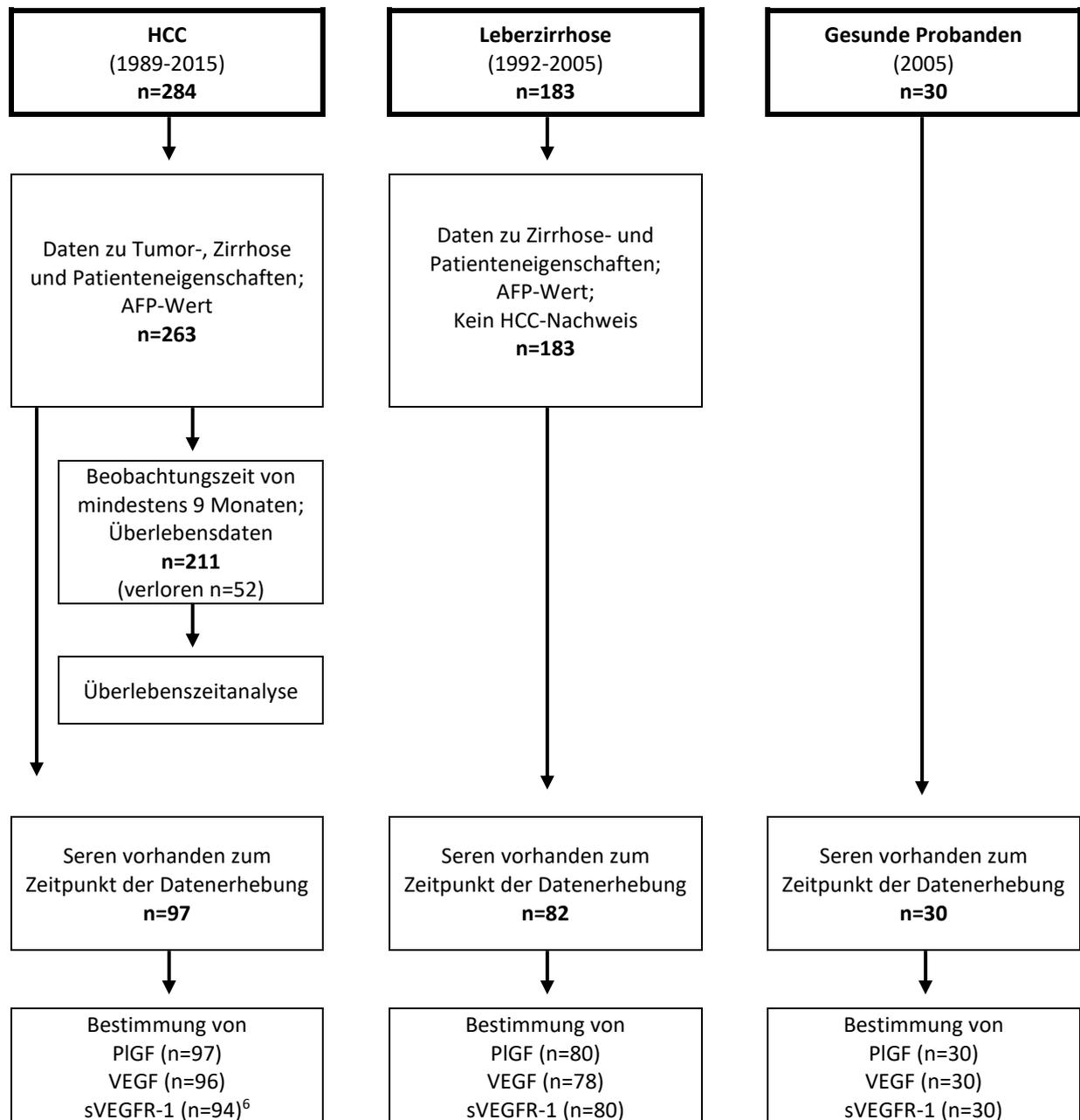


Abbildung 3: Studiendesign mit 3 Kohorten aus dem Interdisziplinären Leberzentrum der Charité- Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum

<sup>6</sup> Die unterschiedlichen Zahlen kommen dadurch zustande, dass bei einzelnen Patienten nicht mehr ausreichend Serum vorhanden war, um alle Bestimmungen durchzuführen.

## 6.3 Labor

### 6.3.1 Grundprinzip *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

PIGF, VEGF und sVEGFR-1 wurden jeweils mittels quantitativer Sandwich-Enzym Immunoassays bestimmt. Hierbei wird das nachzuweisende Antigen zwischen zwei spezifischen Antikörpern an unterschiedlichen Epitopen gebunden, um durch Hinzugabe eines Chromogens sichtbar und messbar gemacht zu werden. Im Idealfall ist die Konzentration eine lineare Funktion in der Farbintensität. Dieser Zusammenhang wird genutzt, um mittels einer exponentiellen Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen die sogenannte Standardkurve zu erstellen, anhand derer jede gemessene Farbintensität einer Konzentration zugeordnet werden kann.

### 6.3.2 Prozedere

Es wurden die Quantikinine® ELISA der Marke R&D systems benutzt (60) (61) (62). Details zu den verwendeten Materialien sind im Kapitel 6.3.3 aufgeführt. Jede Probe und jede Standardkonzentration wurde doppelt gemessen.

Wenn alle Proben und Reagenzien die Raumtemperatur erreicht hatten, konnte die Verdünnungsreihe für den Standard hergestellt werden. Hierbei wurden exponentiell abnehmende Konzentrationen aus dem jeweiligen rekombinanten Enzym hergestellt, welches im gleichen Maße wie das natürlich vorkommende Enzym von den Antikörpern erkannt wird.

Der gefriergetrocknete Standard für PIGF und VEGF wurde mit 1mL einer Kalibrierungsverdünnungslösung (Verdünnungslösung 1) rekonstituiert und diente als höchste Konzentration (1000 beziehungsweise 2000 pg/mL). Für sVEGFR-1 wurden 0,8 mL destilliertes Wasser zu dem gefriergetrockneten Standard hinzugefügt. Davon wurden 100µL mit 900µL Kalibrierungsverdünnungslösung gemischt, um die höchste Konzentration, in diesem Fall 2000 pg/mL, herzustellen. Für die Verdünnungsreihen wurden die Konzentrationen schrittweise in dem gleichen Verdünnungsmittel halbiert. Sie reichten bei PIGF von 1000 bis 15,6 pg/mL und bei VEGF und sVEGFR-1 von 2000 bis 31,3 pg/mL. Als Leerwert zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze diente das Verdünnungsmittel.

Die Mikrotiterplatte ist mit einem monoklonalen, spezifisch gegen PIGF, VEGF oder sVEGFR-1 gerichteten Erstantikörper beschichtet. In die 96, vorab mit jeweils 100µL Verdünnungslösung 2 befüllten Wannern wurden jeweils 100µL Leerwertkonzentration, Standardkonzentration oder Serum verteilt. Überschüssige, ungebundene Substanzen wurden nach zwei Stunden Inkubation mittels Waschpuffer ausgewaschen. Der polyklonale, spezifische und Enzym-gebundene, mobile Zweitantikörper wurde hinzugefügt (Konjugat, jeweils 200µL), und es folgte wieder eine zweistündige Inkubationszeit. Ungebundene Reagenzien wurden durch erneutes Waschen entfernt und anschließend das färbende Substrat hinzugegeben (jeweils 200µL Substrat, hergestellt aus Substrat A und B in gleicher Menge). Hinweis auf ein gutes Ablauf des Testverfahrens war die Blaufärbung der Wannern mit hohen Konzentrationen, also beispielsweise in der Verdünnungsreihe. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch jeweils 50µL Stopp-Lösung

angehalten, was zu einem erneuten Farbumschlag zu Gelb führte. Über die Farbintensität wurden durch ein Lesegerät die dazugehörigen Standardkurven und schließlich die Konzentrationen errechnet.

### 6.3.3 Materialien

#### 6.3.3.1 Materialien für ein Assay

<b>Mikrotiterplatte</b>	<b>PIGF</b>	Polystyrol Mikrotiterplatte bestehend aus 96 Wannen angeordnet in 12 Spalten (1-12) und 8 Reihen (A-H), beschichtet mit einem monoklonalen spezifischen Antikörper gegen humanes PIGF	
	<b>VEGF</b>	Polystyrol Mikrotiterplatte bestehend aus 96 Wannen angeordnet in 12 Spalten (1-12) und 8 Reihen (A-H), beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch gegen VEGF	
	<b>sVEGFR-1</b>	Polystyrol Mikrotiterplatte bestehend aus 96 Wannen angeordnet in 12 Spalten (1-12) und 8 Reihen (A-H), beschichtet mit einem monoklonalen spezifischen Antikörper gegen humanes VEGFR-1	
<b>Standard</b>	<b>PIGF</b>	In Pufferlösung mit Konservierungsstoffen gefriergetrocknetes rekombinantes humanes PIGF	
	<b>VEGF</b>	In Pufferlösung mit Konservierungsstoffen gefriergetrocknetes rekombinantes VEGF 165	
	<b>sVEGFR-1</b>	In Pufferlösung mit Konservierungsstoffen gefriergetrocknetes rekombinantes humanes sVEGFR-1	
<b>Konjugat</b>	<b>PIGF</b>	Mit Meerrettichperoxidase und Konservierungsstoffen konjugierter polyklonaler, spezifisch gegen humanes PIGF gerichteter Antikörper (21mL)	
	<b>VEGF</b>	Mit Meerrettichperoxidase und Konservierungsstoffen konjugierter polyklonaler, spezifisch gegen VEGF gerichteter Antikörper (21mL)	
	<b>sVEGFR-1</b>	Mit Meerrettichperoxidase und Konservierungsstoffen konjugierter polyklonaler, spezifisch gegen humanes VEGFR-1 gerichteter Antikörper (21mL)	
<b>Verdünnungslösung 1</b>	<b>PIGF</b>	<i>Calibrator Diluent</i> DR6-11	Pufferlösung mit Konservierungsstoffen (21mL)
	<b>VEGF</b>	<i>Calibrator Diluent</i> RD6U	Tierisches Serum mit Konservierungsstoffen (21mL)
	<b>sVEGFR-1</b>	<i>Calibrator Diluent</i> RD6-10	Pufferlösung mit Konservierungsstoffen (21mL)
<b>Verdünnungslösung 2</b>	<b>PIGF</b>	<i>Assay Diluent</i> RD1-22	Pufferlösung mit Konservierungsstoffen (11mL)
	<b>VEGF</b>	<i>Assay Diluent</i> RD1W	Pufferlösung mit Konservierungsstoffen (11mL)
	<b>sVEGFR-1</b>	<i>Assay Diluent</i> RD1-68	Pufferlösung mit Konservierungsstoffen (11mL)

<b>Farbreagenz A</b>	Stabilisiertes Hydrogenperoxid (12mL)
<b>Farbreagenz B</b>	Stabilisiertes Tetramethylbenzidin (12mL)
<b>Waschpuffer-konzentrat</b>	25fach konzentrierte Lösung eines Puffertensids mit Konservierungsstoffen (21mL)
<b>Stopplösung</b>	2N Schwefelsäure (6mL)

Tabelle 4: Materialien für ein Assay

### 6.3.3.2 Weitere Hilfsmittel

-Mikroplatten-Reader der Marke *Molecular devices* mit der Software *Softmax Plus*

-Pipetten

-Destilliertes Wasser

## 6.4 Statistische Methoden

Folgende Datenerhebung und statistische Anwendungen erfolgten über das *IBM SPSS Statistics 25 Programm*:

Patientendaten wurden pseudonymisiert und ausschließlich als Identifikationsnummer mit Kohortenzugehörigkeit (HCC, Zirrhose oder gesunde Probanden) in die SPSS-Tabelle für die statistische Auswertung aufgenommen. Nach erfolgter Bestimmung wurden die jeweiligen Werte für PIGF, VEGF und sVEGFR-1 eingetragen sowie die oben genannten klinischen und paraklinischen Daten für die Kohorten der HCC-Patienten und der Zirrhose-Patienten. Für die Serummarker wurden für die statistischen Analysen verschiedene Cut-off-Werte bestimmt: nachweisbares PIGF (vgl. dazu weiter unten sowie Kapitel 8.3), 154 pg/mL für VEGF (entspricht dem Gesamtmedian), für sVEGFR-1 86 pg/mL (entspricht dem Gesamtmedian) und 70 pg/mL (Cut-off-Wert in unserer ROC-Analyse HCC versus Zirrhose, siehe Kapitel 7.5.1), für AFP 10 ng/mL (entspricht dem gängigem Normwert) und 400 ng/mL (Cut-off-Wert des Staging-Systems CLIP). Für die HCC-Kohorte wurde bei jedem Patienten in regelmäßigen Zeitabständen der Status dokumentiert: 1 (lebend), 0 (zwischenzeitlich verstorben), 3 (verloren) oder 2 (bei Abschluss der Studie noch lebend). Schließlich wurde die Überlebenszeit oder Beobachtungszeit in Monaten berechnet.

Über die Fallzusammenführung und die deskriptive Statistik und mit Hilfe von Variablentransformationsprozessen wurden Fallzahlen (beispielsweise Anzahl der Frauen und Männer in der HCC-Kohorte oder Anzahl der fortgeschrittenen Zirrhosen) und Häufigkeiten innerhalb von Subgruppen (beispielsweise 13 Patienten mit BCLC-Stadium A erhielten eine primäre Resektion) berechnet und in Prozenten angegeben (Kapitel 7.1.1 - 7.1.3).

Die Überlebenszeitanalysen (Kapitel 7.4) der HCC-Patienten erfolgten nach dem Kaplan-Meier-Verfahren. Die Patienten wurden in 3 Kategorien eingeteilt: Todeszeitpunkt bekannt (1),

Patient lebt beim Abschluss der Studie noch (2), Patient ist zu einem bestimmten Zeitpunkt verloren gegangen (3). Anschließend konnte die Überlebenszeit nach dem Kaplan-Meier-Verfahren analysiert und als Ereignis „1“ definiert werden. Die anderen Patienten (verloren, noch lebend) wurden somit zensiert und flossen über den Kaplan-Meier-Schätzer in die Analyse mit ein: Anhand der bereits vorhandenen Daten zu Ereignissen wurde zu jedem Zeitpunkt das Risiko abgeschätzt zu versterben und auf die verlorenen und noch lebenden Patienten angewandt. Die mediane Überlebenszeit gibt an, wann die Hälfte der Patienten ein Ereignis erfahren hat. Diese kann nur bestimmt werden, wenn die Kurve die 50% unterschreitet (63). Wir analysierten zum einen die gesamte Überlebenszeit. Zum anderen analysierten wir das Überleben in Abhängigkeit verschiedener Parameter (beispielsweise frühes und spätes Tumorstadium). Bei der Annahme von proportionalen Risiken (Hazards) (über die Zeit annähernd gleichbleibender Unterschied des Sterberisikos zwischen den Gruppen) verglichen wir anhand des Log-Rank-Testes die Signifikanz der Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Wenn sich die Kurven kreuzten waren die Hazards nicht durchgehend proportional und somit nicht vergleichbar (63).

Zur Identifizierung unabhängiger Einflussgrößen führten wir eine multivariate Regressionsanalyse mit den signifikanten Variablen der univariaten Analyse durch (Kapitel 7.4.6). Dabei wurden nur Parameter eingeschlossen, die sich nicht überschneiden und sich somit nicht vorhersehbar beeinflussen (wie es beispielsweise bei Anzahl und Größe der Läsion mit BCLC-Stadien der Fall wäre). Die Regressionsanalyse erfolgte nach der Einschluss-Methode, bei der alle Variablen in einem Schritt in die Analyse aufgenommen werden. Bei signifikant ausfallenden Ergebnissen konnten Hazard-Ratio (vergleicht die Sterberaten der jeweiligen Gruppen), Betawert und Wald-Wert (spiegeln die Richtung und die Stärke des Einflusses wider) verglichen werden.

Wir ermittelten anschließend (Kapitel 7.5) insgesamt und in Untergruppen die Mittelwerte und Mediane von PIGF, VEGF und sVEGFR-1 für alle 3 Kohorten: für HCC-Patienten, für Zirrhose-Patienten und für gesunde Probanden, innerhalb der HCC-Kohorte für verschiedene Tumorstadien und innerhalb der Zirrhose-Kohorte für verschiedene Zirrhosestadien. Die Werte der HCC-Kohorte und der Zirrhose-Kohorte und die Werte der verschiedenen Tumor- und Zirrhosestadien wurden den Werten der Gesunden gegenübergestellt, bei der HCC-Kohorte auch den Werten der Zirrhose-Kohorte. Mittels des t-Tests für Mittelwertgleichheit testeten wir, nach Prüfung der Varianzhomogenität anhand des Levene-Tests, die vorhandenen Unterschiede auf ihre Signifikanz.

Bei den PIGF-Werten ist an dieser Stelle zu bemerken, dass es viele Negativbestimmungen und Bestimmungen unterhalb der Nachweisgrenze von 15,6 pg/mL gab. Um dennoch zwischen nicht nachweisbaren Werten und Werten zwischen 0 und 15,6 pg/mL zu unterscheiden, werteten wir alle Bestimmungen aus und wählten für PIGF (als rein pathologischer Faktor) 0 pg/mL als Cut-off-Wert (vgl. dazu Kapitel 8.3). Wir führten an den positiven Werten jedoch keine ROC-Analysen durch.

Anhand von *receiver operating characteristics* (ROC)-Analysen der HCC- und Zirrhosekohorte untersuchten wir anschließend die vier Marker hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials zum Vorhandensein eines HCC insgesamt und in verschiedenen Tumorstadien. Für jeden Wert wurde die Sensitivität und Spezifität, mit der das HCC diagnostiziert wird, bestimmt, in ein Diagramm eingetragen und durch eine Linie verbunden. Je größer der Abstand zur Diagonalen, umso größer die diagnostische Aussagekraft. Die Analyse wurde unter einer nicht-parametrischen Verteilungsannahme und unter Ausschluss fehlender Werte durchgeführt, wenn die Mittelwerte beziehungsweise Mediane eine entsprechende Tendenz aufzeigten. Die Signifikanz des Unterschiedes einer Fläche unter der Kurve (*area under the curve*= AUC) in Bezug zur Diagonalen wurde anhand des nicht-parametrischen Verfahrens des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt. Der Wert, dessen Koordinate auf dem Diagramm der linken oberen Ecke am nächsten ist, gilt als bestmöglicher Cut-off-Wert. Ein AUC-Wert von 0,5 bis 1 ist positiv (unterscheidet somit in die vermutete Richtung), wobei die Entscheidungskraft umso größer ist je mehr sich der Wert der 1 annähert; bei einem Wert von 0,5 kann der getestete Marker zwischen 2 Gruppen nicht unterscheiden.

Anhand einer Vierfeldertafel bestimmten wir die jeweiligen Sensitivität und Spezifität für das Vorhandensein eines HCC bei Zirrhose und kombinierten die Marker untereinander. Dabei wurden folgende Cut-off Werte benutzt: für AFP der gängige Normwert 10 ng/mL; für PIGF 0 pg/mL; für VEGF der Gesamtmedian unserer Messungen 154 pg/mL, da in der Literatur kein einheitlicher Cut-off-Wert vorliegt; für sVEGFR-1 der anhand unserer AUC (HCC versus Zirrhose) ermittelte Cut-off-Wert 70 pg/mL.

Abschließend untersuchten wir die Marker auf eine mögliche lineare Korrelation nach der Pearson-Methode für metrische Daten.

Die aufgeführten Ergebnisse sind bis auf die  $p < 0,01$  nach der zweiten Dezimalstelle gerundet.

Alle Tests mit statistischer Signifikanz basieren auf einem Alphaniveau von 0,05.

## 7 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnten PIGF, VEGF und sVEGFR-1 das Vorhandensein einer Zirrhose oder eines HCC bei zugrundeliegender Zirrhose nicht sicher vorhersagen. VEGF und sVEGFR-1 hatten jedoch unter anderem eine prognostische Aussagekraft. Im Folgenden werden die Ergebnisse ausführlich dargestellt.

## 7.1 Patienteneigenschaften

### 7.1.1 Kohorte der HCC-Patienten

Die Kohorte von 263 Patienten setzte sich aus 204 Männern (77,6%) und 59 Frauen (22,4%) zusammen. Der Altersmedian betrug 65 Jahre (24-85 Jahre). Bei 262 Patienten war der Zirrhosestatus bekannt. 234 Patienten hatten eine nachgewiesene Zirrhose (89,3%), 28 hatten keine Zirrhose (10,7%). Bei 227 Patienten war die Ursache der Zirrhose bekannt. Die drei häufigsten Ursachen waren chronische Hepatitis C (37%), Alkoholkonsum (35,2%) und chronische Hepatitis B (16,3%). Bei einer Mehrzahl der Patienten lag bereits eine portale Hypertension vor (71,9%). Dabei überwogen die Zirrhose-Frühstadien mit 65,3% Child-Pugh-Stadium A, 28,9% Stadium B und lediglich 5,8% Stadium C. Der MELD-Score konnte bei 207 Patienten errechnet werden und lag auch unter Berücksichtigung der Punktevergabe durch HCC-Frühstadien überwiegend im niedrigen Bereich von unter 9 Punkten (57,5%). Das AFP bei HCC-Diagnose lag in 69,3% der Fälle unter 400 ng/mL (Tabelle 5).

### 7.1.2 Kohorte der Zirrhose-Patienten

Die Kohorte der 82 Patienten mit Zirrhose aber ohne HCC-Nachweis setzte sich aus 43 Männern (52,4%) und 39 Frauen (47,6%) zusammen. Der Altersmedian lag bei 55 Jahren. Die vier häufigsten Ursachen der Zirrhose waren Alkohol (36,3%), chronische Hepatitis C (20%), Autoimmunhepatitis (13,8%) und chronische Hepatitis B (11,3%). Die Zirrhose-Patienten befanden sich zu 38,8% im Child-Pugh-Stadium A, zu 36,3% im Stadium B und zu 25% im Stadium C (Tabelle 6).

