

**Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Teupser**

**Frühzeitige Beurteilung des Ansprechens einer
TACE-Therapie
bei Patienten
mit hepatozellulärem Karzinom
mittels zirkulierender Nukleosomen**

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

vorgelegt von

Nikolaus Josef Kohles

aus Lichtenfels

2013

**Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Stefan Holdenrieder

**Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Lars Lindner
Prof. Dr. Gerd Sauter**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2013

Meinen Eltern gewidmet

Vorveröffentlichungen:

Originalarbeiten:

Kohles N, Nagel D, Jüngst D, Durner J, Stieber P, Holdenrieder S.

The course of circulating nucleosomes in liver cancer patients undergoing transarterial chemoembolization therapy.

In Gahan P. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, Springer 2011; 1st edition: 73-77.

Kohles N, Nagel D, Jüngst D, Durner J, Stieber P, Holdenrieder S.

Relevance of circulating nucleosomes and oncological biomarkers for predicting response to transarterial chemoembolization therapy in liver cancer patients.

BMC Cancer 2011; 11: 202.

Kohles N, Nagel D, Jüngst D, Durner J, Stieber P, Holdenrieder S.

Prognostic value of apoptotic and oncological biomarkers in liver cancer patients undergoing transarterial chemoembolisation therapy.

Tumor Biol 2012; 33: 33-40.

Stoetzer OJ, Wittwer C, Lehner J, Fahmueller YN, **Kohles N**, Fersching DM, Leszinski G, Roessner J, Holdenrieder S.

Circulating nucleosomes and biomarkers of immunogenic cell death as predictive and prognostic markers in cancer patients undergoing cytotoxic therapy.

Expert Opin Biol Ther 2012;12 Suppl 1: 217-224.

Kohles N, Nagel D, Jüngst D, Stieber P, Holdenrieder S.

Predictive value of immunogenic cell death biomarkers HMGB1, sRAGE and DNase in liver cancer patients receiving transarterial chemoembolisation therapy.

Tumor Biol 2012; in Review.

Beiträge auf internationalen Kongressen in Form von Abstracts:

- 10/2009** **37th Symposium of the International Society on Oncological BioMarkers (ISOBM), Amsterdam, Niederlande:**
Kohles N, Jüngst D, Durner J, Nagel D, Stieber P, Holdenrieder S.
Predictive and prognostic value of circulating nucleosomes and oncological biomarkers in liver cancer patients undergoing transarterial chemoembolisation therapy.
ISOBM 2009 Abstract Book; S. 129. (Poster)
- 11/2009** **6th Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS-VI), Hong Kong, SAR, China:**
Kohles N, Jüngst D, Durner J, Nagel D, Stieber P, Holdenrieder S.
Predictive and prognostic value of circulating nucleosomes and oncological biomarkers in liver cancer patients undergoing transarterial chemoembolisation therapy.
CNAPS 2009 Abstract Book; S. 70. (Poster)
- 09/2010** **38th Symposium of the International Society on Oncological BioMarkers (ISOBM), München, Deutschland:**
Kohles N, Jüngst D, Durner J, Nagel D, Stieber P, Holdenrieder S.
New predictive and prognostic biomarkers in liver cancer patients undergoing transarterial chemoembolisation therapy.
Tumor Biol 2010; 31 (S1): S98-99. (Poster)
- 10/2010** **Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Mannheim, Deutschland:**
Kohles N, Jüngst D, Durner J, Nagel D, Stieber P, Holdenrieder S.
New predictive and prognostic biomarkers in liver cancer patients undergoing transarterial chemoembolisation therapy.
Clin Chem Lab Med 2010; 48: A115-116. (Poster)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	HINTERGRUND	3
2.1	HEPATOZELLULÄRES KARZINOM	3
2.1.1	EPIDEMIOLOGIE	3
2.1.2	ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	3
2.1.3	PATHOLOGIE	5
2.1.4	KLINIK	6
2.1.5	DIAGNOSTIK	7
2.1.6	STAGING UND PROGNOSE	11
2.1.7	THERAPIE	15
2.1.8	SCREENING	24
2.2	ZELLTOD	24
2.2.1	APOPTOSE, AUTOPHAGISCHER ZELLTOD UND NEKROSE	24
2.2.2	PATHOGENESE DER APOPTOSE	26
2.2.3	WEITERE FORMEN DES ZELLTODS	30
2.2.4	ZELLTOD BEIM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM	31
2.2.5	ZELLTOD BEI CHEMOTHERAPIE UND TRANSARTERIELLER CHEMOEMBOLISATION	32
2.3	NUKLEOSOMEN	32
2.3.1	STRUKTUR	34
2.3.2	FUNKTION	35
2.3.3	METABOLISMUS UND ABBAU DER NUKLEOSOMEN	37
2.3.4	NUKLEOSOMEN IN DER KLINISCHEN DIAGNOSTIK	40
2.4	BIOMARKER	45
3	PATIENTEN UND METHODEN	51
3.1	PATIENTEN	51
3.2	TRANSARTERIELLE CHEMOEMBOLISATION	53
3.3	KLINISCHE BEWERTUNG DER THERAPIEFFIZIENZ	54
3.4	METHODEN	56
3.4.1	GEWINNUNG UND VORBEHANDLUNG DER BLUTPROBEN	56
3.4.2	QUANTIFIZIERUNG DER KONZENTRATION VON NUKLEOSOMEN	57
3.4.3	QUANTIFIZIERUNG DER WEITEREN BLUTPARAMETER	59
3.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	61
4	ERGEBNISSE	64
4.1	KINETIK DER BIOMARKER NACH TRANSARTERIELLER CHEMOEMBOLISATION	64
4.2	KORRELATION ZWISCHEN DEN EINZELNEN BIOMARKERN	72
4.3	KORRELATION ZWISCHEN DEN BIOMARKERN UND DEM THERAPIEANSPRECHEN	74
4.4	KORRELATION ZWISCHEN DEM THERAPIEANSPRECHEN IN DER BILDGEBUNG UND DEM GESAMTÜBERLEBEN	90
4.5	KORRELATION ZWISCHEN DEN BIOMARKERN UND DER EIN-JAHRESÜBERLEBENSRATE	91
4.6	KORRELATION ZWISCHEN DEN BIOMARKERN UND DEM GESAMTÜBERLEBEN	102
4.7	MULTIVARIATE ANALYSE	114
5	DISKUSSION	118

6	ZUSAMMENFASSUNG	137
7	LITERATURVERZEICHNIS	139
8	ANHANG	160
8.1	EINZELVERLÄUFE ALLER TRANSARTERIELLER CHEMOEMBOLISATIONEN	160
8.2	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	238
9	CURRICULUM VITAE	243
10	DANKSAGUNG	244

1 Einleitung

Jedes Jahr erhalten mehr als 600.000 Menschen die Diagnose eines hepatozellulären Karzinoms (HCC), womit das HCC weltweit das sechsthäufigste Karzinom darstellt. In den letzten Jahren steigt die Inzidenz zunehmend an [Parkin 2005]. Aufgrund der sehr spät auftretenden Symptomatik wird das HCC in 70 - 75 % der Fälle erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Daher ist eine kurative Therapie, wie die Leberteileresektion oder die Lebertransplantation, meist nicht mehr möglich. In diesen Fällen muss auf palliative Therapiemaßnahmen zurückgegriffen werden, wobei die transarterielle Chemoembolisation (TACE) eine häufig genutzte Therapieoption bei nicht kurablem hepatozellulärem Karzinom ist [Llovet 2008].

Die Therapieeffizienz der TACE wird derzeit mittels bildgebender Verfahren, wie Sonografie, Computer- oder Magnetresonanztomografie beurteilt. Die Bewertung des Therapieerfolges ist jedoch erst nach ein bis zwei Monaten in den bildgebenden Verfahren möglich. Zudem ist der Einsatz der radiologischen Geräte sehr teuer und die Beurteilung des Therapieansprechens stark untersucherabhängig.

Trotz der regionalen Applikation des Chemotherapeutikums bei einer TACE kommt es in über 50 % der Fälle zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie beispielsweise dem Postembolisationssyndrom mit Bauchschmerz, Ileus und Fieber [Bruix 2004].

Daher wäre es höchst wünschenswert, kostengünstige Laborparameter zur Verfügung zu haben, die vor bzw. frühzeitig nach Therapie eine Aussage über die Therapieeffizienz der TACE und das Survival des Patienten treffen können. So könnte man das therapeutische Konzept frühzeitig anpassen und Nebenwirkungen einer erfolglosen Therapie vermeiden.

Geeignete Labormarker für prädiktive und prognostische Aussagen könnten leberspezifische Funktions- und Syntheseparameter oder Zelltodprodukte sein, die im peripheren Blut des Patienten detektiert werden können. Diese Biomarker können Zeichen der Leberzellschädigung sowie ein Hinweis auf eine Immunreaktion sein.

Bei Tumoren ist das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelluntergang gestört und es kommt zu einer übermäßigen Zellproliferation. Aufgrund der übermäßigen Zellproliferation folgt auch vermehrt ein Absterben der Zellen. Während des Zelluntergangs,

insbesondere der Apoptose, werden Zelltodprodukte, wie beispielsweise Nukleosomen, freigesetzt. Die freigesetzten Nukleosomen werden anschließend von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert. Wird die Phagozytosekapazität überschritten, gelangen die freigesetzten Nukleosomen in die Blutzirkulation [Kerr 1994; Wyllie 1992]. Diese zirkulierenden Nukleosomen können mittels immunologischer Verfahren quantifiziert werden [Holdenrieder 2001 A]. In niedrigen Konzentrationen sind Nukleosomen auch bei gesunden Personen nachweisbar. Jedoch sind die Nukleosomenkonzentrationen in verschiedenen benignen und malignen Erkrankungen in höheren Konzentrationen messbar [Holdenrieder 2001 B]. Bei malignen Erkrankungen wurden erhöhte Nukleosomenkonzentrationen sowohl spontan als auch unter Radio- und Chemotherapie festgestellt und wurden hierbei auf ihren Nutzen als prädiktiver und prognostischer Marker bei Tumorbehandlungen untersucht. [Holdenrieder 2001 B; Kuroi 2001; Holdenrieder 2004 C; Kremer 2005; Müller 2006]. Vor allem bei Patienten mit einem Lungenkarzinom zeigen Nukleosomen großes Potential für die frühzeitige Einschätzung des Ansprechens einer systemischen Therapie [Holdenrieder 2004 C; 2006 B, 2008, 2009 B]. Dagegen wurden die Nukleosomen im Zusammenhang mit dem hepatozellulären Karzinom bisher nicht untersucht.

Diese Arbeit versucht zu klären, ob die Freisetzung von Nukleosomen und anderen Laborparametern innerhalb des ersten Tages nach einer transarteriellen Chemoembolisation frühzeitig die Effizienz der Therapie anzeigen und zugleich eine Prognose über das Survival des Patienten abgeben können. Dazu wurden Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom in eine prospektive Studie eingeschlossen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen untersucht:

1. Werden Nukleosomen und weitere Laborparameter im Verlauf der TACE nach einem typischen Muster freigesetzt?
2. Korrelieren die Nukleosomenwerte im Verlauf der Therapie mit anderen klassischen Biomarkern wie AFP, Leberenzymen, Cholestaseparametern und Pankreasenzymen?
3. Korrelieren die Nukleosomenkonzentrationen und die weiteren Laborparameter mit dem Therapieansprechen in den bildgebenden Verfahren?
4. Haben die Nukleosomenkonzentrationen und die weiteren gemessenen Laborparameter eine prognostische Bedeutung für das Überleben der Patienten?

2 Hintergrund

2.1 Hepatozelluläres Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zur Gruppe der primären Lebermalignome und ist mit 80-90 % die mit Abstand häufigste Entartung dieser Gruppe. Primäre Lebermalignome sind maligne Neoplasien, die von lebereigenen Zellen ausgehen. Des Weiteren gehören cholangiozelluläre Karzinome zu dieser Gruppe, welche mit 10-15 % am zweithäufigsten vorkommen. Selten findet man Gallengangszytadenokarzinome, Hepatoblastome, epitheloide Hämangioendotheliome, Angiosarkome, embryonale Sarkome, Rhabdomyosarkome und Lymphome [Hamilton 2000].

2.1.1 Epidemiologie

Das HCC ist weltweit bei Männern die fünfthäufigste Ursache für eine maligne Erkrankung, wohingegen das HCC bei Frauen an achter Stelle steht. Zudem ist es bei Männern die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache. Männer erkranken zwei- bis viermal so häufig an einem HCC wie Frauen. Der Altersgipfel liegt in den westlichen Ländern zwischen 60 und 70 Jahren. In Asien und Afrika tritt die maligne Erkrankung meist ein bis zwei Jahrzehnte früher auf. Hier liegt die Inzidenz des HCC bei 20-40/100000, in den westlichen Ländern dagegen bei unter 6/100000 [Mac Sween 2007; Parkin 2005]. In den letzten Jahren stieg die Inzidenz sowohl in Europa als auch in den USA an [El Serag 1999].

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die unterschiedliche regionale Verteilung des hepatozellulären Karzinoms ist auf die verschiedenen Risikofaktoren der Entstehung eines HCC zurückzuführen. Einer der Hauptrisikofaktoren des HCC ist die Hepatitis B-Virus-Erkrankung (HBV), welche vor allem in Asien und Afrika aufgrund des hohen Durchseuchungsgrades eine besondere Bedeutung hat. Die onkogene Wirkung des Virus beruht auf der Integration der viralen DNA in das humane Genom, was zu einer Instabilität der menschlichen DNA führt und Mutationen verursachen kann. [Wang 1990; Chami 2000]. Es existieren verschiedene HBV-Genotypen, welche unterschiedliches Potential in der Onkogenese des Leberzelltumors besitzen. So zeigt der HBV Genotyp C, vor allem aber der Subgenotyp Ce, ein hohes Risiko der Induktion eines Leberzellkarzinoms. Des Weiteren steigt das Risiko einer Tumorentwicklung bei Patienten mit hoher Viruslast [Chan 2008].

Das in den Regionen Afrikas und Asiens gehäuft vorkommende Mykotoxin Aflatoxin B1 erhöht ebenfalls das Risiko an einem HCC zu erkranken. Eine Ursache für die karzinogene

Wirkung des Aflatoxin B1 ist eine häufig vorkommende Mutation des p53 Gens, einem wichtigen Tumorsuppresorgen im Zellzyklus [Bressac 1991].

Auch das Hepatitis C-Virus (HCV) zählt zu den Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC. Das HCV entwickelt seine onkogene Wirkung z.B. über Proteininteraktionen, welche zur Inhibierung der Expression von p21, einem wichtigen Kontrollprotein im Zellzyklus, führen [Lee 2002]. Die zunehmende Ausbreitung des HCV ist ein Grund für die zunehmende Inzidenz des HCC in den westlichen Ländern. Die Veränderungen auf Zellebene durch HBV, HCV und Aflatoxin B1 führen alle zu erhöhtem Zellwachstum und können somit die Hepatokarzinogenese verursachen.

In den westlichen Ländern ist der chronische Alkoholabusus neben dem HCV eine der Hauptursachen für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms durch Wechselwirkungen mit zellulären Oxidationssystemen, DNA-Reperaturmechanismen sowie durch immunsuppressive Effekte. Auch die Leberzirrhose ist vermutlich durch eine unspezifische Erhöhung der zellulären Proliferationsrate für ein erhöhtes Risiko verantwortlich. Über 80 % der Patienten mit HCC leiden an einer Leberzirrhose [Schulte-Frohlinde 2006].

Weiterhin entwickeln Patienten mit einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) gehäuft ein HCC. Eine NASH entsteht vor allem durch Adipositas, Hypertonie, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus und kann zur Leberzirrhose führen [Bugianesi 2002].

Zu den weiteren Risikofaktoren gehören metabolische Erkrankungen, wie etwa die Hämochromatose, die Tyrosinämie, alpha-1-Antitrypsinmangel und der Morbus Wilson [Schulte-Frohlinde 2006].

Die Hepatokarzinogenese ist ein langjähriger, mehrstufiger Prozess, der mit einer chronischen Leberschädigung beginnt, welche meist durch chronische Hepatitiden, hereditäre Erkrankungen und Alkoholabusus bedingt ist. Im weiteren Prozess kommt es zu einem zirrhotischen Umbau der Leber, der als eine präkanzeröse Bedingung für die Entwicklung eines HCC anerkannt ist. Daraufhin entwickeln sich prämaligne Läsionen, wie dysplastische Foci, die kleiner als 0,1 cm sind, sowie dysplastische Knoten zwischen 0,1 und 2 cm Größe. Die nächsten beiden Stufen der Entwicklung bezeichnen Karzinome. Zunächst entstehen frühe, gut differenzierte HCC, die sich zu fortgeschrittenen, gering differenzierten HCC weiterentwickeln (Abbildung 1) [Kern 2007].

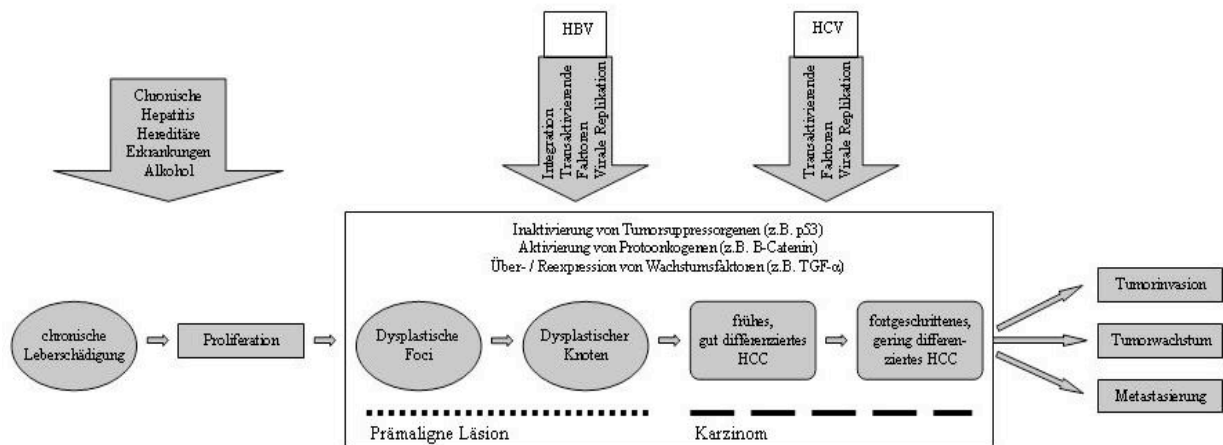


Abbildung 1 Karzinogenese des HCC (modifiziert nach [Kern 2007])

2.1.3 Pathologie

Hepatozelluläre Karzinome sind von Leberzellen ausgehende maligne epitheliale Entartungen mit einer großen Variationsbreite hinsichtlich ihrer makroskopischen und mikroskopischen Charakteristika. HCC können als solitäre oder multifokale Tumorknoten auftreten oder ein diffuses Wachstumsmuster zeigen. Die Ausbreitung des HCC erfolgt vor allem intrahepatisch durch Tumorzellaussaat. Ebenso kann es per continuitatem zu einer Infiltration von Portal- bzw. Lebervenenästen kommen, was zu einer Ausbildung von Tumorthromben führen kann. Seltener ist beim HCC eine hämatogene oder lymphogene Metastasierung zu beobachten. Extrahepatische Metastasierungen treten vor allem in der Lunge, im Skelett, in der Nebenniere, im zentralen Nervensystem und im Peritoneum auf, wobei auch andere Organe betroffen sein können. Lymphogene Metastasierungen finden sich vor allem in den regionalen peripankreatischen und hilusnahen Lymphknoten [Schulte-Frohlinde 2006].

Histologisch unterscheidet man beim HCC vier verschiedene Typen. Am häufigsten kommt der trabekuläre Typ vor, ein hoch differenzierter Tumor mit hepatozytenähnlichen Zellen, der in mehrschichtigen Zellbalken wächst. Der pseudoglanduläre und azinäre Typ, ebenfalls ein hoch differenzierter Tumor, bildet drüsenartige Strukturen aus und kommt meist in Kombination mit dem trabekulären Typ vor. Ein mäßig differenzierter Tumor ist der zirrrose Typ, der durch ein relativ zellarmes sklerosiertes Bindegewebe gekennzeichnet ist. Der solide oder kompakte Typ ist ein schlecht differenziertes Leberkarzinom mit erheblicher Zellpolymorphie, bei dem das trabekuläre Gewebemuster bereits aufgelöst ist. In den meisten Fällen weisen die Karzinome jedoch eine ausgesprochene intratumoröse Heterogenität der verschiedenen Typen auf [Tannapfel 2003].

Für die histopathologische Einteilung des hepatozellulären Karzinoms ist die Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) gebräuchlich. Hierbei sind vor allem

Tumorstadium, Anzahl der Herde, Gefäßinvasion, Größe und Beteiligung von Nachbarorganen von Bedeutung (Tabelle 1).

pT	Primärtumor
	TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	T0 Kein Anhalt für Primärtumor
	T1 Solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion
	T2 Solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder multiple Tumoren ≤ 5 cm
	T3 Multiple Tumoren > 5 cm oder Tumorinfiltration in einen größeren Ast der Leber- oder Portalvene(n)
T4 Kontinuierliche Tumorinfiltration in angrenzende Organe außer Gallenblase oder Tumorperforation des viszeralen Peritoneums	
pN	Regionäre Lymphknoten*
	NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1 Regionäre Lymphknotenmetastasen
pM	Fernmetastasen
	MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
	M0 Keine Fernmetastasen
	M1 Fernmetastasen
	Stadiengruppierung
	Stadium I T1 N0 M0
	Stadium II T2 N0 M0
	Stadium IIIA T3 N0 M0
	Stadium IIIB T4 N0 M0
	Stadium IIIC jedes T, N1 M0
	Stadium IV jedes T, jedes N, M1
	*Empfohlen wird die Untersuchung von mindestens 3 Lymphknoten; bei weniger isolierten, dabei negativen Lymphknoten soll eine Klassifikation pN0 erfolgen.

Tabelle 1 Histopathologische TNM-Klassifikation (modifiziert nach [Sobin 2009])

2.1.4 Klinik

Aufgrund der meist sehr spät auftretenden Symptomatik, wird das hepatozelluläre Karzinom bei 70-75 % der Patienten erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium erkannt. Bestehen bei den Patienten Symptome, so klagten diese vor allem über einen Leistungsknick und einen reduzierten Allgemeinzustand (60 %). Bei der Hälfte aller Patienten mit einem HCC kommt es zu Oberbauchschmerzen, Völlegefühl, Anorexie oder Gewichtsabnahme. 30 % der Patienten haben bis zu diesem Zeitpunkt einen Aszites entwickelt und in etwa 15-20 % der Fälle sieht man einen Ikterus [Schulte-Frohlinde 2006].

2.1.5 Diagnostik

Allein aufgrund klinischer Symptome ist ein HCC nicht zu diagnostizieren, da bei einer Leberzirrhose eine ähnliche Symptomatik auftreten kann. Daher ist es unerlässlich, weitere Diagnostik zu betreiben.

Die Biopsie mit histopathologischer Begutachtung des verdächtigen Leberrundherdes ist der Goldstandard zur Diagnose eines HCC. Diese ist aber nur in unklaren Fällen zur Sicherung der Diagnose indiziert, da bei 2-3 % der Patienten die Gefahr einer Metastasierung in den Stichkanal besteht [Silva 2008].

Bei der Diagnose des hepatozellulären Karzinoms spielt die Bildgebung eine entscheidende Rolle, was vor allem auf die Phänomene der arteriellen Hypervaskularisation und des venösen Washouts zurückzuführen ist. Diese beiden Phänomene beruhen auf der Tatsache, dass die Leber aus zwei Gefäßen, der Leberarterie (Arteria hepatica) und der Pfortader (Vena portae), versorgt wird. Gesundes Lebergewebe wird vor allem durch die Pfortader versorgt, wohingegen maligne Raumforderungen fast ausschließlich aus der Leberarterie versorgt werden. Daher kommt es bei einer Bildgebung mit einem Kontrastmittel in der arteriellen Phase zu einem stärkeren Signal des malignen Prozesses als im gesunden Lebergewebe, was als arterielle Hypervaskularisation bezeichnet wird. Dagegen reichert sich in der venösen Phase einer Bildgebung das Kontrastmittel vermehrt im normalen Lebergewebe an und das Tumorgewebe zeigt eine geringere Aufnahme des Kontrastmittels, was als Washout-Phänomen bezeichnet wird [Sherman 2010]. Jedoch können diese beiden Phänomene vor allem in kleineren Tumorerläsionen und bei gut differenzierten HCC fehlen. Weniger als 20 % der Patienten mit einem höchstens 3 cm großen und gut differenzierten Tumor zeigten in der CT-Untersuchung mit Kontrastmittel eine arterielle Hypervaskularisation mit anschließendem Washout [Yoon 2009].