### 7.1.3 Kohorte der gesunden Probanden

Über die 30 gesunden Probanden aus der Kontroll-Gruppe waren keine weiteren Daten bekannt. Es handelte sich um gesunde Mitarbeiter und Studenten des Forschungszentrums der Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie des Virchow-Klinikums in Berlin, die sich zu einer Blutabnahme zu Forschungszwecken bereit erklärt hatten.

In den folgenden Tabellen werden Patienteneigenschaften der HCC- und Zirrhose-Kohorten zusammengefasst.

Patientencharakteristika	Anzahl n	%
<b>Alter (n=260)</b>		
<50	27	10,4
50-59	51	19,6
60-69	104	40
70-79	68	26,2
80-89	10	3,8
<b>Geschlecht (n=263)</b>		
Männlich	204	77,6
Weiblich	59	22,4
<b>Zirrhose (n=262)</b>		
Ja	234	89,3
Nein	28	10,7
<b>Ursachen der Zirrhose (n=227)</b>		
HCV	84	37
Alkohol	80	35,2
HBV	37	16,3
Kryptogen	11	4,8
NAFLD	7	3,1
Haemochromatose	5	2,2
Andere metabolische Ursachen	3	1,3
<b>Portale Hypertension (n=242)</b>		
Ja	174	71,9
Nein	68	28,1
<b>Child-Pugh-Kriterien (n=225)</b>		
A	147	65,3
B	65	28,9
C	13	5,8
<b>Enzephalopathie (n=240)</b>		
Ja	14	5,8
Nein	226	94,2
<b>Aszites (n=244)</b>		
Ja	78	32
Nein	166	68
<b>MELD-Score (n=207)</b>		
<9	119	57,5
10-19	37	17,9
20-29	50	24,2
30-39	0	0
>39	1	0,5
<b>AFP (ng/mL) bei Diagnose (n=244)</b>		
<400	169	69,3
≥400	75	30,7

Tabelle 5: Patienteneigenschaften der HCC-Kohorte (HCV: chronische Hepatitis C; HBV: chronische Hepatitis B; NAFLD: *non alcoholic fatty liver disease*: nicht-alkoholische Fettlebererkrankung; MELD: *Model for End-Stage Liver Disease*; AFP: Alphafetoprotein)

Patientencharakteristika	n	%
<b>Geschlecht (n=82)</b>		
Männlich	43	52,4
Weiblich	39	47,6
<b>Ursachen der Zirrhose (n=80)</b>		
Alkohol	29	36,3
HCV	16	20
Autoimmunhepatitis	11	13,8
HBV	9	11,3
Kryptogen	8	10
PBC	7	8,8
<b>Child-Pugh-Kriterien (n=80)</b>		
A	31	38,8
B	29	36,3
C	20	25
<b>AFP (ng/mL) (n=82)</b>		
<10	74	90,2
≥10	8	9,8

Tabelle 6: Patienteneigenschaften der Zirrhose-Kohorte (HCV: chronische Hepatitis C; HBV: chronische Hepatitis B; NAFLD: *non alcoholic fatty liver disease*: nicht-alkoholische Fettlebererkrankung; PBC: primär biliäre Cholangitis; AFP: Alphafetoprotein)

## 7.2 Tumoreigenschaften

Bei den diagnostizierten Tumoren handelte es sich ausschließlich um hepatozelluläre Karzinome. Anhand verschiedener Staging-Systeme ließen sich die Tumore in Früh- und Spätstadien unterteilen (Kapitel 5.1.1.4). BCLC-Stadien A, B und C waren mit 18%, 40,8% und 34% vertreten. Sowohl das sehr frühe Stadium 0 und das Spätstadium D waren schwach repräsentiert mit 2% und 5,2%. Mit der TNM-Klassifikation zeigte sich eine regelmäßige Verteilung der Tumore auf alle Stadien (21,9% Stadium I, 28,8% Stadium II, 26,2% Stadium III und 23% Stadium IV). Bei den Klassifikationen CLIP und Okuda überwogen die früheren Stadien 0-3 beziehungsweise A und B. Es gab weniger uni- als multifokale Läsionen (44,4% versus 55,6%). Die Tumore ließen sich der Größe nach in vier Gruppen von unter 3cm bis über 10cm einteilen (25,5%, 30,4%, 31,9% und 12,2%). Bei den meisten Tumoren (61,5%) konnte keine Gefäßinvasion nachgewiesen werden. Metastasen traten selten auf (regional 15,4%, Fernmetastasen 8,9%) (Tabelle 7).

<b>Tumorcharakteristika</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>BCLC (n=250)</b>		
0	5	2
A	45	18
B	102	40,8
C	85	34
D	13	5,2
<b>TNM (n=260)</b>		
I	57	21,9
II	75	28,8
IIIa	41	15,8
IIIb	27	10,4
IIIc	0	0
IVa	37	14,2
IVb	23	8,8
<b>Okuda (n=224)</b>		
A	122	54,5
B	94	42
C	8	3,6
<b>CLIP (n=201)</b>		
0	35	17,4
1	67	33,3
2	55	27,4
3	31	15,4
4	10	5
5	3	1,5
6	0	0
<b>Größe der Läsionen (n=263)</b>		
<3cm	67	25,5
3-5cm	80	30,4
5-10cm	84	31,9
>10cm	32	12,2
<b>Anzahl der Läsionen (n=261)</b>		
1	116	44,4
>1	145	55,6
<b>Gefäßinvasion (n=247)</b>		
Keine	152	61,5
Gefäßinvasion	60	24,3
Invasion V. portae/ Vv. hepaticae	35	14,2
<b>Metastasen (n=247)</b>		
Keine	187	75,7
Regional	38	15,4
Fernmetastasen	22	8,9

Tabelle 7: Tumoreigenschaften (BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer* Staging-System (0-D); Okuda: Okuda Staging-System (A-C); CLIP: *Cancer of the Liver Italian Program* Staging-System (0-6))

### 7.3 Therapiearten

Bei 27 Patienten (10,3%) war eine Therapie aufgrund des Tumorstadiums oder Allgemeinzustandes des Patienten nicht mehr indiziert. Die restlichen Patienten erhielten als erste Therapie sowohl palliative Therapien, Downstaging, als auch kurative Therapien: Sorafenib (19,5%), TACE (18%), primäre Tumorsektion (14,5%) und Afterloading (14,1%). In 12,5% der Fälle wurde primär eine Lebertransplantation durchgeführt, wobei in der Kohorte auch Patienten eingeschlossen wurden, die in den 90er-Jahren auch außerhalb der Milan-Kriterien transplantiert wurden. Weitere Therapien sind jeweils mit unter 10% vertreten: SIRT (überwiegend in Kombination mit Sorafenib), RFA, TAE, konventionelle Chemotherapie, PEI und Metastasenbestrahlung.

134 Patienten (51%) erhielten nur eine Therapielinie, 61 Patienten (23,3%) erhielten insgesamt zwei Therapielinien, 34 Patienten (12,9%) erhielten eine dritte oder mehr Therapielinien. Als zweite Therapielinie war das Afterloading mit 22,1% am häufigsten und Sorafenib mit 17,9% am zweithäufigsten vertreten. TACE kam mit 14,7% als Zweitlinientherapie ähnlich häufig vor. In 15,8% der Fälle wurde (meist nach lokoregionaler Therapie) transplantiert. Weitere potentiell kurative Verfahren wurden ebenfalls durchgeführt: RFA in 6,3% der Fälle, Resektion in 8,4% der Fälle. Als dritte Therapielinie war die Metastasenbehandlung mit 26,5% am häufigsten. Es wurde in 17,6% der Fälle eine Transplantation durchgeführt, seltener eine Resektion (8,8%). Die restlichen Patienten erhielten lokoregionale Verfahren oder Sorafenib (Tabelle 8).

Insgesamt erhielten 158 Patienten ein primär palliatives Verfahren. In dieser Zahl sind Afterloading, PEI und RFA enthalten, die jedoch auch kurativ eingesetzt werden können.

Patienten in frühen BCLC Stadien (0 und A, n=46) wurden vornehmlich kurativ behandelt: 13 Resektionen, 11 Transplantationen, 8 Afterloading und 2 RFA. Im Stadium B (n=100) wurden ebenfalls viele Patienten noch in kurativer Intention therapiert: 16 Resektionen, 7 Transplantationen, 18 Afterloading, 2 RFA. Bei 22 Patienten wurde eine TACE oder TAE durchgeführt, 19 Patienten erhielten primär Sorafenib, 9 wurden nicht therapiert. In fortgeschrittenen Stadien (C und D) (n=97) wurde am häufigsten Sorafenib verabreicht (n=30). 6 Patienten wurden reseziert, 4 transplantiert, 16 erhielten primär TACE und 11 Afterloading oder RFA. 17 Patienten wurden nicht therapiert.

Art der Therapie	n	%
<b>Patienten, die 2 Therapielinien erhielten</b>	61 von 263	23,2
<b>Patienten, die 3 oder mehr Therapielinien erhielten</b>	34 von 263	12,2
<b>Erste Therapie (n= 256)</b>		
Sorafenib	50	19,5
TACE	46	18
Resektion	37	14,5
Afterloading	36	14,1
LTX	32	12,5
BSC	27	10,5
SIRT	13	5,1
RFA	5	2
TAE	3	1,2
Konventionelle Chemotherapie	3	1,2
Anderes	2	0,8
PEI	1	0,4
Metastasenbestrahlung	1	0,4
<b>Zweite Therapielinie (n=95)</b>		
Afterloading	21	22,1
Sorafenib	17	17,9
LTX	15	15,8
TACE	14	14,7
Metastasenbehandlung	8	8,4
Resektion	8	8,4
RFA	6	6,3
Chemotherapie	3	3,2
SIRT	2	2,1
TAE	1	1,1
<b>Dritte Therapielinie (n=34)</b>		
Metastasenbehandlung	9	26,5
LTX	6	17,6
Sorafenib	5	14,7
Afterloading	5	14,7
TACE	4	11,8
Resektion	3	8,8
SIRT	2	5,9

Tabelle 8: Therapiearten in absteigender Häufigkeit (TACE: transarterielle Chemoembolisation; LTX: Lebertransplantation; RFA: Radiofrequenzablation; TAE: transarterielle Embolisation; BSC: *best supportive care*; SIRT: selektive interne Radiotherapie; PEI: perkutane Ethanol Injektion)

## 7.4 Überlebenszeitanalysen

### 7.4.1 Gesamtüberleben

Die Kohorte der HCC-Patienten umfasste 151 Patienten mit vollständigen Überlebensdaten. Diese waren beim Abschluss der Studie zu einem bekannten Zeitpunkt verstorben. 60 Patienten waren am Ende der Beobachtungszeit noch am Leben und wiesen teilweise sehr unterschiedliche Beobachtungszeiten auf. 52 Patienten waren im Laufe der Beobachtungszeit verloren gegangen. Die Überlebenskurven wurden nach dem Kaplan-Meier-Prinzip erstellt. Noch lebende oder verloren gegangene Patienten wurden zensiert und entsprechend markiert. Zudem können transplantierte Patienten aufgrund der frühen Diagnose und der therapiebedingten guten Prognose mit teilweise extrem langer Beobachtungszeit als Sonderfall betrachtet werden (dies betrifft 32 Patienten der HCC-Kohorte). Wir haben im Folgenden die nicht-transplantierten Patienten gesondert analysiert und entsprechend kommentiert, wenn das Ergebnis dadurch beeinflusst wird. Patienten, die weniger als 9 Monate vor Abschluss der Studie eingeschlossen wurden, mussten aufgrund der sehr kurzen Beobachtungszeit aus den Überlebenszeitanalysen vollständig ausgeschlossen werden. Tabelle 9 (alle HCC-Patienten) und Tabelle 10 (transplantierte Patienten ausgenommen) fassen die gesamten Ergebnisse der univariaten Analyse zusammen.

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve aller Patienten zeigte eine mediane Überlebenszeit von 33 Monaten (Abbildung 4, Tabelle 9, Tabelle 10) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 28,3%. Eine Überlebenszeitanalyse aller nicht-transplantierten Patienten, die kurativ, palliativ oder gar nicht therapiert wurden ergab einen Überlebensmedian von 27 Monaten. Die 1-Jahres, 3-Jahres und 5-Jahres-Überlebensraten waren 65%, 35,1% und 18,5% (Abbildung 5, Tabelle 9, Tabelle 10).

Von den 32 transplantierten Patienten lebten nach 20 Jahren noch über 60%.

27 Patienten erhielten keine Therapie, ihre mediane Überlebenszeit betrug 4,5 Monate.

Patienten, die mit palliativem Ansatz behandelt wurden (n=148)<sup>7</sup>, hatten eine mediane Überlebenszeit von 22,5 Monaten.

### 7.4.2 Überlebenszeitanalysen differenziert nach Patientencharakteristika

Die Überlebenskurven aufgeschlüsselt nach **Geschlecht** zeigten eine nicht signifikante Tendenz zu längerem Überleben bei Frauen: Der Überlebensmedian bei Frauen betrug 39 Monate, bei Männer 27 Monate. Ohne transplantierte Patienten wurde dieser Unterschied signifikant (Tabelle 9, Tabelle 10).

---

<sup>7</sup> Der Unterschied zu den unter 7.3 genannten 158 palliativ behandelten Patienten entsteht dadurch, dass hier die individuellen Therapiestrategien, beispielsweise Downstaging oder Bridging, berücksichtigt wurden und nicht zu den palliativen Konzepten gezählt wurden.

Teilte man die Patienten in 3 **Altersgruppen** von unter 60 Jahren, 60-69 Jahren und ab 70 Jahren zeigte sich ein signifikanter Überlebensunterschied zwischen den Gruppen 1 und 2 ( $p=0,01$ ) sowie den Gruppen 1 und 3 ( $p<0,001$ ), nicht jedoch zwischen den Gruppen 2 und 3. Der Überlebensmedian in der jüngsten Gruppe betrug 102 Monaten gegenüber jeweils 27 Monaten in den beiden anderen Gruppen (Tabelle 9, Tabelle 10).

Bei Patienten mit den drei häufigsten **Ursachen der Zirrhose** (Alkohol, HBV und HCV) wurde mit und ohne transplantierte Patienten ein Überlebensvorteil für Patienten mit chronischer viraler Hepatitis deutlich (Tabelle 9, Tabelle 10). Patienten mit einer alkoholbedingten Zirrhose hatten einen Überlebensmedian von 27 Monaten, Patienten mit allen anderen Ursachen von 45 Monaten. Patienten mit einer chronischen viralen Hepatitis lebten im Median 51 Monate, Patienten mit allen anderen Ursachen nur 27 Monate.

#### 7.4.3 Überlebenszeitanalysen differenziert nach Zirrhose-Parametern

Insgesamt gab es in der HCC-Kohorte wenig Patienten mit einer Zirrhose im Child-Pugh-Stadium C, so dass wir im Folgenden die Stadien B und C zusammenfassten.

Patienten mit einer Child A-Zirrhose hatten einen längeren Überlebensmedian als Patienten mit Zirrhose Child B und C (33 versus 19,5 Monate). Problematisch war, dass sich die Überlebenskurven überschneiden (vgl. dazu Kapitel 6.4). Untersuchte man die Kohorte ohne die transplantierten Patienten, zeigten sich signifikant unterschiedliche Überlebenskurven (Tabelle 9, Tabelle 10).

#### 7.4.4 Überlebenszeitanalysen differenziert nach Tumorcharakteristika

Wir untersuchten die Überlebensdaten anhand vier verschiedener Staging-Systeme.

BCLC Stadien 0 und D wurden aufgrund der niedrigen Fallzahlen in die Früh- beziehungsweise Spätstadien eingeschlossen. Die mediane Überlebenszeit bei Patienten mit einem Tumor im Stadium BCLC 0+A betrug 57 Monate, im Stadium BCLC B 33 Monate, im Stadium BCLC C+D 19,5 Monate. Im Endstadium D beträgt der Überlebensmedian 4,5 Monate. Im Log-Rank-Test fanden sich signifikante Unterschiede nur zwischen den Gruppen A und C, die Unterschiede zwischen A und B sowie B und C waren mit einem  $p$  von 0,07 fast signifikant (Abbildung 6, Tabelle 9, Tabelle 10).

Patienten im BCLC Stadium B erhielten teilweise primär potentiell kurative Therapien. Diese wiesen im Vergleich zu Patienten, die nicht-kurativen lokoregionalen Therapie unterzogen wurden ein signifikant längeres Überleben auf. Mehr als 50%, die aggressiv behandelt wurden (22 von 62), waren bei Studienabschluss noch am Leben; der Überlebensmedian der richtliniengemäß behandelten Patienten (40 von 62) lag bei 45 Monaten ( $p=0,02$ ) (Abbildung 10).

Patienten, die in fortgeschrittenen BCLC Stadien primär lokoregionale Therapien erhielten, lebten im Vergleich zu Patienten, die Sorafenib erhielten, länger (33 versus 16,5 Monate). Der Unterschied war fast signifikant ( $p=0,06$ ) (Abbildung 11).

Der Überlebensmedian der **TNM**-Stadien I+II betrug 57 Monate, der der TNM-Stadien III+IV 22,5 Monate<sup>8</sup>. Im Log-Rank Test fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 7, Tabelle 9, Tabelle 10).

Patienten mit einem Stadium C nach **Okuda** wurden aufgrund der niedrigen Fallzahl in das Stadium B eingeschlossen. Der Überlebensmedian für das Okuda-Stadium A betrug 45 Monate, der für die Okuda-Stadien B+C 13,5 Monate. Im Log-Rank-Test war der Unterschied signifikant (Abbildung 8, Tabelle 9, Tabelle 10).

Für das Staging-System **CLIP** gab es keine Patienten im Stadium 6 und niedrige Fallzahlen für die Stadien 4 und 5, so dass diese in die Stadien 2 und 3 eingeschlossen wurden. Der Überlebensmedian für die CLIP-Stadien 0+1 betrug 39 Monate, für die CLIP-Stadien 2+3+4+5 19,5 Monate<sup>9</sup>. Im Log-Rank-Test war der Unterschied signifikant (Abbildung 9, Tabelle 9, Tabelle 10).

Auch die Überlebenskurven differenziert nach der **Anzahl der Läsionen** (uni- versus multifokal) zeigten einen signifikanten Unterschied mit Überlebensmedianen von 57 und 27 Monaten (Tabelle 9, Tabelle 10). Analysierte man die Überlebenskurven differenziert nach der **Größe der Läsionen** (größte Läsion über versus unter 5cm), fand sich auch hier ein signifikanter Unterschied im Überleben der Patienten mit Medianen von 57 und 22 Monaten. (Tabelle 9, Tabelle 10).

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Fallzahlen von Patienten mit (35) und ohne (212) Invasion der Portalvene konnten diesbezüglich keine aussagekräftigen Überlebenskurven erstellt werden.

Trennte man die Patienten anhand des **AFP** bei Diagnose gemäß dem Staging-System CLIP ( $<$  versus  $\geq 400$  ng/mL) waren die Überlebenskurven signifikant unterschiedlich mit Medianen von 45 und 16,5 Monate (Abbildung 12, Tabelle 9, Tabelle 10).

#### 7.4.5 Überlebenszeitanalysen differenziert nach PIGF, VEGF und sVEGFR-1

Bei **PIGF** unterschieden sich die Überlebensmediane von Patienten mit positivem Ergebnis von denen mit nicht nachweisbarem PIGF (39 und 19,5 Monate), ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen (Tabelle 9, Tabelle 10). Ohne transplantierte Patienten näherte sich der Unterschied mit einem  $p$  von 0,06 einer Signifikanz an.

---

<sup>8</sup> Untersuchtete man alle vier Stadien einzeln, kreuzten sich die Kaplan-Meier-Kurven und man erhielt keine vergleichbaren Überlebensmediane.

<sup>9</sup> Untersuchtete man die CLIP-Stadien 0,1,2 und 3+4+5 einzeln ergaben sich auch hier sich kreuzende Kaplan-Meier-Kurven. Wir fassten deswegen die Stadien 0 und 1 sowie 2,3,4 und 5 zusammen.

Bei **VEGF** mit einem Cut-off von 154 pg/mL (entspricht dem Median der gesamten untersuchten Patienten) zeigten sich signifikante Unterschiede in den Kurven ( $p=0,05$ ), die Überlebensmediane sind 27 und 13,5 Monate (Abbildung 13, Tabelle 9, Tabelle 10). Ohne transplantierte Patienten wurden die Unterschiede der Mediane geringer, die Überlebenskurven unterschieden sich nicht mehr.

Für **sVEGFR-1** bestand bei einem Cut-off von 86 pg/mL (entspricht dem Median der gesamten Patienten) ein signifikanter Unterschied der Überlebenskurven auch unter Einschluss der transplantierten Patienten. Die Überlebensmediane waren 65,5 und 19,5 Monate (Abbildung 14, Tabelle 9, Tabelle 10).

Die folgenden Abbildungen stellen die Kaplan-Meier-Kurven der gesamten HCC-Patienten, nach den verschiedenen Tumor-Staging-Systemen und Therapielinien sowie nach den Biomarkern AFP, VEGF und VEGFR-1 dar.

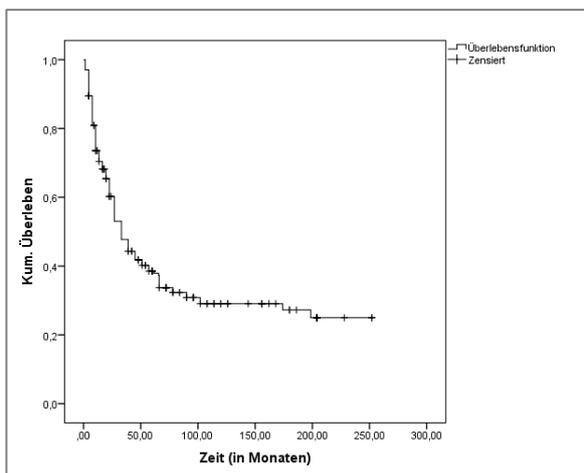


Abbildung 4: Gesamtüberleben der HCC-Patienten (n=237, zensiert=86)

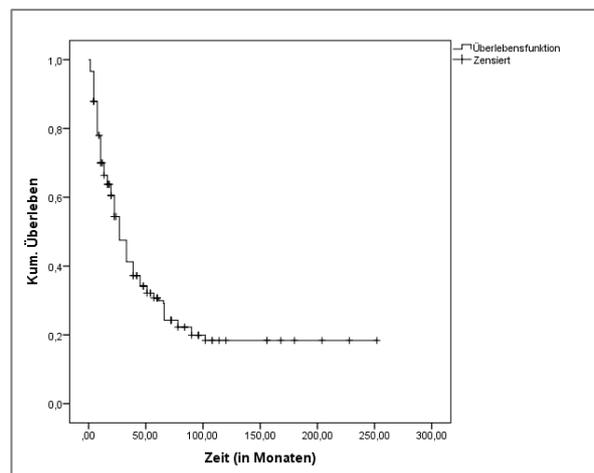


Abbildung 5: Gesamtüberleben der HCC-Patienten, transplantierte Patienten ausgenommen (n=206, zensiert=63)

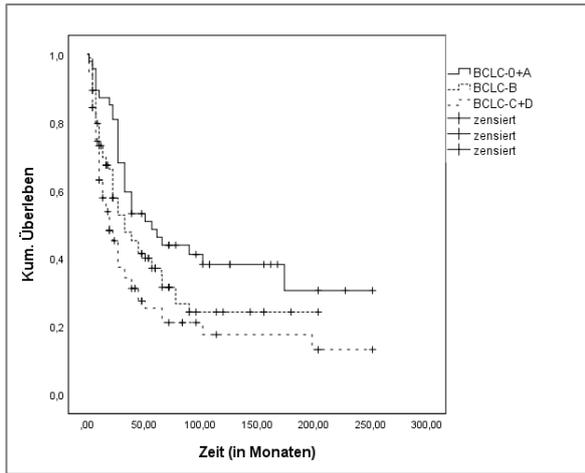


Abbildung 6: Überleben nach BCLC-Stadien (n=224, zensiert=76); p(A/B)=0,07; p(A/C)=0,001; p(B/C)=0,07

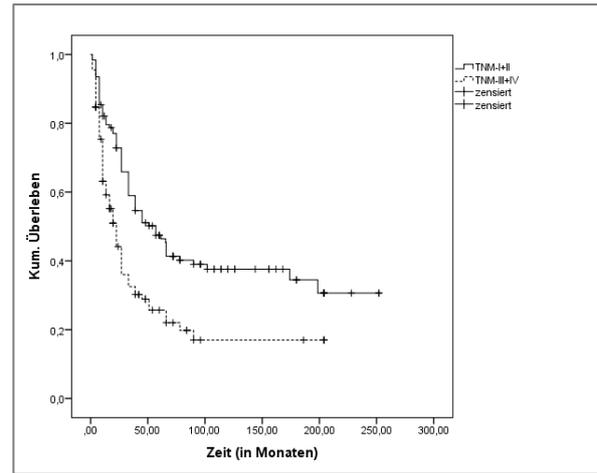


Abbildung 7: Überleben nach TNM-Stadien (n=234, zensiert=84); p<0,0001

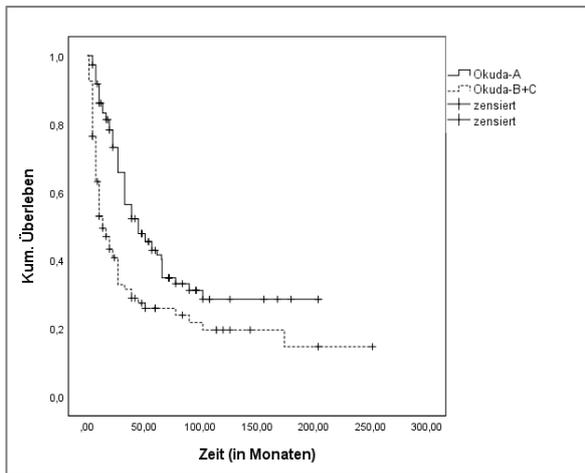


Abbildung 8: Überleben nach Okuda-Stadien (n=202, zensiert=69); p<0,0001

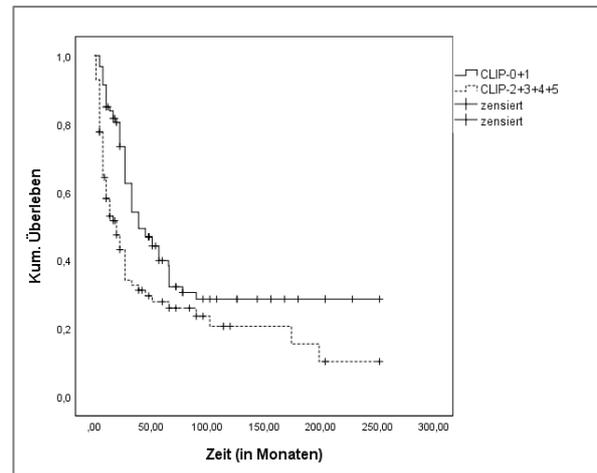


Abbildung 9: Überleben nach CLIP-Stadien (n=178, zensiert=59); p=0,001

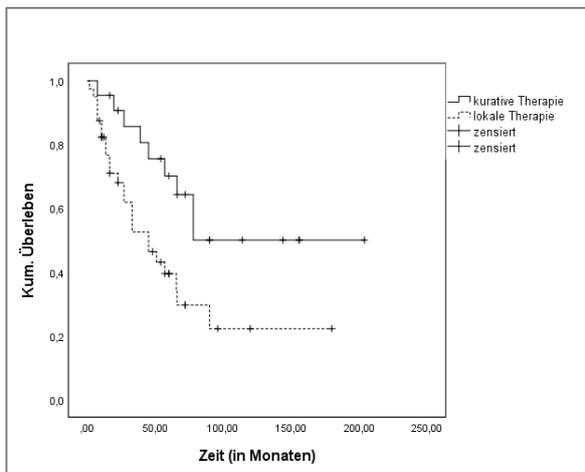


Abbildung 10: Kurative versus lokale Therapie im BCLC Stadium B (n=62, zensiert=29), p=0,02

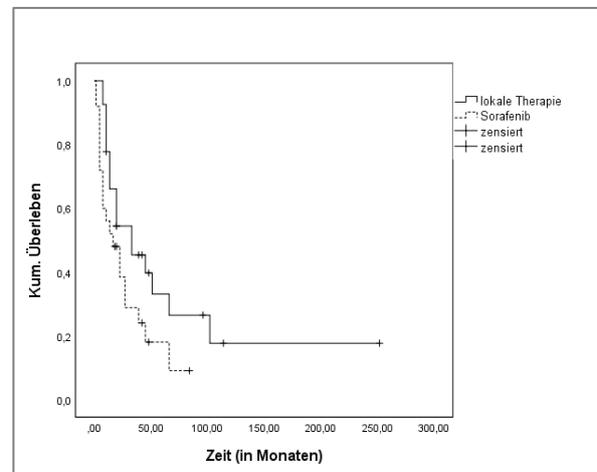


Abbildung 11: Lokale Therapie versus Sorafenib im BCLC Stadium C und D (n=52, zensiert=14), p=0,06

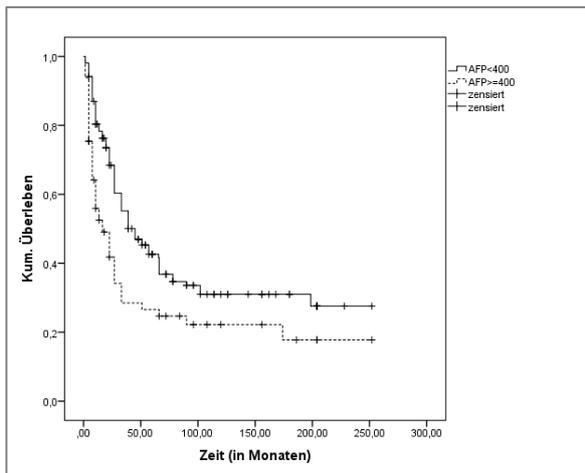


Abbildung 12: Überleben nach AFP (ng/mL) (n=219, zensiert=79);  $p=0,002$

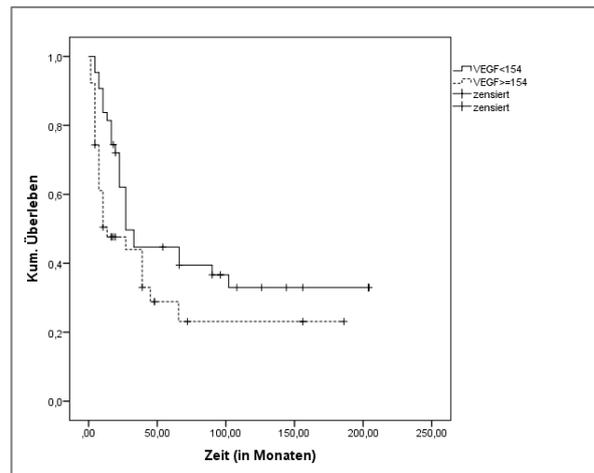


Abbildung 13: Überleben nach VEGF (pg/mL) (n=82, zensiert=29);  $p=0,05$

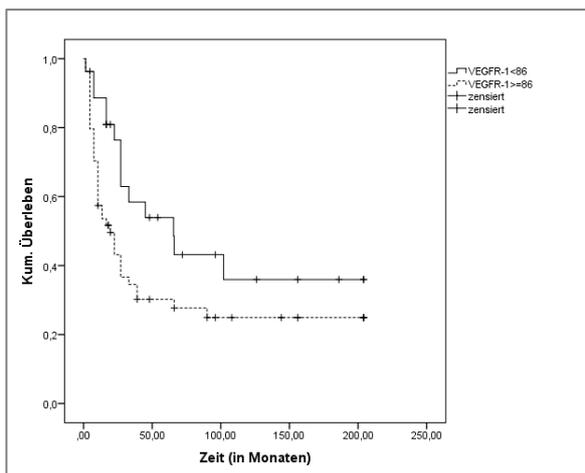


Abbildung 14: Überleben nach sVEGFR-1 (pg/mL) (n=81, zensiert=29);  $p=0,04$

#### 7.4.6 Multivariate Analysen

Zur Überprüfung möglicher Abhängigkeitsstrukturen zwischen den getesteten Einflüssen auf das Überleben führten wir eine Cox-Regression durch. Die zwei folgenden Tabellen fassen zunächst die univariaten Analysen zusammen. In der Tabelle 9 werden die Überlebenszeitanalysen aller Patienten zusammengefasst. In der Tabelle 10 werden die Ergebnisse ohne transplantierte Patienten aufgeführt.

Variable (Anzahl n)	p	Überlebensmedian in Monaten	95%-KI
<b>Gesamtüberleben</b> (237)		33	26,13-39,88
<b>Geschlecht</b> Männlich (187)	0,13	27	20,61-33,39
Weiblich (50)		39	6,45-71,55
<b>Alter in Jahren</b> (1) <60 (69)	p(1/2)= <b>0,01</b>	102	0-208,66
(2) 60-69 (92)	p(1/3)< <b>0,0001</b>	27	19,65-34,35
(3) ≥70 (73)	p(2/3)=0,28	27	18,79-35,21
<b>Ursachen der Zirrhose</b> Alkohol (74) vs nicht-alkoholbedingte Ursache (132)	<b>0,003</b>	27 vs 45	22,63-31,37 vs 24,00-66,00
Virale (HBV+HVC) (109) vs nicht-virale Ursache (97)	<b>0,022</b>	51 vs 27	30,68-71,33 vs 22,23-31,73
<b>Child-Pugh-Kriterien</b> A (131)	Entfällt (Kurven kreuzen)	33	20,81-45,19
B/C (71)		19,5	6,48-32,52
<b>BCLC</b> 0+A (47)	p(A/B)= 0,07	57	26,61-87,38
B (94)	p(A/C)= <b>0,001</b>	33	18,40-47,60
C+D (83)	p(B/C)= 0,07	19,5	12,13-26,87
<b>TNM</b> I+II (123)	< <b>0,0001</b>	57	39,95-74,05
III+IV (111)		22,5	17,20-27,80
<b>Okuda</b> A (109)	< <b>0,0001</b>	45	27,30-62,70
B+C (93)		13,5	7,23-19,77
<b>CLIP</b> 0+1 (93)	<b>0,001</b>	39	25,09-52,91
2+3+4+5 (85)		19,5	10,73-28,27

<b>Anzahl der Läsionen</b>			
Unifokal (110)	<b>0,006</b>	57	38,13-75,87
Multifokal (125)		27	22,58-31,43
<b>Größe der Läsionen in cm</b>			
<5 (132)	<b>&lt;0,0001</b>	57	31,99-82,01
≥5 (105)		22,5	15,25-29,75
<b>AFP in ng/mL</b>			
<400 (154)	<b>0,002</b>	45	29,20-60,80
≥ 400 (65)		16,5	5,92-27,08
<b>PIGF in pg/mL</b>			
0 (45)	0,35	39	18,80-59,19
>0 (37)		19,5	9,09-29,91
<b>VEGF in pg/mL</b>			
<154 (43)	<b>0,05</b>	27	17,78-36,22
≥154 (39)		13,5	0-31,66
<b>sVEGFR-1 in pg/mL</b>			
<86 (27)	<b>0,04</b>	65,5	20,52-110,48
≥86 (54)		19,5	8,20-30,80

Tabelle 9: Zusammenfassung der univariaten Überlebenszeitanalysen mit transplantierten Patienten (signifikante p markiert); p: Signifikanz; KI: Konfidenzintervall; HCV: chronische Hepatitis C; HBV: chronische Hepatitis B; BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer* Staging-System; TNM: Tumor, Nodus, Metastasen (TNM-Klassifikation maligner Tumore); CLIP: *Cancer of the Liver Italian Program* Staging-System; AFP: Alphafetoprotein; PIGF: *placental growth factor*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; sVEGFR-1: *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*)

Variable (Anzahl n)	p	Überlebensmedian in Monaten	95%-KI
<b>Gesamtüberleben</b> (206)		27	22,01-31,99
<b>Geschlecht</b>			
Männlich (161)	<b>0,03</b>	22	18,91-26,09
Weiblich (45)		39	24,94-53,06
<b>Alter (in Jahren)</b>			
(1) <60 (51)	$p(1/2)=0,03$	33	18,10-47,90
(2) 60-69 (81)	$p(1/3)=0,04$	22	17,50-27,50
(3) $\geq 70$ (73)	Entfällt (Kurven kreuzen)	27	18,79-35,21
<b>Ursachen der Zirrhose</b>			
Alkohol (69) vs nicht-alkoholbedingt Ursache (107)	<b>0,008</b>	22,5 vs 33	16,99-28,01 vs 22,28-43,73
Virale (HBV+HVC) (87) vs nicht-virale Ursache (89)	0,051	33 vs 22,5	20,98-45,02 vs 18,03-27,00
<b>Child-Pugh-Kriterien</b>			
A (120)	<b>&lt;0,0001</b>	33	28,19-37,81
B/C (57)		10	5,35-15,65
<b>BCLC</b>			
0+A (36)	$p(A/B)=0,12$	39	28,98-49,02
B (88)	$p(A/C)=0,008$	27	19,64-34,26
C+D (79)	$p(B/C)=0,11$	19,5	11,84-27,17
<b>TNM</b>			
I+II (101)	<b>&lt;0,0001</b>	39	29,19-48,81
III+IV (104)		19,5	14,04-24,97
<b>Okuda</b>			
A (104)	<b>&lt;0,0001</b>	45	29,20-60,80
B+C (84)		10,5	6,24-14,76
<b>CLIP</b>			
0+1 (81)	<b>&lt;0,0001</b>	39	27,80-50,20
2+3+4+5 (78)		13,5	6,21-20,79

<b>Anzahl der Läsionen</b>			
Unifokal (90)	<b>0,002</b>	39	28,54-49,46
Multifokal (115)		22,5	18,07-26,93
<b>Größe der Läsionen (cm)</b>			
<5 (104)	<b>0,002</b>	33	24,76-41,25
≥5 (102)		22,5	15,41-29,59
<b>AFP (ng/mL)</b>			
<400 (130)	<b>0,001</b>	33	24,40-41,60
≥ 400 (59)		13,5	6,55-20,45
<b>PIGF (pg/mL)</b>			
0 (37)	0,06	33	17,44-48,56
>0 (28)		10,5	4,67-16,33
<b>VEGF (pg/mL)</b>			
<154 (30)	0,13	22,5	17,20-27,80
≥154 (35)		10,5	6,29-14,71
<b>sVEGFR-1(pg/mL)</b>			
<86 (21)	<b>0,02</b>	45	10,97-79,03
≥86 (43)		10,5	5,74-15,26

Tabelle 10: Zusammenfassung der univariaten Überlebenszeitanalysen ohne transplantierte Patienten (signifikante p markiert); p: Signifikanz; KI: Konfidenzintervall; LTX: Lebertransplantation; HCV: chronische Hepatitis C; HBV: chronische Hepatitis B; BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer* Staging-System; TNM: Tumor, Nodus, Metastasen (TNM-Klassifikation maligner Tumore); CLIP: *Cancer of the Liver Italian Program* Staging-System; AFP: Alpha-fetoprotein; PIGF: *placental growth factor*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; sVEGFR-1: *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*)

In der multivariaten Analyse wurden folgenden Variablen mit einbezogen, die in den univariaten Analysen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hatten: das Geschlecht, das BCLC-Stadium, das AFP mit einem Cut-off von 400 ng/mL sowie die Ursache der Zirrhose (alkoholbedingt versus nicht-alkoholbedingt). Aufgrund der Überschneidungen zwischen den verschiedenen Klassifikationen wurden die Child-Pugh-Kriterien, die TNM-Klassifikation, die Staging-Systeme CLIP und Okuda sowie die Parameter Größe und Anzahl der Läsionen aus der Analyse ausgenommen und nur die BCLC-Klassifikation berücksichtigt. Da die virale Ursache der Zirrhose in der nicht-alkoholbedingten Ursache enthalten ist wurde nur die Ursache Alkohol versus nicht-alkoholbedingt eingeschlossen. Trotz erheblicher Fallzahlverringerung bezogen wir die Serumwerte VEGF und sVEGFR-1 mit in die Analyse ein. Die Fallzusammenführung ergab eine verfügbare Fallzahl von 65 bei 42 eingetretenen Ereignissen und 23 zensierten Fällen.

Tabelle 11 fasst die Ergebnisse der Regressionsanalyse zusammen. Keiner der Parameter konnte als unabhängige Einflussgröße identifiziert werden. Mit  $p=0,14$  war VEGF mit einem Cut-off von 154 pg/mL bei einem Hazard Ratio von 1,63 als Einflussgröße einem signifikanten Ergebnis am nächsten. sVEGFR-1 und AFP zeigten als Einflussgröße eine Signifikanz von jeweils 1,9 mit Hazard Ratios von 1,60 und 1,65. Mit einem Wald-Wert von 2,14 hätte VEGF einen stärkeren Einfluss auf das Überleben als sVEGFR-1 und AFP (Wald-Werte von jeweils 1,70).

	B	SA	Wald	p	Hazard Ratio	KI
<b>Geschlecht</b> männlich/ weiblich	0,16	0,40	0,17	0,68	1,18	0,54-2,56
<b>Ursache der Zirrhose</b> Alkohol/ nicht-alkoholbe- dingt	0,23	0,34	0,45	0,50	1,26	0,65-2,45
<b>AFP (ng/mL)</b> <400/ ≥400	0,50	0,38	1,70	<b>0,19</b>	1,65	0,78-3,48
<b>BCLC-Stadium</b> 0+A/ B/ C+D	0,27	0,22	1,44	0,23	1,31	0,84-2,02
<b>VEGF (pg/mL)</b> <154/ ≥154	0,49	0,33	<b>2,14</b>	<b>0,14</b>	<b>1,63</b>	0,85-3,13
<b>sVEGFR-1 (pg/mL)</b> <86/ ≥86	0,47	0,36	1,70	<b>0,19</b>	1,60	0,79-3,25

Tabelle 11: Cox-Regression (BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer Staging-System*; AFP: Alphafetoprotein; B: Beta-wert; SA: Standardabweichung; Wald: Wald-Wert; p: Signifikanz; KI: Konfidenzintervall)

## 7.5 Analyse der Serummarker

In dieser Studie wurde bei Patienten mit bekanntem HCC ( $n=96$ ), bei Zirrhose-Patienten ohne bekanntes HCC ( $n=80$ ) und bei gesunden Probanden ( $n=30$ ) PIGF, VEGF und ihr gemeinsamer Rezeptor VEGFR-1 in seiner löslichen Form gemessen. Bei den HCC-Patienten und den Zirrhose-Patienten war zudem das AFP bekannt.

In Tabelle 12 und Tabelle 13 sind die Mittelwerte und Mediane der Marker insgesamt und innerhalb aller Kohorten aufgeführt. Bemerkenswerterweise fielen PIGF-Werte in allen Kohorten sehr niedrig aus. Es gab viele Negativbestimmungen (123 von 207) und viele Werte unterhalb der Nachweisgrenze von 15,6 pg/ml (54 von 207). Wie in Kapitel 6.4 bereits beschrieben, werteten wir diese Ergebnisse dennoch aus, ohne jedoch die positiven PIGF-Werte in die ROC-Analysen einzubeziehen.