Die drei Hauptpfeiler der Bildgebung des HCC sind die Sonographie, die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Als initiales bildgebendes Verfahren wird meist eine Sonographie durchgeführt, da diese schnell verfügbar und preiswert ist. Die Ultraschalluntersuchung ist aber stark untersucherabhängig und bei einer Leberzirrhose schwer zu beurteilen [Kolligs 2010]. Zudem zeigt das HCC in der Sonografie sehr unterschiedliche Verhaltensmuster. Kleine Tumore stellen sich häufig homogen und echoarm dar, große Tumorknoten hingegen inhomogen und echoreich [Yu 2004]. Ab einer Größe von 1 cm gilt ein im Ultraschall detektierter Knoten in der Leber als HCC verdächtig. Die Sensitivität der Sonografie liegt bei ungefähr 60 %, die Spezifität bei 97 % [Colli 2006]. Betrachtet man aber Tumorerläsionen kleiner als 2 cm, so sinkt die Sensitivität

auf 34,9 % [Snowberger 2007]. Aufgrund der arteriellen Hypervaskularisation hepatozellulärer Karzinome kann mit Hilfe eines Farbdopplers durch die Darstellung des Blutflusses sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität verbessert werden [Saar 2008]. Weiterhin können Sensitivität und Spezifität durch den Einsatz eines Kontrastmittels im Zusammenhang mit einer Ultraschalluntersuchung gesteigert werden. Dabei werden als Kontrastmittel gut verträgliche Gasbläschen („Microbubbles“) verwendet, die zu einer Veränderung des Reflexionsmusters im Gewebe führen. Bei dieser Art der Sonografie werden 3 Phasen unterschieden: eine arterielle Phase, in der die Stärke der Vaskularisation des Tumors festgestellt werden kann, eine portalvenöse Phase und eine späte Phase, in denen zwischen maligner und benigner Entität unterschieden werden kann [Claudon 2008]. Mit dieser Methode werden Sensitivitäten von bis zu 87 % erreicht [Pompili 2008].

Nach der Detektion eines HCC-verdächtigen Herdes in der Sonografie, wird zur weiteren Diagnostik ein MRT oder ein CT verwendet. Hierbei wird aufgrund seiner hohen Sensitivität von ungefähr 81 % bei einer Spezifität von 85 % [Colli 2006] ein MRT von Colli et al. als Schnittbildverfahren der ersten Wahl empfohlen. Das MRT profitiert von seinem hohen Weichteilkontrast. In der T2 gewichteten Aufnahme stellt sich das HCC hyperintens dar, in der T1 gewichteten Aufnahme zeigt es sich sehr heterogen [Yu 2004]. Bei der Feststellung der Tumorgröße zeigt sich das MRT dem CT und der Sonografie überlegen [Snowberger 2007]. Durch den Einsatz von Eisenoxiden oder dem Kontrastmittel Gadolinum kann die diagnostische Kapazität des MRT verbessert werden. Eisenoxide werden im gesunden Lebergewebe von Kupferzellen phagozytiert. Da die Kupferzellen im Tumorgewebe nicht vorhanden sind, können Eisenoxide bei der Unterscheidung von gesundem und malignem Lebergewebe helfen [Schulte-Frohlinde 2006]. Bei der dynamischen Bildgebung mit dem Kontrastmittel Gadolinum unterscheidet man vier verschiedene Phasen: 25 – 30 Sekunden nach Kontrastmittelgabe folgt die arterielle Phase, nach 60 – 90 Sekunden die venöse Phase, nach 120 – 150 Sekunden die interstitielle Phase und nach 5 Minuten die späte Phase. Durch die Verwendung von Gadolinum zeigt sich die typische arterielle Hypervaskularisation und das venöse Washout in den Tumoreläsionen des HCC [Ayyappan 2010].

Andere Gruppen favorisieren das multiphasische helikale CT (MPCT) als das bildgebende Verfahren der Wahl bei der Diagnose und dem Staging des hepatozellulären Karzinoms [Yu 2004; Lopez Hänninen 1998; Shapiro 1996]. Beim CT werden ebenfalls Kontrastmittel verwendet, wobei hier ebenfalls vier verschiedene Phasen unterschieden werden: eine Phase vor der Kontrastmittelgabe, eine arterielle Phase nach 25 Sekunden, eine portalvenöse Phase nach 70 Sekunden und eine späte Phase nach 300 Sekunden. Dabei zeigt das HCC die

typische arterielle Hypervaskularisation in der arteriellen Phase und das venöse Washout in der portalvenösen und späten Phase [Gomaa 2009]. Mit der MPCT erreicht man eine Sensitivität von bis zu 100 % bei Tumoren größer als 2 cm und bei Tumoren kleiner als 1 cm werden bis zu 60 % erreicht [Kim 1999]. Die Effektivität der CT ist abhängig von der Injektion des Kontrastmittels und Tumorfaktoren, wie Größe und Hypervaskularisation [Gomaa 2009]. In den letzten Jahren hat sich auch das CT durch die Multidetektor-CT (MDCT) verbessert. Bei der MDCT werden in der arteriellen Phase eine frühe und eine späte Phase unterschieden. Dieses bildgebende Verfahren hat bei Tumoren kleiner als 1 cm eine Detektionsrate von 90 bis zu 95 % [Zhao 2007]. Daher ist es vor allem zur Früherkennung gut geeignet.

Eine weitere Modalität zur Diagnosefindung eines HCC ist die Angiografie. Bei einer Tumorgöße kleiner als 5 cm hat sie eine Sensitivität von 82 % bis zu 93 % und eine Spezifität von 73 %. Bei Tumorgößen unter 2 cm sinken Sensitivität und Spezifität [Takayasu 1986; Sumida 1986]. Sie ist heutzutage nicht mehr zur Diagnose eines HCC indiziert, wird aber zur Vorbereitung auf interventionelle Therapieverfahren genutzt [Kolligs 2010].

Eine wichtige laborchemische diagnostische Maßnahme ist die Verlaufsbeobachtung des α_1 -Fetoprotein (AFP). Das α_1 -Fetoprotein ist ein 70 kDa Glykoprotein mit einer Halbwertszeit von fünf bis sieben Tagen, welches im Dottersack, in nicht differenzierten Leberzellen und im fetalen Gastrointestinaltrakt gebildet wird [Yao 2007]. Daher wird bei Neugeborenen ein erhöhter AFP-Wert gemessen, der innerhalb der ersten 12 Monate wieder abfällt [Adinolfi 1975]. Auch bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom werden erhöhte Werte des α_1 -Fetoprotein gemessen, welche jedoch nicht spezifisch für das HCC sind. Patienten mit benignen Lebererkrankungen, Lebermetastasen oder nicht seminotösen Keimzelltumoren des Hoden können auch erhöhte AFP-Serumkonzentrationen aufweisen. In den bisher durchgeführten Studien variierten die Sensitivitäten von 39 % bis 65 % und die Spezifitäten von 76 % bis 94 % [Daniele 2004]. Daher ist die diagnostische Spezifität des Tumormarkers eingeschränkt und als alleiniges Diagnosekriterium ungeeignet [Okuda 1999]. Jedoch wird der Einsatz des AFP in Kombination mit der Bildgebung von der NACB (National Academy of Clinical Biochemistry) zum Screening von Hochrisikopatienten und zur Diagnose des HCC empfohlen: So sollte bei Patienten mit Leberzirrhose, HBV- und HCV-Infektion alle sechs Monate eine Screeninguntersuchung mit Sonografie und AFP-Bestimmung durchgeführt werden [Sturgeon 2010]. Laut den AASLD (American Association for the Study of Liver

Diseases) Richtlinien von 2005 sichert ein AFP über 200 ng/ml und ein positiver Befund in der Bildgebung die Diagnose eines HCC [Bruix 2001]. Neben Screening und Diagnose kann das AFP zudem als Verlaufsparemeter nach erfolgter Resektion oder Lebertransplantation verwendet werden, um ein Rezidiv frühzeitig zu erkennen. Hierfür sollten für zunächst zwei Jahre alle drei Monate und später alle sechs Monate die AFP-Werte bestimmt werden [Sturgeon 2010].

In den letzten Jahren wurden weitere Tumormarker entwickelt, zu denen die drei Parameter AFP-L3 (Lens culinaris agglutinin-reaktive Fraktion des α_1 -Fetoprotein), DCP (des-gamma-carboxyprothrombin) und GPC-3 (Glypican-3) zählen. Das AFP-L3 ist eine Isoform des AFP mit einer zusätzlichen Zuckerstruktur, welche stark an Lens culinaris agglutinin bindet. DCP ist eine abnormale Form des Prothrombin, bei der keine abschließende Carboxylierung der Prothrombin-Vorstufe stattgefunden hat. Dieser abschließende Vorgang fehlt aufgrund einer defekten Genexpression, welche gehäuft bei Patienten mit HCC auftritt [Carr 2007]. In einer Metaanalyse von Tateishi et al. aus dem Jahr 2008 zeigten sich beide Parameter dem AFP überlegen. Vor allem kleine Tumore sind damit besser zu detektieren. Zusätzlich kann das AFP-L3 besser maligne sowie benigne Prozesse unterscheiden [Tateishi 2008], und eine höhere AFP-L3-Fraktion weist auf einen weniger differenzierten sowie weiter fortgeschrittenen Tumor hin [Kumuda 1999]. Bei einem cut-off von 15 % erreicht dieser Marker eine Sensitivität von 75 % bis zu 97 % und eine Spezifität von 90 % bis zu 92 % [Zhou 2006; Taketa 2002; Khien 2001]. Das DCP differenziert Patienten mit Zirrhose und Patienten mit hepatozellulärem Karzinom mit einer Sensitivität von 86 % und einer Spezifität von 93 %. Durch eine Kombination von AFP und DCP kann die Effizienz der Tumormarker gesteigert werden [Volk 2007]. Zudem kann das DCP ebenfalls maligne und benigne Prozesse in der Leber signifikant unterscheiden [Lamerz 1999]. GPC-3 ist ein über Glycosylphosphatidylinositol in der Membran verankertes Protein, das sowohl im Gewebe als auch im Serum von Patienten mit HCC detektiert werden kann. Die drei neuen Tumormarker AFP-L3, DCP und GPC-3 sind aktuell noch nicht für den klinischen Einsatz geeignet, zeigen jedoch gute Ansätze und müssen in weiteren Studien auf ihre Tauglichkeit untersucht werden [Sturgeon 2010].

Die AASDL formulierte im Jahr 2005 folgende Diagnosekriterien: Bei Tumorknoten größer als 2 cm, die in einem bildgebenden Verfahren detektiert werden, sind entweder die typischen Verhaltensmuster in der Bildgebung, die arterielle Vaskularisation und das venöse Washout, oder ein AFP-Spiegel über 200 ng/ml zur Diagnose des HCC ausreichend. Sind diese

Kennzeichen nicht vorhanden oder besteht keine Leberzirrhose, wird eine Biopsie notwendig. Als bildgebende Verfahren sind die Sonographie, die CT und die MRT anerkannt. Bei Tumoren zwischen 1 und 2 cm sollten zwei bildgebende Verfahren in einer zirrhotischen Leber die typischen Charakteristika eines HCC zeigen, um die Diagnose zu sichern. Auch hier sollte bei einer nicht zirrhotischen Leber eine Biopsie erfolgen. Läsionen, die kleiner als 1 cm sind, sollten alle drei bis sechs Monate mit Hilfe einer Sonografie beurteilt werden [Bruix 2005].

Zur Verbesserung der bestehenden Diagnosemöglichkeiten, vor allem der frühzeitigen Detektion kleiner Tumorherde, werden vermehrt genetische Besonderheiten des HCC untersucht. Einige Gewebemerkmale wie zum Beispiel das Hitzeschockprotein 70 (HSP70), GPC-3 [Capurro 2003], Telomerase Reverse Transcriptase (TERT), Serin/Threonin Kinase 15 (STK6) und Phospholipase A2 (PLAG12B) [Marrero 2004] wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion und Microarrays bereits entdeckt. In einer Studie mit 49 Patienten wurde das Zelloberflächenprotein Glypican-3 bei HCC Patienten mit einer Sensitivität von 83 % und einer Spezifität von 96 % nach einer Feinnadelaspiration mittels einer Immunzytochemie detektiert [Ligato 2008]. Ein 3-Marker-Panel mit Glypican-3, LYVE-1 und Survivin erreichte mit einer Sensitivität von 95 % und einer Spezifität von 94 % sehr gute Werte [Llovet 2006]. Bei einem weiteren 3-Marker-Panel mit GPC-3, Glutaminsynthetase und HSP70 ergibt sich eine Sensitivität für die Diagnose eines frühen HCC von 70 % bei einer Spezifität von 100 %, wenn mindestens 2 dieser Marker positiv sind. Jedoch sind in den kommenden Jahren weiterführende Untersuchungen notwendig, um diese Art der Diagnosefindung zu optimieren [Di Tommaso 2009].

2.1.6 Staging und Prognose

Zur Einteilung des hepatozellulären Karzinoms wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, aber das ideale Staging System ist bis heute noch nicht gefunden worden. Die bei anderen Tumoren übliche TNM-Einteilung ist beim HCC nicht geeignet, da wichtige Faktoren, wie Leberfunktion und Leberzirrhose fehlen. Die UICC hat anhand der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus und der Metastasierung eine Stadieneinteilung erstellt; allerdings berücksichtigt auch diese nicht die Leberfunktion [Edge 2010]. TNM- und UICC-Einteilung sind identisch mit der histopathologischen Klassifikation des HCC.

Im Jahr 1985 veröffentlichte Okuda et al. eine erste klinische Stadieneinteilung unter Berücksichtigung des Ausmaßes des Leberbefalls und der funktionellen Parameter. Hierbei

können drei Stadien unterschieden werden. Die medianen Überlebenszeiten betragen für Stadium I 11 Monate, für Stadium II 3 Monate und für Stadium III 1 Monat.

Ab Ende der neunziger Jahre wurden weitere Staging Systeme in Italien [Farinati 2000], Spanien [Llovet 1999 A], Frankreich [Chevret 1999], Österreich [Schöniger-Hekele 2001] und Japan [Tateishi 2005] entwickelt. Die genannten Systeme sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

Alle genannten Staging Systeme wurden in mehreren größeren Studien untersucht, wobei keines für das gesamte Patientenkollektiv überzeugende Ergebnisse erreichte. Für Patienten in palliativer Situation ist der CLIP-SCORE (Clinic of the Liver Italian Program) empfehlenswert [Collette 2008; Camma 2008], den auch das American Joint Committee on Cancer (AJCC) für das primäre Staging empfiehlt [Henderson 2003]. Bei Patienten mit kurativem Therapieziel ist die Einteilung nach BCLC (Barcelona Clinic Liver Carcinoma) dem CLIP-SCORE überlegen [Cillo 2004; Camma 2008]. Die BCLC-Gruppe hat in Ihrem System auch den Allgemeinzustand des Patienten anhand des Performance-Status nach ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) integriert, bei dem in Abhängigkeit von Leistungsfähigkeit, Aktivitätszustand, Erfüllung von Alltagstätigkeiten sowie Hilfs- und Pflegebedürftigkeit dem Patienten einen Punktwert von 0 - 5 zugeteilt wird. Der Gegenpart des ECOG-Performance-Status ist der Karnofsky-Index, welcher die Patienten nach ihrem Leistungsstatus von 0 - 100 % einteilt [Ma 2010]. Der im Jahr 2005 von Tateishi et al. entwickelte Tokyo-Score zeigt sich vor allem bei Patienten in einem sehr frühen Stadium der Tumorerkrankung, die einer chirurgischen Resektion oder einer ablativen Therapie zugänglich sind, dem BCLC etwas überlegen. Dagegen ist der Tokyo-Score bei Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium weniger geeignet [Tateishi 2005]. Die weiteren zwei Staging Systeme GRETCH (Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire) [Chevret 1999] und VISUM (Vienna survival model for HCC) [Schöniger-Hekele 2001] sind den anderen unterlegen. In den nächsten Jahren ist eine Weiterentwicklung der bestehenden Staging Systeme nötig, um ein einheitliches System für alle Patienten mit hepatozellärem Karzinom zur Verfügung zu haben.

In Tabelle 4 werden die Prognosen der Patientengruppen anhand der verschiedenen Staging Systeme aufgezeigt. Hierbei wird deutlich, dass das hepatozelluläre Karzinom insgesamt eine sehr schlechte Prognose aufweist. Aufgrund der meist sehr späten Diagnose eines HCC, können in diesen Stadien nur palliative Therapiemaßnahmen durchgeführt werden. Durch die verschiedenen Patientenkollektive, die in den einzelnen Studien untersucht wurden, resultieren deutliche Unterschiede in den Überlebensdaten.

Klassifikation	Stadium	Kriterien
TNM	T1	Solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion
	T2	Solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder multiple Tumoren ≤ 5 cm
	T3	Multiple Tumoren > 5 cm oder Tumordinfiltration in einen größeren Ast der Leber- oder Portalvene(n)
	T4	Kontinuierliche Tumordinfiltration in angrenzende Organe außer Gallenblase oder Tumorperforation des viszerale Peritoneums
	N1	Regionale Lymphknotenmetastasierung
	M1	Fernmetastasen
UICC	I	T1 N0 M0
	II	T2 N0 M0
	IIIA	T3 N0 M0
	IIIB	T4 N0 M0
	IIIC	Jedes T, N1 M0
	IV	Jedes T, jedes N, M1
Okuda	I	0 Punkte
	II	1-2 Punkte
	III	3-4 Punkte
	Je 1 Punkt, wenn Tumor > 50 % des Lebervolumens, Aszites vorhanden, Bilirubin > 3 mg/dl, Albumin < 3 g/dl	
BCLC	A	ECOG 0
	A1-3	Okuda 1, solitärer Konoten
	A1	Wenn keine portale Hypertension und Bilirubin normal
	A2	Wenn portale Hypertension und Bilirubin normal
	A3	Wenn portale Hypertension und Bilirubin erhöht
	A4	Child-Pugh A oder B, Okuda I oder II, 2 oder 3 Knoten < 3 cm
	B	Child-Pugh A oder B Okuda I oder II ECOG 0 Multiple Tumorknoten, wenigstens einer ≥ 3 cm
	C	Child-Pugh A oder B Okuda I oder II ECOG 1-2 oder vaskuläre Invasion oder extrahepatische Ausbreitung
	D	Child-Pugh C Okuda III oder ECOG 3-4

Tabelle 2 Stadieneinteilungen nach TNM, UICC, Okuda und BCLC (modifiziert nach [Neuhaus und Wittekind 2007])

Klassifikation	Kriterien		Punkte
GRETCH	Karnofsky-Index (%)	≥ 80	0
		< 80	3
	Serumbilirubin (µmol/l = 17,1x[mg/dL])	< 50	0
		≥ 50	3
	Alkalische Phosphatase: Vielfaches des oberen Grenzwertes	≥ 2	0
		< 2	2
	AFP (µg/l = ng/ml)	< 35	0
		≥ 35	2
	Sonographisch bestimmte Portalobstruktion	Nein	0
		Ja	1
VISUM	Bilirubin (mg/dL)	≤ 2	0
		> 2	1
	Prothrombin-Zeit (%)	> 70	0
		≤ 70	1
	AFP (kU/L = 1,2 x [ng/ml])	≤ 125	0
		> 125	1
	Tumor im Verhältnis zur Leber	≤ 50 %	0
		> 50 %	1
	Vergrößerte Lymphknoten	Nein	0
		Ja	1
Pfortaderthrombose	Nein	0	
	Ja	1	
CLIP	Child-Pugh-Klassifikation	A	0
		B	1
		C	2
	Tumorausbreitung (klinisch)	≤ 50 % Befall, solitär	0
		≤ 50 % Befall, multiple	1
		> 50 % Leberbefall	2
	AFP	< 400 ng/ml	0
≥ 400 ng/ml		1	
Portalvenenthrombose (Stamm und/oder rechter oder linker Hauptast)	Nein	0	
	Ja	1	
Tokyo	Albumin (g/dl)	> 3,5	0
		2,8-3,5	1
		< 2,8	2
	Bilirubin (mg/dl)	< 1	0
		1-2	1
		> 2	2
	Tumorgröße (cm)	< 2	0
		2-5	1
		> 5	2
	Anzahl der Tumoren	≤ 3	0
> 3		2	

Tabelle 3 Stadieneinteilung nach, GRETCH, VISUM, CLIP-SCORE und Tokyo-Score (modifiziert nach [Neuhaus und Wittekind 2007; Schöniger-Hekele 2001])

Klassifikation	Punkte/Stadium	Überlebensrate (%)	Medianes Überleben (Mon.)
		1-JÜR	
Okuda	I	40-50	11
	II	15-20	3
	III	3	1
		3-JÜR	
BCLC	A	51	36,9
	B	27,9	13,8
	C	3,3	2,9
	D	2,6	1,6
		1-JÜR	
GRETCH	0	70-80	
	1-5	30-35	
	6-11	4-7	
VISUM	0-2		15,2
	3		7,2
	4-6		2,9
		3-JÜR	
CLIP-SCORE	0	75	31
	1	68	27
	2	32	13
	3	22	8
	4	0	2
	5	0	2
		5-JÜR	
Tokyo-Score	0	78,7	
	1	62,1	
	2	40	
	3	27,7	
	4-6	14,3	

Tabelle 4 Überlebensraten und medianes Überleben nach den einzelnen Staging Systemen für das hepatozelluläre Karzinom (modifiziert nach [Neuhaus und Wittekind 2007; Wang 2008; Schöniger-Hekele 2001])

2.1.7 Therapie

Eine Heilung des hepatozellulären Karzinoms ist grundsätzlich nur durch vollständige Entfernung oder Zerstörung des Tumors möglich, was vor allem durch chirurgische Maßnahmen wie Tumorresektion oder Lebertransplantation (LTX) erzielt werden kann. Bei einigen Patienten ist es allerdings auch durch lokale Therapieverfahren, wie beispielsweise der Radiofrequenzablation (RFA), gelungen, eine komplette Tumornekrose zu erreichen

[Llovet 2008]. Jedoch ist bei etwa 70-75 % der HCC-Patienten wegen der meist erst späten Diagnosestellung keine chirurgische Therapie mehr möglich. Diese Patienten können nur mit palliativen Maßnahmen behandelt werden, um das Fortschreiten der Krankheit zu verzögern und die Symptome zu verringern. Zu diesen Verfahren zählen vor allem die RFA, die perkutane Ethanolinjektion (PEI) und die transarterielle Chemoembolisation (TACE). Wenn auch diese Maßnahmen nicht mehr möglich sind, beziehungsweise vom Patienten nicht gewünscht werden, können auch medikamentöse Therapien, wie der Multikinaseinhibitor Sorafenib (Nexavar®), zum Einsatz kommen.

Leberresektion

Die Therapie der Wahl bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom ist die vollständige Resektion des Tumors. Die Tumorsektion ist jedoch nicht nur durch die Größe des Tumors limitiert, sondern auch durch die meist verminderte Leberfunktion. Schon bei Erstdiagnose ist die Leberfunktion durch die vorhandene Leberzirrhose häufig eingeschränkt. Da bei ausgeprägter Leberzirrhose postoperative Komplikationen, wie akutes Leberversagen, häufig auftreten, sollte bei Patienten mit zirrhotischer Leber eine genaue Selektion erfolgen und eine optimale postoperative Überwachung gewährleistet sein [Llovet 2003 A]. Die höchsten Überlebensraten nach Resektion zeigen Patienten mit solitären Tumoren, fehlender Gefäßinfiltration und Child-Pugh Stadium A (Tabelle 5), das einer guten Leberfunktion entspricht [Arii 2000; Llovet 1999 B].

Kriterium	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	Einheit
Serum-Bilirubin (gesamt)	<2,0	2,0 - 3,0	>3,0	mg/dl
Serum-Albumin	>3,5	2,8 - 3,5	<2,8	g/dl
INR	<1,7	1,7 - 2,2	>2,2	
Aszites im Ultraschall	keiner	leicht	mittelgradig	
hepatische Enzephalopathie	keine	Stadium I-II	Stadium III-IV	
Child-Pugh Stadium	Punkte			
A	5-6			
B	7-9			
C	10-15			

Tabelle 5 Child-Pugh Punkteinteilung

Somit ist die Tumorresektion vor allem für Patienten ohne Leberzirrhose und guter funktioneller Leberreserve geeignet [Song 2004]. Gute Prädiktoren für eine ausreichende Leberfunktion sind im Referenzbereich liegende Bilirubinwerte und ein Portalvenendruck kleiner als 10 mmHg [Murakami 2001]. Durch eine Selektion der Patienten wurden 5-Jahresüberlebensraten von bis zu 50 % und eine Senkung der perioperativen Mortalität auf circa 3 % erreicht [Bruix 2005]. Trotz einer R0-Resektion, die einer vollständigen Tumorentfernung entspricht, kommt es innerhalb der ersten 5 Jahre bei etwa 70 % der erfolgreich resezierten Patienten zu Neubildungen eines hepatozellulären Karzinoms [Okada 1994; Adachi 1995; Imamura 2003]. Hierbei handelt es sich in ungefähr 60-70 % der Rezidive um intrahepatische Metastasen und in 30-40 % der Fälle um neue Tumoren [Chen 2000; Finkelstein 2003], die im Vergleich zu den intrahepatischen Metastasen meist erst zwei Jahre nach der erstmaligen Tumorresektion auftreten [Imamura 2003].

Lebertransplantation

Bei nicht resezierbarem HCC kann eine Lebertransplantation (LTX) in Betracht gezogen werden, falls keine extrahepatische Metastasierung und keine Gefäßinvasion vorliegen [Bismuth 1993; Mazzaferro 1996].

Der große Vorteil der Lebertransplantation ergibt sich aus der Tatsache, dass Tumor und Leberzirrhose zugleich entfernt werden. Durch die Entfernung des gesamten Organs können keine Regenerationsprozesse induziert werden, die zu einer Proliferation residualer Tumorzellen Anlass geben [Schwartz 2004]. Außerdem kommen für diese Therapiemodalität auch Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion in Frage.

Im Jahr 1996 formulierten Mazzaferro et al. die Milan-Kriterien, welche auch heute noch in vielen Therapiezentren als Richtwerte in Anspruch genommen werden. Diesen Kriterien zufolge können vor allem Patienten mit solitärem Tumor kleiner als 5 cm oder maximal 3 Tumorknoten kleiner als 3 cm von einer LTX profitieren. Dabei liegt die 5-Jahresüberlebensrate mit 70 % höher als bei chirurgischer Resektion des Tumors und die Rezidivrate liegt bei etwa 15 % [Mazzaferro 1996].