### 7.5.1 PIGF, VEGF, sVEGFR-1 und AFP als Marker für HCC und Zirrhose

**Vergleich von Gesunden und HCC-Patienten.** Insgesamt fanden sich bei allen drei Markern die höchsten Mittelwerte und bei PIGF sowie VEGF auch die höchsten Mediane bei den gesunden Probanden. Lediglich bei sVEGFR-1 war der Median bei HCC-Patienten höher (Tabelle 12). Im Vergleich von gesunden Probanden und HCC-Patienten differenziert nach Tumorstadien zeigten sich für sVEGFR-1 nur in fortgeschrittenen Tumorstadien höhere Mediane (Tabelle 16, Kapitel 7.5.2). In der ROC-Analyse (vgl. Kapitel 6.4) zeigte sich hier jedoch keine gute Differenzierung zwischen Gesunden und HCC-Patienten insgesamt oder in fortgeschrittenen Tumorstadien, in frühen Stadien fielen die AUC teilweise negativ aus (Tabelle 16, Kapitel 7.5.2).

**Vergleich von Gesunden und Zirrhose-Patienten.** Die Mittelwerte und Mediane von Zirrhose-Patienten waren niedriger als die von gesunden Probanden (Tabelle 12). Im Vergleich mit den verschiedenen Child-Pugh-Stadien zeigten sich nur für VEGF bei Patienten mit einer Zirrhose Child B oder C höhere Mediane als bei gesunden Probanden (Tabelle 18, Kapitel 7.5.3).

**Vergleich von Zirrhose-Patienten und HCC-Patienten.** Betrachtete man nur die Gruppe der kranken Probanden, also HCC-Patienten und Zirrhose-Patienten, waren die PIGF-Mittelwerte und sVEGFR-1-Werte bei HCC-Patienten höher als bei Zirrhose-Patienten. Der sVEGFR-1-Wert war bei HCC-Patienten im Test für Mittelwertgleichheit bei unabhängigen Stichproben signifikant höher ( $p < 0,001$ , Tabelle 12). In der ROC-Analyse zeigte sich bei sVEGFR-1 eine signifikante Differenzierung zwischen HCC-Patienten und Zirrhose-Patienten. Mit einer AUC von 0,78 zeigte sVEGFR-1 eine gute Entscheidungskraft (Tabelle 16, Kapitel 7.5.2, Abbildung 21).

Im Vergleich von Zirrhose-Patienten mit HCC-Patienten differenziert nach Tumorstadien zeigten sich auch hier für PIGF teilweise und für sVEGFR-1 stets sogar in Tumorfrühstadien höhere Mittelwerte bzw. Mediane als bei Zirrhose-Patienten. In Spätstadien waren teilweise auch die VEGF-Werte höher als bei Patienten ohne HCC. Die ROC-Analysen für sVEGFR-1 fielen in allen Tumorstadien im Vergleich zu Zirrhose-Patienten signifikant aus (Tabelle 16, Kapitel 7.5.2). Die ROC-Analysen für VEGF in diesen Subgruppen ergab teilweise negative Ergebnisse mit einer  $AUC < 0,5$  (Tabelle 15, Kapitel 7.5.2).

AFP-Werte fielen bei HCC-Patienten deutlich höher aus als bei Zirrhose-Patienten ohne HCC-Nachweis. Durch die große Streuung und die stark unterschiedliche Fallzahl fiel der Mittelwertvergleich nicht signifikant aus ( $p = 0,07$ , Tabelle 13). In der ROC-Analyse zeigte sich mit einer AUC von 0,884 eine gute Differenzierung von HCC-Patienten zu Patienten mit alleiniger Zirrhose ( $p < 0,001$ , Abbildung 22). In den ROC-Analysen zeigte sich ebenfalls eine gute Differenzierung zwischen Zirrhose und allen Tumorstadien unabhängig vom Staging-System (Tabelle 17, Kapitel 7.5.2).

**PIGF (pg/mL)**

Gruppe	n	MW (SA)	Med <sup>10</sup>
HCC	97	5,26 (8,41)	0,00
Zirrhose	80	3,48 (8,19)	0,00
Gesunde Kontrollen	30	9,68 (7,91)	9,37
Gesamt	207	5,22 (8,46)	0,00

**VEGF (pg/mL)**

Gruppe	n	MW (SA)	Med
HCC	96	224,37 (239,25)	133,56
Zirrhose	78	241,57 (253,79)	156,41
Gesunde Kontrollen	30	300,36 (317,17)	170,37
Gesamt	204	242,12 (257,37)	154,20

**sVEGFR-1 (pg/mL)**

Gruppe	n	MW (SA)	Med
HCC	94	122,32 (83,98)	103,69
Zirrhose	80	60,27 (41,03)	62,15
Gesunde Kontrollen	30	189,81 (353,89)	98,09
Gesamt	204	107,91 (154,14)	86,72

Tabelle 12: PIGF, VEGF und sVEGFR-1 in den verschiedenen Kohorten (n=Anzahl der Probanden; MW: Mittelwert; Med: Median; SA: Standardabweichung)

**AFP (ng/mL)**

Gruppe	n	MW (SA)	Med
HCC	244	8658,45 (43180,31)	53,50
Zirrhose	82	5,45 (6,32)	4,00

Tabelle 13: AFP in den Kohorten HCC und Zirrhose (n=Anzahl der Probanden; MW: Mittelwert; Med: Median; SA: Standardabweichung)

Diese Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen als Boxplots dargestellt.

<sup>10</sup> Die Mediane von 0 oder nahe 0 pg/mL sind Ausdruck der vielen Negativbestimmungen bei PIGF.

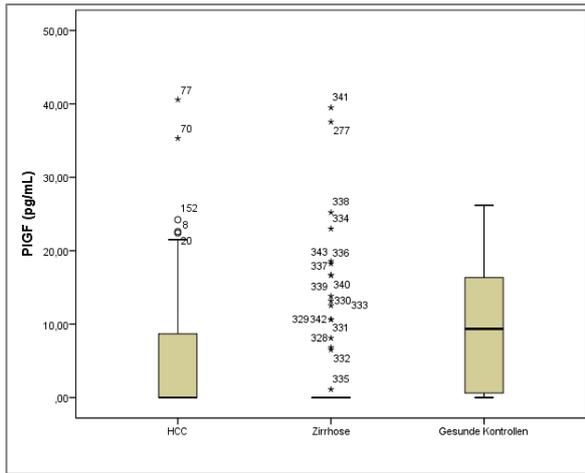


Abbildung 15: Boxplots von PIGF in den verschiedenen Kohorten (°: moderate Ausreißer; \*: extreme Ausreißer (mit Identifikationsnummer))

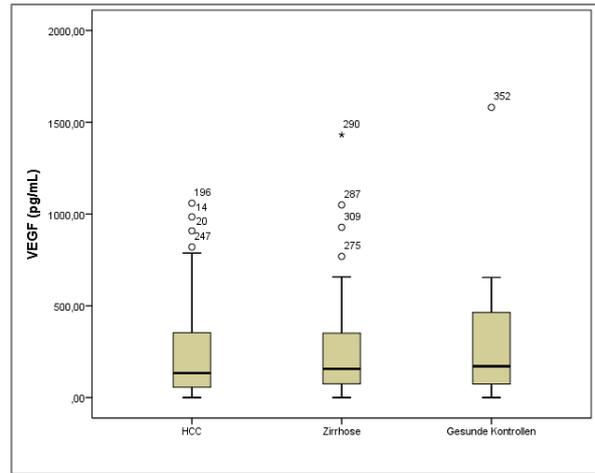


Abbildung 16: Boxplots von VEGF in den verschiedenen Kohorten (°: moderate Ausreißer; \*: extreme Ausreißer (mit Identifikationsnummer))

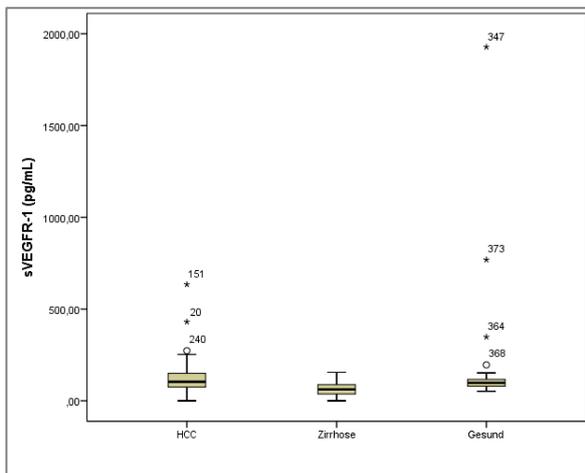


Abbildung 17: Boxplots von sVEGFR-1 in den verschiedenen Kohorten (°: moderate Ausreißer; \*: extreme Ausreißer (mit Identifikationsnummer))

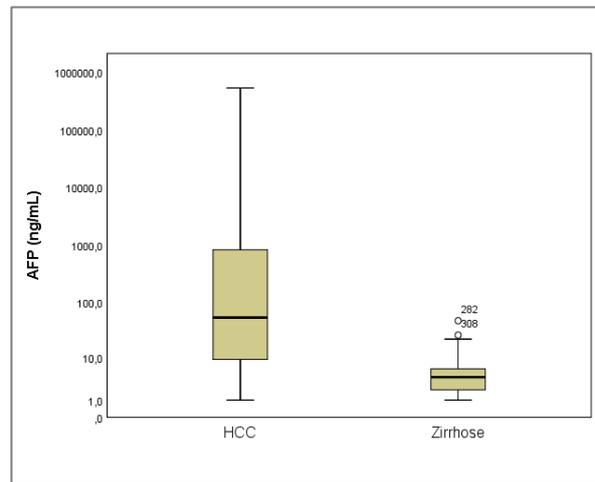


Abbildung 18: Boxplot von AFP in den Kohorten HCC und Zirrhose (°: moderate Ausreißer; \*: extreme Ausreißer (mit Identifikationsnummer))

In den folgenden Abbildungen sind für VEGFR-1 und AFP die ROC-Kurven für die Differenzierung zwischen HCC und Zirrhose dargestellt. Da die VEGF-Werte in der HCC-Gruppe niedriger als in der Zirrhose-Gruppe waren, wurde hierfür keine ROC-Analyse erstellt.

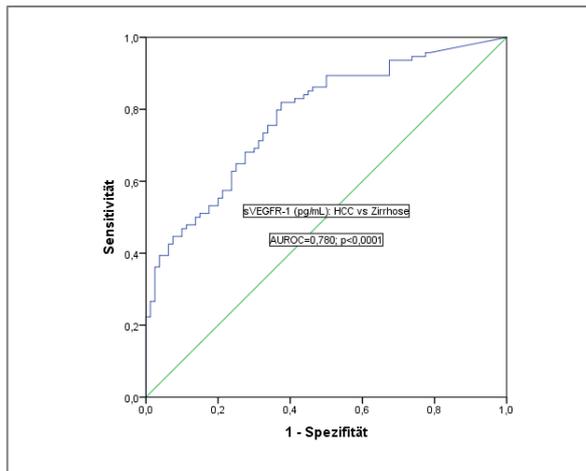


Abbildung 19: ROC-Kurve für sVEGFR-1 zur Differenzierung von HCC und Zirrhose (80 Zirrhose+94 HCC=174,  $p < 0,0001$ )

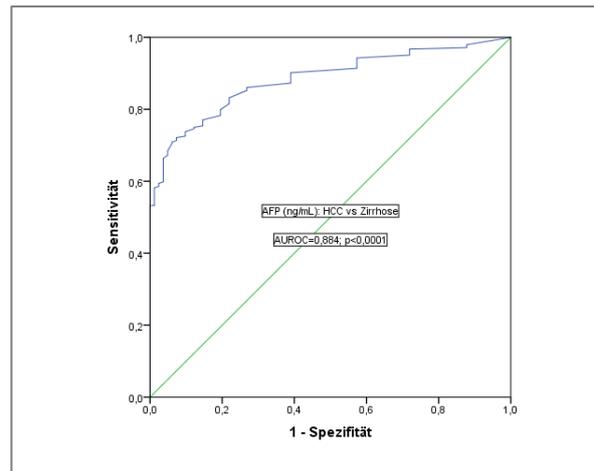


Abbildung 20: ROC-Kurve für AFP zur Differenzierung von HCC und Zirrhose (82 Zirrhose+244 HCC=326,  $p < 0,0001$ )

### 7.5.2 PIGF, VEGF, sVEGFR-1 und AFP als Marker für Tumorcharakteristika

Innerhalb der HCC Kohorte gab es eine einheitliche Tendenz zu höheren Werten bei PIGF, VEGF und sVEGFR-1 in fortgeschrittenen Tumorstadien bei allen getesteten Staging-Systemen. Die PIGF-Mediane lagen jedoch zwischen 0 und 0,3 pg/mL. Signifikante Ergebnisse im Mittelwertvergleich ließen sich nur bei sVEGFR-1 zwischen den Stadien A und B+C nach dem Staging-System Okuda und zwischen den Stadien 0+1 und 2+3+4+5 nach dem Staging-System CLIP erzielen (Tabelle 14, Tabelle 15 und Tabelle 16).

AFP-Werte waren im Median in fortgeschrittenen Tumorstadien höher, allerdings gab es für die Mittelwerte keine einheitliche Tendenz (Tabelle 17).

Die vier folgenden Tabellen geben einen Überblick über PIGF, VEGF, VEGFR-1 und AFP in verschiedenen Tumorstadien. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Mittelwertvergleiche sowie die Mediane aufgeführt. Diese Serumwerte werden in den Tabellen mit den Ergebnissen bei den gesunden Kontrollen und den Zirrhose-Patienten gegenübergestellt. Wenn HCC-Patienten tendenziell höhere Werte aufwiesen als eine der beiden Vergleichsgruppen, erfolgte eine ROC-Analyse, die hier ebenfalls aufgeführt ist.

PIGF (pg/mL)									
	BCLC			TNM		Okuda		CLIP	
	0+A	B	C+D	I-II	III-IV	A	B+C	0+1	2+3+4+5
<b>n</b>	18	40	34	47	49	46	33	42	36
<b>MW</b>	<b>2,85</b>	<b>5,50</b>	<b>6,20</b>	<b>3,99</b>	<b>6,32</b>	<b>5,66</b>	<b>5,83</b>	<b>4,67</b>	<b>5,99</b>
<b>SA</b>	5,84	7,20	10,93	6,51	9,84	8,59	9,78	7,20	10,49
<b>p</b>	A/B 0,15	B/C 0,75	A/C 0,23	0,18		0,95		0,53	
<b>Med</b>	<b>0</b>	<b>0,30</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,06</b>
<b>Vgl.</b> <b>Ges.</b>	n=30 MW= 9,68 SA= 7,90 Med= 9,37								
<b>Vgl.</b> <b>Zirrh.</b>	n=80 MW= 3,48 SA= 8,19 Med= 0,00								

Tabelle 14: Vergleich von PIGF in verschiedenen Tumorstadien, Vergleich der HCC-Kohorte (insgesamt und in verschiedenen Tumorstadien) mit Zirrhose-Patienten und gesunden Probanden; n=Anzahl der Probanden; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; Med: Median; p: Signifikanz; Vgl.: verglichen; Ges.: gesunde Probanden; Zirrh.: Zirrhose; NB: Mittelwerte und Mediane von HCC-Patienten waren hier wie im Gesamtvergleich immer niedriger als bei Gesunden, so dass kein statistischer Vergleich erfolgte. Mittelwerte (nicht Mediane) waren insgesamt und vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien bei HCC-Patienten höher als bei Zirrhose-Patienten. Aufgrund der vielen Negativbestimmungen in allen Kohorten wurden PIGF-Werte in keine ROC-Analyse einbezogen.

## VEGF (pg/mL)

	BCLC			TNM		Okuda		CLIP	
	0+A	B	C+D	I-II	III-IV	A	B+C	0+1	2+3+4+5
<b>n</b>	18	40	33	47	48	45	33	41	36
<b>MW</b>	<b>136,81</b>	<b>245,17</b>	<b>257,90</b>	<b>186,77</b>	<b>262,56</b>	<b>224,57</b>	<b>257,44</b>	<b>157,67</b>	<b>243,93</b>
<b>SA</b>	165,93	253,44	253,96	206,59	266,33	244,57	246,67	212,01	239,65
<b>p</b>	A/B 0,10	B/C 0,83	A/C 0,08	0,12		0,56		0,10	
<b>Med</b>	<b>93,33</b>	<b>156,26</b>	<b>157,84</b>	<b>103,00</b>	<b>158,60</b>	<b>125,02</b>	<b>186,15</b>	<b>92,21</b>	<b>151,97</b>
<b>Vgl. Ges.</b>	n=30 MW= 300,36 SA= 317,17 Med= 170,37								
<b>Vgl. Zirrh.</b>	n=78 MW= 241,57 SA= 253,79 Med= 156,41 AUC (Zirrh. vs HCC gesamt)=0,47 ; p=0,47								
	AUC=0,35 p=0,05 n=96	AUC=0,49 p=0,88 n=118	AUC=0,53 p=0,69 n=111	AUC=0,42 p=0,13 n=125	AUC=0,51 p=0,76 n=126	AUC=0,46 p=0,50 n=123	AUC=0,52 p=0,69 n=111	AUC=0,36 p=0,01 n=119	AUC=0,51 p=0,83 n=114

Tabelle 15: Vergleich von VEGF in verschiedenen Tumorstadien (signifikante p herausgehoben), Vergleich der HCC-Kohorte (insgesamt und in verschiedenen Tumorstadien) mit Zirrhose-Patienten und gesunden Probanden (signifikante Differenzierungen herausgehoben); n=Anzahl der Probanden; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; Med: Median; p: Signifikanz; Vgl.: verglichen; Ges.: gesunde Probanden; Zirrh.: Zirrhose; NB: Mittelwerte und Mediane von HCC-Patienten waren hier (mit einer Ausnahme: Median Okuda B+C) immer und im Gesamtvergleich niedriger als bei Gesunden, es erfolgte keine weitere statistische Auswertung. Mittelwerte und Mediane unterschieden sich in fortgeschrittenen Tumorstadien von denen der Zirrhose-Patienten, so dass trotz negativ ausfallendem Gesamtvergleich die ROC-Analysen für die Subgruppen der Tumorstadien erfolgten.

## sVEGFR-1 (pg/mL)

	BCLC			TNM		Okuda		CLIP	
	0+A	B	C+D	I-II	II-IV	A	B+C	0+1	2+3+4+5
<b>n</b>	18	39	32	46	47	43	33	40	36
<b>MW</b>	<b>99,67</b>	<b>122,39</b>	<b>135,66</b>	<b>106,20</b>	<b>136,80</b>	<b>96,22</b>	<b>157,41</b>	<b>96,44</b>	<b>153,45</b>
<b>SA</b>	52,43	77,88	106,90	68,40	95,54	48,15	119,69	51,77	112,21
<b>p</b>	A/B 0,20	B/C 0,56	A/C 0,12	0,08		0,003		0,007	
<b>Med</b>	<b>97,59</b>	<b>96,43</b>	<b>119,14</b>	<b>95,32</b>	<b>124,31</b>	<b>87,41</b>	<b>124,31</b>	<b>90,22</b>	<b>143,02</b>
<b>Vgl.</b>	n=30								
<b>Ges.</b>	<b>MW= 189,81</b>								
	SA= 353,89								
	<b>Med= 98,09</b>								
	AUC (Ges vs HCC)=0,52 ; p=0,71								
	AUC=0,47	AUC=0,51	AUC=0,57	AUC=0,46	AUC=0,57	AUC=0,40	AUC=0,63	AUC=0,43	AUC=0,63
	p=0,72	p=0,93	p=0,36	p=0,60	p=0,29	p=0,16	p=0,071	p=0,29	p=0,07
	n=48	n=69	n=62	n=76	n=77	n=73	n=63	n=70	n=66
<b>Vgl.</b>	n=80								
<b>Zirrh.</b>	<b>MW=60,27</b>								
	SA= 41,03								
	<b>Med=62,15</b>								
	<b>AUC (Zirrh. vs HCC gesamt)=0,780 ; P&lt;0,0001</b>								
	<b>AUC=0,74</b>	<b>AUC=0,78</b>	<b>AUC=0,80</b>	<b>AUC=0,74</b>	<b>AUC=0,82</b>	<b>AUC=0,71</b>	<b>AUC=0,84</b>	<b>AUC=0,71</b>	<b>AUC=0,85</b>
	<b>p=0,001</b>	<b>p=&lt;0,0001</b>	<b>p&lt;0,0001</b>						
	n=98	n=119	n=112	n=126	n=127	n=123	n=113	n=120	n=116

Tabelle 16: Vergleich von sVEGFR-1 in verschiedenen Tumorstadien (signifikante p herausgehoben), Vergleich der HCC-Kohorte (insgesamt und in verschiedenen Tumorstadien) mit Zirrhose-Patienten und gesunden Probanden (signifikante Differenzierungen herausgehoben); n=Anzahl der Probanden; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; Med: Median; p: Signifikanz; Vgl.: verglichen; Ges.: gesunde Probanden; Zirrh.: Zirrhose; NB: Mittelwerte von HCC-Patienten fielen immer niedriger aus als bei Gesunden, so dass kein Mittelwertvergleich erfolgte. Da die Mediane jedoch bei HCC-Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien höher ausfielen, erfolgte eine ROC-Analyse HCC versus Gesunde für die Subgruppen der Tumorstadien. Bei höheren sVEGFR-1-Werten von HCC-Patienten insgesamt ( $p<0,001$ ) und in allen Tumorstadien im Vergleich zu Zirrhosepatienten erfolgten die ROC-Analysen für die Subgruppen.

AFP (ng/mL)									
	BCLC			TNM		Okuda		CLIP <sup>11</sup>	
	0+A	B	C+D	I-II	III-IV	A	B+C	0+1	2+3+4+5
<b>n</b>	48	92	92	124	118	111	98	102	99
<b>MW</b>	<b>168,78</b>	<b>11537,95</b>	<b>9842,96</b>	<b>6462,20</b>	<b>11105,67</b>	<b>10267,33</b>	<b>8392,97</b>	<b>359,00</b>	<b>12297,20</b>
<b>SA</b>	428,18	61812,31	30500,23	49821,87	35364,99	55816,89	30826,05	2133,93	37001,68
<b>p</b>	A/B 0,21	B/C entfällt	A/C <b>0,03</b>	0,40		entfällt		<b>0,001</b>	
<b>Med</b>	<b>23</b>	<b>51,85</b>	<b>119,6</b>	<b>30,35</b>	<b>196,00</b>	<b>31,00</b>	<b>148,80</b>	<b>17,25</b>	<b>632,5</b>
<b>Vgl.</b>	n=82								
<b>Zirrh.</b>	MW : 5,451220								
	SA=6,32								
	Med : 4,00								
	AUC (Zirrh. vs HCC gesamt)=0,89 ; p<0,0001								
	AUC=0,91	AUC=0,87	AUC=0,88	AUC=0,87	AUC=0,9	AUC=0,87	AUC=0,90	AUC=0,87	AUC=0,91
	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
	n=130	n=174	n=174	n=206	n=200	n=193	n=180	n=184	n=181

Tabelle 17: Vergleiche von AFP in verschiedenen Tumorstadien (signifikante p herausgehoben), Vergleich mit Zirrhose-Patienten; n=Anzahl der Probanden; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; Med: Median; p: Signifikanz; Vgl.: verglichen; Zirrh.: Zirrhose

### 7.5.3 PIGF, VEGF, VEGFR-1 und AFP als Marker für Zirrhosestadien

HCC und Zirrhose können nicht als unabhängige Variablen betrachtet werden. Im Folgenden untersuchten wir somit ausschließlich die Zirrhose-Kohorte.

Im gesamten Mittelwert- und Medianvergleich fand sich lediglich bei VEGF eine signifikante Tendenz zu höheren Werten in fortgeschrittenen Zirrhosestadien (Tabelle 18). Im Vergleich zur gesunden Kohorte war nur der Median im fortgeschrittenen Zirrhosestadium höher (Tabelle 18).

Der AFP-Wert war in unserer Kohorte kein sinnvoller Indikator des Child-Pugh-Stadiums (Tabelle 19).

<sup>11</sup> AFP ist Teil des Staging-System CLIP, somit zeigt sich eine gute Korrelation.

		Child-Pugh-Stadium	
		A	B+C
PIGF (pg/mL)	n	31	47
	MW (SA)	4,57 (9,78)	2,30 (6,67)
	Med	0,00	0,00
	Vgl. Ges.	MW= 9,68 (SA=7,91) Med= 9,37	
VEGF (pg/mL)	n	31	45
	MW (SA)	167,65 (167,17)	296,46 (293,77)
	p	p (A vs B/C)=0,03	
	Med	107,18	223,60
	Vgl. Ges.	MW= 300,36 (SA=317,17) Med= 170,37	
sVEGFR-1 (pg/mL)	n	31	47
	MW (SA)	57,94 (44,83)	59,98 (38,45)
	p	p (A vs B/C)=0,83	
	Med	54,42	63,06
	Vgl. Ges.	MW= 189,81 (SA=353,89) Med= 98,09	

Tabelle 18: Vergleiche von PIGF, VEGF und sVEGFR-1 in verschiedenen Zirrhose-Stadien; n=Anzahl der Seren; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; p: Signifikanz; Med: Median; Vgl.: verglichen; Ges.: Gesunde, Zirrh.: Zirrhose; NB: Mittelwerte und Mediane fielen bei Zirrhose-Patienten für PIGF und sVEGFR-1 immer niedriger aus als bei Gesunden. Bei VEGF fand sich nur im fortgeschrittenem Zirrhosestadium ein höherer Median als bei Gesunden.

		Child-Pugh-Stadium	
		A	B+C
AFP (ng/mL)	n	31	49
	MW (SA)	6,87 (8,93)	4,49 (3,81)
	Med	4,00	4,00

Tabelle 19: AFP in verschiedenen Zirrhosestadien; n=Anzahl der Seren; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; Med: Median

#### 7.5.4 Kombination der Marker

Im Folgenden wurden innerhalb der kranken Population (HCC-Patienten und Zirrhose-Patienten), einzeln und in Kombination, Marker auf ihr diagnostisches Potential für das Vorhandensein eines HCC untersucht. Die Werte der gesunden Probanden wurden nicht berücksichtigt.

##### 7.5.4.1 Sensitivität und Spezifität einzelner Marker zur HCC-Diagnose

In der folgenden Tabelle wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Werte in Bezug auf die HCC-Diagnose bei Zirrhose-Patienten aufgeführt. Für das AFP wählten wir ein

Cut-off von 10 ng/mL gemäß dem gängigen Normwert. Für PIGF wurde aufgrund der insgesamt sehr niedrig ausgefallenen Werte ein Cut-off von 0 pg/mL gewählt<sup>12</sup>, für VEGF wurde der Gesamtmedian von 154 pg/mL beibehalten. Da sVEGFR-1 in der ROC-Analyse eine gute Differenzierung aufwies, erhielten wir einen Cut-off von 70 pg/mL.

Auffallend war bei AFP die hohe Spezifität von 90,2%, bei einer Sensitivität von 73,8%. PIGF und VEGF waren mit einer Sensitivität von 45,4% bzw. 46,9% sowie einer Spezifität von 78,8% bzw. 50% keine guten diagnostischen Marker. sVEGFR-1 hatte eine Sensitivität von 80,9% und eine Spezifität von 62,5%.

	AFP <10	AFP ≥10	Gesamt		PIGF=0	PIGF >0	Gesamt
HCC	64	180	244	HCC	53	44	97
Kein HCC	74	8	82	Kein HCC	63	17	80
Gesamt	138	188	326	Gesamt	116	61	177
Sensitivität=180/244=73,8% Spezifität=74/82=90,2%				Sensitivität=44/97=45,4% Spezifität=63/80=78,8%			
	VEGF <154	VEGF ≥154	Gesamt		sVEGFR-1 <70	sVEGFR-1 ≥70	Gesamt
HCC	51	45	96	HCC	18	76	94
Kein HCC	39	39	78	Kein HCC	50	30	80
Gesamt	90	84	174	Gesamt	68	106	174
Sensitivität=45/96=46,9% Spezifität=39/78=50%				Sensitivität=76/94=80,9% Spezifität=50/80=62,5%			

Tabelle 20: Sensitivität der einzelnen Marker AFP, PIGF, VEGF und sVEGFR-1 zur Differenzierung von HCC vs. Zirrhose ohne Nachweis von HCC (AFP in ng/mL, PIGF, VEGF und sVEGFR-1 in pg/mL).

#### 7.5.4.2 Sensitivität und Spezifität der Kombinationen verschiedener Marker

Die drei folgenden Tabellen zeigen das Verhalten der verschiedenen Serumwerte bei HCC-Patienten in Kombination miteinander.

Kombinierte man das AFP mit den potentiellen neuen Markern, verbesserte sich die Sensitivität erheblich von 73,8% auf 84%, 83,7% und 92,2% bei PIGF, VEGF bzw. sVEGFR-1. Allerdings verschlechterte sich die Spezifität wie erwartet, vor allem bei einer Kombination mit VEGF, von 90,2% auf 42,3%. Bei der Kombination mit PIGF sank die Spezifität lediglich auf 71,3%, bei Kombination mit sVEGFR-1 auf 61,3%.

Die Kombination von PIGF mit VEGF bzw. sVEGFR-1 verbesserte auch hier die Sensitivität von 45,4% auf 69,8% bzw. 84%. Leider verschlechterte sich die ursprüngliche Spezifität von 78,8% auf 37,2% bzw. 53,8%. Auch für VEGF und sVEGFR-1 ging die Kombination mit PIGF mit einer verbesserten Sensitivität und einer Abnahme der Spezifität einher.

<sup>12</sup> Vgl. Kapitel 6.4 für die Erklärung des Cut-off-Wertes 0 pg/mL für PIGF.

Die Kombination von VEGF und sVEGFR-1 zeigte auch eine deutlich bessere Sensitivität von 89,4% im Vergleich zu den beiden Werten alleine, dies ging aber mit einem dramatischen Rückgang der Spezifität auf 24,4% einher.

Insgesamt bedeutet das, dass mehr HCC-Patienten erfasst wurden, zugleich aber auch mehr Zirrhose-Patienten ohne HCC in den Verdacht kamen, ein HCC zu haben.

	<b>AFP&lt;10 und PIGF=0</b>	<b>AFP≥10 oder PIGF&gt;0</b>	<b>Gesamt</b>		<b>AFP&lt;10 und VEGF&lt;154</b>	<b>AFP≥10 oder VEGF≥154</b>	<b>Gesamt</b>
<b>HCC</b>	14	<b>79</b>	93	<b>HCC</b>	15	<b>77</b>	92
<b>Kein HCC</b>	<b>57</b>	23	80	<b>Kein HCC</b>	<b>33</b>	45	78
<b>Gesamt</b>	71	102	173	<b>Gesamt</b>	48	122	170
Sensitivität=79/93=84,0% Spezifität=57/80=71,3%				Sensitivität=77/92= 83,7% Spezifität=33/78=42,3%			
	<b>AFP&lt;10 und sVEGFR-1&lt;70</b>	<b>AFP≥10 oder sVEGFR-1≥70</b>	<b>Gesamt</b>				
<b>HCC</b>	7	<b>83</b>	90				
<b>Kein HCC</b>	<b>49</b>	31	80				
<b>Gesamt</b>	56	114	170				
Sensitivität= 83/90=92,2% Spezifität=49/80=61,3%							

Tabelle 21: Sensitivität und Spezifität zur HCC-Diagnose vs Zirrhose ohne HCC-Nachweis bei Kombination von AFP mit PIGF, VEGF und sVEGFR-1 (AFP in ng/mL, PIGF, VEGF un sVEGFR-1 in pg/mL)

	<b>PIGF=0 und VEGF&lt;154</b>	<b>PIGF&gt;0 oder VEGF≥154</b>	<b>Gesamt</b>		<b>PIGF=0 und sVEGFR-1&lt;70</b>	<b>PIGF&gt;0 oder sVEGFR-1≥70</b>	<b>Gesamt</b>
<b>HCC</b>	29	<b>67</b>	96	<b>HCC</b>	15	<b>79</b>	94
<b>Kein HCC</b>	<b>29</b>	49	78	<b>Kein HCC</b>	<b>43</b>	37	80
<b>Gesamt</b>	58	116	174	<b>Gesamt</b>	58	116	174
Sensitivität=67/96=69,8% Spezifität=29/78=37,2%				Sensitivität=67/96=69,8% Spezifität=43/80=53,8%			

Tabelle 22: Sensitivität und Spezifität zur HCC-Diagnose versus Zirrhose ohne HCC-Nachweis bei Kombination von PIGF mit VEGF und sVEGFR-1 (AFP in ng/mL, PIGF, VEGF un sVEGFR-1 in pg/mL).

	<b>VEGF&lt;154 und sVEGFR-1&lt;70</b>	<b>VEGF ≥154 oder sVEGFR-1≥70</b>	<b>Gesamt</b>
<b>HCC</b>	10	<b>84</b>	94
<b>Kein HCC</b>	<b>19</b>	59	78
<b>Gesamt</b>	29	143	172
Sensitivität= 84/94=89,4%			
Spezifität=19/78=24,4%			

Tabelle 23: Sensitivität und Spezifität zur HCC-Diagnose vs. Zirrhose ohne HCC-Nachweis bei Kombination von VEGF mit sVEGFR-1 (VEGF un sVEGFR-1 in pg/mL)

### 7.5.5 Korrelation von AFP, PIGF, VEGF und sVEGFR-1

Ein erhöhtes PIGF war schwach positiv und signifikant mit einem erhöhten sVEGFR-1 korreliert (Korrelationskoeffizient=0,222;  $p=0,001$ ). VEGF korrelierte nicht signifikant mit PIGF. Ein hohes AFP korrelierte schwach positiv und signifikant mit einem erhöhten PIGF (Korrelationskoeffizient=0,176;  $p=0,021$ ). Es bestand keine signifikante Korrelation mit den beiden anderen Markern.

## 8 Diskussion

In dieser Studie befassten wir uns zum einen mit dem Zusammenhang von verschiedenen klinischen und paraklinischen Merkmalen und dem Überleben bei HCC-Patienten, einschließlich dreier potentieller neuer Serummarker aus einer Familie angiogener Faktoren, PIGF, VEGF und deren gemeinsamen löslichen Rezeptor sVEGFR-1. Zum anderen untersuchten wir mögliche Zusammenhänge zwischen erhöhten Werten dieser Marker und dem Vorhandensein einer Zirrhose oder eines HCC. Dabei wurden drei Gruppen betrachtet: HCC-Patienten, Zirrhose-Patienten ohne HCC-Nachweis und eine Kontrollgruppe gesunder Probanden. Zusätzlich untersuchten wir einen möglichen Zusammenhang mit dem klinischen Fortschreiten der Zirrhose oder des HCC. Schließlich befassten wir uns mit dem diagnostischen Potential der Marker im Einzelnen und in Kombination für die Erkennung eines HCC bei Patienten mit Zirrhose.

Der Überlebensmedian insgesamt lag bei 33 Monaten. In der univariaten Analyse waren folgende Parameter signifikant mit einem kürzeren Überleben assoziiert: ein höheres Alter, die Ursache der Zirrhose (Alkohol bzw. nicht-virale Ursache), ein fortgeschrittenes Tumorstadium und einzelne Kriterien wie Größe und Anzahl der Läsionen, ein  $\text{AFP} \geq 400$  ng/mL, ein  $\text{VEGF} \geq 154$  pg/mL und ein  $\text{sVEGFR-1} \geq 86$  pg/mL. Tendenzen zu einem kürzeren Überleben zeigten sich bei dem männlichen Geschlecht, einem fortgeschrittenem Zirrhosestadium und einem positiven PIGF. In der multivariaten Analyse war keiner der eingeschlossenen Parameter eine signifikant unabhängige Einflussgröße.

In der Analyse der Serummarker PIGF, VEGF und sVEGFR-1 wurden die höchsten Mittelwerte bei den gesunden Kontrollen gemessen. PIGF wies insgesamt betrachtet viele Negativbestimmungen und Werte unterhalb der angegebenen Nachweisgrenze auf (vgl. Kapitel 6.4, 7.5, 8.2.3 und 8.3). Der Vergleich der Zirrhose- und HCC-Kohorte ergab für sVEGFR-1 eine signifikante Differenzierung mit einer AUC von 0,78 und einer Sensitivität und Spezifität von 80,9% und 62,5%. AFP konnte mit einer AUC von 0,88 und mit einer Sensitivität und Spezifität von 73,8% und 90,2% sicherer zwischen Zirrhose- und HCC-Patienten unterscheiden. Auch die Kombination der Marker untereinander und mit AFP erbrachte keinen Vorteil zu AFP alleine. Insbesondere VEGF und sVEGFR-1 zeigten aber deutliche Tendenzen zu höheren Werten bei fortschreitendem Tumorstadium. Signifikante Ergebnisse wurden hierbei für sVEGFR-1 und den Staging-Systemen CLIP und Okuda erzielt. VEGF zeigte einen signifikanten Anstieg mit fortschreitender Zirrhose. Somit könnten diese Marker als individuelle Verlaufsparameter unter Berücksichtigung des komplexen Zusammenspiels und multifaktorieller Schwankungen angiogener Faktoren bei Zirrhose und HCC verstanden werden.

Im Folgenden besprechen wir zunächst die Vergleichbarkeit unserer Kohorten mit der aktuellen Datenlage bezüglich Patientencharakteristika, Tumoreigenschaften, Therapiearten und Prognose. Anschließend werden die Ergebnisse der Serumanalysen in Bezug zu aktuellen Forschungsergebnissen gesetzt.

## **8.1 Kohortencharakteristika und Überlebensdaten im Kontext der aktuellen Datenlage**

### **8.1.1 Patientencharakteristika**

Die Kohorte der HCC-Patienten wies deutlich mehr Männer als Frauen auf (77,6% versus 22,4%, Tabelle 5). Dies entspricht bekannten epidemiologischen Daten. Männer erkrankten insgesamt und innerhalb der Risikopopulation zwei- bis viermal so häufig an HCC wie Frauen (64). Bei Kitai et al. (65) waren beispielsweise 70% der Betroffenen Männer.

Wie auch in anderen größeren Kohorten beschrieben (3), war in unserer Kohorte bei HCC meistens (in 90% der Fälle, Kapitel 7.1.1) eine Zirrhose vorbekannt.

Der Altersmedian bei HCC-Diagnose war mit 65 Jahren (Kapitel 7.1.1) ebenfalls mit aktuellen epidemiologischen Daten in Europa und USA vergleichbar. Je nach Kohorte liegt dieser zwischen 63 Jahren (66) (67) und 69 Jahren (68). In asiatischen Ländern tritt aufgrund der hohen HBV-Prävalenz im Kindesalter die Erkrankung früher auf. Die Erkrankungsmediane liegen unter 60 Jahren (68).

Die häufigsten Ursachen der Zirrhose beziehungsweise des HCC entsprachen mit HCV und Alkohol (Tabelle 5) ebenfalls den bekannten Risikofaktoren in westlichen Ländern (2). Wenig vertreten war hingegen die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung als Ursache für die

Leberzirrhose und des HCC. Tatsächlich ist die Fettleber mit 30% Prävalenz die häufigste Lebererkrankung in Europa und ein von der Zirrhose unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC (6) (39).

In retrospektiven und prospektiven Kohortenstudien zur Leberzirrhose überwogen männliche Patienten (42) (43). Im Gegensatz dazu waren es in unserer Kohorte der Zirrhose-Patienten etwa gleich viele Männer und Frauen, was darauf beruht, dass sie Patienten willkürlich und nicht zufällig in die Kohorte rekrutiert wurden, um eine möglichst repräsentative Kontrollgruppe zu ergeben (Tabelle 6). Die häufigsten Ursachen Alkohol und virale Hepatitiden (37) waren vertreten, wobei die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung fehlt oder unerkannt geblieben ist. Mit 38,8 % war das kompensierte Frühstadium wie auch beispielsweise bei d'Amico et al. (43), einer prospektiven Langzeitstudie zu Komplikationen der Leberzirrhose bei 495 Patienten, stark vertreten.

### 8.1.2 Tumoreigenschaften

Insgesamt gab es in unserer Kohorte viele Tumorfrühstadien unabhängig vom Staging-System (Tabelle 7). In vergleichbaren Kohorten fanden sich ebenfalls bei Diagnose ungefähr 40-50% lokale Stadien beziehungsweise Frühstadien (65) (69). Dabei muss beachtet werden, dass an spezialisierten Zentren und in westlichen Ländern mit effektiveren Screening- und Beobachtungsmöglichkeiten ein Selektionsfehler entstehen kann. Weltweit, teils auch in industrialisierten Ländern, muss man davon ausgehen, dass das HCC meist in intermediären und fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird (7) (70) (66).

### 8.1.3 Therapiearten

Wie in der BRIGDE-Studie (7) beschrieben, gibt es hinsichtlich der Therapien weltweit große geographische Unterschiede. Kosten- und ressourcenintensive Therapien wie die Transplantation und die Gabe von Sorafenib kamen in den USA und Europa öfter zur Anwendung als in vergleichsweise ärmeren Ländern. Entgegen der BCLC-gestützten Empfehlungen wurde Sorafenib bei BCLC-C Patienten nicht grundsätzlich als erste Therapie angewendet. Vielmehr prädominierte weltweit die Anwendung der TACE in diesem Stadium.

Mit Sorafenib als häufigste Therapie (19,5%) unterschied sich unsere Kohorte somit deutlich von der großen Kohorte der BRIDGE-Studie (unter 5% Sorafenib als erste Therapie). In Europa kam in 20-30% der Fälle die TACE als Ersttherapie am häufigsten zur Anwendung. Die Resektion hingegen wurde in unserer Kohorte etwa gleich häufig als erstes durchgeführt (14,5%), die PEI und die RFA jedoch vergleichsweise selten (0,4% und 2% im Vergleich zu insgesamt circa 30% in der BRIDGE-Studie). Afterloading wurde deutlich häufiger angewendet (14,1% im Vergleich zu unter 5% in der BRIDGE-Studie). Diese Unterschiede kommen durch die Spezialisierung des Leberzentrums des Campus Virchow Klinikum auf das Afterloading zustande. Auch die Lebertransplantation spielte in unserer Kohorte aufgrund der langen

Beobachtungszeit (Beginn vor Einführung der Milan-Kriterien) eine deutlich größere Rolle (12,5% Ersttherapie) als in der BRIDGE-Studie beschrieben (unter 5%) und wurde in allen BCLC-Stadien A-C durchgeführt, meist jedoch in frühen Stadien (16 von 31).

Therapieentscheidungen wurden in unserer Kohorte individuell getroffen (Tabelle 8). So wurden beispielsweise 9 bzw. 8 von 46 Patienten bereits im Frühstadium mit TACE bzw. Afterloading behandelt. Patienten mit intermediären Tumoren wurden teilweise noch einer primären Resektion unterzogen (16 von 100) und Patienten mit fortgeschrittenem Tumor noch primär lokoregional behandelt (16 bzw. 10 von 97 mit TACE und Afterloading). Multiple beziehungsweise multimodale Therapien wurden vornehmlich bei intermediären und fortgeschrittenen Stadien angewandt. Auch in der BRIDGE-Studie beobachtet man Abweichungen der strikt BCLC-orientierten Therapieempfehlungen: Weltweit wurden bereits in frühen Stadien weit über 20% primär mit TACE behandelt; andererseits wurde in späten Stadien noch reseziert (7).

#### 8.1.4 Überlebenszeitanalysen

Die 5-Jahres-Überlebensrate von 28,5% aller Patienten lag deutlich über den in der Literatur beschriebenen 15% in Europa (15) und unter 5% in weniger entwickelten Ländern (64). Sie spiegelt den hohen Anteil an transplantierten Patienten und die Behandlung an einem hochspezialisierten Zentrum wider.