Neben der notwendigen lebenslangen Immunsuppression zeigte sich im Verlaufe der Jahre ein weiteres Problem. Durch die ansteigende Inzidenz des HCC stehen nicht mehr genügend Spenderorgane zur Verfügung. Dadurch entstehen für die Patienten immer längere Wartezeiten, was häufig dazu führt, dass Patienten die Milan-Kriterien nicht mehr erfüllen und somit nicht mehr transplantiert werden können [Llovet 1999 B]. Um dieses Problem zu beheben, gibt es verschiedene Lösungsansätze. So wird vor allem in Asien vermehrt auf eine

Lebertransplantation eines Lebendspenders (LDLT) zurückgegriffen, bei der einem gesunden Spender ein Teil seiner Leber entnommen wird und dem HCC-Patienten transplantiert wird. In Asien hat sich die Anzahl dieses Therapieverfahrens in den letzten 10 Jahren verzehnfacht [Lee 2009]. Dadurch wird die Wartezeit des Empfängers verkürzt und ein Überschreiten der Milan-Kriterien verhindert [Sarasin 2001]. Einige Studien entdeckten keine Unterschiede bezüglich des Überlebens und der Rezidivrate bei Patienten, die eine Leber aus einer Lebendspende und einer Totspende erhielten [Lee 2009]. Jedoch zeigte eine amerikanische Studie gegensätzliche Ergebnisse, im Sinne einer erhöhten Mortalität bei Spender und Empfänger sowie einer erhöhten Rezidivrate nach einer Lebendspende [Fisher 2007]. Außerdem stehen derzeit keine Ergebnisse über einen längeren Zeitraum hinweg zur Verfügung, und die Frage der Kostensenkung ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Lebendspende ist laut Sarasin zu empfehlen, wenn die Wartezeit länger als 7 Monate für eine Lebertransplantation betragen würde [Sarasin 2001]. Weiterhin empfiehlt die UNOS (United Network for Organ Sharing), dass Patienten mit HCC-Knoten größer als 2 cm zunächst vor Patienten mit kleineren Herden transplantiert werden [Freeman 2004]. Zudem wird versucht, durch adjuvante Therapieverfahren, wie der transarteriellen Chemoembolisation, der chirurgischen Resektion oder der Radiofrequenzablation das Tumorwachstum zu verhindern oder den Tumor zu verkleinern. Für diese Vorgehensweise hat man bis heute jedoch noch keinen Vorteil für das Überleben gefunden [Llovet 2008].

Perkutane Ethanolinjektion

Bei der PEI handelt es sich um ein perkutanes Ablationsverfahren, bei dem reiner Alkohol sonographisch gesteuert in den Tumorknoten injiziert wird. Danach verteilt sich der Alkohol im Tumorgewebe und verursacht durch Proteindenaturierung, Dehydratation und Thrombose der tumorversorgenden Gefäße eine Tumorschämie und -nekrose, wobei das umliegende Gewebe geschont wird [Zuber-Jerger 2004]. Diese Form der Therapie ist daher meist sehr gut verträglich und zudem sehr kostengünstig. Bei Tumoren kleiner als 3 cm können in 70-80 % der Fälle komplette Nekrosen erzielt werden [Vilana 1992]. Bei Child-Pugh A Patienten werden 5-Jahresüberlebensraten von ungefähr 50 % erreicht. [Lencioni 2005; Sala 2004]. Bei größeren Tumoren hingegen sind die Ergebnisse unbefriedigend [Castellano 1997].

Radiofrequenzablation

Die RFA zählt neben der PEI zu den perkutanen Ablationsverfahren. Radiofrequenzen von etwa 480-500 kHz führen durch eine lokale Hyperthermie zu thermischen Gewebeschäden im

behandelten Lebergewebe, die sich histologisch als Koagulationsnekrosen zeigen [Lencioni 2003]. Dabei stehen verschiedene Elektroden mit einer oder mehreren gekühlten Spitzen zur Verfügung, die perkutan mittels bildgebender Unterstützung, laparoskopisch oder bei einer Laparotomie ins Tumorgewebe eingebracht werden können. Der Vorteil der RFA gegenüber der PEI besteht darin, dass weniger Therapiesitzungen nötig sind, um gleich gute oder sogar bessere Ergebnisse in den Nekrosearealen zu erreichen [Lencioni 2005]. Zudem sind die Ansprechraten bei Tumoren zwischen 3 und 5 cm bei einer RFA überzeugender. Bei einer randomisierten Studie mit 238 HCC-Patienten mit solitären Tumoren kleiner als 5 cm oder maximal 3 Tumorknoten kleiner als 3 cm, zeigte sich bei Patienten mit einer RFA ein signifikant höheres 4-Jahresüberleben als bei Patienten, welche mit einer PEI behandelt wurden (74 % bzw. 57 %) [Shiina 2005]. Nachteile gegenüber der PEI ergeben sich jedoch durch die höheren Kosten und die häufigeren Nebenwirkungen. Bei beiden Verfahren kommt es in etwa 50 % der Behandlung zu Abdominalschmerzen, seltener zu Fieber und sehr selten zu Abszessen oder Hämatomen. Patienten, die mit einer RFA behandelt werden, zeigen häufiger bronchobiliäre Fisteln, Magenperforationen, Hautverätzungen und Leberinfarkte als bei einer PEI, jedoch kommen diese Nebenwirkungen sehr selten vor [Mahnken 2009]. Die Rezidivraten nach RFA sind mit der chirurgischen Resektion vergleichbar. Nach drei Jahren entwickeln sich bei 50 % der Patienten Rezidive, nach fünf Jahren liegt die Rezidivrate bei 70 % [Castellano 1997; Ishii 1996].

Transarterielle Chemoembolisation

Bei Patienten mit inoperablen oder multilokulären Tumoren, bei denen eine PEI oder RFA kontraindiziert ist, stellt die transarterielle Chemoembolisation (TACE) die Therapie der Wahl dar.

Die Möglichkeit einer TACE ergibt sich dadurch, dass Tumore hauptsächlich oder auch ausschließlich durch die Leberarterie versorgt werden, wohingegen die Leber vor allem durch die Pfortader mit Blut versorgt wird [Nakashima 1987]. Zunächst wird ein Chemotherapeutikum, meist Doxorubicin oder Cisplatin, zusammen mit der Trägersubstanz Lipiodol, während einer Angiografie direkt in die tumorversorgende Arterie injiziert. Lipiodol ist ein öliges Kontrastmittel, welches mehrere Wochen oder einige Monate selektiv in den Tumoraläsionen gespeichert wird. Anschließend wird mittels einer hämostatischen Substanz, wie beispielsweise dem Gelatinepartikel Gelfoam® (Pfizer; New York; USA), der arterielle Zufluss zum Tumor okkludiert. Die Rekanalisation der okkludierten Arterie setzt beim Gelfoam® innerhalb der ersten beiden Wochen ein [Vogl 2009]. Durch die Kombination aus

Okklusion der tumorversorgenden Arterie und lokaler Chemotherapie wird einerseits eine Tumorischämie verursacht und andererseits eine hohe Dosis und eine verlängerte Kontaktzeit des Chemotherapeutikums im Tumor erreicht. Darüberhinaus wird das umliegende Lebergewebe geschont und die Durchblutung des gesunden Lebergewebes durch die Pfortader bleibt erhalten. Die zumeist benutzten Medikamente Doxorubicin und Cisplatin zeigen vergleichbare Ergebnisse. Weiterhin werden auch Epirubicin und Mitomycin C verwendet [Bruix 2004; Marelli 2007]. Es ist aber noch nicht abschließend geklärt, ob durch eine alleinige Embolisation der tumorversorgenden Arterie ohne zusätzliche Gabe eines Chemotherapeutikums der gleiche Überlebensvorteil zu erzielen ist [Kolligs 2010]. In den letzten Jahren wurde ein neues System entwickelt, welches aus mit Doxorubicin beladenen Partikeln (drug-eluting beads) besteht, die das Chemotherapeutikum langsamer an das umgebende Gewebe abgeben. Es konnten im Vergleich zur konventionellen TACE die gleichen therapeutischen Effekte mit geringeren Nebenwirkungen erzielt werden [Varela 2007].

Trotz der regionalen Applikation des Chemotherapeutikums kommt es bei 60 bis 80 % der behandelten Patienten zu einem Postembolisationssyndrom, welches die Symptome Bauchschmerz, Ileus und Fieber umfasst. In weniger als 10 % der Fälle kommt es zu einer ischämischen Cholezystitis, einem Leberabszess oder einer biliären Strikturen. Die Mortalität bei der TACE liegt etwa bei 4 % [Bruix 2004].

Aufgrund der oben beschriebenen Nebenwirkungen und der nicht vernachlässigbaren Mortalitätsrate sind verschiedene Kontraindikationen zu beachten. So zählen das Child-Pugh Stadium C, extrahepatische Metastasen, karzinombedingte Symptome, erniedrigte Thrombozytenzahlen (unter 50.000/ μ l) oder eine eingeschränkte Nierenfunktion zu den Kontraindikationen für die Durchführung einer TACE. Ausgeschlossen sind zudem Patienten mit Shunts, Pfortaderthrombose und hepatofugalem Blutfluss [Fornier 2006].

Die TACE zeigt im Gegensatz zur konservativen Behandlung bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium einen signifikanten Überlebensvorteil [Llovet 2002]. Auch bei einer Metaanalyse von Bruix et al. von 7 randomisierten Kontrollstudien entdeckte man, dass die TACE einer symptomatischen Behandlung überlegen ist, denn nach 2 Jahren lebten noch 41 %, der mit einer TACE behandelten Patienten, jedoch nur 27 % der symptomatisch behandelten Patienten. Als unabhängige prädiktive Faktoren für das Überleben, die bereits vor Beginn der TACE erhoben wurden, gelten Tumorgröße, Gefäßinvasion, AFP-Spiegel, Child-Pugh Stadium, Bilirubin-Spiegel, Aszites, der Karnofsky Index und der Performance Status [Bruix 2004].

Das Ansprechen des Tumors sollte 4-6 Wochen nach der TACE mittels bildgebender Verfahren evaluiert werden. Hierfür sind zwei Merkmale des Tumors entscheidend: die Größenveränderung und die Vitalität. Die Veränderung der Tumorgroße vor und nach Therapie wird anhand der RECIST-Kriterien eingeteilt (Tabelle 6). Im Gegensatz zu den WHO-Kriterien von 1981 [Miller 1981], bei denen die Tumordiameter in zwei Dimensionen gemessen wurden, wird bei Tumorknoten nach den RECIST-Kriterien nur der größte Tumordiameter in einer Dimension ermittelt [Therasse 2000]. Jedoch wird die alleinige Einteilung des Therapieansprechens nach den RECIST-Kriterien von der EASL abgelehnt, da neben der Abnahme der Tumorgroße auch die Vitalität des Tumors von großer Bedeutung ist. Daher empfiehlt die EASL in den erweiterten RECIST-Kriterien auch die vitalen Anteile des Tumors und Tumornekrosen zu berücksichtigen [Bruix 2001]. In der Literatur findet man verschiedene Empfehlungen im Hinblick auf die verwendete bildgebende Modalität. Die Kennzeichen der Tumornekrose im CT sind die Lipiodolaufnahme im Tumorgewebe und das Fehlen der arteriellen Hypervaskularisation des Tumorknotens [Brown 2006]. Im MRT kommt eine Nekrose hypointens zur Darstellung und ein weiterhin vitaler Tumor als hyperintens, was jedoch ebenso entzündetes oder hämorrhagisches Gewebe sein kann [Assumpcao 2008]. Für die Beurteilung der Lipiodol-speicherung im Tumor ist die CT vorzuziehen, da bei einer nativen CT-Aufnahme das Lipiodol hyperdens zur Darstellung kommt. Jedoch ist die Größenbestimmung des Tumors im CT nur bedingt zu ermitteln, da das Lipiodol bei einer Kontrastmittel-verstärkten Aufnahme die genaue Größenbestimmung behindert. Hierfür ist das MRT besser geeignet [Vogl 2002]. Außerdem kann auch anhand des Diffusions-gewichteten MRT ein Therapieansprechen angezeigt werden, wobei die Bewegung der Wassermoleküle im Gewebe detektiert wird. Hierbei hilft die Bestimmung eines Diffusionskoeffizienten (ADC). Steigt dieser Koeffizient an, spricht dieser Anstieg für eine Tumornekrose [Vossen 2006]. Im Allgemeinen wird die Bewertung des Therapieansprechens mittels CT bevorzugt [Lim 2005].

Letztlich ergibt sich der klinische Erfolg einer transarteriellen Chemoembolisation allerdings vor allem aus dem Überlebensvorteil des Patienten [Brown 2006]. Eine erneute TACE sollte bei Tumorprogression oder partieller Tumornekrose und bestehender Hypervaskularisation durchgeführt werden [Thabet 2008].

Therapieansprechen	Tumorgröße im Vergleich zur vorherigen Bildgebung
Complete Response (CR)	Kein Tumor mehr in der Bildgebung
Partial Response (PR)	Abfall der Größe $\geq 30\%$
Stable Disease (SD)	Abfall der Größe $< 30\%$ und Anstieg $< 20\%$
Progressive Disease (PD)	Anstieg der Größe um $\geq 20\%$ oder neue Tumorknoten

Tabelle 6 RECIST-Kriterien für solide Tumoren [Therasse 2000]

Für Patienten und Therapeuten wäre es von großem Vorteil schon frühzeitig nach der Therapie zu erkennen, ob die TACE erfolgreich war, um bei Misserfolg einen Therapiewechsel durchführen zu können. Dafür hat Khaddari et al. mehrere Parameter drei bis vier Wochen nach der ersten TACE untersucht. Jedoch konnte keine der untersuchten Variablen, wie die AFP-Veränderung zum prätherapeutischen Wert, die Lipiodol-speicherung im Tumor und das Erkranken an einem Postembolisationssyndrom, das Survival mit ausreichender Sicherheit vorhersagen [El Khaddari 2002].

In einer weiteren Studie zeigte Sacco et al., dass bei einer selektiven TACE-Therapie ein signifikanter Anstieg des Leberenzym Glutamatoxalacetattransaminase (GOT), des Cholestaseparameters Bilirubin und der Prothrombinzeit 24 Stunden nach Therapie erfolgt. Jedoch fallen diese Werte im Verlauf wieder ab und die Leberfunktion bleibt im Langzeitverlauf konstant [Sacco 2009].

In neuen Studien werden die unterschiedlichen Therapieverfahren kombiniert. Bei einer Kombination von TACE und RFA erzielte man ein besseres Überleben als bei den einzeln angewendeten Therapieverfahren [Helmberger 2007]. Auch bei einer Kombination von TACE und PEI zeigten sich Überlebensvorteile im Gegensatz zu einer alleinigen Therapie mit TACE oder PEI. Des Weiteren wird die TACE auch als neoadjuvantes oder adjuvantes Therapieverfahren eingesetzt. Hierbei wird entweder vor oder nach einer chirurgischen Resektion eine TACE durchgeführt. Bei beiden Therapieoptionen wiesen Patienten, die zusätzlich mit einer TACE behandelt wurden, ein längeres Überleben auf als Patienten, deren Tumor nur chirurgisch reseziert wurde. Es besteht jedoch die Gefahr, dass Funktionen von Leber und Immunsystem beeinträchtigt werden. Zudem kann eine TACE vor einer geplanten LTX hilfreich sein. Einerseits können Patienten, die sich auf der Warteliste für eine Leberspende befinden, mit einer TACE vorbehandelt werden, um eine Progression des Tumors zu verhindern, was als Bridging bezeichnet wird. Andererseits kann bei Patienten, deren Tumorgröße die Grenzwerte für eine Lebertransplantation verfehlt, durch eine TACE versucht werden, den Tumor zu verkleinern, um diese Grenzwerte zu unterschreiten, was als „Downstaging“ bezeichnet wird [Vogl 2009].

Selektive Intraarterielle Radiotherapie

Bei der selektiven intraarteriellen Radiotherapie (SIRT) wird ähnlich der TACE eine Substanz in die tumorversorgende Arterie eingebracht. Hierbei handelt es sich um Mikrosphären, die beispielsweise mit Iod-131 oder Yttrium-90 radioaktiv beladen sind. Bei Iod-131 konnten Tumoransprechraten von etwa 50 % [Leung 1994; Raoul 1997], bei Yttrium-90 von etwa 65 % bei guter Verträglichkeit erreicht werden [Carr 2004]. Beim Zerfall von Yttrium-90 werden β -Strahlen emittiert, die eine geringe Penetrationstiefe von durchschnittlich nur 2,5 mm im Gewebe haben. Daher entfalten diese β -Strahlen ihre Wirkung lokal im Bereich der applizierten, tumorversorgenden Arterie und schonen umliegendes, gesundes Lebergewebe. Die SIRT kann derzeit außerhalb von Studien nicht als Erstlinientherapie empfohlen werden, da randomisierte Studien fehlen [Kolligs 2010].

Systemische Medikation

Falls weder chirurgische noch lokale Therapieverfahren einsetzbar sind, kommen nur noch systemische medikamentöse Therapieoptionen in Frage. Jedoch ist durch die meist vorhandene Leberzirrhose die Toleranz der Leber gegenüber zytotoxischen Substanzen stark eingeschränkt [Llovet 2003 B]. Schon zahlreiche Substanzen wurden auf ihre Wirksamkeit hin überprüft. Zunächst konnte jedoch für keine der getesteten Substanzen, wie zum Beispiel Doxorubicin, Tamoxifen [Barbare 2005], Octreotide [Yuen 2002], Interferon oder auch Antiandrogene, ein signifikanter Vorteil gegenüber der „best supportive care“ nachgewiesen werden [Ganne-Carrie 2004]. Doch in den letzten Jahren kam eine Substanz auf den Markt, die in Studien überzeugen konnte. Dabei handelt es sich um den Multikinaseinhibitor Sorafenib (Nexavar®) von der Firma Bayer, Deutschland. In einer doppelblinden Phase III Studie zeigte sich ein signifikanter medianer Überlebensvorteil von 10,7 im Gegensatz zu 7,9 Monaten [Llovet 2008]. Als Nebenwirkungen wurden Hand-Fuß-Syndrome, Diarrhö und Abgeschlagenheit registriert, jedoch war das Medikament für die Leber gut verträglich. Weitere Substanzen, wie der Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des Wachstumsfaktor-Rezeptors Erlotinib und der Angiogenese-Inhibitor Bevacizumab befinden sich derzeit in klinischen Studien, zeigen aber vielversprechende Tendenzen [Kolligs 2010].

In der Literatur sind noch weitere Therapieverfahren beschrieben, die in der Klinik aber selten zum Einsatz kommen. Dazu zählen weitere perkutane Ablationsverfahren, wie zum Beispiel Kryotherapie, Mikrowellentherapie und die Lasertherapie [Bruix 2006].

2.1.8 Screening

In den letzten Jahren ist es zunehmend gelungen, hepatozelluläre Karzinome in einem früheren Stadium zu detektieren, da für Risikopatienten Screeningverfahren angeboten werden [Llovet 2003 A]. So sind beispielsweise in Japan bis zu 30 % der neu diagnostizierten HCC-Knoten kleiner als 2 cm [Ikai 2004]. Es gibt Schätzungen, die im Jahr 2020 davon ausgehen, dass 40-60 % der neu detektierten HCC-Knoten kleiner als 2 cm sind [Llovet 2008]. Dieses Screening beinhaltet alle sechs Monate eine Sonografie der Leber als auch eine Bestimmung des AFP-Levels und wird für Risikopatienten mit Leberzirrhose, chronischer HBV- oder HCV-Infektion bereitgestellt [Sturgeon 2010].

2.2 Zelltod

Bereits im Jahr 1842 erkannte Carl Vogt, dass Zellen durch einen "programmierten" Tod sterben können [Vogt 1842]. Der Embryologe Gluecksmann entdeckte im Jahr 1951, dass der Zelltod eine bedeutende Rolle während der physiologischen Prozesse von multizellulären Organismen, vor allem auch in der Embryogenese, spielt [Gluecksmann 1951]. Der Begriff des programmierten Zelltods wurde im Jahre 1964 erstmals benannt, wobei diese Art von Zelltod einer Sequenz von definierten Schritten folgt, was zu einer örtlichen und zeitlichen Selbstzerstörung der Zelle führt [Lockshin 1964]. Nach Versuchen an toxinbehandelten Leberzellen führten Kerr, Wyllie und Currie acht Jahre später den Begriff der Apoptose ein [Kerr 1972]. Das Wort Apoptose ist griechischen Ursprungs und beschreibt das Herabfallen der Blätter von den Bäumen. Die Apoptose ist entscheidend für die Entwicklung von mehrzelligen Organismen sowie die Erhaltung der Zellpopulation in Geweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Fehlerhafte Prozesse im Ablauf der Apoptose können zur Entwicklung von Krankheiten beitragen. Ein vermehrter Zelltod kann beispielsweise neurodegenerative oder ischämische Krankheiten verursachen, wohingegen ein zu geringer Zelltod zur Entwicklung von Tumor- oder Autoimmunerkrankungen führen kann [Fadeel 1999 A].

2.2.1 Apoptose, autophagischer Zelltod und Nekrose

Heute sind vor allem drei Formen des Zelltods bekannt, die sich über charakteristische morphologische Veränderungen auszeichnen. Dazu gehören die Apoptose (Typ 1), der autophagische Zelltod (Typ 2) und die Nekrose (Typ 3) [Tesniere 2008].

Die Apoptose ist durch ihre morphologischen Besonderheiten definiert (Abbildung 2). Zunächst werden Zellschrumpfung und Pyknose beobachtet. Durch die Schrumpfung der

Zellen werden die Zellen kleiner, das Zytoplasma wird dichter und die Zellorganellen werden enger und kräftiger verpackt. Außerdem verlieren die Zellen die Kontakte zu benachbarten Zellen. Die Pyknose ist durch die Kondensation des Chromatins gekennzeichnet. Weiterhin verliert die Plasmamembran an Stabilität, was zu einer Abschnürung von membranumgebenden Vesikeln führt. Dieser Mechanismus wird auch "Budding" genannt. Nach dem Abschnüren entstehen sogenannte Apoptosekörperchen, die Zellfragmente der absterbenden Zelle beinhalten. Diese können im weiteren Verlauf von Makrophagen oder Epithelzellen phagozytiert werden. Im gesamten Verlauf der Apoptose kommt es zu keiner Entzündungsreaktion.

Die Autophagie (Abbildung 2) setzt sich aus den beiden griechischen Wörtern „auto“ und „phagy“ zusammen, was als „Selbstverdau“ ins Deutsche übersetzt werden kann. Als Autophagie wird ein mehrstufiger Prozess bezeichnet, der durch den Abbau von zytoplasmatischen Komponenten durch zelleigene Lysosomen charakterisiert ist. Eine wichtige Struktur dieses Prozesses ist das Autophagosom. Autophagosomen sind von einer Doppelmembran umgeben und enthalten degenerierende zytoplasmatische Organellen oder Cytosol. Im Laufe des Prozesses fusionieren die Autophagosomen mit Lysosomen, in denen die zellulären Komponenten verdaut werden. Dies führt zu einer starken Vakuolisierung der Zellen, einem morphologischen Merkmal der Autophagie. Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Autophagie zu keiner Chromatinkondensation [Kroemer 2005]. Der Prozess der Autophagie wird durch verschiedene Stimuli, wie Nährstoffdefizienz oder hypoxische Bedingungen, initiiert [Maiuri 2007]. Interessanterweise kann die Autophagie einerseits zum Absterben einer Zelle führen und andererseits das Überleben von Zellen in Stresssituationen verlängern, indem sie geschädigte Organellen beseitigt, Mikroorganismen bekämpft und Antigene präsentiert. Dennoch kann eine kontinuierliche Autophagie zum autophagischen Zelltod führen [Amaravadi 2007].

Im Gegensatz zur Apoptose ist eine Entzündungsreaktion charakteristisch für die Nekrose [Saraste 2000]. Die Nekrose (Abbildung 2) ist gekennzeichnet durch ein Anschwellen der Zelle, was durch einströmendes Wasser verursacht wird. Außerdem kommt es durch den Wassereinstrom zum Verlust der Membranintegrität und Zerplatzen der Zelle, was wiederum zur Zerstörung benachbarter Zellen führt. Anschließend folgt die ungehinderte Freisetzung von Zellbestandteilen. Hierbei werden proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise Interleukin-8, Interleukin-10 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) freigesetzt, die eine Entzündungsreaktion auslösen können [Leist 2001]. Eine akute Hypoxie oder ein ischämisches Ereignis führen zu einem nekrotischen Zelltod.