In der BRIDGE-Studie (7) fanden sich abnehmende Überlebensmediane von 80, 27, 15 und 4 Monaten für die BCLC-Stadien A, B, C und D. Unsere Überlebenszeitanalysen zeigten ebenfalls abnehmende Mediane von 57, 33 und 19,5 Monaten bei BCLC Stadien 0+A, B und C+D (Kapitel 7.4.4). Der Überlebensmedian von 4,5 Monaten im Endstadium D war vergleichbar.

Für palliativ behandelte Patienten fanden sich in der Literatur kürzere Überlebensmediane von 10-20 Monaten (71) als in unserer Kohorte (22,5 Monate, Kapitel 7.4.1). Dieser Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Studienteilnehmer an einem hochspezialisierten Zentrum behandelt wurden. Dies führte womöglich auch zu Unterschieden innerhalb einer BCLC-Kategorie mit tendenziell besserem Überleben für aggressiver behandelte Patienten außerhalb der Empfehlungen (Kapitel 7.4.4). Ferner fiel auf, dass in unserer Kohorte bei den HCC-Patienten die Zirrhose meistens nicht weit fortgeschritten war. Wenige Patienten hatten eine Enzephalopathie oder Aszites, so dass vielfältige Therapieoptionen zur Verfügung standen. Transplantierte Patienten hatten in unserer Kohorte, wie auch in anderen Kohorten beschrieben, das beste Outcome (Überlebensrate von 60% nach 20 Jahren, Kapitel 7.4.1). Zhang et al. (72) beschrieben für transplantierte Patienten beispielsweise eine 5-Jahres-Überlebensrate von 69,4%.

Insgesamt verzerrten transplantierte Patienten in unserer Analyse nicht wesentlich die Überlebenszeit im Hinblick auf einzelne Kriterien, auf die im Folgenden eingegangen wird. Der Einfluss transplantiertter Patienten beschränkte sich auf die Signifikanz bestimmter Ergebnisse in

der univariaten Analyse (Überleben nach Geschlecht, Zirrhosestadium oder VEGF), veränderte aber nicht die jeweiligen Tendenzen (Tabelle 9, Tabelle 10).

In einer großen Meta-Analyse von 2010 zu Überlebensdaten bei unbehandelten Patienten in randomisierten Studien konnte für das männliche Geschlecht, späte Zirrhose- und Okuda-Tumorstadien, eine alkoholbedingte Lebererkrankung sowie einzelne BCLC-Kriterien ein negativer Einfluss auf das Überleben nachgewiesen werden; die chronische Hepatitis B war hingegen insgesamt mit einem kürzeren, die Hepatitis C bei BCLC-Stadien B und C mit einer besseren 1-Jahres-Überlebensrate assoziiert (68). Bei Zhang et al. (72) zeigte die univariate Analyse signifikante Ergebnisse unter anderem für höhere VEGF-Werte, eine Tumorgöße über 5 cm sowie eine Gefäßinvasion. Ein AFP über 100ng/mL beeinflusste das Überleben nicht. In der multivariaten Analyse war nur die Gefäßinvasion eine unabhängige Einflussgröße für das Überleben bei transplantierten Patienten. In einer prospektiven Studie zum fortgeschrittenen HCC hingegen konnte in der univariaten Analyse für fast alle einzelnen Kriterien und für ein höheres VEGF ein signifikanter Einfluss festgestellt werden, in der multivariaten Analyse blieben die fortgeschrittene Zirrhose, die Tumormorphologie und das AFP über 400 ng/mL unabhängige Einflussgrößen. Das Vorhandensein einer viralen Hepatitis wirkte sich in der univariaten Analyse negativ auf das Überleben aus, allerdings befanden sich in dieser Studie viele Patienten ohne Zirrhose (73).

Für das AFP, die Staging-Systeme und die einzelnen Patienten-, Tumor- und Zirrhoseparameter waren somit in dieser Studie deutliche Tendenzen zu sehen, die sich mit aktuellen Daten decken. Die Ursache der Leberschädigung ist möglicherweise ebenfalls von prognostischer Bedeutung, abhängig davon, ob bereits eine Zirrhose oder noch ein Fibrosestadium vorliegt. Wir berücksichtigten jedoch weder, dass bei einer chronischen HBV-Infektion im Gegensatz zur HCV-Infektion die Höhe der Viruslast und der Transaminasen mit dem HCC-Risiko korreliert (14), noch, dass die Kumulation zusätzlicher Risikofaktoren wie Alkoholkonsum oder Fettlebererkrankung oftmals schwer zu erfassen sind. Auf die Serummarker VEGF, sVEGFR-1 und PIGF gehen wir im Kapitel 8.2 näher ein.

Sowohl bei der BCLC-Klassifikation als auch bei den Staging-Systemen CLIP und Okuda lassen sich Intermediär- und Spätstadien schlecht differenzieren und prognostisch einordnen (20). Auch in unserer Kohorte konnten wir bei der TNM-Klassifikation und dem Staging nach CLIP nur durch Zusammenführen von Frühstadien einerseits und Intermediär- und Spätstadien andererseits einen signifikanten Unterschied in der Kaplan-Meier-Analyse darstellen. Bei den BCLC-Stadien hoben sich nur die Spätstadien mit einem signifikanten Überlebensnachteil im Vergleich zu Stadium 0, A und B hervor.

Es ist auch zu bemerken, dass die Child-Pugh-Klassifikation nicht alle fortgeschrittenen Zirrhosen erfasst. Faktoren wie Varizenblutung, Malnutrition, das hepatorenale Syndrom und ein Blutdruckabfall werden nicht berücksichtigt, obwohl sie auch eine rasche Progression der

Zirrhose widerspiegeln und das Überleben beeinflussen (5). Die fortschreitende Zirrhose als starke Einflussgröße wurde in unserer Kohorte möglicherweise unterschätzt.

## 8.2 Analyse der Serummarker

### 8.2.1 Das klinische Management des HCC und seine Grenzen

Eine Verbesserung der Therapiestrategien geht mit einer möglichst frühen Diagnose und einer sicheren individuellen Prognoseeinschätzung bei der Diagnose und vor oder unter Therapie einher. Zwar konnten bestimmte, schon länger bekannte, klinische und paraklinische Parameter ein schlechtes Ergebnis auch in unserer Kohorte vorhersagen (Kapitel 7.4), der Progress der Erkrankung ist jedoch nicht linear und wahrscheinlich durch starre Staging-Systeme nicht sicher zu erfassen (3). Prognostisch relevante Parameter wie Histologie, Molekularbiologie, Biomarker, Lokalisation des Tumors oder Ursache der Zirrhose werden bisher in der Praxis nicht berücksichtigt (1). Auch fehlen eindeutige Empfehlungen zum Vorgehen bei Patienten mit fortschreitender Zirrhose, die vom Child-Pugh-Score nicht erfasst wird (beispielsweise mit Varizenblutungen). Zudem gibt es nur wenig Empfehlungen zu Kombinationstherapien und Zweitlinientherapien (13). Aufgrund heterogener Mechanismen ist sogar die Definition der Tumorprogression schwierig: Nicht alle Patienten ohne radiologischen Progress leben länger (3). Im klinischen Alltag fehlt es somit an anwendbaren prätherapeutischen Markern.

Es bleibt insbesondere schwierig, individuell zu bestimmen, welche Patienten von einer aggressiven Therapie profitieren. Anhand unserer Daten können wir vermuten, dass aggressivere und multimodale Therapieschemata zu einem verbesserten Überleben führen (Kapitel 7.4.4). Multizentrische retrospektive Studien deuteten darauf hin, dass die Milan-Kriterien möglicherweise zu restriktiv sind und die BCLC-Kriterien keine adäquate Selektion von Patienten erlauben, die von einer Resektion oder Transplantation profitieren (74) (75) (13). Starke Prädiktoren für das Outcome nach Transplantation, wie die Gefäßinvasion, lassen sich nur intraoperativ sicher diagnostizieren (72). AFP sowie Anzahl und Größe der Läsionen sind gute prognostische Marker. Aber akkurate Prädiktoren für ein gutes Ergebnis und somit für ein gerechtes Management gelisteter Patienten sind noch nicht etabliert (3). Der HAP-Score (basierend auf Albumin, Bilirubin, Tumorgröße und AFP) selektierte bereits in prospektiven Kohortenstudien Patienten, die am ehesten von einer TACE profitieren und wird für weitere Studien benutzt (13). Bei intermediären und fortgeschrittenen Tumorstadien konnten auch in westlichen Kohorten teilweise gute Ergebnisse und differenziertere Therapiestrategien mit der HKLC-Klassifikation (Kapitel 5.1.1.4) erzielt werden (76) (77), was für eine aggressivere Therapiestrategie in manchen Fällen spricht. Unklar bleibt jedoch, ob Patienten, die von einer derartigen Strategie nicht profitieren, sogar einen Nachteil erleiden (3).

Ferner bleibt die Frühdiagnose des HCC weiter eine Herausforderung, da sie hauptsächlich auf radiologischen Kriterien basiert. Risikopatienten werden zudem nicht immer erkannt und

entsprechender Diagnostik zugeführt, da es kein einheitliches Screening-Programm für chronische Lebererkrankungen gibt (39) (8). Das AFP weist im Gegensatz zu unseren Daten (Kapitel 7.5.4.1) insgesamt keine reproduzierbare gute Sensitivität und Spezifität auf und wird aktuell in diagnostischen Algorithmen nicht berücksichtigt (1), zumal es auch bei Leberzirrhose oder chronischer Hepatitis ansteigen kann (78).

### **8.2.2 Angiogene Faktoren als diagnostische, prognostische und prädiktive Marker für das HCC in der Literatur**

Wie in der Einleitung erwähnt sind Faktoren der Angiogenese in verschiedenen Schritten des Tumorwachstums involviert. Deren Bestimmung im Serum könnte für Diagnose, Prognose und Therapiemanagement des HCC hilfreich sein.

Bei Yvamoto et al. (79) waren die VEGF-Serumwerte bei HCC-Patienten signifikant höher als bei Patienten mit einer Zirrhose, einer chronischen HCV-Infektion oder bei der gesunden Kontroll-Gruppe. Atta et al. (54) untersuchten HCC-Patienten im Vergleich zu Patienten mit Zirrhose und Gesunden. Das Plasma-VEGF konnte bei einem Cut-off-Wert von 271,85 pg/mL mit einer Sensitivität und einer Spezifität von jeweils 90% ein HCC diagnostizieren.

Ferner konnte die VEGF-Konzentration in prospektiven Studien und Subgruppenanalysen großer Phase-III-Studien bei fortgeschrittenem HCC mit verschiedenen klinischen Markern für schlechtes Therapieansprechen (wie beispielsweise der Metastasierung und der Größe) und mit einer schlechter Prognose in Zusammenhang gebracht werden (53) (80) (81) (82). In einer monozentrischen Studie an 164 Patienten von Zhang et al. (72) konnten niedrige VEGF-Plasmakonzentrationen das rezidivfreie Überleben nach Transplantation vorhersagen, auch bei Patienten, die außerhalb der Milan-Kriterien transplantiert wurden. In der retrospektiven Studie von Nagoka et al. (57) an fast 200 HCC-Patienten mit überwiegend frühen Stadien konnte der PIGF-Wert alleine im Serum nicht als unabhängiger Prognosemarker identifiziert werden - trotz deutlicher Tendenz zu erhöhten Werten bei schlechter Prognose und höheren Werten bei fortgeschrittenen Tumoren und fortgeschrittener Zirrhose. Ähnliche Ergebnisse erzielten Zhu et al. (82) im Plasma. PIGF wird jedoch in tumoralem und peritumoralem Gewebe vermehrt exprimiert (55) und ist auch in chronischen Lebererkrankungen im Serum erhöht (42) (83). sVEGFR-1 konnte in den zwei o.g. retrospektiven Studien als unabhängiger Marker das Überleben vorhersagen (57) (82). Der PIGF/sVEGFR-1 Quotient war ein unabhängiger prognostischer Marker für das Überleben (57).

Wir untersuchten in Anlehnung an diese Ergebnisse die Serumkonzentrationen der potentiellen Marker PIGF, VEGF und sVEGFR-1 in verschiedenen Gruppen auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Überleben und mit Tumor- und Zirrhosestadien sowie auf ihren möglichen diagnostischen Wert für das HCC.

### 8.2.3 Angiogene Faktoren und AFP als diagnostische und prognostische Marker in unseren Kohorten

In der vorliegenden Studie konnten zunächst in der univariaten Analyse erhöhte Spiegel von VEGF und sVEGFR-1 mit einem Überlebensnachteil innerhalb der gesamten HCC-Kohorte in Zusammenhang gebracht werden. Bei PIGF fiel das Ergebnis trotz einer deutlichen Tendenz nicht signifikant aus (Tabelle 9). Die multivariate Analyse ergab für keinen der eingeschlossenen Parameter als unabhängige Einflussgröße ein signifikantes Ergebnis. In Anbetracht der Tatsache, dass die Fallzahl sich durch Hinzunahme der Serumwerte stark verringerte, waren signifikante Ergebnisse aber nicht unbedingt zu erwarten. VEGF (Cut-off-Wert von 154 pg/mL), sVEGFR-1 (Cut-off-Wert 86 p/mL) und AFP (Cut-off-Wert 400 ng/mL) zeigten als Einflussgröße ein vergleichsweise niedriges p von 0,14 (VEGF) und jeweils 0,19 (sVEGFR-1 und AFP); es ist möglich, dass diese Ergebnisse in einer größeren Population signifikant ausfallen würden. Die Hazard Ratios für VEGF, sVEGFR-1 und AFP zeigten hier ein 1,63-, 1,6- und 1,65-fach erhöhtes Sterberisiko an.

Insgesamt jedoch zeigten sich für PIGF sehr niedrige Werte und die höchsten Mittelwerte für alle drei Marker bei der gesunden Kontrollkohorte. Im Vergleich ausschließlich der kranken Patienten, also HCC- und Zirrhose-Patienten, konnte anhand von sVEGFR-1 zwischen HCC und Zirrhose-Patienten insgesamt und zwischen einer Zirrhose und allen Tumorstadien differenziert werden. AFP zeigte deutlich höhere Werte bei HCC-Patienten als bei Zirrhose-Patienten und unterschied in der ROC-Analyse am besten zwischen den beiden Gruppen - und dies in jedem Tumorstadium. Mit fortschreitendem Tumorstadium zeigten sich für alle drei Marker PIGF, VEGF und sVEGFR-1 tendenziell höhere Mittelwerte, die Ergebnisse fielen aber nur bei sVEGFR-1 und für die Staging-Systeme CLIP und Okuda signifikant aus. VEGF zeigte einen signifikanten Anstieg bei fortschreitender Zirrhose. AFP zeigte weder für Tumorstadien noch für Zirrhosestadien einheitliche Ergebnisse. Betrachtete man die gesamte Kohorte, waren lediglich PIGF und sVEGFR-1 (schwach) positiv untereinander korreliert (Kapitel 7.5).

Durch Kombination von AFP mit den neuen potentiellen Markern für eine sicherere Diagnose des HCC innerhalb der HCC- und Zirrhose-Kohorten konnte zwar die Sensitivität erhöht werden, jedoch nur auf Kosten einer erheblichen Verringerung der Spezifität. Keine der Kombinationen erreichte eine Spezifität über 72%. Das AFP alleine war in unserer Studie mit einer Sensitivität von 73,8% und einer Spezifität von 90,2% deutlich besser (Kapitel 7.5.4).

Im Folgenden gehen wir näher auf die Literatur ein, um Ähnlichkeiten mit unseren Ergebnissen und mögliche Erklärungen zu finden. Zum einen wurden in Studien sehr unterschiedliche und ebenfalls uneinheitliche Werte gemessen und analysiert. Es wurden selten Kontroll-Gruppen mit gesunden Patienten einbezogen. Außerdem korrelierten die Marker nur mit einzelnen Kriterien der Tumorstadien.

#### 8.2.4 VEGF-Cut-off-Werte

Für Überlebensanalysen wurden VEGF-Cut-off-Werte von beispielsweise 450 pg/mL bei Kaseb et al. (81), von 271,85 pg/mL bei Atta et al. (54), von 108 pg/mL bei Mukozu et al. (84) und von 44 pg/mL bei Zhang et al. (72) bestimmt. In einer Metaanalyse von Cao et al. (85) mit über 1000 Patienten wurden VEGF-Konzentrationen im Blut mit dem Ansprechen auf Sorafenib bei fortgeschrittenem HCC in Verbindung gebracht. Hierbei wurde erwähnt, dass die Cut-off-Werte sehr unterschiedlich ausfallen. Zwei weitere Meta-Analysen von 2009 (86) und 2013 (87) über die Korrelation von erhöhten VEGF-Konzentrationen mit kürzeren Überlebenszeiten beziehungsweise rezidivfreiem Überleben bei HCC-Patienten mit variablen Tumor-Stadien verwiesen auf die unterschiedlichen Methoden der Cut-off-Bestimmungen als eindeutige Limitierung für die Interpretation der Datenlage.

#### 8.2.5 VEGF-Werte bei HCC, Zirrhose und chronischer Lebererkrankung

Bei Yvamoto et al. (79) lag der Mittelwert für VEGF im Serum bei HCC-Patienten bei 588 pg/mL bei einer großen Standardabweichung von 501 pg/mL. Im Vergleich zu Patienten mit Zirrhose, Patienten mit chronischer Hepatitis C und gesunden Kontrollen war der Mittelwert bei HCC-Patienten zwar deutlich höher, Zirrhose-Patienten wiesen jedoch im Mittel niedrigere Werte auf als HCV-Patienten und Gesunde. Die Sensitivität und Spezifität für die HCC-Diagnostik im Vergleich zu Zirrhose-Patienten lagen bei 65% bzw. 85%. Die Differenzierung von HCC-Patienten und HCV-Patienten beziehungsweise Gesunden gelang jedoch nur mit einer geringen Sensitivität von 50% bzw. 40%. AFP schnitt wie in unserer Studie deutlich besser ab.

In einer retrospektiven, monozentrischen Studie von Mukozu et al. (84) waren die VEGF-Werte bei HCC-Patienten höher (206,65; Standardabweichung 109,23 pg/mL) als in den anderen Gruppen (Zirrhose ohne HCC und HCV-Patienten ohne Zirrhose), sie diagnostizierten das HCC akkurater als AFP. Eine gesunde Kontroll-Gruppe gab es jedoch nicht. Die Zirrhose-Patienten unterschieden sich hinsichtlich der VEGF-Konzentration nicht von Patienten ohne Zirrhose (49,48; Standardabweichung 34,4 pg/mL versus 35,78; Standardabweichung 19,0 pg/mL), und VEGF konnte weder mit der Leberfunktion noch mit dem Tumorstadium, sondern nur mit der Gefäßinvasion bei vorhandenem HCC assoziiert werden.

In einer monozentrischen prospektiven Studie von Youssef et al. (88) wurden insgesamt sehr hohe VEGF-Werte gemessen. Bei HCC-Patienten waren die Werte höher als bei Zirrhose-Patienten und gesunden Kontrollen (2180,8 pg/mL vs. 1605,3 pg/mL und 561 pg/mL). Der Unterschied zwischen HCC und Zirrhose fiel jedoch nicht signifikant aus. Im Gegensatz zu anderen Studien war VEGF hier mit einer Sensitivität und Spezifität von 60% bzw. 57,6% kein guter diagnostischer Marker.

In einer prospektiven Studie mit fast 300 Patienten von Kaseb et al. (81) sagten hohe VEGF-Werte im Plasma, insbesondere in Kombination mit niedrigen *insuline-like growth factor*

(IGF)-1-Werten, das Überleben voraus und ergänzten die BCLC-Kriterien. Eine Kontrollgruppe gab es hier jedoch auch nicht.

In den bereits erwähnten Subgruppen-Analysen von Phase-3 Studien zu Everolimus und Sorafenib, die unter anderem einen Zusammenhang von VEGF, sVEGFR-1 und Prognose bei fortgeschrittenem Stadium herstellten, wurden ebenfalls ausschließlich HCC-Patienten untersucht (80) (82).

Auch wenn insgesamt VEGF mit Aggressivitätskriterien des HCC in Zusammenhang gebracht werden kann, unterscheiden sich die einzelnen Beobachtungen und ergeben kein einheitliches Bild. Bei Atta et al. (54) war VEGF nicht mit der Größe oder dem Tumorstadium, jedoch mit der Anzahl der Läsionen, der Gefäßinvasion und einem hohen AFP-Wert assoziiert. Bei Kaseb et al. (81) hingegen war VEGF vor allem mit der Größe des Tumors assoziiert. In einer Übersichtsarbeit zeigten Muto et al. (53) ein heterogenes Bild unterschiedlicher Korrelationen von HCC und VEGF (unter anderem Metastasierung, Gefäßinvasion, Größe, Tumorstadium). Wie bei Mukozu et al. (84) und Youssef et al. (88) war oftmals der Zusammenhang zu einzelnen Kriterien (Gefäßinvasion beziehungsweise Anzahl der Läsionen) einfacher herzustellen als zum Tumorstadium insgesamt.

### **8.2.6 PIGF- und VEGFR-1-Werte bei HCC, Zirrhose und chronischer Lebererkrankung**

Angaben zu möglicherweise pathologischen PIGF- und sVEGFR-1-Konzentrationen bei HCC-Patienten fanden sich beispielsweise in Phase II-Studien zu antiangiogenen Therapien bei fortgeschrittenen Tumoren: ein PIGF von 32,6 pg/mL, 22 pg/mL und 11,4 pg/mL (89) (56) (21) beziehungsweise ein sVEGFR-1 von 154 pg/mL und 163 pg/mL (56) (21). Bei Nagaoka et al. (57) wurden PIGF-Werte von 27,3 pg/mL und sVEGFR-1-Werte von 134,2 pg/mL als hoch und Werte von 15,5 pg/mL beziehungsweise 110,4 pg/mL als niedrig angesehen. Ein hohes PIGF war nicht signifikant mit einem kürzeren Überleben assoziiert. Patienten mit einem hohen sVEGFR-1-Wert und einem niedrigen PIGF/sVEGFR-1-Quotienten hingegen hatten eine signifikant verkürzte Überlebenszeit.

In einer großen prospektiven Studie mit über 800 Patienten mit chronischer Lebererkrankung wurde für PIGF ein Cut-off-Wert von 20,2 pg/mL zur Detektion einer Fibrose ermittelt. Wie in unserer Studie konnte nur durch Kombination mit anderen Markern (*growth differentiation factor-15* und *hepatic growth factor*) die Sensitivität von 79% auf 84% erhöht werden, hier jedoch auch mit einer verbesserten Spezifität von 72% statt 63% (42). In einer kleinen monozentrischen Kohortenstudie zur Fibrose wurden PIGF- und sVEGFR-1-Werte auch bei gesunden Kontrollen gemessen. Patienten mit chronischer viraler Hepatitis hatten im Mittel eine PIGF- und sVEGFR-1-Plasmakonzentration von 20 (Werte von 15-38) pg/mL bzw. 91 (65-167) pg/mL, Gesunde im Mittel 16 (10-38) pg/mL beziehungsweise 69 (52-101) pg/mL. Der Unterschied fiel wie in unserer Studie gering aus, die Werte wiesen zudem eine große Streuung auf. Sie

fielen trotzdem signifikant aus, PIGF konnte sogar mit dem Grad der Fibrose korreliert werden (83).

Dewerchin et al. (49) äußerten in einer Übersichtsarbeit über PIGF die Vermutung, dass der angiogene Effekt von PIGF konzentrationsabhängig ist und möglicherweise an die VEGFR1-Expression gekoppelt ist. Die PIGF-Konzentration alleine habe keine Aussagekraft. In einer monozentrischen prospektiven Studie an 55 Patienten mit M. Behçet wurden neben VEGF auch sVEGFR-1 und VEGF/sVEGFR-1 gemessen und daran die Bedeutung eines pro- und antiangiogenem Gleichgewicht herausgearbeitet: Bei erkrankten Patienten stieg sVEGFR-1 als negativ regulierender Faktor weniger an als VEGF selbst, so dass VEGF/sVEGFR-1 größer war als bei gesunden Kontrollen (48). In unserer Studie haben wir dies nicht berücksichtigt, sondern jeden Faktor einzeln betrachtet und lediglich Korrelationen analysiert. Sollten sich die Konzentrationen verschiedener Faktoren der Angiogenese abhängig voneinander verändern, könnte dies auch unsere multivariate Analyse beeinflusst haben, da nur unabhängige Einflussgrößen durch die Regressionsanalyse hervorgehoben werden.

Unsere ermittelten Blutwerte hatten somit eine mit der Literatur vergleichbare Größenordnung. Auch PIGF-Konzentrationen fielen in anderen Studien wie oben beschrieben niedrig aus, teilweise ebenfalls unter 15,6 pg/mL und mit geringen Unterschieden zwischen den getesteten Gruppen. Bei Werten dieser Größenordnung nahe an der Nachweisgrenze ist es schwierig, akkurat zu bestimmen und Aussagen zu treffen.

Insgesamt ergibt sich auch durch die Datenlage kein vorhersehbarer Anstieg der Marker mit der Krankheitsprogression bei Zirrhose und HCC.

### 8.2.7 Faktoren der Angiogenese im Gewebe

Überraschende und uneinheitliche Ergebnisse zeigten auch Studien zu HCC- beziehungsweise Zirrhose-Gewebe. Deli et al. (90) beobachteten eine signifikant niedrigere VEGF-Expression im HCC-Gewebe als im umliegenden zirrhotischen Gewebe. Bei Xu et al. (91) zeigte sich bei fast 500 operierten HCC-Patienten eine signifikant erhöhte PIGF-Expression im peritumoralen Gewebe verglichen mit dem korrespondierenden HCC-Gewebe (und verglichen mit zirrhotischem und nicht-zirrhotischem Gewebe von Patienten ohne HCC). Eine hohe PIGF-Expression korrelierte ferner mit dem Tumorstadium (nach BCLC und TNM) und, bei einer Beobachtungszeit von 2,5-5 Jahren, mit einer kürzeren Überlebenszeit. Die intratumorale Expression hingegen war mit diesen Endpunkten nicht assoziiert. Die Autoren diskutierten, ob diese Assoziation einer proangiogenen Umgebung mit der Tumorbiologie als Wegbereiter für das HCC und seinen Progress verstanden werden sollte oder als hypoxieinduzierte Reaktion auf den wachsenden Tumor mit zunehmender Metastasierung und Gefäßinvasion. Die peritumorale PIGF-Expression könnte somit bei resektablem HCC als prädiktiver Marker möglicherweise die Nachsorge beeinflussen.

Bei Ho et al. (55) hingegen war die PIGF-Expression bei 71 operierten, nicht vorbehandelten Patienten vor allem abhängig von dem Vorhandensein einer aktiven Hepatitis. Unterschiede zwischen tumoralem und nicht-tumoralem Gewebe waren nicht signifikant. PIGF war in fortgeschrittenen Tumorstadien mit dem Outcome korreliert, VEGF mit dem Differenzierungsgrad des Tumors.

### 8.2.8 Angiogene Faktoren unter Therapie

Schließlich kommt es bei PIGF, VEGF und VEGFR-1 unter antiangiogener und lokoregionaler (hypoxieinduzierender) Therapie zu möglicherweise tumorunabhängigen und schwer vorhersehbaren Veränderungen der Konzentrationen.

In einer Phase-II-Studie für Ramucirumab bei fortgeschrittenem HCC zeigte sich ein Anstieg von VEGF und PIGF und ein Abfall von sVEGFR-2 ohne eine Korrelation zur Prognose. Ein Abfall von sVEGFR-1 schien mit einer verbesserten Prognose assoziiert zu sein (92).

In einer Subgruppen-Analyse der SHARP-Studie (80) zeigte sich ein signifikanter Anstieg von VEGF unter Sorafenib, auch hier ohne Korrelation zur Prognose. In dieser Untergruppe konnte der VEGF-Wert vor Therapie das Überleben nicht vorhersagen.

Bei Boige et al. (89) zeigte sich hingegen ein Anstieg von PIGF, ein Abfall von VEGF und ein transienter Anstieg von sVEGFR-2 unter Bevacizumab. Hier zeigte sich bei kleiner Patientenzahl keine Assoziation zum Outcome der Patienten.

Ronald et al. (93) untersuchten in einer prospektiven Studie an 25 Patienten mehrere angiogene Faktoren unter lokoregionaler Therapie und konnten bei den meisten (unter anderem VEGF und PIGF) einen transienten Anstieg feststellen. Ein Zusammenhang mit dem Ansprechen konnte nur mit Interleukin-6 (IL-6) festgestellt werden.

Bei Zhang et al. (72) waren nach 51 Tagen die VEGF-Konzentrationen bei Patienten, die vor Transplantation eine lokoregionale Therapie erhielten, signifikant höher als bei therapie-naiven Patienten. In dieser Subgruppe vortherapierter Patienten hatten Patienten mit niedrigeren VEGF-Konzentrationen ein signifikant besseres Outcome.

Insgesamt ist es schwierig, zwischen tumorabhängigen und therapiebedingten Änderungen angiogener Faktoren zu unterscheiden. Möglicherweise ist der antiangiogene Effekt sogar abhängig vom Wirkmechanismus des Therapeutikums (89). Eine antiangiogene Therapie kann unter Umständen auch aggressivere Tumorzellen selektieren (94) oder mit anderen ungünstigen Prozessen einhergehen wie Escape, Unterstützung des metastatischen Prozesses (95) oder Resistenzentwicklung (96) (91), und somit weiter in das Wechselspiel der Marker eingreifen und deren Aussagekraft schwächen. Da viele Patienten bei Einschluss in unserer Studie nicht therapie-naiv waren, muss auch hier mit einem komplizierten Einfluss auf die Konzentrationen gerechnet werden.

### 8.3 Grenzen der Studie

Im Folgenden werden die Schwächen der Datenerhebung und der Bestimmung der Serumwerte PIGF, VEGF und sVEGFR-1 sowie der statistischen Auswertung unserer retrospektiven Langzeitstudie besprochen.

- Bei der HCC-Kohorte handelte es sich um eine sehr heterogene Kohorte mit Patienteneinschluss über mehr als 20 Jahre in verschiedenen Tumorstadien mit teilweise unterschiedlicher Stadienberechnung und Therapieplanung. Beispielsweise waren die Milan-Kriterien in den 1990-Jahren noch nicht eingeführt. Bestimmte Therapiearten wie Sorafenib am Anfang der Datenerhebung noch nicht zur Verfügung. Auch waren Ein- bzw. Ausschluß in einzelnen Fällen abhängig von den verfügbaren Daten.
- Die BCLC-Einteilung beruht teilweise auf subjektiven Kriterien wie dem Performance Status, der in einer retrospektiven Untersuchung nach Aktenlage nicht überprüfbar ist. Auch kann es durch die Einführung des INR-Wertes anstelle des Quick-Wertes im Child-Pugh-Score zu Verschiebungen zwischen den Stadien A, B und C in früheren BCLC-Einteilungen kommen.
- Durch niedrige Fallzahlen in den extremen Früh- und Spätstadien mussten diese für statistische Auswertungen mit den nächstliegenden Stadien zusammengeführt werden und konnten nicht gesondert untersucht werden. Das führte zu Verzerrungen beispielsweise bei den Überlebenszeitanalysen.
- Therapien wie Transplantation, Afterloading und Sorafenib waren im Vergleich zu anderen europäischen Kohorten überrepräsentiert (7).
- Viele BCLC-C-Patienten waren zudem bei Einschluss nicht therapienaiv, sondern wurden bei Rezidiv oder Progress zu BCLC-C erst in der Sprechstunde vorgestellt.
- Als Ursache der Zirrhose wurde das metabolische Syndrom und somit eine mögliche NAFLD als zusätzlicher Risikofaktor für HCC in der HCC-Kohorte und in der Zirrhose-Kohorte wahrscheinlich unterschätzt. Tatsächlich ist die Fettlebererkrankung mit schätzungsweise 30% in Europa die häufigste Lebererkrankung (6).
- Wie bereits angesprochen wurden in den Überlebenszeitanalysen wichtige Faktoren wie die fortschreitende Zirrhose und die Ursache der Lebererkrankung möglicherweise auch unterschätzt. Auch konnten wichtige Kriterien wie die Pfortaderthrombose (68) aufgrund zu niedriger Fallzahlen nicht berücksichtigt werden.
- Die Bestimmung von Cut-off- beziehungsweise Referenzwerten war insgesamt uneinheitlich. Für AFP wählten wir für die Überlebenszeitanalysen den Wert von 400 ng/mL bei HCC-Patienten gemäß dem CLIP Score (Kapitel 7.4). Für die Kombination verschiedener Marker zur HCC-Diagnose bei Zirrhose wählten wir einen niedrigen Wert von 10 ng/mL entsprechend dem üblichen Referenzwert (Kapitel 7.5.4). Für VEGF und sVEGFR-1 gibt es keine Referenzwerte und in der Literatur uneinheitliche Cut-off-

Werte, so dass wir uns bei den Überlebenszeitanalysen auf die Mediane bezogen. Lediglich bei der Kombination der verschiedenen Marker konnten wir für sVEGFR-1 einen in der ROC-Analyse selbst ermittelten Cut-off-Wert verwenden.

- Bei PIGF gab es auffällig viele Negativbestimmungen und Werte unterhalb der angegebenen Nachweisgrenze von 15,6 pg/mL. Wir entschieden uns, zwischen Negativbestimmungen und Werten zwischen 0 und 15,6 pg/mL zu unterscheiden und setzten den Cut-off auf 0 pg/mL. Vorgesehen ist die Standardkurve jedoch nur bis zur Nachweisgrenze. Durch die vielen Negativbestimmungen (vgl. PIGF-Mediane Tabelle 12 und 14) können zudem Verzerrungen insbesondere bei den Vergleichen der Kohorten entstehen, so dass unsere Ergebnisse bezüglich PIGF weiterer Validierung bedürfen. ROC-Analysen der positiven Werte führten wir nicht durch.
- Die Seren, bei denen PIGF, VEGF und sVEGFR-1 bestimmt wurden, waren alle eingefroren wurden und teilweise sehr lange gelagert. Dadurch könnte die Qualität mancher Seren gelitten haben.
- Anzumerken ist auch, dass wir PIGF, VEGF und sVEGFR-1 mit AFP verglichen, welches aus Akten erhoben und mit unterschiedlichen, zum Teil nicht dokumentierten Methoden und Materialien gemessen wurde.
- Die 30 Gesunden Probanden wiesen bei allen drei Markern die höchsten Mittelwerte und bei PIGF und VEGF auch die höchsten Mediane auf, obwohl sie in der Literatur als pathologische Marker gelten. Angesichts der niedrigen Fallzahl gesunder Probanden sowie der fehlenden Daten bezüglich deren Gesundheitszustandes und der Annahme, dass angiogene Faktoren auch in anderen Erkrankungen erhöht sind (72) (57), konzentrierten wir uns auf die kranken Patienten (HCC, Zirrhose), um die Eigenschaften von PIGF, VEGF und sVEGFR-1 als diskriminierende Marker oder Verlaufsmarker zu analysieren.
- Es ist anzunehmen, dass die Gewebeexpression angiogener Faktoren in der Blutkonzentration widerspiegelt wird (66). Schönleber et al. (86) kommen in einer Metaanalyse zu dem Schluss, dass VEGF-Bestimmungen im Serum verglichen mit Bestimmungen im Gewebe besser untersucht sind und zu reproduzierbaren Ergebnissen bei HCC-Patienten führen. Die im Serum vorhandenen Thrombozyten beeinflussen jedoch möglicherweise insbesondere die VEGF-Bestimmung und können fälschlicherweise zu hohen Werten in geronnenen Proben führen (72). Die Thrombozytenzahl wurde in unserer Untersuchung jedoch nicht berücksichtigt.

## 8.4 Schlussfolgerungen

Ähnlich wie andere Studien (Kapitel 8.2) deutet unsere Studie darauf hin, dass sowohl das Fortschreiten der Zirrhose als auch das Auftreten und die Progression eines HCC mit komplexen, fließend ineinander übergehenden Vorgängen (51) und mit einem komplexen Zusammenspiel

mit den drei potentiellen Markern PIGF, VEGF und sVEGFR-1 einhergeht. Deren möglicher Nutzen in der Diagnostik und der Verlaufskontrolle ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Datenlage bezüglich der Cut-off-Werte, der Ergebnisse zu Korrelationen angiogener Faktoren mit Krankheit und Krankheitsmerkmalen sowie bezüglich der Expression dieser Faktoren am Gewebe selbst ist noch unübersichtlich. Der Einfluss hypoxieinduzierender Therapien wie lokale oder systemische antiangiogene Therapien konnte bisher noch nicht geklärt werden, wie auch das genaue Zusammenspiel der Faktoren nicht. Möglicherweise beeinflusst die molekularbiologische Heterogenität des HCC ebenfalls die Ergebnisse (1).

In dieser Studie zeigten sich trotz scheinbar widersprüchlicher Ergebnisse aber interessante Tendenzen, die für die Charakterisierung der Zirrhose oder des HCC hilfreich sein können. Auch korrelierten die verschiedenen Staging-Systeme unterschiedlich gut mit den Markern. Beispielsweise korrelierte sVEGFR-1 am besten mit den Staging-Systemen CLIP und Okuda und VEGF am besten mit den Child-Pugh-Stadien. Prospektive Studien mit therapie-naiven Patienten und gesunden Kontrollen könnten diese Aspekte aufgreifen und die Datenlage bereichern. Die positive oder negative Korrelation der Faktoren und deren Veränderungen sowie die Korrelation der Marker mit weiteren, beispielsweise molekulargenetischen Parametern, sollten ebenfalls untersucht werden.

Es gibt bereits Ansätze, neue Marker mit bestehenden Staging-Systemen zu kombinieren. Kaseb et al. (73) integrierten VEGF in den CLIP-Score und erzielten vor allem in den frühen Stadien eine bessere Stratifizierung der Patienten bezüglich des Überlebens. Sie entwickelten ferner den sogenannten IV-BCLC-Score, indem sie IGF-1 und VEGF in die BCLC-Stadien integrierten und eine bessere prognostische Vorhersage ermöglichten (81).

Auch für die Leberfibrose und -zirrhose gibt es Versuche, die Stadien mit nicht-invasiven Markern besser zu stratifizieren. Krawczyk et al. (42) setzten PIGF als Marker für Fibroestadien ein. Insbesondere in Kombination mit anderen Markern verbesserte es vor allem die Erkennung von Frühstadien bei Patienten mit normaler transiente Elastographie. Toson et al. (50) integrierten VEGF in einen Score mit Hyaluronsäure und dem ASAT/ALAT-Quotienten und erzielten eine sehr gute Sensitivität und Spezifität ab dem Fibroestadium 2 bei HCV-Patienten.

Die vorliegende Studie zeigte eine Aussagekraft von VEGF und sVEGFR-1 bezüglich der Prognose und insbesondere für sVEGFR-1 bezüglich des Tumorstadiums. Es konnte aber nicht bestätigt werden, dass PIGF, VEGF und sVEGFR-1 zur Diagnose eines HCC zusätzlichen Nutzen zu AFP bringen. Sie können vielmehr als individuelle Verlaufparameter begriffen werden und könnten in Kombination mit anderen, bereits bekannten und noch zu etablierenden prädikativen oder prognostischen Markern der Zirrhose und des HCC eingesetzt werden.

## 9 Literaturverzeichnis

1. **Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul JL, Schirmacher P, Vilgrain V.** EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2018, Bd. 69, S. 182-236.
2. **Massarweh NN, El-Serag HB.** Epidemiology of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Control*. 2017, Bd. 24, S. 1-11.
3. **Bruix J, Reig M, Sherman M.** Evidence-based diagnosis, staging and treatment of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2016, Bd. 150, S. 835-853.
4. **Bhala N, Angula P, van der Poorten D, Lee E, Hui JM, Saracco G, Adams LA, Charatcharoenwitthaya P, Topping JH, Bugianesi E, Day CP, George J.** The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: a international collaborative study. *Hepatology*. 2011, Bd. 54, S. 1208-1216.
5. **Gerbes A, Zoulim F, Tilg H, Dufour J-F, Bruix J, Paradis V, Salem R, Peck-Radosavljevic M, Galle PR, Greten T, Nault J-C, Avila MA.** Gut roundtable meeting paper: selected recent advances in hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2017, Bd. 0, S. 1-9.
6. **Greten TF, Malek NP, Schmidt S, Arends J, Bartenstein P, Bechstein W, Bernatik T, Bitzer M, Chavan A, Dollinger M, Domagk D, Drognitz O, Dux M, Farkas S, Folprechts G, Galla P, Geissler M, Gerken G, Habermehl D, Helmberger T, Herfarth K, Hoffmann RT, Holtmann M, Huppert P, Jakobs T, Keller M, Klempnauer J, Kolligs F, Körber J, Lang H, Lehner F, Lordick F, Lubienski A, Manns MP, Mahnken A, Möhler M, Mönch C, Neujaus P, Niederau C, Ocker M, Otto G, Pereira P, Pott G, Riemer J, Ringe K, Ritterbusch U, Rummeny E, Schirmacher P, Schlitter HJ, Schlottmann K, Schmitz V, Schuler A, Schulze-Bergkamen H, Schweinitz von D, Seehofer D, Sitter H, Strassburger CP, Stroszczyński C, Strobel D, Tannapfel A, Trojan J, van Thiel I, Vogel A, Wacker F, Wedemeyer H, Wege H, Weinmann A, Wittekind C, Wörmann B, Zech CJ.** Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. Mai 2013, Bd. 51, S. 1269-1326.
7. **Park J-W, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen P-J, Kudo M, Johnson P, Wagner S, Orsini LS, Sherman M.** Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver International*. 2015, Bd. 35, S. 2155-2166.
8. **Czauderna C, Marquardt JU, Galle PR, Wörns MA.** Das hepatozelluläre Karzinom. *Der Internist*. April 2017, Bd. 58, S. 469-479.

9. **Gomes MA, Priollo DG, Tralhao JG, Botelho MF.** Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2013, Bd. 59(5), S. 514-524.
10. **Breuhahn K.** Molekulare Progressionsmechanismen der humanen Hepatokarzinogenese. *Der Pathologe.* 2010, Bd. 31 (2), S. 170-176.
11. **Alvarez-Sola G, Uriarte I, Latasa MU, Urtasun R, Bàrcena-Varela M, Elizalde M, Jiménez M, Rodríguez-Ortigosa CM, Corrales FJ, Fernández-Barrena MG, Berasain C, Avila MA.** Fibroblast growth factor 15/19 in hepatocarcinogenesis. *Digestive Diseases.* 2017, Bd. 35, S. 158-165.
12. **Raoul J-L, Bruix J, Greten TF, Shermann M, Mazzaferro V, Hilgard P, Scherubl H, Scheulen ME, Germanidis G, Dominguez S, Ricci S, Nadel A, Moscovici M, Voliotis D, Llovet JM.** Relationship between baseline hepatic status and outcome, and effect of sorafenib on liver function: SHARP trial subanalyses. *Journal of Hepatology.* 2012, Bd. 56, S. 1080-1088.
13. **Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet JM, Meyer T, Nault JC, Neumann U, Ricke J, Sangro B, Schirmacher P, Verslype C, Zech CJ, Arnold D, Martinelli E.** Hepatocellular carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2018, Bd. 29(4), S. 238-255.
14. **Marrarero A, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, Roberts LR, Heimbach JK.** Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018, Bd. 68 (2), S. 723-750.
15. **European Association for the Study of the Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer.** EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. 2012, Bd. 56(4), S. 908-943.
16. **Lee Y-S, Seo YS, Kim JH, Lee J, Kim HR, Yoo YJ, Kim TS, Kang SH, Suh SJ, Joo MK, Jung YK, Lee BJ, Yim HJ, Yeon JE, Kim JS, Park JJ, Um SH, Bak Y-T, Byun KS.** Can more aggressive treatment improve prognosis in patients with hepatocellular carcinoma? A direct comparison of the Hong Kong Liver Cancer and Barcelona Clinic Liver Cancer algorithms. *Gut and Liver.* Januar 2018, Bd. 12(1), S. 94-101.
17. **Yau T, Tang VYF, Ya TJ, Fan ST, Lo CM, Poon RTP.** Development of Hong Kong Liver Cancer Staging System with treatment stratification for patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2014, Bd. 146, S. 1691-1700.
18. **Maida M, Orlando E, Camma C, Cabibbo G.** Staging systems of hepatocellular carcinoma: a review of literature. *World Journal of Gastroenterology.* 2014, Bd. 20(15), S. 4141-4150.