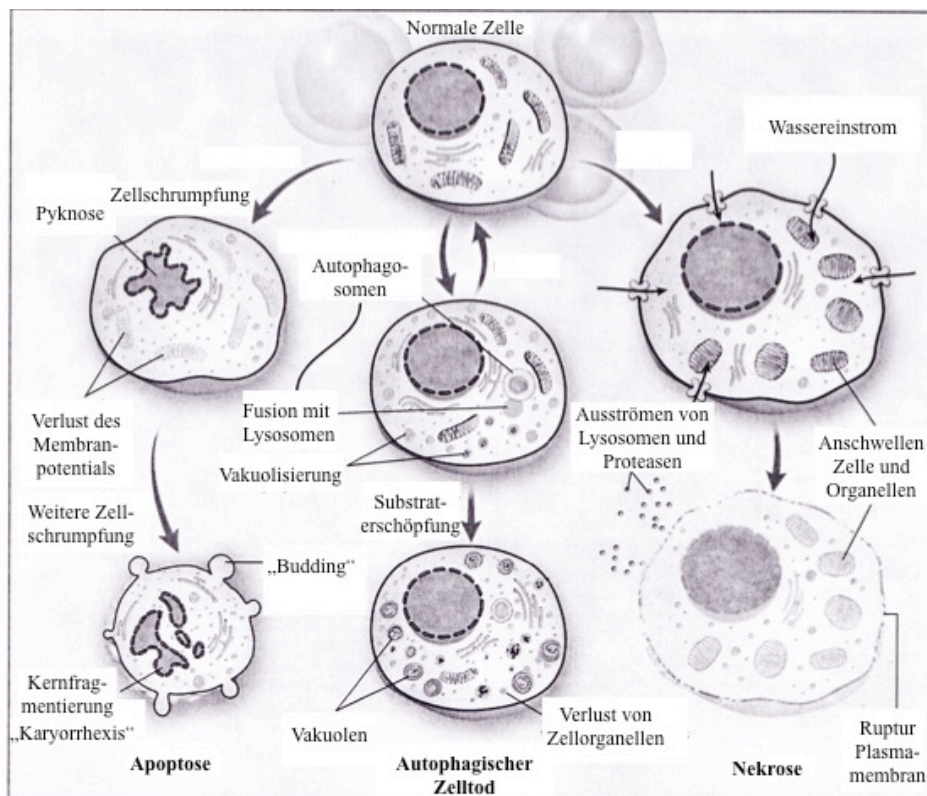


Abbildung 2 Kennzeichen des apoptotischen, autophagischen und nekrotischen Zelltods (modifiziert nach [Hotchkiss 2009])

2.2.2 Pathogenese der Apoptose

Der Mechanismus der Apoptose ist sehr komplex aufgebaut. Heute sind zwei Hauptwege des programmierten Zelltodes bekannt, ein extrinsischer und ein intrinsischer Weg. Zusätzlich existiert noch ein Pfad bei T-Zellen über Perforin und Granzym A oder Granzym B. Alle Wege enden gemeinsam in der Aktivierung der Caspase-3, was zu einer Fragmentation der DNA führt. Eine Ausnahme bildet jedoch der Mechanismus über Granzym A, bei dem ohne Caspasenaktivierung ein DNA-Schaden ausgelöst wird.

Ein weiteres Merkmal des programmierten Zelltods ist die Expression von Zelloberflächenmolekülen, die umliegende Zellen zur frühzeitigen Phagozytose anlockt. Durch das Verschieben der Phosphatidylserine von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite, können Phagozyten angelockt werden, wobei das umgebende Gewebe nur einer minimalen Gefährdung ausgesetzt ist [Bratton 1997]. Die Verlagerung der Phosphatidylserine an die Membranaußenseite kann man sich bei der Detektion apoptotischer Zellen zu Nutze machen: Das Protein Annexin V bindet sehr spezifisch an diese Phosphatidylserinresiduen und eignet sich somit sehr gut als Apoptosemarker [Pellicciari 1997; Van England 1998].

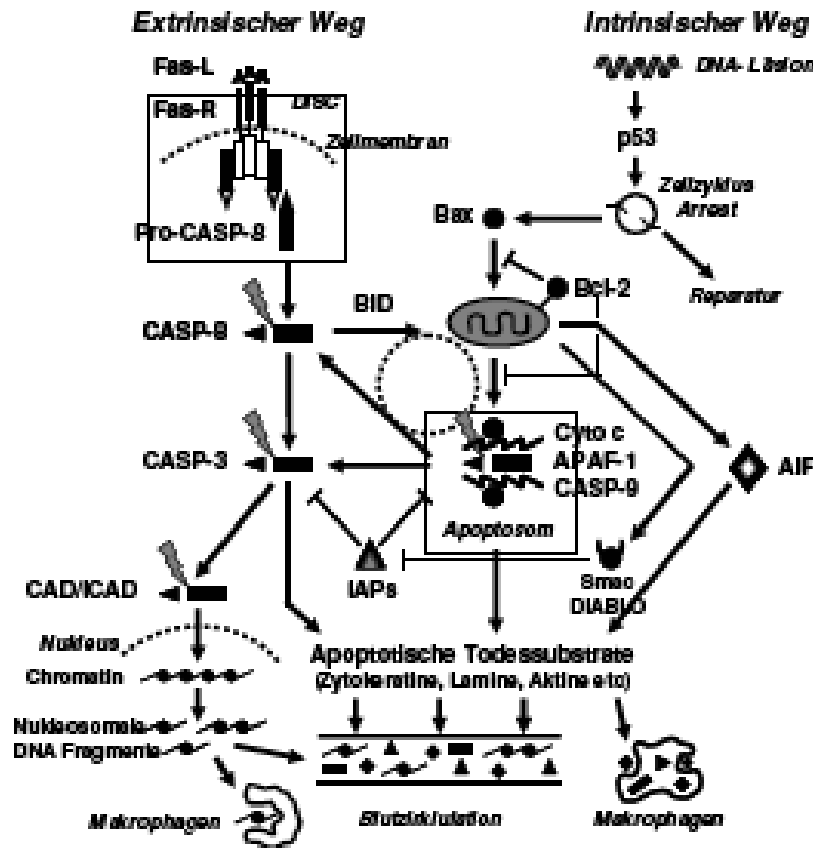


Abbildung 3 Extrinsische und intrinsische Aktivierungskaskade der Apoptose (modifiziert nach [Holdenrieder 2004 (A)])

Der extrinsische Weg (Abbildung 3) des programmierten Zelltodes verläuft über Transmembranrezeptoren der jeweiligen Zellen, welche der großen Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) angehören. Diese sind gekennzeichnet durch cysteinreiche extrazelluläre Domänen und haben zusätzlich einen 80 Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Abschnitt, der auch „death domain“ genannt wird [Ashkenazi und Dixit 1998]. Bekannte Liganden und deren Todesrezeptoren sind beispielsweise FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 und Apo2L/DR5 [Ashkenazi und Dixit 1998; Suliman 2001].

Im Folgenden soll anhand des Paares FasL/FasR der weitere Ablauf aufgezeigt werden. Zu Beginn der extrinsischen Kaskade binden homologe Liganden (FasL) an die Rezeptoren (FasR) auf der Zelloberfläche. Nach Trimerisierung des Rezeptor-Liganden Komplexes kann das Adapterprotein FADD („Fas-associated death domain protein“) an die intrazelluläre „death domain“ andocken, über welches dann die Initiatorcaspase Procaspase-8 rekrutiert wird. Hierdurch wird ein „death-inducing signaling complex“ (DISC) gebildet, der dazu führt, dass sich die Procaspase-8 autokatalytisch aktiviert [Kischkel 1995]. Im Folgenden werden weitere Caspasen aktiviert, die das Signal intrazellulär weiterleiten. Das regulatorische

Protein c-FLIP kann an FADD binden und dadurch die Apoptose verhindern (Scaffidi 1999).

Der intrinsische Weg (Abbildung 3) geht von den Mitochondrien aus und wird durch verschiedene Faktoren aktiviert. Ein Überschuss an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies, erhebliche DNA-Schädigungen oder ein Mangel an Wachstumsfaktoren führen zur erhöhten Membranpermeabilität der Mitochondrien. Dadurch geht das Transmembranpotential verloren, was zur Freisetzung von Cytochrom c, der Serinprotease HtrA2/Omi, SMAC/DIABLO und weiteren apoptogenen Molekülen in das Zytoplasma führt [Saelens 2004; van Loo 2002; Garrido 2004]. Zytoplasmatisches Cytochrom c bildet zusammen mit dem „apoptotic protease activating factor 1“ (APAF1), ATP und Procaspase-9 das Apoptosom. In diesem Komplex wird die Caspase-9 autokatalytisch aktiviert und spaltet dann ihrerseits die Effektorcaspase-3 [Hill 2004].

Auch HtrA2/Omi und SMAC/DIABLO haben eine wichtige Funktion bei der Apoptose. Van Loo et al. berichtet 2002, dass die beiden Proteine die Apoptose durch die Inhibition des Apoptose-inhibierenden Proteins (IAP) verstärken. Weitere pro-apoptotische Proteine, wie der Apoptose-induzierende Faktor (AIF), die Endonuklease G (EndoG) oder die Caspasen-anhängige DNase (CAD) werden im späten Verlauf der Apoptose von den Mitochondrien freigesetzt und wandern anschließend in den Zellkern. AIF und EndoG funktionieren Caspase unabhängig, CAD wird vor Aufnahme in den Zellkern durch Caspase-3 von seinem Inhibitor ICAD abgespalten [Enari 1998]. Im Nukleus induzieren AIF, EndoG und CAD die Fragmentierung der DNA und die Chromatinkondensation. [Joza 2001; Li 2001].

Der intrinsische Signalweg wird durch die Bcl-2 Proteinfamilie gesteuert, die direkt die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran kontrolliert. Diese Proteinfamilie wird in antiapoptotische und proapoptotische Faktoren eingeteilt. Zu den antiapoptotischen Proteinen gehören unter anderem Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w und BAG, zu den proapoptotischen Proteinen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik und Blk. Durch die proapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder Bax und Bak erfolgt die Permeabilisierung der Membran, indem sie durch Oligomerisierung Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran bilden. Diese Kanäle führen zu einer Veränderung des Membranpotentials und der Freisetzung der oben beschriebenen Signalproteine [Degli Esposti und Dive 2003].

Die Bcl-2 Proteinfamilie wird wiederum vom p53-Protein reguliert, welches eine zentrale Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen spielt [Schuler und Green 2001]. Neben seiner wichtigen Funktion in der Regulation des Zellzyklus ist der Tumorsuppressor p53 ein wesentlicher Modulator des apoptotischen Zelltods. Das Protein p53 hat eine entscheidende

Bedeutung als Transkriptionsfaktor und aktiviert eine große Anzahl von Zielgenen, wie beispielsweise Bax und Fas/Apo1, welche für proapoptotische Moleküle codieren [Vousden und Lu 2002]. In letzter Zeit wurde neben der transkriptionsabhängigen Methode ein weiterer Mechanismus bekannt über den p53 zur Apoptose beiträgt [Chipuk 2003; Moll 2005; Speidel 2006]. Zellen, die einer Überexpression von Onkogenen, DNA-Schäden oder anderen Formen von Stress ausgesetzt sind, aktivieren und stabilisieren p53 [Vogelstein 2000]. Nach schweren Schäden leitet aktiviertes p53 über die Regulation der Transkription sowie transkriptionsunabhängige Mechanismen die Apoptose durch Aktivierung von proapoptotischen Molekülen ein.

Bei den T-Zellen wurde ein weiterer Apoptoseweg detektiert, der über das Molekül Perforin und die Serinprotease Granzym gesteuert wird. Perforin kann in der Plasmamembran Poren formen, woraufhin eine exozytische Freisetzung zytoplasmatischer Granula durch die Poren in die Zielzelle folgt, die beispielsweise Granzym A und Granzym B enthalten [Trapani und Smyth 2002]. Im weiteren Verlauf löst Granzym A die Verbindung zwischen der DNase NM23-H1 und dem Protein SET, welches die DNase inhibiert. Somit kann NM23-H1 die DNA spalten. Des Weiteren übernimmt der SET Komplex Funktionen bei der Chromatinstruktur und der DNA-Reparatur [Liebermann und Fan 2003]. Im Gegensatz zu Granzym A, welches Caspasen-unabhängig zur Spaltung der DNA führt, aktiviert Granzym B durch eine Spaltung an Aspartatresten die Procaspase-10 oder auch direkt die Caspase-3 [Sakahira 1998]. Zudem kann Granzym B durch Aktivierung des Protein Bid über den mitochondrialen Weg Cytochrom c freisetzen [Barry und Bleackley 2002]. Devadas et al. schreibt dem Apoptoseweg über das Granzym B einen entscheidenden Kontrollmechanismus bei der Entwicklung von T2-Helferzellen zu [Devadas 2006].

Die beschriebenen Wege des programmierten Zelltods verfügen über eine gemeinsame Endstrecke. Hierbei ist vor allem die Aktivierung der Caspase-3 entscheidend, da diese spezifisch die Endonuklease CAD durch Abspaltung des Inhibitors ICAD aktiviert. Danach kann CAD in den Zellkern eindringen, DNA abbauen und die Kondensation des Chromatins verursachen [Sakahira 1998]. Weiterhin führt die Aktivierung von Caspase-3 zur Reorganisation des Zytoskeletts und die Desintegration von Zellen in Apoptosekörperchen. Aktiviert wird die Caspase-3 durch Initiatorcaspasen, wie Caspase-8, Caspase-9, Caspase-10. Weitere sogenannte Effektorcaspasen sind Caspase-6 und Caspase-7.

2.2.3 Weitere Formen des Zelltods

Neben den drei bereits dargestellten Formen des Zelltodes sind in den letzten Jahren weitere Arten beschrieben worden: der immunogene Zelltod, die Paraptose, die Pyroptose, die mitotische Katastrophe und die zelluläre Alterung (zelluläre Seneszenz).

Nachdem zunächst davon ausgegangen wurde, dass die Nekrose immer mit einer Immunantwort einhergeht und die Apoptose ohne eine Antwort des Immunsystems abläuft, fand man in den letzten Jahren heraus, dass man hier keine eindeutige Grenze ziehen kann. Verschiedene Arten des Zelltods können eine Immunantwort auslösen, wofür eine bestimmte Gruppe von Molekülen verantwortlich ist, die als „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) bezeichnet werden. DAMPs sind intrazelluläre Bestandteile, die bei Zelltod in die Umgebung sezerniert werden oder auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Moleküle besitzen die Fähigkeit verschiedene Effekte auf Antigen präsentierenden Zellen auszulösen, wie zum Beispiel dendritischen Zellen, was zu einer Maturation, Aktivierung oder Antigenpräsentation führt. DAMPs interagieren nach ihrer Freisetzung oder Exposition mit membrangebundenen oder vesikulären „pattern-recognition receptors“ (PRRs), wie beispielsweise den Toll-like Rezeptoren (TLRs) [Garg 2010]. Ein Beispiel für einen DAMP ist das proinflammatorische Protein „high-mobility group box 1“ (HMGB1), welches von absterbenden Zellen freigesetzt wird und durch die Bindung an verschiedene Rezeptoren, wie den receptor for advanced glycosylation end products (RAGE), TLR2 oder TLR4, zu einer Immunantwort führt. TLR4, das auf den Oberflächen dendritischer Zellen vorkommt, kontrolliert die Initiierung der Immunantwort, indem es die Fusion von Phagosomen und Lysosomen inhibiert. Dadurch können die Tumorantigene prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden, wodurch eine Aktivierung von T-Zellen erfolgen kann [Tesniere 2008]. Ein weiterer Signalweg führt über Calreticulin, das an der Zelloberfläche absterbender Zellen präsentiert wird, nachdem es über einen Signalweg vermittelt aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt wurde [Zitvogel 2010].

Der immunogene Zelltod hat eine wichtige Bedeutung bei der Chemotherapie. Bei Anthrazyklinen beispielsweise kommt es zu einer Art Immunisierung gegen Bestandteile des Tumors. Durch das Abtöten der Zellen durch die chemotherapeutische Substanz wird vor allem Calreticulin auf der Zelloberfläche der apoptotischen Zelle präsentiert. Anschließend kommt es zur Aktivierung von dendritischen Zellen und einer Tumor spezifischen T-Zellantwort. Somit kommt es zu einer Verstärkung des Effektes der Chemotherapie [Garg 2009].

Die Paraptose ist durch eine Vakuolenbildung des Zytoplasmas charakterisiert, die mit einer zunehmenden Anschwellung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums beginnt. Sie wird als eine Form des programmierten Zelltods verstanden, die Caspasen-unabhängig und ohne typische Apoptoseveränderungen abläuft [Sperandio 2000].

Die Pyroptose ist eine Form des programmierten Zelltods, die bisher nur während in vitro Versuchen beobachtet wurde und meistens von intrazellulären Bakterien verursacht wird. Für den Prozess der Pyroptose sind Caspase-1-Aktivierungskomplexe erforderlich [Ting 2008].

Die mitotische Katastrophe ist eine Art des Zelltodes, die während der Mitose auftritt und morphologisch durch die Bildung vielkerniger Riesenzellen mit unkondensierten Chromosomen charakterisiert ist. Hierzu kommt es bei beschädigten Zellen oder fehlerhaften Kontrollpunkten des Zellzyklus. Misslingt es den Zellzyklus vor oder während der Mitose anzuhalten, wird eine anormale Chromosomentrennung eingeleitet, welche in der Aktivierung des apoptotischen Weges gipfelt und zum Zelluntergang führt. Die mitotische Katastrophe ist wichtig, um eine Aneuploidie zu verhindern [Castedo 2004].

Die zelluläre Alterung kann beispielsweise durch Telomerverkürzung, DNA Schäden, oxidativen Stress oder Chemotherapeutika ausgelöst werden und zeigt sich durch einen anhaltenden Arrest des Zellzyklus. Morphologisch werden abgeflachte und vergrößerte Zellen beobachtet, welche spezifische Marker, wie die β -Galaktosidase und Lipofuszin Granula zeigen [Campisi 2007].

2.2.4 Zelltod beim hepatozellulären Karzinom

Die Dysregulation zwischen Proliferation und Zelltod ist in der hepatozellulären Karzinogenese entscheidend. Das Tumorsuppresorgen p53 hat für die Imbalance eine große Bedeutung, denn es ist beim HCC häufig mutiert. HBV, HCV und Aflatoxin B1 können zu einer Mutation dieses Tumorsuppresorgens führen. Weil viele Chemotherapeutika über p53-Induktion wirken, zeigt sich das HCC gegen eine große Anzahl an Chemotherapeutika resistent [Fabregat 2009].

Der extrinsische Apoptoseweg über die Todesrezeptoren ist in vielen HCC herunterreguliert. Die Mehrheit der HCC zeigt eine oder mehrere Veränderungen im Apoptoseweg über Fas.

Des Weiteren findet man in hepatozellulärem Karzinomgewebe eine erhöhte Aktivität des Proteins c-FLIP, welches die Aktivierung der Caspase-8 inhibiert [Fabregat 2009].

Zum Ungleichgewicht von Proliferation und Zelltod führen auch die Überexprimierung antiapoptotischer Proteine, wie Bcl-XL, und die Unterexprimierung proapoptotischer Proteine, wie Bid.

Ein weiterer Inhibitor der Apoptose, das Protein Survivin, wird beim HCC ebenfalls vermehrt exprimiert. Ihm wird eine entscheidende Bedeutung bei der Metastasierung zugeschrieben, da es nicht nur die Apoptose inhibiert, sondern auch die Zellproliferation unterstützt [Fabregat 2009].

2.2.5 Zelltod bei Chemotherapie und transarterieller Chemoembolisation

Die transarterielle Chemoembolisation erreicht über zwei verschiedene Wege die Zerstörung von Tumorzellen. Einerseits wirken die Chemotherapeutika auf die Tumorzellen und andererseits führt die Ischämie im Tumorgebiet zum Zelltod. Als Chemotherapeutikum für die TACE werden häufig Anthrazykline, wie Doxorubicin oder Epirubicin verwendet, die hauptsächlich den apoptotischen Zelltod induzieren. Beide Medikamente verursachen DNA-Schäden über die Inhibition der DNA-Topoisomerase II, was zu Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen der DNA führt. Des Weiteren bilden sich reaktive Sauerstoffradikale, die mit intrazellulären Komponenten, wie Nukleinsäuren oder Proteinen interagieren und diese zerstören [Lee 2002, Ozkan 2004]. Die durch die Embolisation erzeugte Ischämie verursacht sowohl nekrotischen als auch apoptotischen Zelltod [Brown 2008]. In einer Studie von Lu et al. konnte 2008 gezeigt werden, dass bei präoperativer TACE sowohl Apoptoserate als auch Nekroserate signifikant höher waren, als bei chirurgischer Resektion ohne präoperativer TACE [Lu 2008].

2.3 Nukleosomen

Im Jahr 1975 wurde der Begriff „Nukleosom“ eingeführt, nachdem ein Jahr zuvor von mehreren Gruppen der Aufbau aus einem Histon-Oktamer, einem Linker-Histon und etwa 160-200 Basenpaaren beschrieben wurde.

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist Träger des menschlichen Erbgutes und ist im Zellkern lokalisiert. Als lineares Makromolekül hat die DNA jedoch eine Länge von ungefähr 1,8 m und würde in keinen Zellkern passen. Daher muss die DNA verschiedene komplexe

Strukturen einnehmen, um diesen Größenunterschied zu überwinden. Die DNA ist im Normalzustand in Form einer Doppelhelix organisiert, die aus zwei langen Ketten, den Nukleinsäuren besteht. Diese Nukleinsäuren wiederum setzen sich aus verschiedenen Nukleotiden zusammen. Jedes Nukleotid besteht aus einem Phosphat-Rest, einem Zucker und einer von vier organischen Basen Adenosin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Die DNA-Doppelhelix ist in sich verdrillt mit ungefähr 10,5 Basen pro Umdrehung. Ihr Querdurchmesser beträgt dabei 2 nm. Die nächste Organisationsstufe wird als Nukleosom bezeichnet. Hierbei windet sich die Doppelhelix rund 1,65 mal um einen Histonproteinkomplex. Einzelne Nukleosomen sind durch Linker-DNA miteinander verbunden. Die daraus entstehende perlenförmige Struktur hat einen Durchmesser von 11 nm und wird als Chromatin bezeichnet. Durch weitere Drehungen dieser Kette aus DNA und Histonen entsteht eine Chromatinfaser, die im Durchmesser rund 30 nm misst. Diese Chromatinfaser bildet nun Schleifen und ist zu einem Supertwist verdrillt. Innerhalb eines Chromosoms ist sie schleifenartig zusammengesetzt und wird durch Nichthistonproteine stabilisiert (Abbildung 4).

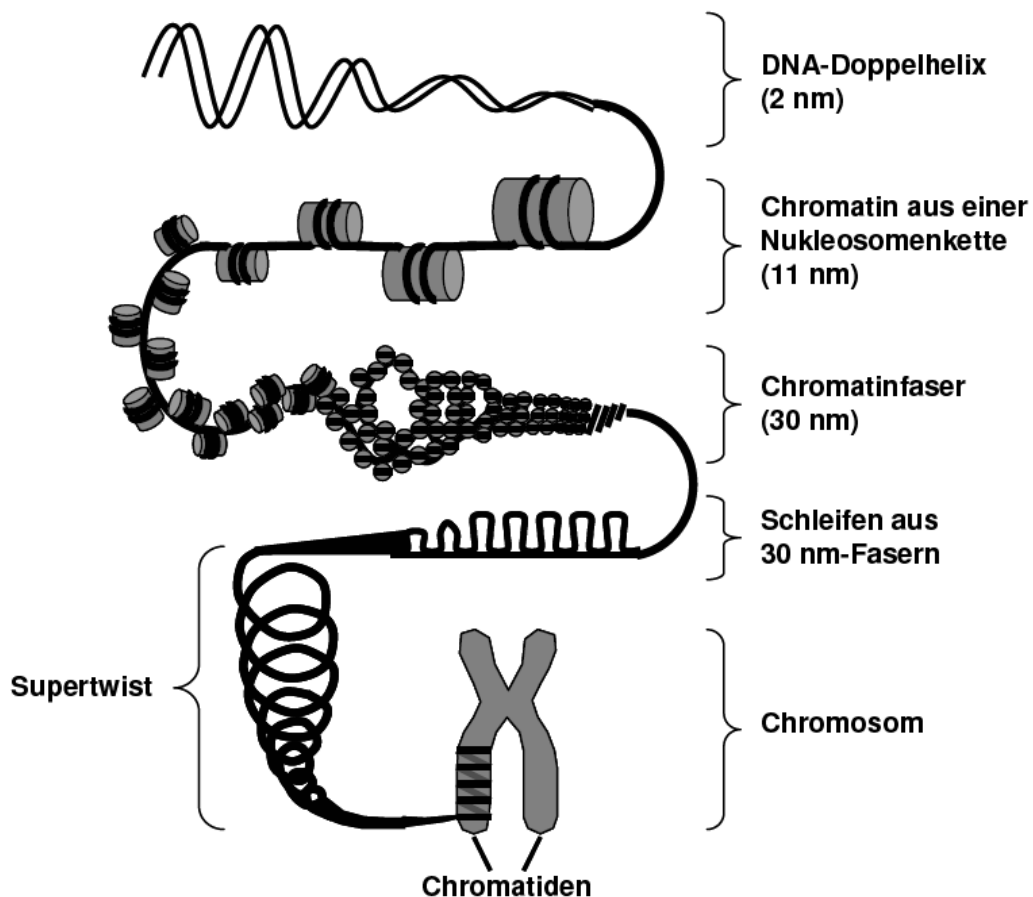


Abbildung 4 Aufbau des Chromatin (modifiziert nach [Plattner 1997])

Das Chromatin kann in zwei funktionell und strukturell verschiedene Formen unterteilt werden: Heterochromatin und Euchromatin. Im Zellkern kommt das Chromatin zumeist als Heterochromatin vor, bei der das Chromatin in kondensierter Form vorliegt, womit es am besten gegen exogene und endogene Schädigungen geschützt ist. Damit verschiedene Vorgänge, wie Replikation oder Transkription, durchgeführt werden können, kann sich das Chromatin in einen lockeren, dekompensierten Zustand umwandeln, was als Euchromatin bezeichnet wird [Plattner 1997; Kornberg 1999].

2.3.1 Struktur

Die Nukleosomen sind aufgebaut aus basischen Proteinen, sogenannten Histonen, und der DNA. Wie oben bereits erwähnt, windet sich die DNA-Doppelhelix um einen Histonproteinkomplex. Dieser Komplex besitzt eine oktamere Struktur und besteht aus den jeweils doppelt vertretenen Histonen H2A, H2B, H3 und H4. Um die flache Außenseite des Histonproteinkomplexes winden sich 147 Basenpaare der DNA (Abbildung 5).

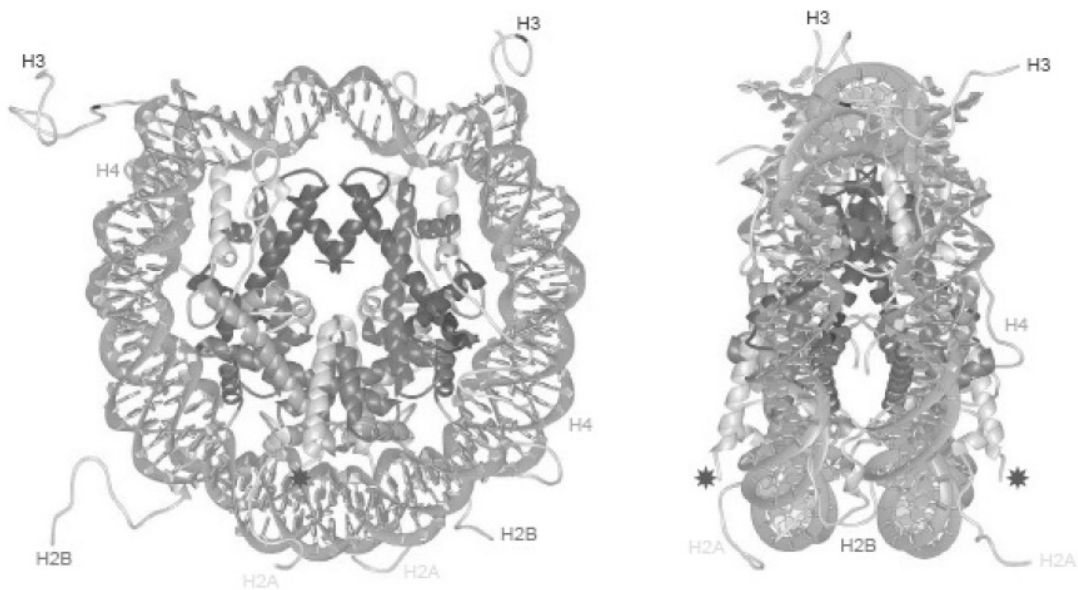


Abbildung 5 Räumliche Struktur eines Nukleosoms (aus [Luger 2003])

Stabilisiert wird diese Struktur durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren der Histone und Phosphorsäurediester und Deoxyribosegruppen der DNA [Luger 2003; Luger 2006]. DNA und Histonproteinkomplex formen einen scheibenähnlichen Nukleosomenkern mit einem Molekulargewicht von 206

kDa. Die sogenannte Linker-DNA sorgt dafür, dass benachbarte Nukleosomen verbunden werden können. Diese verfügt über eine Länge von 20 bis 80 Basenpaaren und hat im Abstand von etwa zehn Nukleosomen Histone vom H1-Typ angeordnet. Durch zusätzliche Verbindungen zu benachbarten Nukleosomen über kürzere Peptidketten mit einer Länge von 15 bis 30 Aminosäuren, die aus dem Histonzentrum herausragen, wird die Chromatinfaser weiter stabilisiert [Luger 2003; Khorasanizadeh 2004; Luger 2006].

Außerdem können diese Endigungen biochemisch modifiziert werden und damit den Zugriff von Hormonen, Enzymen und Transkriptionsfaktoren entscheidend beeinflussen [Kornberg 1999; Strahl 2000; Khorasanizadeh 2004].

Lediglich in Prokaryonten und Mitochondrien liegt die DNA als freie, ringförmige Struktur vor, ohne an Proteine assoziiert zu sein.

2.3.2 Funktion

Nukleosomen haben mehrere Funktionen. Eine wichtige Aufgabe der Nukleosomen besteht darin, die DNA zu kondensieren und zu stabilisieren. Im kondensierten Zustand ist die DNA relativ gut gegenüber exogenen und endogenen Noxen geschützt. Allerdings ist die kondensierte DNA weder für Enzyme, Hormone noch Transkriptionsfaktoren zugänglich [Kornberg 1999; Khorasanizadeh 2004]. Um die genetische Information zu replizieren, transkribieren oder reparieren, muss die DNA decondensiert werden. Hierfür haben epigenetische Vorgänge eine entscheidende Bedeutung. Die Epigenetik bezeichnet Veränderungen an Genen, welche nicht die Abfolge der Basenpaare der DNA betrifft. Die wichtigsten epigenetischen Phänomene sind DNA Methylierung und Histonmodifikationen.

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt liegen im Nukleosomenkern Histonproteine. Diese Histone gewähren oder verhindern z.B. den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu den DNA-Sequenzen. Allerdings können diese Histone durch Modifikation der abstehenden Endstücke beeinflusst werden, was als Histonmodifikation bezeichnet wird. In experimentellen Studien wurden verschiedene Molekülgruppen, wie Acetyl-, Methyl-, Phosphoryl-, Ubiquitinyl-, Glucosyl- und ADP-Ribosyl-Gruppen an Histone angefügt oder entfernt [Grunstein 1997; Kornberg 1999; Strahl 2000; Khorasanizadeh 2004]. Die zumeist untersuchten Histonmodifikationen sind Acetylierung und Methylierung. Hierbei konnten bei der Verteilung von Histonmodifikationen im Genom grundsätzliche Gemeinsamkeiten festgestellt werden. Euchromatische Bereiche weisen häufig acetylierte Histone und trimethyliertes

H3K4 sowie H3K36 auf, wohingegen Histone heterochromatischer Bereiche zumeist deacetyliert sind und Methylierungen wie H3K9me2 sowie H3K27me3 tragen [Portela 2010].

Nukleosomen dürfen nicht als starre Strukturen angesehen werden. Vielmehr handelt es sich um dynamische Verbindungen, die ständig umgebaut werden und ihre Position im Zellkern ändern. Am Beispiel der Acetylierung soll dies veranschaulicht werden. Histonacetyltransferasen übertragen Acetyl-Reste auf Histonendigungen. Diese Acetylierung lässt das Chromatin lokal begrenzt dekondensieren und lockert Verbindungen zwischen und innerhalb von Nukleosomen, d.h. zwischen DNA und Histonproteinen. Das Histonoktamer kann sich von der DNA lösen und wird entlang der Doppelhelix verschoben. Dadurch werden bestimmte Gensequenzen der DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglich. Andererseits entfernen Histon-Deacetylasen die angehefteten Acetylreste und unterbinden das Ablesen der genetischen Information [Kornberg 1999; Strahl 2000; Khorasanizadeh 2004]. In den letzten Jahren zeichnet sich ab, dass die Beeinflussung von Histon-Deacetylasen eine vielversprechende Therapieoption bei Tumorerkrankungen darstellen könnte, denn die Histonmodifikationen haben einen großen Einfluß auf die Tumorentwicklung. Die bekannteste Modifikation ist die Hypoacetylierung von H4K16, welche durch Histon-Deacetylasen vermittelt wird [Portela 2010]. Diese Histon-Deacetylasen können inhibiert werden, mit dem Ziel aberrierende epigenetische Veränderungen, die mit Tumoren assoziiert sind, rückgängig zu machen [Pandolfi 2001; Baylin 2006]. Erste Phase-II und -III-Studien belegen den Nutzen eines kombinierten Einsatzes von Histon-Deacetylase-Inhibitoren mit herkömmlichen Chemotherapeutika. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, die Gemcitabin und den Histon-Deacetylase-Inhibitor CI-994 erhielten, konnte allerdings weder Gesamtüberleben, Ansprechrate noch progressionsfreies Intervall gegenüber der Gemcitabin-Monotherapie verbessert werden [Richards 2006].

Ein weiterer wichtiger epigenetischer Marker ist die Trimethylierung von H3K27, welcher beispielsweise in der Entwicklung eines Prostatakarzinoms ein wichtiger epigenetischer Marker ist. Die Methylierung wird durch die Histon-Methyltransferase EZH2 vermittelt, die in vielen Tumorentitäten überexprimiert ist [Delegizer 2010].

Einflüsse anderer Modifikationen werden teils kontrovers diskutiert. So wird die Ubiquitinierung der Histone in unterschiedlichen Studien sowohl als Induktor [Zhang 2003] als auch Repressor der Transkription angesehen [Shiio 2003].

Die DNA-Methylierung bezeichnet ein weiteres epigenetisches Phänomen und ist die einzige reversible Möglichkeit ein Gen weiterzuerben ohne die Basenabfolge zu verändern. Dieses Phänomen wird vor allem im Bereich von CpG-Inseln beobachtet, die Regionen im Genom mit statistisch erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte bezeichnen. CpG-Inseln sind nicht länger als 500 Basenpaare und haben einen GC-Gehalt von mehr als 55%. An diesen Orten findet man in 60 bis 90 % eine Methylierung dieser Basenpaare. DNA Methyltransferasen sind für die Methylierung der C-5 Position von Cytosin verantwortlich. Diese Enzyme nutzen S-Adenosylmethionin als Donor von Methylgruppen, was zur Bildung von S-Adenosylhomocystein führt. Durch die Methylierung kommt es einerseits zur Hemmung der Übersetzung von Genen in Proteine und andererseits zur Stabilisierung dieser Genome. In gesunden somatischen Zellen findet man eine Hypermethylierung in CpG-armen Bereichen und eine Hypomethylierung in CpG-reichen Bereichen. Interessanterweise kommt es während der Tumorentstehung zur Hypermethylierung von CpG-Inseln und Hypomethylierung der anderen Regionen. CpG-Inseln liegen häufig in Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen, welche durch die Hypermethylierung abgeschwächt werden. Im Verlaufe der Tumorentstehung kommt es zu charakteristischen Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA [Espada 2010]. Beispielsweise ist die Hypermethylierung von E-Cadherin ein entscheidender Schritt vom epithelialen zu einem dedifferenzierten Stadium und ist für die Entstehung von Metastasen verantwortlich [Fraga 2004].

2.3.3 Metabolismus und Abbau der Nukleosomen

Die nukleosomalen DNA-Fragmente entstehen durch die Fragmentierung des Chromatins, was mit Hilfe der Caspasen-abhängigen DNase im Zellkern nach proteolytischer Aktivierung der DNase durch die Effektorcaspasen geschieht [Lichtenstein 2001; Enari 1998; Kanduc 2002]. Die Effektorcaspasen ihrerseits wurden vorher durch den schon oben beschriebenen Apoptoseweg aktiviert. Nach Desintegration der Zellmembran führt der Weg der nukleosomalen DNA in den extrazellulären Raum und schließlich in die Blutbahn. Jedoch wird der überwiegende Teil der Nukleosomen in Apoptosekörperchen verpackt, die später in der Blutbahn von Makrophagen und Nachbarzellen phagozytiert werden [Lichtenstein 2001; Hengartner 2001]. Bei Zellversuchen erkannte man, dass nach morphologischem Nachweis der Apoptose 12 Stunden bis zum Anstieg der extrazellulären Nukleosomenkonzentration vergehen [van Nieuwenhuijze 2003].

Die Nukleosomen werden in zwei Phasen aus der Blutbahn entfernt. In der ersten, schnellen Phase werden in etwa 90% der Nukleosomen abgebaut, woraufhin eine langsamere, zweite Phase der Elimination folgt [Burlingame 1996]. In einem Versuch von Rumore et al. wurde für die Nukleosomen [Rumore 1992] eine Halbwertszeit von 4 Minuten berechnet. Jedoch wurde in einem Tierversuch festgestellt, dass sich bei Erreichen einer Schwelle die Eliminationsgeschwindigkeit verlangsamt [Gauthier 1996].

Bei einer starken körperlichen Anstrengung wie etwa einem Marathon kommt es wie bei einem Myokardinfarkt oder einem Trauma zu einer sterilen Entzündungsreaktion, was an einer Erhöhung des Entzündungsparameters C-reaktives Protein (CRP) beobachtet werden kann. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass es nach sportlicher Betätigung zu einem Anstieg der freien zirkulierenden DNA kommt. Der Anstieg wird auf eine aktive Sekretion z.B. aus Leukozyten oder auf eine erhöhte Zelltodrate in geschädigten Zellen z.B. der Skelettmuskulatur zurückgeführt. Die Apoptose bzw. Nekrose wird durch Hypoxie und vermehrte freie Radikale verursacht. Die erhöhte Zelltodrate ist unter anderem am Verhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen zu sehen. Zwei Stunden nach einem Sechsstunden Lauf, der einem Ultramarathon entspricht, kommt es zu einem Anstieg des proapoptotischen Proteins Bax. Das antiapoptotische Protein Bcl-2 zeigt sich zu diesem Zeitpunkt noch stabil im Vergleich zum Wert vor Beginn des Ultramarathons. Allerdings steigt die Expression dieses Proteins nach 24 Stunden an. Dieses Verhältnis spiegelt sich auch in der frei zirkulierenden DNA wieder. Nach einem Anstieg der frei zirkulierenden DNA zwei Stunden nach Rennende, fallen die Werte 24 Stunden danach auf die Werte vor Rennbeginn zurück [Atamaniuk 2008]. In einer weiteren Studie mit einer kürzeren Belastung zeigte die zirkulierende DNA bereits nach 30 Minuten die höchsten Werte. Nach zwei Stunden fielen die Werte bereits auf das Niveau vor körperlicher Belastung. Diese Beobachtungen sprechen für einen sehr schnellen Abbau der zirkulierenden DNA im Blutplasma der Patienten [Fatouras 2010]. Nach einem 10 km Lauf kommt es bereits nach einer halben Stunde zu einem Abfall der frei zirkulierenden nukleosomalen DNA [Beiter 2011].

Für den Abbau der DNA stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Eine Degradierung durch Endonukleasen kann bereits in der Blutbahn geschehen [Emlen 1988]. Weiterhin kann die DNA von Makrophagen und anderen Mitgliedern des Retikuloendothelialen Systems phagozytiert werden. Auch kann die DNA durch Antikörper komplexiert und präzipitiert werden [Macanovic 1997; Amoura 1994; Burlingame 1994; Amoura 2000]. Der Hauptaufnahmeort der nukleosomalen DNA befindet sich in der Leber, wo über 70% der

bereits eliminierten DNA lokalisiert ist [Gauthier 1996]. Auch die Niere ist an der Ausscheidung der zirkulierenden DNA beteiligt, denn diese wird wahrscheinlich, verpackt in Apoptosekörperchen, in liposomaler Form durch Glomerula filtriert [Lichtenstein 2001].

Vor kurzem wurde eine neue Struktur entdeckt, welche nukleosomale Strukturen enthält. Neutrophile extrazelluläre „Traps“ (NETs) sind extrazelluläre Strukturen, welche aus azurophilen Granula, wie neutrophiler Elastase, Catepsin G und Myeloperoxidase, sowie DNA bestehen. Sie haben einen Durchmesser von etwa 15 nm und repräsentieren eine Nukleosomenkette von ungefaltetem Protein. NETs können ebenso wie Nukleosomen von DNase gespalten werden. NETs entstehen durch das Absterben von neutrophilen Granulozyten nach deren Aktivierung, beispielsweise durch Bakterien. Dieses Phänomen wird als NETosis bezeichnet, eine neue Form des Zelltods [Brinkmann 2007]. Interessanterweise haben NETs antimikrobielle Aktivität, indem sie Antigene sowohl im Blut als auch im Gewebe fangen und töten können [Lögters 2009].

In den letzten Jahren rückten Exosomen zunehmend in den Blickpunkt medizinischer Forschung. Exosomen sind 40 - 100 nm groß, die endozytotisch durch Fusion von multivesikulären Körpern und der Plasmamembran entstehen und freigesetzt werden. Sie dienen der interzellulären Kommunikation und haben Funktionen innerhalb der Immunantwort, der Antigenpräsentation und dem Transport von RNA und Proteinen. Exosomen wurden in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel im Blut, in der Amnionflüssigkeit, in der Synovialflüssigkeit, in malignem Aszites, in der Muttermilch und im Speichel gefunden. Neben membranösen und zytosolischen Proteinen, beinhalten Exosomen zudem vor allem mRNA und microRNA, welche in andere Zellen transferiert werden und dort Funktionen übernehmen. Aufgrund des Vorkommens von microRNA in Exosomen sind diese wichtige Ansatzpunkte in der Forschung nach Biomarkern für die Diagnose von Krebserkrankungen, da Exosomen auch von Tumorzellen freigesetzt werden [Simpson 2009]. In mehreren Studien zeigte die microRNA aus Gewebeproben Auffälligkeiten im Expressionsmuster im Hinblick auf Tumorklassifikation, Diagnose und Krankheitsstadium. Nach Entdeckung von miRNA enthaltenden Exosomen in verschiedenen Körperflüssigkeiten, ist es möglich ohne invasive Diagnostik eine Aussage über das Tumorgewebe und dessen weitere Eigenschaften zu treffen [Kosaka 2010]. Neben der RNA in Exosomen, fand man in Urinproben auch frei zirkulierende DNA [Miranda 2010]. In einer weiteren Studie von Guescini et al. wurde mitochondriale DNA in Exosomen entdeckt, die

von Astrozyten und Glioblastomazellen freigesetzt wurden [Guescini 2010]. Auf diesem Gebiet sind jedoch weitergehende Studien notwendig, um im klinischen Alltag Verwendung zu finden.

Des Weiteren besitzen die Nukleosomen zusätzlich eine pathophysiologische Relevanz. So kann zum Beispiel im Körper zirkulierende Tumor-DNA von gesunden Zellen aufgenommen werden und diese im folgenden zu malignen Zellen umgewandelt werden [Garcia-Olmo 1999; Garcia-Olmo 2004]. Auch bei der Neoangiogenese schreibt man den Nukleosomen eine große Bedeutung zu. So stimulieren sie nach ihrer Freisetzung aus abgestorbenen Zellen in endothelialen Zellen die Expression von Interleukin-8, was die Neubildung von Gefäßen anregt [Tanner 2004]. Zudem haben die Nukleosomen auch antigene Eigenschaften und sind so wesentlich bei der Schädigung der glomerulären Basalmembran in der Niere aufgrund der Ablagerungen von Nukleosomen-Antikörper-Komplexen verantwortlich [Amoura 2000; Fournie 1988].

2.3.4 Nukleosomen in der klinischen Diagnostik

In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien untersucht, ob Nukleosomen in der klinischen Labordiagnostik zur Diagnose, zum Staging, zur Prognose oder zur Therapiekontrolle bei benignen oder malignen Erkrankungen eingesetzt werden können. Da bei malignen, autoimmunen, degenerativen, inflammatorischen und ischämischen Erkrankungen die Apoptose dereguliert ist [Lichtenstein 2001; Fadeel 1999 B; Holdenrieder 2004 A] und diese bei zytotoxischen Therapien gezielt beeinflusst werden soll, bietet sich das Zelltodprodukt "zirkulierende DNA" als geeignetes biochemisches Korrelat an. Selbst bei gesunden Patienten sind geringe Mengen von Nukleosomen zu detektieren, wobei drei Mechanismen bekannt sind. Der überwiegende Teil wird dabei von den absterbenden Zellen in die Blutbahn freigegeben [Lichtenstein 2001; Jahr 2001], die anderen Anteile stammen von einer aktiven Sekretion aus Lymphozyten, sowie der Freisetzung aus bestimmten Zelltypen nach deren Differenzierung, wie zum Beispiel der Erythroblasten, die im Laufe ihrer Entwicklung den Zellkern freisetzen [Lichtenstein 2001; Stroun 2000]. Da täglich etwa 10^{11} bis 10^{12} Zellen neugebildet werden, muss zur Erhaltung der Homöostase im menschlichen Körper eine ähnlich große Anzahl an Zellen zugrunde gehen, was meist auf apoptotischen Weg geschieht. Diese Homöostase ist bei verschiedenen Erkrankungen gestört und somit kommt es beispielsweise bei degenerativen Erkrankungen zu überschüssigem Zellabbau und

bei Tumorerkrankungen zu überschießendem Zellwachstum [Lichtenstein 2001; Fadeel 1999 B; Holdenrieder 2004 A].

Bei Patienten mit soliden Tumoren wurden höhere Nukleosomenwerte im Serum detektiert als bei Gesunden oder bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen [Holdenrieder 2001 A]. Im gleichen Jahr waren bei einem größeren Patientenkollektiv ähnliche Wertelagen entdeckt worden: Während Patienten mit malignen Tumoren die höchsten Nukleosomenkonzentrationen aufwiesen, zeigten Patienten mit benignen Erkrankungen niedrigere Werte und gesunde Probanden die niedrigsten Nukleosomenkonzentrationen. Hierbei waren die Unterschiede der benignen und malignen Gruppe jedoch nicht signifikant [Holdenrieder 2001 B]. Auch bei Patienten mit Prostatakarzinom konnte eine erhöhte Anzahl an zellfreier DNA im Serum festgestellt werden. Hierbei zeigte die zellfreie DNA eine höhere Spezifität als der Tumormarker PSA (64,0 % vs. 38,5 %) bei allerdings geringerer Sensitivität (87,5 % vs. 92,1 %) [Ellinger 2008 A]. Weiterhin konnten beim Lungenkarzinom [Sozzi 2001; Herrera 2005], beim invasiven Harnblasenkarzinom [Ellinger 2008 B], beim Hodenkarzinom [Ellinger 2009] und beim Mammakarzinom [Kuroi 1999] erhöhte Nukleosomenwerte festgestellt werden. In allen Studien waren die Wertelagen von Tumorpatienten und Kontrollgruppen mit benignen Erkrankungen jedoch sehr überlappend, weshalb die zirkulierenden Nukleosomen nicht für die Diagnostik von malignen Erkrankungen beziehungsweise Screeninguntersuchungen in Frage kommen.

Ebenso ist der Einsatz von Nukleosomen für Stagingzwecke fraglich. Auf der einen Seite fanden sich beispielsweise bei Karzinomen der Lunge und des Gastrointestinaltraktes signifikant höhere Werte bei Patienten mit fortgeschritteneren Tumoren [Maebo 1990; Fournie 1995; Holdenrieder 2001 C], auf der anderen Seite konnten keine derartigen Ergebnisse bei Patienten mit Mammakarzinom, Lungenkarzinom sowie diversen Karzinomarten beobachtet werden [Kuroi 2001; Sozzi 2001; Holdenrieder 2001 B; Holdenrieder 2001 C]. Auch bei Patienten mit kolorektalem Karzinom und palliativem Therapieziel wurden höhere Nukleosomenwerte beschrieben als bei Patienten mit adjuvanter Therapie [Holdenrieder 2005].

Neben der Diagnose einer Erkrankung ist auch deren Prognose für Ärzte und Patienten von enormer Bedeutung. Daher wurde in mehreren Studien eruiert, ob Nukleosomen bei Tumorpatienten als Prognosemarker fungieren können. Schwarzenbach et al. entdeckte 2008

erhöhte Nukleosomenwerte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, wobei sehr hohe Werte mit einer schlechteren Prognose einhergingen. Ebenfalls hatten Patienten mit hepatozellulärem Karzinom und höheren Nukleosomenwerten eine schlechtere Prognose als Patienten mit niedrigeren Werten [Ren 2006]. Auch bei Patienten mit Brustkrebs [Silva 2002; Gal 2004] und Lungenkrebs [Fournie 1995; Gautschi 2004] konnte eine derartige Assoziation gezeigt werden. Jedoch findet man auch hier widersprüchliche Ergebnisse. In einigen Studien konnte keine prognostische Wertigkeit der DNA festgestellt werden [Kuroi 1999; Sozzi 2001]. In einer Studie bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Nukleosomen und dem Überleben [Wimberger 2010]. Daher ist auch die prognostische Aussagekraft der zirkulierenden DNA eingeschränkt.

Die Therapiekontrolle von Tumorpatienten nach systemischer Chemotherapie oder Radiotherapie erfolgt größtenteils durch bildgebende Verfahren, wie CT, MRT und PET, mehrere Wochen oder Monate nach der Therapie. Zusätzlich werden onkologische Biomarker verwendet, die Tumor-assoziiert sind, wie beispielsweise das AFP. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass abfallende Werte auf ein positives Therapieansprechen und ansteigende Werte auf ein negatives Therapieansprechen zurückzuführen sind. Daher untersuchten mehrere Gruppen, ob Nukleosomen ein ähnliches Verhaltensmuster aufweisen und zum Monitoring einer Tumorthherapie geeignet sind. Dieses Verhaltensmuster wurde bei den Nukleosomen in verschiedenen Tumorentitäten bestätigt. So halbierten sich bei Patienten mit Regression ihres Tumors die prätherapeutischen Werte um 50 %, wohingegen bei Progression häufig eine Zunahme um mehr als 50 % zu sehen war [Holdenrieder 2001 B]. In Zervixkarzinompatientinnen wurden im Falle einer Remission fallende Nukleosomenwerte und bei Progression der Tumorerkrankung steigende oder konstant hohe Werte beobachtet [Trejo-Becceril 2005]. Auch in einer Studie an Brustkrebspatienten zeigte sich eine Korrelation der Nukleosomenverläufe mit der zytotoxischen Therapie [Kuroi 2001]. Eine weitere Studie brachte hervor, dass innerhalb einer Woche im Anschluß an eine Radiotherapie bei Tumorpatienten ein Anstieg der Nukleosomenwerte im Plasma erfolgte [Cheng 2009]. In einer Studie an 55 Patienten mit kolorektalem Karzinom zeigte sich ein Absinken der Werte nach mehreren Zyklen der Chemotherapie. Bei einer Progression stiegen die Nukleosomenwerte wieder an [Schwarzenbach 2008]. Zitt et al. untersuchte 2008 das Ansprechen einer Radiochemotherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom. Ein Abfall der Nukleosomen nach Ende der Therapie spricht für einen Therapieresponder, ein Anstieg dagegen für einen Nonresponder [Zitt 2008].

Bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom kann anhand von Nukleosomenverläufen eine Aussage über die Therapieeffizienz bei Chemo- und Radiotherapie gemacht werden. Im Allgemeinen kommt es hier zu einem schnellen Anstieg der Nukleosomenwerte bereits während der ersten Tagen nach Verabreichung der Therapie, der gefolgt ist von einem Abstieg auf prätherapeutische Wertlagen nach etwa einer Woche. Es gibt jedoch Unterschiede zwischen Patienten mit erfolgreicher Therapie und jenen mit einer frühen Krankheitsprogression. Bei unzureichender Therapiewirksamkeit stiegen die Werte während der ersten Tage stärker an und blieben nach einer Woche auf einem höheren Niveau. Somit konnte man schon in der allerersten Therapiewoche anhand des Nukleosomenverlaufs das spätere Therapieansprechen abschätzen [Holdenrieder 2004 B, Holdenrieder 2006].