19. **Lui P-H, Hsu C-Y, Hsia C-Y, Lee Y-H, Su C-W, Huang Y-H, Lee F-Y, Lin H-C, Huo T-I.** Prognosis of hepatocellular carcinoma: assessment of eleven staging systems. *Journal of Hepatology*. 2016, Bd. 64, S. 601-608.
20. **Kinoshita A, Onoda H, Fushiya N, Koike K, Nishino H, Tajiri H.** Staging systems for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *World Journal of Hepatology*. 2015, Bd. 7(3), S. 406-424.
21. **Goyal L, Zheng H, Abrams TA, Miksad R, Bullock AJ, Allen JN, Yurgelun MB, Clark JW, Kambadakone A, Muzikansky A, Knowles M, Galway A, Afflitto AJ, Dinicola CF, Regan E, Hato T, Mamessier E, Shigeta K, Jain RK, Duda DG, Zhu AX.** A phase II and biomarker study of sorafenib combined with modified FOLFOX in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*. Januar 2019, Bd. 25(1), S. 80-89.
22. **Rehm VA.** Angiopoietin-2 als Serummarker zur Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms und der Leberzirrhose. *Dissertation an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin*. 2009.
23. **CLIP investigators group.** A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology*. 1998, Bd. 28, S. 751-755.
24. **Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K.** Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer*. August 1985, Bd. 15(4), S. 918-928.
25. **Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PM, Gores GJ, Langer B, Perrier A.,** Recommendations for liver transplantation for liver carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncology*. 2012, Bd. 13, S. e11-22.
26. **Bang A, Dawson LA.** Radiotherapy for HCC: ready for prime-time? *JHEP Reports*. 2019, Bd. 1, S. 131-137.
27. **Couri T, Pillai A.** Goals and targets for personalized therapy for HCC. *Hepatology International*. März 2019, Bd. 13(2), S. 125-137.
28. **Vilgrain V, Pereira H, Assenat E, Guiu B, Ilonca AD, Pageaux GP, Sibert A, Bouattour M, Lebtahi R, Allaham W, Barraud H, Laurent V, Mathias E, Bronowicki JP, Tasu JP, Perdrisot R, Silvain C, Gerolami R, Mundler O, Seitz JF, Vidal V, Aube C, Oberti F, Couturier O, Bernot-Rossi I, Raoul JL, Sarran A, Costentin C, Itti E, Luciani A, Adam R, Lewin M, Samual D, Ronot M, Dinut A, Castera L, Chatellier G.** Efficacy and safety of selective internal radiotherapy with yttrium-90 resin microspheres compared with sorafenib in locally advanced and inoperable hepatocellular carcinoma (SARAH): an open label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncology*. 2017, Bd. 18, S. 1624-1636.

29. **Chow PKH, Gandhi M, Tan SB, Khin MW, Khasbazar A, Ong J, Choo SP, Cheow PC, Chotipanich C, Lim K, Lesmana LA, Manuaba TW, Yoong BK, Raj A, Law CS, Cua IHY, Lobo RR, Teh CSC, Kim YH, Jong YW, Han HS, Bae SH, Yoon HK, Lee RC, Hung CF, Peng CY, Liang PC, Bartlett A, Kok KYY, Thng CH, Low ASC, Goh ASW, Tay KH, Lo RHG, Goh BKP, Ng DCE, Lekurwale G, Liew WM, GebSKI V, Mak KSW, Soo KC.** SIRveNIB: Selective Internal Radiation versus Sorafenib in Asia-Pacific patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. Juli 2018, Bd. 36, S. 1913-1921.
30. **Ricke J, Bulla K, Kollings F, Peck-Radosavljevic M, Reimer P, Sangro B, Schott E, Schütte K, Verslype C, Walecki J, Malfertheiner P.** Safety and toxicity of radioembolization plus Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: analysis of the european multicentre trial SORAMIC. *Liver International*. 2015, Bd. 35, S. 620-626.
31. **Reig M, Gomes da Fonseca L, Faivre S.** New trials and results in systemic treatment of HCC. *Journal of Hepatology*. März 2018, Bd. 69, S. 525-533.
32. **Keating GM.** Sorafenib: a review in hepatocellular carcinoma. *Targeted Oncology*. März 2017, Bd. 12, S. 243-253.
33. **Llovet JM, Ricci S, Mazzafero V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondo L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J.** Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*. Juli 2008, Bd. 359, S. 378-390.
34. **Reig M, Torres F, Rodriguez-Lop, Forner A, Llarch N, Rimola J, Darnell A, Rios J, Ayuso C, Bruix J.** Early dermatologic adverse events predict better outcome in HCC patients treated with sorafenib. *Journal of Hepatology*. 2014, Bd. 61, S. 318-324.
35. **Zhu AX, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, Kudo M.** Ramucirumab in advanced hepatocellular carcinoma in REACH-2: the true value of  $\alpha$ -fetoprotein. *The Lancet Oncology*. 2019, Bd. 20(4), S. e191.
36. **Forner A, Reig M, Bruix J.** Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*. April 2018, Bd. 391, S. 1301-1314.
37. **Berzigotti A.** Advances and challenges in cirrhosis and portal hypertension. *BMC Medicine*. November 2017, Bd. 15(1), 200.
38. **Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F.** The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*. 2013, Bd. 58, S. 593-608.
39. **Wiegand T, Berg T.** Ätiologie, Diagnose und Prävention einer Leberzirrhose- Teil 1 der Serie zur Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt*. 2013, Bd. 110(6), S. 85-91.

40. **Bocca C, Novo E, Miglietta A, Parola M.** Angiogenesis and fibrogenesis in chronic liver diseases. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2015, Bd. 1(5), S. 477-488.
41. **Agné C, Lankisch T.** Leberzirrhose und ihre Komplikationen. [Hrsg.] MP Manns und S Schneidewind. *Praxis der Hepatologie*. s.l. : Springer, Berlin, Heidelberg, 2016, S. 259-266.
42. **Krawczyk M, Zimmermann S, Hess G, Holz R, Dauer M, Raedle J, Lammert F, Grünhage F.** Panel of three novel serum markers predicts liver stiffness and fibrosis stage in patients with chronic liver disease. *PLoS ONE*. 2017, Bd. 12(3), S. e0173506.
43. **D'Amico G, Pasta L, Morabito A, D'Amico M, Caltagirone M, Malizia G, Tine F, Giannuoli G, Traina M, Vizzini G, Politi F, Luca A, Virdone R, Licata A, Pagliaro L.** Competing risks and prognostic stages of cirrhosis: a 25-year inception cohort study of 494 patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2014, Bd. 39, S. 1180-1193.
44. **Sauerbruch T, Appenrodt B, Schmitz V, Spengler U.** Konservative und interventionelle Therapie der Komplikationen bei Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt*. Februar 2013, Bd. 110 (8), S. 126-132.
45. **Deutsche Stiftung Organtransplantation.** [Online] [Zitat vom: 11. 12 2017.] <https://www.dso.de/home.html>.
46. **Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkist C, Colle I, Van Vlierberghe H.** Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver International*. Februar 2011, Bd. 31(2), S. 146-162.
47. **Morse MA, Sun W, Kim R, He AR, Abada PB, Mynderse M, Finn RS.** The role of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*. Februar 2019, Bd. 25, S. 912-920.
48. **Sertoglu E, Omma A, Yucel C, Colak S, Can S, Ozgurtas S, Ozgurtas T.** The relationship of serum VEGF and sVEGFR-1 levels with vascular involvement in patients with Behcet's disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2018, Bd. 87(6), S. 443-449.
49. **Dewerchin M, Carmeliet P.** Placental growth factor in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2014, Bd. 18(11), S. 1339-1354.
50. **Toson ESA, Shiha GE, Abdelgaleel AE.** Fibrogenic/ angiogenic linker for non-invasive assessment of hepatic fibrosis staging in chronic hepatitis C among egyptian patients. *Annals of Hepatology*. November-Dezember 2017, Bd. 16(6), S. 862-873.
51. **Novikova MV, Khromova NV, Kopnin PB.** Components of the hepatocellular carcinoma microenvironment and their role in tumor progression. *Biochemistry (Moscow)*. 2017, Bd. 83(8), S. 861-873.

52. **Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK.** HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*. Mai 2011, Bd. 8(5), S. 292-301.
53. **Muto J, Shirabe K, Sugimachi K, Maehara Y.** Review of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 2015, Bd. 45, S. 1-9.
54. **Atta MM, Atta HM, Gad MA, Rashed LA, Said EM, Hassanien Sel-S, Kaseb AO.** Clinical significance of vascular endothelial growth factor in hepatitis C related hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. 2016, Bd. 3, S. 19-24.
55. **Ho MC, Chen CN, Lee H, Hsieh FJ, Shun CT, Chang CL, Lai YT, Lee PH.** Placental growth factor not vascular endothelial growth factor A or C can predict the early recurrence after radical resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*. 2007, Bd. 250(2), S. 237-249.
56. **Zhu AX, Ancukiewicz M, Supko JG, Sahani DV, Blaszkowsky LS, Meyerhardt JA, Abrams TA, Jackson McCleary N, Bhargava P, Muzikansky A, Sheehan S, Regan E, Vasudev E, Knowles M, Fuchs CS, Ryan DP, Jain RK, Duda DG.** Efficacy, safety, pharmacokinetics, and biomarkers of cediranib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *Clinical Cancer Research*. 2013, Bd. 19(6), S. 1557-1566.
57. **Nagaoka S, Yoshida T, Akiyoshi J, Akiba J, Hisamoto T, Yoshida Y, Abe M, Koga H, Toirimura T, Ueno T, Sata M.** The ratio of serum placental growth factor to soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 predicts the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*. 2010, Bd. 23, S. 1647-1654.
58. **Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL.** Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet*. Februar 2016, Bd. 388, S. 518-529.
59. **Myers I.** Improved survival of patients with HCC through new therapeutic options and the use of multimodal therapy concepts: data from a large German university hospital. *Dissertation an der Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin*. 2014.
60. **R&DSystems™.** For the quantitative determination of human placenta growth factor (PlGF) concentrations in cell culture supernates, serum, plasma, and urine. *Quantikine® ELISA Human PlGF Immunoassay (Technical Datasheet)*. 2014.
61. —. For the quantitative determination of human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma. *Quantikine® ELISA Human VEGF Immunoassay (Technical Datasheet)*. 2015.
62. —. For the quantitative determination of human soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF R1) concentrations in cell culture supernates, cell lysates, serum, plasma, sa. *Quantikine® ELISA Human VEGF R1/Flt-1 Immunoassay (Technical Datasheet)*. 2015.

63. **Zwiener I, Blettner M, Hommel G.** Überlebenszeitanalyse, Teil 15 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. *Deutsches Ärzteblatt*. März 2011, Bd. 108(10), S. 163-169.
64. **Wallace MC, Preen D, Jeffrey GP, Adams LA.** The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2015, Bd. 9:6, S. 765-779.
65. **Kitai S, Kudo M, Izumi N, Kaneko S, Ku Y, Kokudo N, Sakamoto M, Takayama T, Nakashima O, Kadoya M, Matsuyama Y, Matsunaga T.** Validation of three staging systems for hepatocellular carcinoma (JIS score, biomarker-combined JIS score and BCLC system) in 4649 cases from a Japanese nationwide survey. *Digestive Diseases*. 2014, Bd. 32, S. 717-724.
66. **Li JW, Goh BG, Chang P-E, Tan C-K.** Barcelona Clinic Liver Cancer outperforms Hong Kong Liver Cancer staging of hepatocellular carcinoma in multiethnic Asians: real-world perspective. *World Journal of Gastroenterology*. 2017, Bd. 23(22), S. 4054-4063.
67. **National Institute of Health.** Liver and bile duct cancer- health professional version. *National Cancer Institute*. [Online] 2017. [Zitat vom: 22. November 2017.] <https://www.cancer.gov/types/liver/hp>.
68. **Cabibbo G, Enea M, Attanasio, Bruix J, Craxì, Cammà C.** A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010, Bd. 51, S. 1274-1283.
69. **Cillo U, Vitale A, Grigoletto F, Farinati F, Brolese A, Zanusi G, Neri D, Boccagni P, Srsen N, D'Amico F, Ciarleglio FA, Brida A, D'Amico DF.** Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *Journal of Hepatology*. 2006, Bd. 44, S. 723-731.
70. **Kirstein M, Schweitzer N, Lappas K, Winter T, Manns M, Vogel A.** Treatment strategies in patients with hepatocellular carcinoma in a real-life cohort. *Journal of Clinical Oncology*. 2016, Bd. 34, S. 15630.
71. **LLovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J, Gores GJ.** Targets and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *Journal of National Cancer Institute*. 2008, Bd. 100, S. 689-711.
72. **Zhang W, Kim R, Quintini C, Hashimoto K, Fujiki M, Diago T, Eghtesad B, Miller C, Fung J, Tan A, Narayanan Menon KV, Aucejo F.** Prognostic role of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation. *Liver Transplantation*. September 2015, Bd. 21, S. 101-111.
73. **Kaseb AO, Hassan MM, Lin E, Xiao L, Kumar V, Pathak P, Lozano R, Rashid A, Abbruzzese JL, Morris JS.** V-CLIP: Integrating plasma endothelial growth factor into a new

scoring system to stratify patients with advanced hepatocellular carcinoma for clinical trials. *Cancer*. 2011, Bd. 117, S. 2478-2488.

74. **Farinati F, Vanin V, Giacomini A, Pozzan C, Cillo U, Vitale A, Di Nolfo AM, Del Poggio P, Benvegna L, Rapaccini G, Zoli M, Borzio F, Giannini EG, Trevisani F.** BCLC stage B hepatocellular carcinoma and transcatheter arterial chemoembolization: a 20-year survey by the Italian Liver Cancer Group. *Liver International*. 2015, Bd. 35, S. 223-231.

75. **Vitale A, Morales RR, Zanusi G, Farinati F, Burra P, Angeli P, Frigo AC, Del Poggio P, Rapaccini G, Di Nolfo MA, Benvegna L, Zoli M, Borzio F, Giannini EG, Caturelli E, Chiaramonte M, Trevisani F, Cillo U.** Barcelona Clinic Liver Cancer staging and transplant survival benefit for patients with hepatocellular carcinoma: a multicentre, cohort study. *The Lancet Oncology*. 2011, Bd. 12, S. 654-662.

76. **Adhoute X, Penaranda G, Bronowicki J-P, Raoul J-L.** Usefulness of the HKLC vs BCLC staging system in a European HCC cohort. *Journal of Hepatology*. 2015, Bd. 62, S. 492-501.

77. **Sohn JH, Duran R, Zhao Y, Fleckenstein F, Chapiro J, Sahu S, Scherthaner RE, Qian T, Lee H, Zhao L, Hamilton J, Frangakis C, Lin MD, Salem R, Geschwind J-F.** Validation of the Hong Kong Liver Cancer Staging System in determining prognosis of the North American patients following intra-arterial therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2017, Bd. 15, S. 746-755.

78. **Gamil M, Alboraie M, El-Sayed M, Elsharkawy A, Asem N, Elbaz T, Mohey M, Abbas B, Mehrez M, Esmat G.** Novel cores combining AFP with non-invasive markers for prediction of liver-fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Journal of Medical Virology*. 2018, Bd. 90, S. 1080-1086.

79. **Yvamoto EY, Ferreira RF, Nogueira V, Pinhel MAS, Tenani GD, Andrade JGSC, Baitello MEL, Gregorio ML, Fucuta PS, Silva RF, Souza DRS, Silva RCMA.** Influence of vascular endothelial growth factor and alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma. *Genetics and Molecular Research*. Dezember 2015, Bd. 14(4), S. 17453-17462.

80. **Llovet JM, Pena CEA, Lathia CD, Shan M, Meinhardt G, Bruix J.** Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2012, Bd. 18(8).

81. **Kaseb AO, Morris JS, Hassan MM, Siddiqui AM, Lin E, Xiao L, Abdalla EK, Vauthery J-N, Aloia TA, Krishnan S, Abbruzzese JL.** Clinical and prognostic implications of plasma Insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2011, Bd. 29, S. 3892-3899.

82. **Zhu AX, Chen D, He W, Kanai M, Voi M, Chen L-T, Daniele B, Furuse J, Kang Y-K, Poon RTP, Vogel A, Chiang DY.** Integrative biomarker analyses indicate etiological variations in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2016, Bd. 65, S. 296-304.

83. **Salcedo Mora X, Sanz-Cameno P, Medina J, Martín-Vílchez S, García-Buey, Borque MJ, Moreno-Otero R.** Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas*. 2005, Bd. 97(10), S. 699-706.
84. **Mukozy T, Nagai H, Matsui D, Kanekawa T, Sumino Y.** Serum VEGF as a tumor marker in patients with HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*. 2013, Bd. 33, S. 1013-1022.
85. **Cao G, Li X, Qin C, Li J.** Prognostic value of VEGF in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib: a meta-analysis. *Medical Science Monitor*. 2015, Bd. 21, S. 3144-3151.
86. **Schönleber SJ, Kurtz DM, Talwalkar JA, Roberts LR, Gores GJ.** Prognostic role of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 2009, Bd. 100, S. 1385-1392.
87. **Zhan P, Qian Q, Yu LK.** Serum VEGF level is associated with the outcome of patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*. 2013, Bd. 2(4), S. 209-215.
88. **Youssef AA, Issa HA, Omar MZ, Behiry EG, Elfallah AA, Hasaneen A, Darwish M, Ibrahim DB.** Serum human endothelial cell-specific molecule-1 (endocan) and vascular endothelial growth factor in cirrhotic HCV patients with hepatocellular carcinoma as predictors of mortality. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2018, Bd. 11, S. 431-438.
89. **Boige V, Malka D, Bourredjem A, Dromain C, Baey C, Jacques N, Pignon JP, Vimond N, Bouvet-Forteau N, De Baere T, Ducreux M, Farace F.** Efficacy, safety and biomarkers of single-agent bevacizumab therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *The Oncologist*. Juni 2012, Bd. 17, S. 1063-1072.
90. **Deli G, Jin C-H, Mu R, Yang S, Liang Y, Chen D, Makuuchi M.** Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues. *World Journal of Gastroenterology*. 2005, Bd. 11(7), S. 960-963.
91. **Xu H-X, Zhu XD, Zhuang PY, Zhang JB, Zhang W, Kong LQ, Wang WQ, Liang Y, Wu WZ, Wang L, Fan J, Tang ZY, Sun HC.** Expression and prognostic significance of placental growth factor in hepatocellular carcinoma and peritumoral liver tissue. *International Journal of Cancer*. 2011, Bd. 128, S. 1559-1569.
92. **Zhu AX, Finn RS, Mulcahy M, Gurtler J, Sun W, Schwartz JD, Dalal RP, Joshi A, Hozak RR, Xu Y, Ancukiewicz M, Jain RK, Nugent FW, Duda DG, Stuart K.** A phase II and biomarker study of ramucirumab, a human monoclonal antibody targeting the VEGF receptor-2, as first-line monotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*. Dezember 2013, Bd. 19(23), S. 6614-6623.

93. **Ronald J, Nixon AB, Marin D, Gupta RT, Janas G, Chen W, Suhocki PV, Pabon-Ramos W, Sopko DR, Starr MD, Brady JC, Hurwitz HI, Kim CY.** Pilot evaluation of angiogenesis signaling factor response after transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Radiology*. Oktober 2017, Bd. 285(1), S. 311-318.
94. **Shibuya M.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti-and pro-angiogenic therapies. *Genes & Cancer*. 2011, Bd. 2(12), S. 1097-1105.
95. **Heindryckx F, Coulon S, Terrie E, Cesteleyn C, Stassen J-M, Geerts A, Libbrecht L, Allenmeerch J, Cermeliet P, Colle I, Van Vlierberghe H.** The placental growth factor as a target against hepatocellular carcinoma in a diethylnitrosamine-induced mouse model. *Journal of Hepatology*. 2013, Bd. 58, S. 319-328.
96. **Hoff PM, Machado KK.** Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012, Bd. 38, S. 825-833.

## 10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Astrid Wendt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Korrelation von *placental growth factor*, *vascular endothelial growth factor* und *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1* im Serum mit Tumorstadien und Prognose des hepatozellulären Karzinoms“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

## **11 Lebenslauf**

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

## 12 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater PD Dr. Tobias Müller für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung sowie für seine konstruktive Kritik.

Mein besonderer Dank gilt auch Professor Eckart Schott, der die Arbeit erst möglich machte und mich in jeder Bearbeitungsphase unterstützte und wissenschaftlich und methodisch begleitete.

Barbara Malik vom Forschungsbereich der Medizinischen Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie des Campus Virchow-Klinikum danke ich für ihre professionelle Mitarbeit und Beratung bei den Bestimmungen der Serumwerte.

Murat Karaman danke ich für die statistische Beratung.

Außerdem danke ich Professor Werner Kratz für das ausführliche und sehr hilfreiche Korrekturlesen.

Dr. Peter Kratz danke ich ebenfalls für das gründliche Korrekturlesen und für seine stetige Unterstützung.