In Studien an insgesamt 311 Patienten mit einem nicht kleinzelligem Lungenkarzinom während Erstlinien-Chemotherapie [Holdenrieder 2006], an 161 Patienten mit einem nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms während Zweitlinien-Chemotherapie [Holdenrieder 2009 A] und an 128 Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom während Erstlinien-Chemotherapie [Holdenrieder 2008] konnte anhand der Nukleosomenwerte während des ersten Therapiezyklus das Nicht-Ansprechen einer Therapie mit hoher Spezifität und Sensitivität erkannt werden [Holdenrieder 2009 B].

Ein weiteres Augenmerk richteten einige Studien auf die Aussagekraft von Nukleosomen bei der frühzeitigen Beurteilung von Tumorthérapien. Durch ein zeitnahes Erkennen eines Misserfolges einer Therapie könnte nämlich ein neuer Therapieplan durch den Arzt aufgestellt werden und auf der anderen Seite der Patient vor den gefährlichen Noxen beispielsweise einer weiteren Chemotherapie bewahrt werden. Natürlich wäre es zusätzlich für das Gesundheitswesen von besonderer Bedeutung, da immense Kosten durch erfolglose Therapiemaßnahmen eingespart werden könnten. Da Nukleosomen schnell in die Blutbahn freigesetzt werden und unter physiologischen Bedingungen eine kurze Halbwertszeit besitzen, kann der Verlauf der Nukleosomen innerhalb der ersten Tage nach einer Chemo- oder Radiotherapie die Effektivität einer Therapie kennzeichnen und die frühzeitige Beurteilung des Therapieansprechens ermöglichen, wie in den oben genannten Studien gezeigt wurde [Holdenrieder 2009 B].

Neben den Studien an Lungentumorpatienten wurden auch weitere Tumorarten exemplarisch untersucht. So analysierte Kremer et al. 2005 den Nukleosomenverlauf bei 32 Patienten mit Pankreastumor im Verlaufe der ersten Woche einer Radiochemotherapie. Hierbei konnte gezeigt werden, dass anhand der Fläche unter der Kurve der Nukleosomenwerte der ersten

drei Behandlungstage eine Aussage über den Therapieerfolg gemacht werden kann. Auch bei der akuten myeloischen Leukämie konnte anhand der Nukleosomen innerhalb der ersten beiden Wochen frühzeitig der Erfolg einer Chemotherapie gesehen werden. Höhere Nukleosomenwerte im Serum der Patienten während der ersten Behandlungstage deuteten auf ein besseres Ansprechen und eine anschließende komplette Remission hin [Mueller 2006]. All die aufgeführten Studien zeigen, dass es mit Hilfe der Nukleosomen in Zukunft möglich sein könnte, im klinischen Alltag frühzeitig den Erfolg einer Tumorthherapie zu erkennen und danach den weiteren Therapieablauf richten zu können.

Nicht nur maligne Prozesse führen zu einem erhöhten Nukleosomengehalt im Blut. Auch bei benignen Erkrankungen wurde der neue Biomarker untersucht. So wurden beispielsweise erhöhte Nukleosomenwerte im Plasma bei Patienten mit Fieber, schwerer Sepsis und septischem Schock gefunden [Zeerleder 2003]. Bei Schlaganfällen zeigten sich erhöhte Nukleosomenzahlen im Blut, wobei der Wert am dritten Tag nach dem cerebralen Infarkt zusätzlich eine prognostische Bedeutung hat [Geiger 2007]. Auch Rainer et al. untersuchte im Jahr 2003 den Nukleosomenverlauf bei Patienten mit Schlaganfall, hier aber im Plasma. Hier zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Nukleosomengehalt und Mortalität, wobei Patienten mit hohen Werten eine schlechtere Prognose hatten. Weiterhin wurde bei der Endometriose vermehrt zirkulierende DNA im Plasma der Patientinnen gefunden [Zachariah 2009]. Lo et al. untersuchte im Jahr 2000 den Plasma-DNA-Gehalt bei Patienten nach einem akuten stumpfen Trauma. Hierbei waren die Werte bei gesunden Probanden niedriger als Werte bei Patienten mit einem akuten Trauma. Des Weiteren zeigten Patienten mit höherem Injury Severity Score (ISS) einen höheren Wert als Patienten mit niedrigem ISS. Die DNA-Werte bei Patienten mit pulmonalen Komplikationen lagen um mehr als das 10-fache über den Werten der Patienten ohne Komplikation. Auch beim Morbus Whipple sind erhöhte Nukleosomenwerte zu sehen, deren Höhe zudem eine Aussage über die Aktivität leisten kann [Benoit 2007]. Beim systemischem Lupus erythematodes wurden ebenfalls erhöhte Nukleosomenwerte festgestellt [Amoura 1997]. Auch bei Patienten mit ANCA assoziierten Vaskulitiden, Autoimmunhepatitiden und Kollagenosen stellte man erhöhte Nukleosomenwerte im Serum fest [Holdenrieder 2006 A].

2.4 Biomarker

Neben den bereits dargelegten Nukleosomen und dem α_1 -Fetoprotein wurden innerhalb dieser Studie weitere Biomarker als prädiktive und prognostische Marker einer transarteriellen Chemoembolisation bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom evaluiert. In diesem Kapitel werden diese Laborparameter kurz erläutert [Dörner 2003; Thomas 2005].

Cytokeratin 19-Fragmente (CYFRA 21-1)

CYFRA 21-1 ist ein Zytokeratin mit einem Molekulargewicht von 40 kDa. Zytokeratine gehören wie beispielsweise Vimentin und Desmin zu den Intermediärfilamenten. Bei den Zytokeratinen handelt es sich um unlösliche Stützproteine der Zelle, wohingegen ihre Fragmente serumlöslich sind. Cytokeratinfragment 19 wird im Zytoplasma mehrerer epithelialer Tumore inklusive der Lungenkarzinome exprimiert und kann mittels immunhistochemischer Methoden detektiert werden. Bei apoptotischem und nekrotischem Zelltod wird CYFRA 21-1 in die Blutzirkulation freigesetzt [Broers 1988; Bodenmüller 1992].

CYFRA 21-1 ist bei Patienten mit Lungenkarzinomen erhöht, vor allem in fortgeschrittenen Stadien und ist somit nicht nur als Zelltodparameter anerkannt, sondern auch als Tumormarker [Stieber 1994]. Vor allem beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ist CYFRA 21-1 ein Biomarker mit hoher prognostischer Aussagekraft zum Diagnosezeitpunkt, sowie ein wichtiger Verlaufsparemeter nach systemischer Therapie. Weiterhin gibt der postoperative Verlauf von CYFRA 21-1 wichtige Hinweise auf die Prognose. Auch ein Rezidiv eines Lungenkarzinoms kann mit Hilfe des CYFRA 21-1 detektiert werden [Stieber 2000].

In einer Studie von Uenishi et al. wurden erhöhte Werte von CYFRA 21-1 in Patienten in fortgeschrittenen Stadien des HCC mit Pfortaderthrombose beobachtet, jedoch zeigte dieser Biomarker mit 18 % eine sehr geringe Sensitivität [Uenishi 2006].

Ebenso ist CYFRA 21-1 bei Tumoren des HNO-Traktes neben dem Squamos Cell Carcinoma Antigen (SCCA) und dem karzinoembryonalen Antigen (CEA) ein relevanter Biomarker. Während CYFRA 21-1 weniger zur Diagnose und zum Screening geeignet ist, kann es vor allem zur Verlaufskontrolle bei Patienten mit einem HNO-Karzinom hilfreich sein [Kurokat 2002, Stieber 2000].

Laktatdehydrogenase (LDH)

LDH ist ein Enzym, das gelöst im Zytoplasma in praktisch allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat mit der gleichzeitigen Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ bzw. dessen Rückreaktion ($\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Lactat} + \text{NAD}^+$). In der Labordiagnostik ist dieser Marker zur Bestimmung von Gewebe- und Organschädigungen geeignet. Im menschlichen Körper sind fünf Isoenzyme der LDH bekannt, welche in verschiedenen Organen bevorzugt vorkommen. So findet man die Isoenzyme LDH-1 und LDH-2 vorwiegend im Herzmuskel als auch in den roten Blutkörperchen, LDH-3 in der Milz, der Lunge und den Lymphknoten und LDH-4 sowie LDH-5 vor allem in der Leber und im Skelettmuskel. Der Referenzbereich erstreckt sich im Universitätsklinikum München-Großhadern bis 245 U/L.

Nach einem Zellschaden werden intrazelluläre Bestandteile, wie beispielsweise die LDH, in erhöhter Konzentration in die Blutzirkulation freigesetzt. Allerdings kann nur anhand der Bestimmung der LDH-Isoenzyme nachvollzogen werden, welchem Organ die Herkunft der Enzymerhöhung zuzuschreiben ist. Die Bestimmung der LDH kann vor allem bei hämatologischen Erkrankungen, bei Muskelerkrankungen sowie bei Leber- und Gallenwegserkrankungen Aufschluss darüber geben, ob ein pathologischer Prozess vorliegt. Vor Entdeckung des kardialen Troponins zur Diagnostik von Myokardinfarkten, wurde die LDH-Aktivität auch hierfür verwendet. Während LDH als diagnostisches Kriterium für eine Tumorerkrankung nicht geeignet ist, kann es für die Verlaufsbeobachtung und die Prognose nützlich sein. Letztlich kann eine Diagnose nur in Zusammenschau mehrerer Befunde gestellt werden.

C-reaktives Protein (CRP)

Das CRP ist ein kohlenhydratfreies Protein, das in der Leber synthetisiert wird. Von dort wird es als Akute-Phase-Protein in die Blutzirkulation freigesetzt. Das CRP steigt vor allem bei Erkrankungen entzündlicher Genese an, wobei eine bakterielle Infektion den stärksten Stimulus darstellt. Hier kann das CRP innerhalb von Stunden bis zum 2000fachen des normalen Wertes ansteigen. Dagegen erfolgt bei viraler Infektion mit Ausnahme der Adenoviren in der Regel kein Anstieg des CRP. Es dient daher einerseits als differentialdiagnostischer Marker zwischen bakterieller und viraler Infektion. Weiterhin wird er als Verlaufsmarker bei nekrotisierenden, neoplastischen und rheumatischen Erkrankungen verwendet, denn auch nach größeren chirurgischen Eingriffen, Traumata, metastasierenden Tumoren und akuten Schüben einer rheumatischen Erkrankung kann das CRP stark erhöht

sein. Die quantitative Bestimmung erfolgt mittels Nephelometrie, wobei sich der Referenzbereich bis 0,5 mg/dL erstreckt.

Glutamatoxalacetattransaminase (GOT) bzw. Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Glutamatpyruvattransaminase (GPT) bzw. Alanin-Aminotransferase (ALAT)

GOT und GPT gehören zur Gruppe der Transaminasen, welche für den Abbau von Aminosäuren durch Desaminierung verantwortlich sind. Obwohl beide Enzyme in allen Organen und Zellen vorkommen, ergibt sich aus der stark unterschiedlichen Organkonzentration eine beachtliche Organselektivität. Während die GPT nahezu ausschließlich in der Leber vorkommt, ist die GOT neben der Leber auch stark in Herz und Skelettmuskulatur lokalisiert. Weiterhin unterscheiden sich beide Enzyme ebenso nach ihrer Lokalisation in der Zelle. Die GPT befindet sich vor allem im Zytoplasma, die GOT ist auch in den Mitochondrien lokalisiert.

Daraus ergibt sich auch die diagnostische Bedeutung der beiden Enzyme: Haupteinsatzort ist die Leberdiagnostik. Durch den Einsatz des De-Ritis-Quotienten (GOT / GPT) kann die Stärke des Leberzellschadens beurteilt werden. Ein kleiner De-Ritis-Quotient (<1) weist auf einen geringen Leberschaden hin, wie z.B. bei einer Virushepatitis. Dagegen spricht ein großer De-Ritis-Quotient (>1) für eine schwere Leberzellschädigung, wie beispielsweise bei chronischer Hepatitis und Alkoholabusus, denn bei einer schweren Leberzellschädigung werden vermehrt mitochondriale Enzyme freigesetzt.

Zur Diagnostik bei Myokardinfarkt hat die GOT, ebenso wie die LDH, nach Einführung des kardialen Troponins an Einfluss verloren. Zur Diagnose von Tumorerkrankungen sind GOT und GPT nicht geeignet. Der Referenzbereich der GOT reicht von 10–31 U/L bei Frauen und 11–39 U/L bei Männern, der von GPT von 9–35 U/L bei Frauen und von 9–43 U/L bei Männern.

Glutamatdehydrogenase (GLDH)

Die GLDH befindet sich vor allem in den Mitochondrien der Hepatozyten und ist dort für die Bildung von Ammoniak verantwortlich. Indiziert ist die Bestimmung der GLDH zur Abschätzung des Schweregrades einer Leberschädigung. Je tiefgreifender eine hepatische Schädigung ist, desto höhere GLDH-Aktivitäten sind im Blut messbar. Der Referenzbereich geht bei Frauen bis 4,8 U/L, bei Männern bis 6,5 U/L.

Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT)

Auch die GGT kommt in mehreren Organen vor, aber hauptsächlich in Niere und Leber. Die GGT ist durch ihre Reaktion am Aminosäuretransport in die Zelle hinein beteiligt. Das Enzym ist an den Strukturen der Zellmembran angelagert und kann davon relativ leicht entfernt werden. Indiziert ist dieser Laborparameter bei Leber- und Gallenwegserkrankungen, da durch Cholestase die GGT von der Zelloberfläche abgelöst wird und somit zu einer Erhöhung der Enzymaktivität im Blut führt. Auch bei chronischem Alkohol- und Medikamentenabusus ist durch eine Induktion der Enzymsysteme eine erhöhte Aktivität im Serum nachweisbar. Der Referenzbereich der GGT liegt bei Frauen zwischen 7-32 U/L, bei Männern zwischen 11-49 U/L.

Alkalische Phosphatase (AP)

Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, welches Phosphorsäureester hydrolysiert und am effektivsten im alkalischen Milieu arbeitet. Dabei werden Phosphat-Gruppen u.a. von Proteinen und Nukleotiden entfernt. Es wird unterschieden zwischen einer Leber-, Knochen-, Dünndarm- und Plazenta-AP, wobei die ersten beiden diagnostisch am relevantesten sind. Die Bestimmung der AP ist indiziert bei Verdacht auf eine Erkrankung der Knochen und bei der Differenzialdiagnose von Leber- und Gallenwegserkrankungen. Sehr hohe Werte werden vor allem bei malignen Knochentumoren (Osteosarkom) oder beim Morbus Paget detektiert. Zudem findet sich eine Erhöhung der Enzymaktivität auch bei hepatobiliären Erkrankungen. Ein starker Anstieg ist bei Lebermetastasen und Cholestase zu beobachten, schwächere Anstiege des AP können die Folge von akuten und chronischen Hepatitiden sein. Es ist auch möglich, dass Knochenmetastasen zu erhöhten Werten führen. Der Referenzbereich der GGT liegt bei Frauen zwischen 35-104 U/L, bei Männern zwischen 40–129 U/L.

Bilirubin

Das Bilirubin wird hauptsächlich beim Abbau des Hämoglobins gebildet und an Albumin gebunden zur Leber transportiert. Intrahepatisch wird das Bilirubin glucuronidiert und in die intrahepatischen Gallenwege freigesetzt. Der weitere Abbauprozess zum Urobilinogen wird durch Bakterien im Dünndarm fortgesetzt. Der größte Teil wird über weitere Umbauprozesse mit dem Stuhl ausgeschieden. Kleinere Teile werden über den Urin ausgeschieden oder in die Blutbahn rückresorbiert. Der Normalwert des Gesamtbilirubins im Serum liegt unter 1,2 mg/dl. Bei einer Hyperbilirubinämie kommt es zu einem Ikterus, wobei sich zunächst die Skleren und bei höheren Werten die Haut gelb verfärben. Beim Ikterus werden drei Arten

unterschieden: Ein prähepatischer Ikterus, der beispielsweise bei starker Hämolyse auftreten kann, ein intrahepatischer Ikterus, der sich bei Bilirubinstoffwechselstörungen oder intrahepatischer Cholestase zeigen kann, oder ein posthepatischer Ikterus, der bei einer extrahepatischen Cholestase entstehen kann. Bei Medikamenteneinnahme kann es zu einer intrahepatischen Cholestase kommen, wodurch das Gesamtbilirubin ansteigen kann. Zur Differenzialdiagnose dieser drei Ikterusursachen wird zusätzlich das direkte Bilirubin bestimmt und im Vergleich zum Gesamtbilirubin bewertet.

Cholinesterase (CHE)

Cholinesterasen werden in der Leber synthetisiert und sorgen für die Spaltung von Cholin-Ester. Neben der Acetylcholinesterase, welche den Neurotransmitter Acetylcholin spaltet, existiert die Pseudocholinesterase, die ein breiteres Substratspektrum hat. Diagnostische Bedeutung hat vor allem die Pseudocholinesterase. Ihr Referenzbereich liegt zwischen 5,0 und 13,3 kU/L. Mit Hilfe der Bestimmung der CHE können Hinweise auf die Syntheseleistung der Leber gewonnen werden. Chronische Erkrankungen, wie eine chronische Hepatitis oder eine Leberzirrhose, führen zu erniedrigten Werten der CHE und zeigen eine Störung der Proteinsynthese der Leber an, wobei die Wertelage mit der Schwere der hepatischen Erkrankung korreliert. Auch bei Tumoren können gelegentlich erniedrigte Werte gemessen werden. Bei akuten Lebererkrankungen liegt die CHE-Aktivität dagegen oft im Referenzbereich, da die CHE eine lange biologische Halbwertszeit von 12-14 Tagen aufweist.

Amylase

Die Amylase kommt in zwei Isoenzymen vor, der pankreatischen und der salivären Amylase. Ihre Aufgabe besteht in der Spaltung von Kohlenhydraten bis hin zur Maltose. Indiziert ist die Bestimmung der Amylase vor allem bei unklaren Oberbauchbeschwerden bei der Frage nach einer akuten Pankreatitis. Der Anstieg der Amylase bei akuter Pankreatitis erfolgt nach wenigen Stunden und die Amylase normalisiert sich nach 1 bis 4 Tagen. Zusätzlich kann die Amylase bei Verdacht auf Speicheldrüsenerkrankungen bestimmt werden. Der Normalwert der Amylase liegt bei beiden Geschlechtern unter 220 U/L.

Lipase

Die Lipase ist ein weiteres Pankreasenzym, kommt jedoch auch in sehr geringer Konzentration in Leber, Magenfundus, Speicheldrüsen, Dünndarmmukosa, Gefäßendothelien

und Fettgewebe vor. Sie wird, wie die Amylase, zur Abklärung bei unklaren Oberbauchschmerzen verwendet. Der Referenzbereich der Lipase liegt zwischen 13 und 60 U/L. Vorteil der Lipase im Gegensatz zur Amylase ist die weitaus höhere Spezifität und Sensitivität bei allen Formen einer Pankreatitis. Nach einer langjährigen chronischen Pankreatitis werden aufgrund der exokrinen Insuffizienz keine Lipaseerhöhungen mehr detektiert. Der Abfall der Lipase erfolgt nach 5–10 Tagen und tritt somit später als bei der Amylase ein.

Kreatinin

Kreatinin ist eine harnpflichtige Substanz und entsteht durch eine Wasserabspaltung des Kreatinphosphats, welches in der Muskulatur aus Kreatin und ATP entsteht. Die Ausscheidung des Kreatinin erfolgt nahezu ausschließlich über die Niere. Die Bestimmung des Kreatinins ist im Serum, Plasma und Urin möglich. Im Serum liegt der Referenzbereich bei Frauen zwischen 0,5 und 1,0 mg/dL, bei Männern zwischen 0,5 und 1,2 mg/dL. In der klinischen Routine wird es zur Überprüfung der Nierenfunktion und zur Verlaufskontrolle bei Nierenerkrankungen verwendet. Jedoch steigt die Kreatininkonzentration im Serum erst an, wenn die glomeruläre Filtrationsrate auf 50 % oder weniger reduziert ist.

Harnstoff

Der Harnstoff ist das Endprodukt beim Proteinstoffwechsel, welcher in der Leber entsteht und zu 90 % über die Niere ausgeschieden wird. Die Höhe des Harnstoffspiegels hängt von der Proteinzufuhr, dem Proteinkatabolismus und der glomerulären Nierenfunktion ab, weshalb pathologische Werte nicht nur renal bedingt sind. Der Referenzbereich liegt zwischen 12 und 48 mg/dL. Der Harnstoff dient zur Diagnostik und Verlaufskontrolle einer Niereninsuffizienz und zur Kontrolle der Proteinzufuhr bei Niereninsuffizienz.

Harnsäure

Ein weiterer hauptsächlich renal ausgeschiedener Stoff ist die Harnsäure. Sie ist das Endprodukt des Purinstoffwechsels. Der Referenzbereich bei Frauen liegt zwischen 2,5–5,9 mg/dL und bei Männern zwischen 3,5–7,1 mg/dL. Eine Erhöhung kann beispielsweise bei einer Niereninsuffizienz vorliegen, da hierbei die Ausscheidung der Harnsäure gestört ist. Weitere Ursachen für eine Erhöhung der Harnsäure ist hauptsächlich die primäre Hyperurikämie, die als Gicht bekannt ist.

3 Patienten und Methoden

3.1 Patienten

Das Studiendesign der Doktorarbeit war eine prospektive, reine Beobachtungsstudie ohne Randomisierung und zusätzliche Intervention. Den Antrag zu dieser Studie hat die Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilian-Universität bewertet und genehmigt. Ausschließlich erwachsene Personen mit vollständiger Aufklärungs- und Zustimmungsfähigkeit wurden in meine Studie aufgenommen. Alle meine Patienten wurden vor Abnahme der ersten Blutproben von mir persönlich über Ablauf, Theorie und Nutzen der Studie umfassend informiert und aufgeklärt. Von jedem dieser Patienten musste eine schriftliche Erklärung über ihre Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie vorliegen. Alle Patienten kamen von den Stationen F6A, F7, F8, F9 und F21 der II. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern. Sämtliche Blutentnahmen zu den in der Studie definierten Zeitpunkten über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr wurden nur durch mich persönlich durchgeführt.

Es wurden konsekutiv Patienten mit der Diagnose eines hepatozellulären Karzinoms nach den Kriterien der AASLD eingeschlossen, die mit transarterieller Chemoembolisation behandelt wurden. Vornehmlich wurden Patienten vor der ersten TACE-Therapie aufgenommen, aber auch spätere TACE-Therapien wurden berücksichtigt. Es gab keine speziellen Selektionskriterien für die Auswahl der Patienten. Lediglich Patienten mit einem Zweitkarzinom sowie Patienten, die eine Teilnahme an der Studie verweigerten, schlossen wir aus.

Im Zeitraum von April 2007 bis Juli 2008 wurden insgesamt 50 Personen mit der Diagnose eines HCC konsekutiv in die Studie aufgenommen. Davon waren 8 Patienten weiblich und 42 Patienten männlich. Das Alter der Patienten erstreckte sich bei Studienbeginn von 45 Jahren bis 83 Jahren, der Median lag bei 66,7 Jahren. Bei Primärdiagnose waren die Patienten im Durchschnitt 64,1 Jahre alt. Nach der TNM-Einteilung (Tabelle 2) befanden sich 10 Patienten in Stadium I, 4 Patienten im Stadium II, 36 Patienten im Stadium III und keiner der Patienten im Stadium IV. Alle Patienten bekamen eine oder mehrere transarterielle Chemoembolisationen im Institut für Klinische Radiologie des Klinikums Großhadern (Tabelle 7). Das mediane Überleben der Patienten ab Studienbeginn lag bei 14,5 Monaten.

	Median	Range
Alter bei Studienbeginn (J)	66,7	45,1 - 83,7
Gesamtüberleben (Mon)	14,5	1,1 - 25,1
<hr/>		
	Anzahl	Prozent
Gesamt	50	100,0
<hr/>		
Geschlecht		
Weiblich	8	16,0
Männlich	42	84,0
Leberzirrhose	37	74,0
Child-Pugh Stadium		
A	20	40,0
B	14	28,0
C	3	6,0
Risikofaktoren		
HBV	2	4,0
HCV	8	16,0
HBV + HCV	3	6,0
Alkoholische Leberzirrhose	21	42,0
Alkohol + HCV	1	2,0
Anzahl der Tumorknoten		
Singuläre Läsion	13	26,0
Zwei Läsionen	8	16,0
Multiple Läsionen	29	58,0
Tumorgröße		
≤1 cm	2	4,0
≤3 cm	14	28,0
≤5 cm	17	34,0
≤10 cm	13	26,0
>10 cm	4	8,0
Stadium		
T1	10	20,0
T2	4	8,0
T3	36	72,0
T4	0	0,0
Indikation zur TACE		
Palliativ	33	66,0
Bridging	6	12,0
Palliative (plus RFA)	6	12,0
Palliativ nach Resektion	5	10,0

	Anzahl	Prozent
Behandlungen vor TACE		
Tumorsektion	5	10,0
PEI	2	4,0
Behandlungen nach TACE		
TACE	21	42,0
Sorafenib	7	14,0
TACE und Sorafenib	4	8,0
LTX	6	12,0
Zeitpunkt Studieneinschluss		
1. TACE Behandlung	21	42,0
2. oder spätere TACE Behandlung	29	58,0
Anzahl TACE pro Patient		
1 Therapie	33	66,0
2 Therapien	9	18,0
3 Therapien	6	12,0
4 Therapien	2	4,0
Gesamtanzahl TACE Therapien	77	

Tabelle 7 Patientenübersicht

3.2 Transarterielle Chemoembolisation

Die transarterielle Chemoembolisation wurde von Herrn PD Dr. med. Wagershauser oder einem seiner Kollegen im Institut für Klinische Radiologie – Klinikum der Universität München durchgeführt. Der regelhafte Ablauf der TACE war wie folgt:

Nach Hautdesinfektion und sterilem Abdecken der rechten Leistengegend folgte unter Lokalanästhesie die Punktion der rechten Femoralarterie in Seldinger-Technik. Danach wurde eine 4 French Schleuse und ein 4 French Kobrakatheter eingelegt. Daraufhin folgte die selektive Darstellung des Bauchhöhlenstammes (Truncus coeliacus) und der Leberarterie (Arteria hepatica). Mit Hilfe der indirekten Portographie wurde zusätzlich die Durchgängigkeit der Pfortader untersucht. Unter Einführen eines Terumo-Drahtes wurden rechte und linke Leberarterie sondiert. Im weiteren Behandlungsverlauf wurden die Tumorherde angiografisch dargestellt und anschließend mit Epirubicin und Lipiodol embolisiert. In den meisten Fällen wurden 50 mg Epirubicin in 5 ml Lipiodol über die gesamten hypervaskularisierten Areale der Leber verteilt. Nach Verabreichung des Chemotherapeutikums wurde die Anreicherung des Lipiodols in der Leber beurteilt.

Es folgten das Entfernen des Katheters und der Schleuse sowie anschließend das manuelle Abdrücken der rechten Leiste für fünf bis zehn Minuten. Schließlich wurde ein Druckverband

angelegt, welcher für ungefähr 24 Stunden belassen wurde. Im Anschluss sollte strenge Bettruhe für vier Stunden eingehalten werden.

3.3 Klinische Bewertung der Therapieeffizienz

Die Evaluation des Therapieansprechens ist ein wichtiger Bestandteil einer Tumorthherapie, da prätherapeutisch keine sichere Aussage über die Wirksamkeit einer Tumorthherapie getroffen werden kann. Zur Kontrolle der Therapieeffizienz erfolgen nach mehreren Wochen bis Monaten üblicherweise Staging-Untersuchungen mittels bildgebender Verfahren und Tumor- oder Organ-bezogener Blutparameter.

Im Klinikum Großhadern erfolgte die erste TACE kurz nach Sicherung der Diagnose eines hepatozellulären Karzinoms mittels radiologischer Diagnostik und dem Tumormarker AFP. Im Regelfall wurden die Patienten nach eineinhalb bis vier Monaten zur Evaluation des Therapieansprechens erneut in das Universitätsklinikum einbestellt. Bei Persistenz von vitalen Tumoranteilen und arterieller Hypervaskularisation des Tumors bei der Kontrolluntersuchung mittels bildgebender Diagnostik wurde eine weitere Chemoembolisation am darauffolgenden Tag durchgeführt. Die große Divergenz des Zeitraums bis zur Kontrolluntersuchung ist einerseits auf die Eigenschaften des Tumors, die das Therapieintervall bestimmen, andererseits auch auf die mangelnde Compliance der Patienten zurückzuführen.

Die Therapieeffizienz in unserer Studie wurde mittels der schriftlich dokumentierten Befunde der Computertomografie oder der Kernspintomografie vor und nach der Therapie überprüft. Bei der Beurteilung des Verlaufes anhand der radiologischen Befunde wurden nach Möglichkeit die RECIST-Kriterien (Tabelle 6) angewendet. Hiernach wurden die Patienten in Gruppen mit kompletter oder partieller Remission, sowie stabiler Erkrankung und Progression eingeteilt. In Ausnahmefällen wurde zusätzlich der klinische Verlauf als Ansprechen der Therapie in die Bewertung mit einbezogen. Hierbei wurden Patienten, die vor einer erneuten Bildgebung verstorben waren, in die Gruppe der Non-Responder eingeteilt.

In Tabelle 8 ist das Therapieansprechen der Patienten, die genutzten Modalitäten zur Bestimmung des Therapieansprechens und die Zeit bis zur Bestimmung des Therapieansprechens zusammengefasst. Da bei 6 Patienten, bzw. 6 TACE-Therapien zusätzlich am folgenden Tag eine Radiofrequenzablation durchgeführt wurde und damit die posttherapeutische Bildgebung verfälscht war, werden diese Patienten extra aufgeführt und

beim Therapieansprechen nicht mit ausgewertet. Somit bleiben noch 71 transarterielle Chemoembolisationen, von denen 2 eine Remission, 30 einen stabilen Befund und 32 eine Progression ihres Tumors aufweisen.

Therapieansprechen	Anzahl	Prozent
TACE + RFA		
Remission	5	6,5
PD	1	1,3
TACE		
Remission	2	2,6
SD	30	39,0
PD	39	50,7
Therapiekontrolle		
CT – Abdomen		
CR	1	1,3
PR	1	1,3
SD	24	31,2
PD	27	35,1
NMR – Abdomen		
CR	2	2,6
PR	3	3,9
SD	5	6,5
PD	5	6,5
Oberbauch - Sonographie		
PD	2	2,6
Klinik		
SD	1	1,3
PD	6	7,8
Tage bis Therapiekontrolle nach TACE		
< 60 Tage	22	28,6
60-90 Tage	38	49,4
> 90 Tage	17	22,1

Tabelle 8 Therapieansprechen und Therapiekontrolle

Das am häufigsten genutzte bilgebende Verfahren zur Bildkontrolle war die Computertomografie mit über 60 %, gefolgt von der Kernspintomografie mit ungefähr 20 %. Bei zwei Patienten musste auf eine Oberbauchsonographie zurückgegriffen werden, wobei hier

aber bei beiden Patienten eine eindeutige Progression ihrer Erkrankung vorlag. Da bei 7 weiteren Therapien keine Bildgebung vorlag, wurden diese Patienten anhand ihrer Klinik eingeteilt. Davon starben 6 Patienten und wurden somit in die Kategorie der Progression eingeteilt.

Der Median der posttherapeutischen Therapieevaluation lag bei 70 Tagen, wobei sich die Zeitpunkte über einen Zeitraum von 22 Tagen bis zu 216 Tagen verteilten. Eine Person starb bereits 22 Tage nach erfolgter Chemoembolisation und wurde deshalb in die Gruppe der Non-Responder eingeteilt. Ein weiterer Patient erschien nicht zur geplanten Therapiekontrolle aufgrund seines guten Allgemeinbefindens und starb nach 216 Tagen an seinem Tumorleiden. Insgesamt waren es nur vier Patienten, deren Therapieansprechen nach mehr als 4 Monaten evaluiert wurde, von denen zwei in die Gruppe der Responder aufgenommen wurden. Jedoch lag der Untersuchungszeitpunkt der meisten Patienten innerhalb eines Intervalls von zwei bis drei Monaten.

3.4 Methoden

3.4.1 Gewinnung und Vorbehandlung der Blutproben

Die Zeitpunkte der Blutentnahmen wurden so gewählt, dass sie im normalen klinischen Ablauf vorgenommen werden konnten. Die eigenhändig durchgeführten Blutabnahmen erfolgten vor Beginn der transarteriellen Chemoembolisation, drei bzw. sechs Stunden nach der Therapie, und am Morgen des darauffolgenden Tages.

Aus einer Cubitalvene wurde möglichst hämolysefrei Blut in zwei Blutröhrchen der Firma Sarstedt (S-Monovette[®]) entnommen. Hierbei wurde ein Serumröhrchen der Größe 9 ml und ein Kalium-EDTA-Röhrchen der gleichen Menge verwendet. Abweichend hiervon wurden bei den drei bzw. sechs Stunden Abnahmen jeweils nur 4,7 ml Kalium-EDTA-Röhrchen gebraucht. Für die Bestimmung der Nukleosomen verwendeten wir Serumproben. Die präanalytische Behandlung der Proben erfolgte in der von Holdenrieder et al. beschriebenen Weise [Holdenrieder 2001 B]. Im Einzelfall wurde das Vollblut spätestens ein bis zwei Stunden nach der Entnahme für etwa 10 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand vom Blutkuchen wurde abgesert. 1 ml dieses Serums wurde mit 100 µl einer 100 mM EDTA-Lösung (Ethylendiamin-Tetraacetat) versetzt, gut gemischt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Noch am selben Tag wurden die stabilisierten Seren in 2 ml Plastikgefäße der Fa. Greiner mit Schraubverschluss gefüllt. Insgesamt wurden zwei Aliquots mit EDTA

versetztem Serum, drei mit nativem Serum und zwei bzw. drei weitere mit Plasma, jeweils mit etwa 500 µl Volumen, bei -80°C tief gefroren. Innerhalb eines Jahres wurde von jeder Blutabnahme eines der stabilisierten EDTA-Seren aufgetaut und darin durch mich persönlich die Konzentration der Nukleosomen gemessen. Der Apoptosemarker CYFRA 21-1 und der Tumormarker AFP wurde durch Mitarbeiterinnen des Kompetenzzentrums „Onkologische Labordiagnostik“ unter der Leitung von Frau Dr. Stieber aus nativen Seren bestimmt. Die Mitarbeiterinnen des Hauptlabors des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Großhadern haben ebenso aus den nativen Seren die übrigen Laborparameter gemessen.

3.4.2 Quantifizierung der Konzentration von Nukleosomen

Der Cell Death Detection-ELISApplus (CDDE-Test) von Roche Diagnostics, Mannheim (Katalog-Nummer 1774425) wurde für die Messung der Nukleosomen im Serum verwendet. Dieser nicht-kompetitive Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) beruht auf dem Sandwichprinzip. Hierbei werden die Nukleosomen von zwei monoklonalen Maus-Antikörpern, die gegen Histone und DNA gerichtet sind, spezifisch gebunden. Zusätzlich bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Mikrotiterplatte und stellt den Festphasen-Antikörper dar. Der Anti-DNA-Antikörper ist mit dem Enzym Peroxidase markiert, welches das Substrat ABTS (2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)) umsetzt. Eine Farbreaktion wird erreicht, wenn beide Nukleosomenkomponenten, Histone und DNA, vorhanden sind. Die Anzahl an Nukleosomen, die von Antikörpern gebunden wird, ist proportional zur entstehenden Farbentwicklung. Anhand einer Kalibrationskurve wird die photometrische Messung und Quantifizierung der Nukleosomen in einer Serumprobe ermöglicht.

Für diesen ELISA werden verschiedene Materialien benötigt, die teils gebrauchsfertig mitgeliefert werden oder vor dem Test hergestellt werden müssen:

- PBS (Phosphate Buffer Saline): Gebrauchsfertige Lösung, die 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O und 0,2 g KH₂PO₄ in einem Liter Wasser enthält und auf pH = 7,4 justiert ist.
- Inkubationspuffer: Gebrauchsfertige Lösung, die PBS mit 1% Rinderserumalbumin, 0,5 % Tween 20 und 1 mM EDTA enthält.
- Anti-Histon-Biotin: Tablette eines lyophilisierten und biotinylierten Anti-Histon-AK Panels, die in 450 µl bidestillierten Wasser aufgelöst wird.

- Anti-DNA-POD: Tablette eines lyophilisierten und Peroxidase markierten Anti-DNA-AK Panels, die in 450 µl bidestillierten Wasser aufgelöst wird.
- Immunreagens: 1/20 Volumenanteile der biotinylierten Anti-Histon-Antikörper und 1/20 Volumenanteile der Peroxidase markierten Anti-DNA-Antikörper werden vorsichtig mit 18/20 Volumenanteilen Inkubationspuffer homogenisiert.
- Substratpuffer: Gebrauchsfertige Lösung, die 1047,5 mg Zitronensäure, 62,5 mg Natriumperborat * 3 H₂O, 9,77 mg CaCl₂ * H₂O, 1335 mg Na₂HPO₄ * 2 H₂O in 125 ml enthält und auf pH = 4,5 justiert ist.
- Substrat: Drei Tabletten mit 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat) (ABTS), die unmittelbar vor Gebrauch in 15 ml Substratpuffer gelöst werden und lichtgeschützt gelagert werden müssen.
- Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte und Adhäsiv-Folien.

Die für diesen CDDE-Test verwendeten monoklonalen Anti-Histon-Antikörper besitzen eine spezifische Affinität für die Histone H2a, H2b, H3 und H4 und stammen aus dem Mausklon H 11-4. Im Mausklon M-CA-33 wurden die monoklonalen Anti-DNA-Antikörper gezüchtet, die Einzel- und Doppelstrang-DNA erkennen können. Aufgrund des Sandwichverfahrens werden nur nukleäre Mono- und Oligonukleosomen aus eukaryontischen Zellen erfasst. In Mitochondrien und prokaryontischen Zellen, wie Bakterien, Rickettsien und Viren ist die DNA nicht mit Histonen assoziiert und kann deshalb auch nicht in Form von Nukleosomen vorliegen. Auch RNA ist nicht an Histone gebunden und wird ebenfalls beim CDDE-Test nicht detektiert [Plattner 1997].

Das Testverfahren wurde nach der Beschreibung von Holdenrieder et al. durchgeführt [Holdenrieder 2001 B]: Nach dem Auftauen der Proben wurden sie für drei Sekunden mit dem Vortex homogenisiert und mit dem Inkubationspuffer im Verhältnis 1:4 (20 µl Serum und 60 µl Inkubationspuffer) verdünnt. Danach wurden die verdünnten Serumproben ein weiteres Mal für drei Sekunden „gevortext“, woraufhin jeweils 20 µl in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Dazu wurden 80 µl des Immunreagens, bestehend aus biotinylierten Anti-Histon-Antikörpern, Peroxidase-markierten, Anti-DNA-Antikörpern und Inkubationspuffer, gegeben, mit einer Adhäsivfolie bedeckt und für jeweils zwei Stunden auf einem Mikrotiterplatten-Rüttler bei etwa 500 U/min inkubiert.

Während der zweistündigen Inkubationszeit bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Proteinkomponente der Nukleosomen und fixiert diesen Komplex mit Hilfe des Biotins an der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen.

Anschließend wurden durch dreimaliges Waschen mit je 300 bis 400 µl Inkubationspuffer die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Die fixierten Antikörper-Komplexe wurden mit 100 µl ABTS (2,2'-Azinodi(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)) inkubiert, danach die Mikrotiterplatte mit einer Adhäsivfolie verschlossen und bei 500 U/min gerüttelt. Durch eine Reaktion des Substrats mit dem Enzym Peroxidase der Anti-DNA-Antikörper, bewirkt dies eine zu den gebundenen Antikörpern proportionale Farbveränderung, die photometrisch bei $\delta = 405$ nm gegen die Substratlösung als Blank (Referenzwellenlänge $\delta = 492$ nm) quantifiziert wurde.

Zusätzlich wurde eine Standardkurve aus nukleosomenreichem Referenzmaterial hergestellt, um eine direkte Quantifizierung der Nukleosomen mit hoher Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Testläufen zu ermöglichen. Dieses Referenzmaterial wurde vor der Durchführung des Tests mit Inkubationspuffer so verdünnt, dass nach einer definierten Farbentwicklungszeit von 30 Minuten die niedrigste Verdünnungsstufe Extinktionswerte von etwa 2500 milli-Units (mU) optischer Dichte erreichte. Dieser Wert liegt im oberen Messbereich des Photometers. Diese Verdünnung setzte sich aus einem Volumenanteil Referenzmaterial und 23 Volumenanteilen Inkubationspuffer zusammen (1:24). Durch weitere Verdünnungsschritte (1:32, 1:48, 1:64, 1:96) wurde eine lineare Standardkurve erstellt, die durch den Ursprung des Koordinatensystems läuft.

Ursprünglich wurden als Messeinheit sogenannte Arbitrary Units (AU) definiert. Diese geschätzten Units geben eine an der Standardkurve orientierte, relative Konzentrationsangabe der Nukleosomen im getesteten Material an. Definitionsgemäß erhielt der höchste Standardwert einen relativen Wert von 1000 AU. Durch die Bestimmung des DNA-Gehalts in einem definierten Standard konnte eine Umrechnung von Arbitrary Units auf Nanogramm pro Milliliter erfolgen. 1000 AU entsprechen dabei 572 ng/ml.

3.4.3 Quantifizierung der weiteren Blutparameter

Die Quantifizierung der beiden Tumormarker AFP und CYFRA 21-1 wurden mit einer automatisierten Methode auf dem Elecsys 2010 der Firma Roche Diagnostics gemessen.

Beide Testverfahren funktionieren nach der ECLIA-Methode (Elektrochemilumineszenz Immunoassay). Zur Bestimmung des AFP werden 10 µL, zur Messung des CYFRA 21-1 20 µL des Patientenserums benötigt, welches jeweils eine Temperatur zwischen 20-25°C haben sollte. Dafür wurden die von mir eingefrorenen, nicht stabilisierten Serumproben der Patienten zu allen vier Zeitpunkten verwendet. Bei der ersten Inkubation bildet das Patientenserum mit einem biotinyliertem monoklonalen Antikörper und einem mit Ruthenium-Komplex markierten monoklonalen Antikörper einen Sandwich-Komplex. Bei der zweiten Inkubation wird durch Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln der Komplex über Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an die Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Meßzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Daraufhin werden mit ProCell die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenzemmission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert. Im Falle der AFP Bestimmung handelt es sich bei den Antikörpern um monoklonale AFP-spezifische Antikörper, bei der CYFRA 21-1 Bestimmung um monoklonale Cytokeratin 19 spezifische Antikörper. Die Gesamtdauer beider Testverfahren beträgt 18 Minuten.

Zusätzlich wurden Messungen der Nukleosomen mit dem Impact-Analyser der Firma Roche durchgeführt. Dieses automatisierte Messverfahren befindet sich jedoch noch in der Testphase, weshalb keine näheren Angaben zum Versuchsaufbau gemacht werden können.

Im Hauptlabor wurde die Quantifizierung der weiteren Blutparameter am High-End Analyzer AU 2700 der Firma Olympus, jetzt Beckman Coulter im Rahmen der Routinemessungen durchgeführt. Der AU 2700 ist ein vollautomatisches System für klinisch-chemische und immunologische Parameter sowie für die Detektion von Medikamentenmissbrauch und die Überwachung der Körperflüssigkeitsspiegel therapeutischer Medikamente. Es stehen diesem Analysegerät zwei Messprinzipien zur Verfügung: Zum einen die ISE-Einheit, die zur Elektrolytmessung mit ionenselektiven Elektroden (ISE) und mit einer Referenzelektrode (REF) ausgestattet ist. Diese ionenselektiven Elektroden können ein bestimmtes Ion selektiv erkennen. Die ISE-Einheit wird zur Messung der entstehenden Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden beim Passieren der Probe verwendet. Zum anderen die Photometrie-

Einheit, bei der eine Patientenprobe mit einem bestimmten Reagenz gemischt wird und die Extinktion eines monochromatischen Lichtstrahls durch die Mischung photometrisch ermittelt wird. Für die Messungen benutzten die Mitarbeiterinnen des Hauptlabors wiederum von mir persönlich eingefrorene nicht stabilisierte Serumproben der Studienteilnehmer. Auch hier untersuchten wir alle vier Zeitpunkte. Dabei wurden neben den Leberparametern Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glutamatdehydrogenase (GLDH), γ -Glutamyltranspeptidase (GGT), Cholinesterase (CHE) und Bilirubin (Bili) auch die Nierenwerte Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin bestimmt. Neben dem Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) quantifizierten wir ebenso den Zelllysemarker Laktat-Dehydrogenase (LDH). Zuletzt wurden noch die beiden Pankreasenzyme Lipase und Amylase und die alkalische Phosphatase (AP) gemessen.

3.5 Statistische Auswertung

Die folgenden Biomarker wurden prätherapeutisch (0h), drei (3h) und sechs (6h) Stunden nach Therapie, sowie am darauffolgenden Tag (24h) gemessen und ausgewertet.

- Nukleosomen ELISA Serum (NHS), Impact Serum (NIS) und Impact Plasma (NIP)
- Alphafetoprotein (AFP)
- Cytokeratin Fragment 21-1 (CYFRA 21-1)
- Laktatdehydrogenase (LDH)
- C-reaktives Protein (CRP)
- Glutamatoxalacetattransaminase (GOT)
- Glutamatpyruvattransaminase (GPT)
- Glutamatdehydrogenase (GLDH)
- Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT)
- Alkalische Phosphatase (AP)
- Cholinesterase (CHE)
- Bilirubin
- Amylase
- Lipase
- Kreatinin
- Harnstoff
- Harnsäure

Die Werteverteilungen der Biomarker wurden deskriptiv anhand von Boxplots, Dotplots und Kinetiken dargestellt. Im Boxplot werden alle Werte der sogenannten Fünf-Punkte-Zusammenfassung, also der Median, zwei Quartilen (25. Perzentile und 75. Perzentile) und die beiden Antennen, dargestellt. Die Antennen, auch als Whisker bezeichnet, kennzeichnen die 5. und 95. Perzentile. Zudem werden Ausreißer anhand von Punkten gezeigt. Dotplot-Grafiken präsentieren dagegen sehr anschaulich alle Einzelwerte. Letztere haben den Vorteil, dass Werteverteilungsmuster besser beurteilbar sind. In der Darstellung der Kinetiken sind die Einzelverläufe der Patienten vom prätherapeutischen zum 24 Stunden Wert gezeigt.

Die Korrelationen zwischen den einzelnen Biomarkern wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman analysiert.

Differenzen der Wertlagen der Biomarker zwischen dem prätherapeutischen Zeitpunkt und späteren Zeitpunkten wurden mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen auf Signifikanz geprüft.

Es sollte geprüft werden, ob die Biomarker frühzeitig das Ansprechen auf die transarterielle Chemoembolisation (TACE) anzeigen können. Für die Prüfung des Unterschieds der Verteilungen in den Gruppen der Responder versus Non-Responder kam der Wilcoxon-Mann-Whitney Test für unabhängige Stichproben zur Anwendung.

Alle zum Zeitpunkt 0h oder 24h signifikanten Biomarker gingen in ein multivariates logistisches Regressionsmodell und zwar in logarithmierter Form zur Basis 2. Zusätzlich wurden in diesem Modell auch die Tumorgröße und die Nummer der TACE Behandlung berücksichtigt. Das beste Modell wurde mittels Vorwärts- und Rückwärts-Selektion ermittelt.

In der vorliegenden Dissertation sollte außerdem untersucht werden, ob die Biomarker prognostische Bedeutung im Hinblick auf das Gesamtüberleben nach TACE haben. Die Überlebenszeiten ab der ersten ausgewerteten TACE Behandlung wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und grafisch dargestellt. Stetige Variablen müssen für die Kaplan-Meier Analyse mit Hilfe von cut-off Werten in mindestens zwei Gruppen eingeteilt werden. Als cut-off für die Biomarker wurden der Median und die 75. Perzentile, bzw. bei inversem Zusammenhang (CHE) die 25. Perzentile, verwendet. Mit dem Log-Rank-Test wurden die Überlebenskurven auf signifikante Unterschiede geprüft.

Da der follow-up für alle überlebenden Patienten länger als ein Jahr war, konnten die Patienten nach ihrem 1-Jahresüberleben (1-JÜ), ebenfalls nach der ersten ausgewerteten

TACE berechnet, eingeteilt werden. Bei dieser Auswertung kann auf einen cut-off Wert für die Biomarker verzichtet werden, die Unterschiede in den Wertelagen zwischen der Gruppe der Patienten, die mindestens ein Jahr überlebt haben, und derjenigen, die schon im ersten Jahr verstarben, wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Test auf Signifikanz geprüft.

Neben den univariaten Analysen wurden auch multivariate Überlebenszeit-Analysen mit dem Cox'schen Regressionsmodell durchgeführt. Um zu berücksichtigen, ob es sich bei der ersten ausgewerteten TACE um die erste TACE überhaupt handelte oder nicht, wurde eine entsprechende Variable eingeführt. Zusätzlich gingen die Tumorgroße sowie alle in der Kaplan-Meier Analyse signifikanten Biomarker in die Modelle ein. Es wurden alle Modelle mit zwei oder drei Variablen geprüft und mit dem Akaike Informationskriterium (AIC) verglichen.

Für das beste aus nur zwei Variablen bestehende Modell wurde der simultane Einfluss auf das 1-Jahresüberleben mit dem Mantel-Haenszel Test veranschaulicht.

Signifikanz wurde bei einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1.Art unter 5% angenommen ($p < 0,05$). Da es sich um eine explorative Datenanalyse handelt, wurden P-Werte nicht adjustiert. Alle statistischen Kalkulationen wurden mit der Software SAS durchgeführt (Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4 Ergebnisse

In der Studie wurden insgesamt 50 Patienten untersucht, die sich aufgrund eines hepatozellulären Karzinoms einer transarteriellen Chemoembolisation unterzogen. Jedoch mussten zwei Patienten aufgrund einer Lebertransplantation innerhalb eines Jahres nach Aufnahme in meine Studie von der Auswertung zu Therapieansprechen und Überleben ausgeschlossen werden. Insgesamt erhielten die Patienten 77 Chemoembolisationen, wobei nur 71 Behandlungen im Hinblick auf das Therapieansprechen evaluiert wurden. Sechs Therapien mussten ausgeschlossen werden, da nach diesen Therapien zusätzlich eine RFA am darauffolgenden Tag durchgeführt wurde, welche die posttherapeutische Bildgebung beeinflusste. Die Blutabnahmen erfolgten bei allen Patienten vor Beginn der Therapie, drei und sechs Stunden nach der Therapie sowie am darauffolgenden Tag. In den gesammelten Proben wurden die oben bereits erwähnten Laborparameter bestimmt. Zunächst soll auf Unterschiede des Freisetzungsmusters der einzelnen Laborparameter vor Therapiebeginn eingegangen werden.

4.1 Kinetik der Biomarker nach transarterieller Chemoembolisation

In diesem Kapitel wird auf den Verlauf der gemessenen Laborparameter innerhalb eines Tages nach der Therapie eingegangen. In Abbildung 6 bis Abbildung 21 (signifikante Differenzen sind mit ★ gekennzeichnet) werden die Verläufe aller Patienten anhand von box-plot-Graphiken dargestellt und in Tabelle 9 befinden sich die Mediane aller gemessenen Laborparameter mit ihren Bandbreiten.

Der Median der Nukleosomen manuell im Serum gemessen fiel nach drei bzw. sechs Stunden nach der Chemoembolisation von anfangs 97,8 ng/mL auf 69,8 ng/mL bzw. 66,4 ng/mL ab. Jedoch stiegen die Nukleosomen nach 24 Stunden wieder auf 139,3 ng/mL an und lagen somit höher als der prätherapeutische Median der Nukleosomenwerte (Abbildung 6). Ähnlich verhielt sich auch der maschinell im Serum gemessene Nukleosomenwert im Verlaufe des ersten Tages nach transarterieller Chemoembolisation. Hier zeigte sich jedoch bereits nach sechs Stunden ein leicht ansteigender Nukleosomenwert mit 64,7 ng/mL, der jedoch noch unter dem prätherapeutischen Wert mit 81,4 ng/mL lag. Wie beim ELISA, so stieg auch beim Impact der 24 Stunden Wert auf 106,0 ng/mL an (Abbildung 7). Der mit dem Impact im Plasma gemessene Nukleosomenwert zeigte stabile Werte über den Verlauf des ersten Tages nach Therapie (Abbildung 8).

Der AFP-Wert veränderte sich im Verlaufe des ersten Tages nach Therapie nur geringfügig und zeigte nach 24 Stunden mit 5,4 ng/mL einen ähnlichen Median im Vergleich zum prätherapeutischen Wert von 5,9 ng/mL (Abbildung 9).

CYFRA 21-1 wies, ähnlich den Nukleosomen im Serum, nach 24 Stunden einen Anstieg auf. Der prätherapeutische Median des CYFRA 21-1 betrug 1,8 ng/mL. Nach drei (1,7 ng/mL) bzw. sechs Stunden (1,6 ng/mL) zeigten sich stabile Wertelagen, woraufhin nach 24 Stunden ein diskreter Anstieg des CYFRA 21-1 auf 2,0 ng/mL folgte (Abbildung 10).

Der Median des Enzyms LDH zeigte sich innerhalb der ersten sechs Stunden konstant. Von 200,0 U/L (prätherapeutischer Wert) über 199,0 U/L (3 Stunden) und 204,5 U/L (6 Stunden) stieg der Wert auf 240 U/L nach 24 Stunden etwas an (Abbildung 11).

Einen ähnlichen Verlauf wies auch der Entzündungsparameter CRP auf. Nach einem konstanten Verlauf in den ersten sechs Stunden kletterte der Median des CRP von 0,6 mg/dL nach sechs Stunden auf 1,4 mg/dL nach 24 Stunden (Abbildung 12).

Die Mediane der Leberenzyme GOT (Abbildung 13), GPT (Abbildung 14) und GLDH (Abbildung 15) stiegen jeweils nach 24 Stunden stark an, nachdem diese über die ersten sechs Stunden nur geringfügig schwankten.

Bilirubin (Abbildung 16) stieg bereits nach drei Stunden von 0,9 mg/dL auf 1,2 mg/dL an, blieb bis sechs Stunden nach Therapie stabil und stieg nach 24 Stunden nochmals auf 1,5 mg/dL an. Die beiden anderen Cholestaseparameter, GGT (Abbildung 17) und AP (Abbildung 18), zeigten im Verlauf des ersten Tages nur geringfügige Schwankungen.

Ebenso fanden wir bei beiden Pankreasenzymen, Amylase (Abbildung 19) und Lipase (Abbildung 20), einen relativ stabilen Werteverlauf innerhalb eines Tages nach TACE, wobei der Median der Lipase einen diskreten Abfall nach 24 Stunden aufzeigte.

Im Verlaufe des ersten Tages nach TACE blieb der Median der CHE stabil. Sowohl prätherapeutisch als auch 24 Stunden nach Therapie lag der Median bei 4,4 kU/L (Abbildung 21).

Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin zeigten im Verlaufe des ersten Tages ebenfalls einen konstanten Verlauf. Auf die Abbildung dieser drei Laborparameter wurde in dieser Arbeit verzichtet.

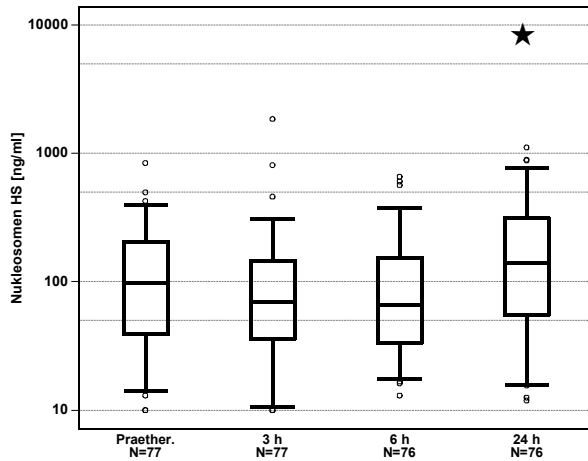


Abbildung 6 Verlauf der **Nukleosomen-Konzentration** gemessen mit dem **ELISA im Serum** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

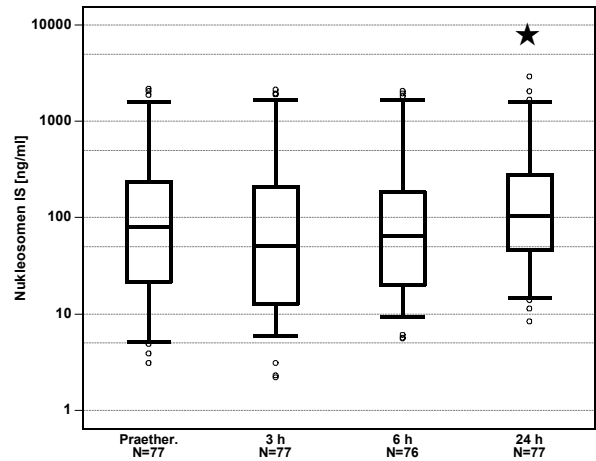


Abbildung 7 Verlauf der **Nukleosomen-Konzentration** gemessen mit dem **Impact im Serum** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

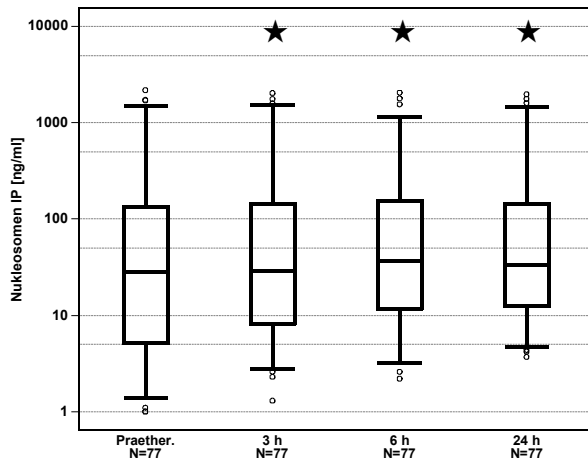


Abbildung 8 Verlauf der **Nukleosomen-Konzentration** gemessen mit dem **Impact im Plasma** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

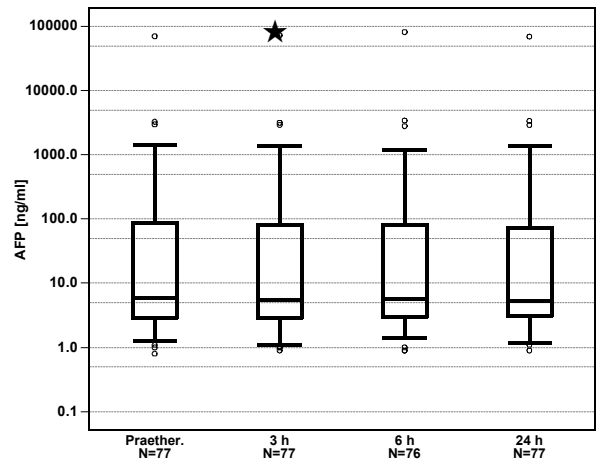


Abbildung 9 Verlauf der **AFP-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

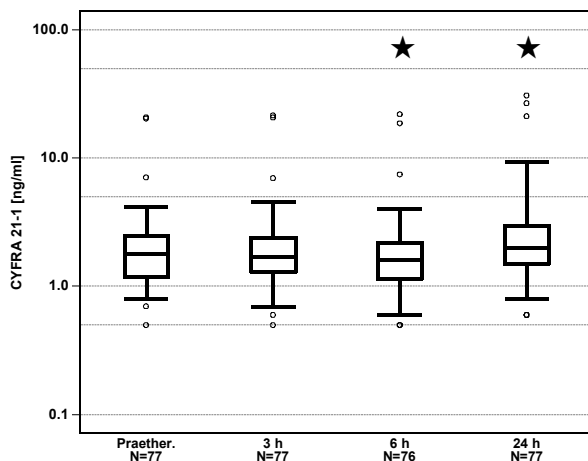


Abbildung 10 Verlauf der **CYFRA 21-1-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

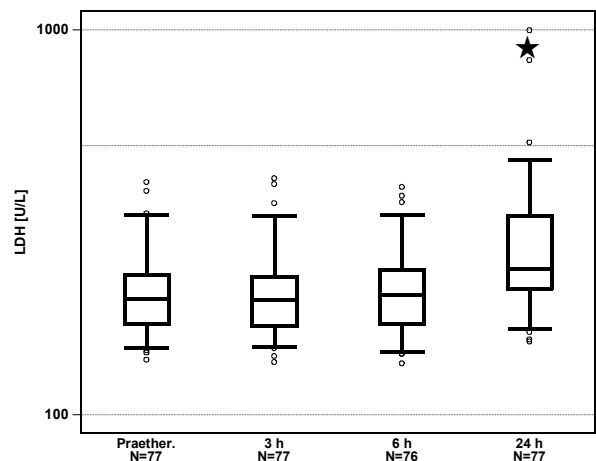


Abbildung 11 Verlauf der **LDH-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

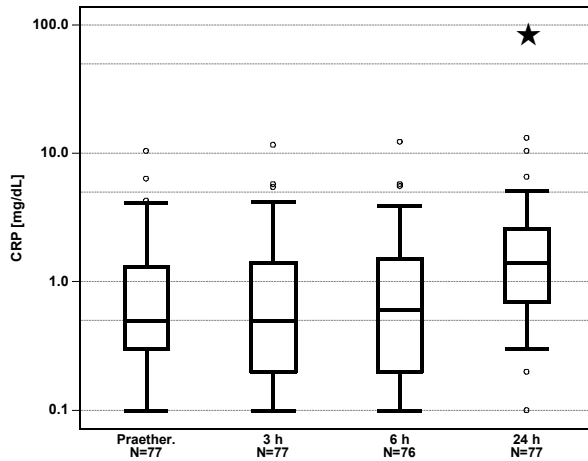


Abbildung 12 Verlauf der **CRP-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

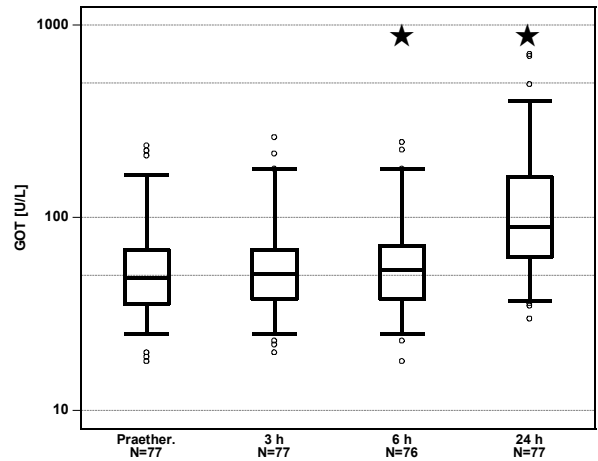


Abbildung 13 Verlauf der **GOT-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

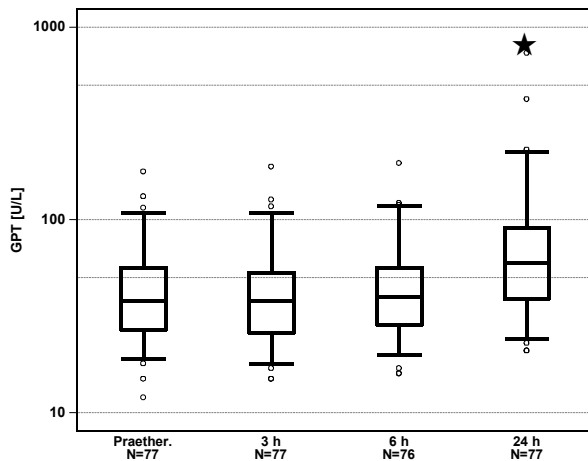


Abbildung 14 Verlauf der **GPT-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

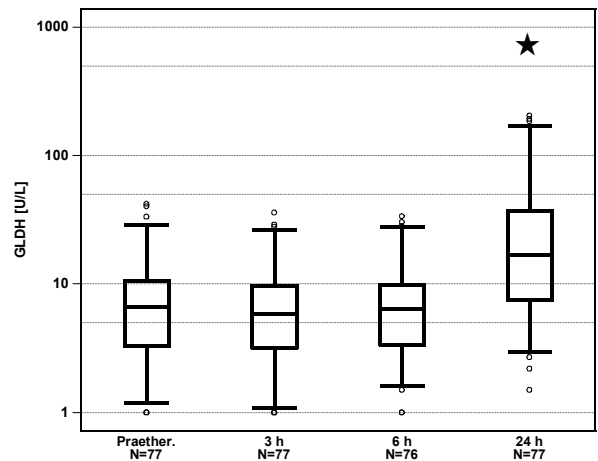


Abbildung 15 Verlauf der **GLDH-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

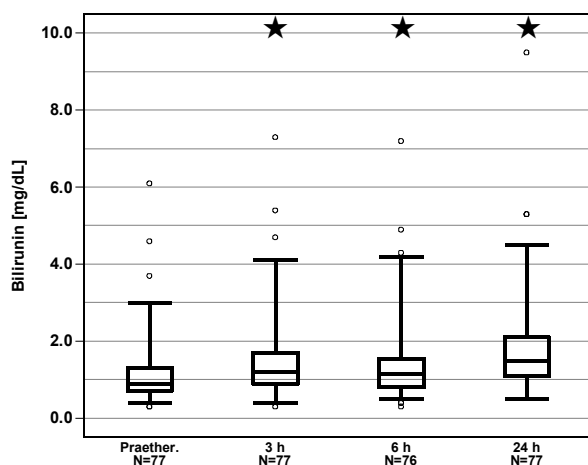


Abbildung 16 Verlauf der **Bilirubin-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

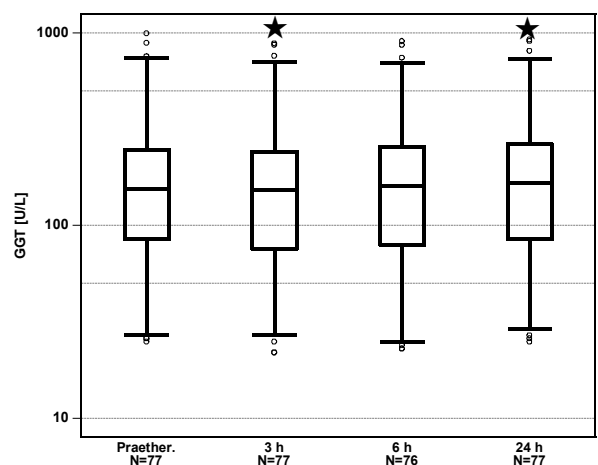


Abbildung 17 Verlauf der **GGT-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

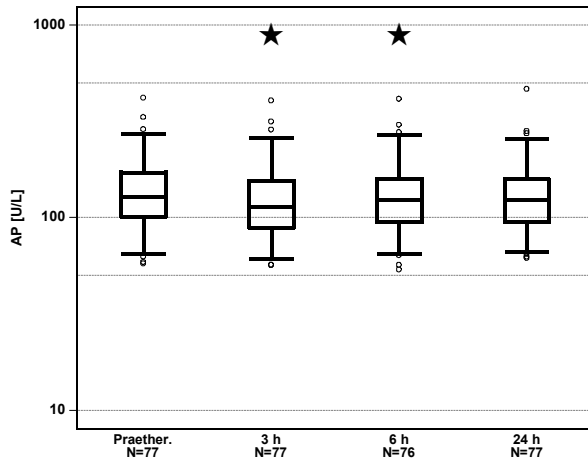


Abbildung 18 Verlauf der **AP-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

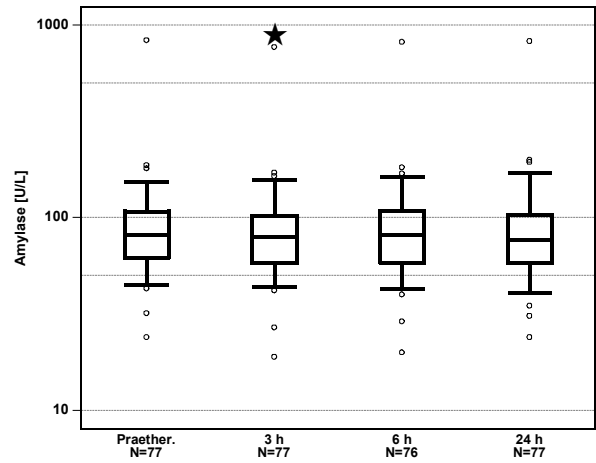


Abbildung 19 Verlauf der **Amylase-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

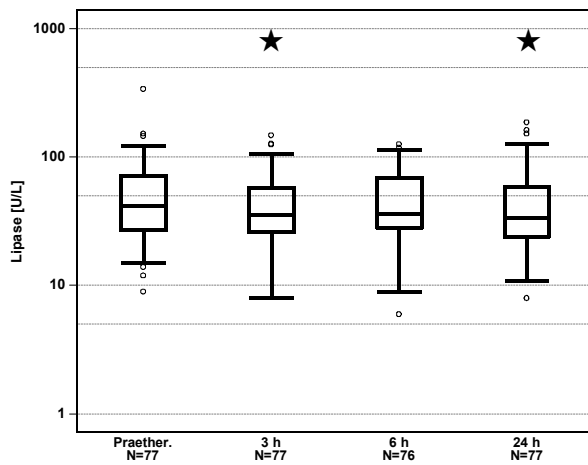


Abbildung 20 Verlauf der **Lipase-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

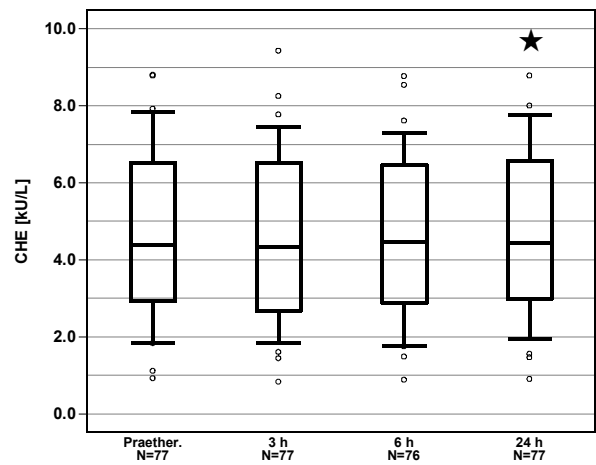


Abbildung 21 Verlauf der **CHE-Konzentration** aller Patienten im Verlauf des ersten Tages nach TACE

	0h	3h	6h	24h
NHS	97,8 (10,0 - 846,0)	69,8 (10,0 - 1861,3) p = 0,067	66,4 (13,0 - 660,1) p = 0,121	139,3 (11,9 - 1116,5) p = 0,007
NIS	81,4 (3,1 - 2193,0)	50,6 (2,2 - 2148,0) p = 0,352	64,7 (5,6 - 2079,0) p = 0,069	106,0 (8,4 - 2949,0) p = 0,014
NIP	28,0 (0,6 - 2196,0)	29,3 (1,3 - 2045,0) p = 0,002	37,1 (2,2 - 2068,0) p = 0,002	33,0 (3,7 - 1988,0) p < 0,001
AFP	5,9 (0,8 - 71221,0)	5,5 (0,9 - 73955,0) p = 0,032	5,8 (0,9 - 82861,0) p = 0,086	5,4 (0,9 - 70228,0) p = 0,553
CYF	1,8 (0,5 - 20,9)	1,7 (0,5 - 21,6) p = 0,702	1,6 (0,5 - 22,1) p = 0,017	2,0 (0,6 - 31,0) p = 0,003
LDH	200,0 (139,0 - 403,0)	199,0 (137,0 - 412,0) p = 0,958	204,5 (136,0 - 391,0) p = 0,351	240,0 (155,0 - 1062,0) p < 0,001
CRP	0,5 (0,1 - 10,5)	0,5 (0,1 - 11,7) p = 0,802	0,6 (0,1 - 12,4) p = 0,262	1,4 (0,1 - 13,3) p < 0,001
GOT	49,0 (18,0 - 238,0)	51,0 (20,0 - 263,0) p = 0,063	53,5 (18,0 - 248,0) p < 0,001	90,0 (30,0 - 710,0) p < 0,001
GPT	38,0 (12,0 - 179,0)	38,0 (15,0 - 190,0) p = 0,083	40,0 (16,0 - 198,0) p = 0,313	60,0 (21,0 - 740,0) p < 0,001
GLDH	6,6 (1,0 - 42,3)	5,9 (1,0 - 36,2) p = 0,065	6,5 (1,0 - 33,9) p = 0,574	16,8 (1,5 - 206,0) p < 0,001
BILI	0,9 (0,3 - 6,1)	1,2 (0,3 - 7,3) p < 0,001	1,2 (0,3 - 7,2) p < 0,001	1,5 (0,5 - 9,5) p < 0,001
GGT	156,0 (25,0 - 1007,0)	153,0 (22,0 - 888,0) p < 0,001	161,0 (23,0 - 911,0) p = 0,092	168,0 (25,0 - 930,0) p = 0,001
AP	128,0 (58,0 - 421,0)	113,0 (57,0 - 408,0) p < 0,001	124,0 (54,0 - 416,0) p < 0,001	124,0 (62,0 - 468,0) p = 0,221
Amylase	82,0 (24,0 - 839,0)	80,0 (19,0 - 773,0) p < 0,001	81,5 (20,0 - 821,0) p = 0,322	77,0 (24,0 - 829,0) p = 0,131
Lipase	42,0 (9,0 - 342,0)	36,0 (8,0 - 149,0) p < 0,001	36,5 (6,0 - 127,0) p = 0,061	34,0 (8,0 - 188,0) p < 0,001

	0h	3h	6h	24h
CHE	4,4 (0,9 - 8,8)	4,4 (0,8 - 9,4) p = 0,563	4,5 (0,9 - 8,8) p = 0,840	4,4 (0,9 - 9,7) p = 0,002
Harnstoff	33,0 (16,0 - 87,0)	33,0 (17,0 - 79,0) p = 0,079	35,5 (16,0 - 81,0) p = 0,316	35,0 (17,0 - 89,0) p = 0,014
Harnsäure	5,9 (3,2 - 10,7)	6,2 (3,2 - 10,9) p = 0,011	6,1 (3,4 - 10,9) p = 0,018	6,0 (3,5 - 10,9) p = 0,438
Kreatinin	0,9 (0,6 - 1,6)	0,9 (0,5 - 1,7) p = 0,001	1,0 (0,5 - 1,7) p = 0,393	1,0 (0,6 - 1,8) p = 0,201

Tabelle 9 Mediane und Schwankungsbereiche von allen gemessenen Laborparametern der Patienten prätherapeutisch und 3, 6 und 24 Stunden nach der transarteriellen Chemoembolisation

Zur genaueren Darstellung des Verlaufs der einzelnen Patientenwerte unter Therapie werden in Abbildung 22 bis Abbildung 27 die Kinetiken der Laborparameter an ausgesuchten Labormarkern vor Beginn der Therapie und einen Tag nach der Therapie veranschaulicht. Zur besseren Veranschaulichung wurde auf die Darstellung der Werte nach drei und sechs Stunden verzichtet.

Interessanterweise kristallisieren sich bei den mit dem ELISA gemessenen Nukleosomen zwei Gruppen heraus. Bei einigen Patienten kommt es im Verlauf des ersten Tages zu einem starken Anstieg der Nukleosomen, wohingegen andere Patienten abfallende Nukleosomenwerte vorweisen (Abbildung 22). Ähnlich verhält sich diese Beobachtung auch bei den mit dem Impact im Serum gemessenen Nukleosomen. Auch hier zeigen sich Patienten mit steigenden bzw. fallenden Nukleosomenwerten 24 Stunden nach Therapiebeginn (Abbildung 23).

Stärkere Veränderungen zeigen auch CYFRA 21-1 (Abbildung 25), LDH (Abbildung 26) und CRP (Abbildung 27). Dagegen präsentieren sich die AFP-Werte (Abbildung 24) der Patienten auf einem sehr konstanten Niveau.

Im Anhang dieser Arbeit befinden sich zusätzlich die Einzelverläufe aller in der Studie eingeschlossenen Patienten und ihrer einzelnen Therapien. In diesen Einzelverläufen sind alle Verläufe der einzelnen Laborparameter vor Beginn der Therapie, drei, sechs und 24 Stunden nach Therapie dargestellt.

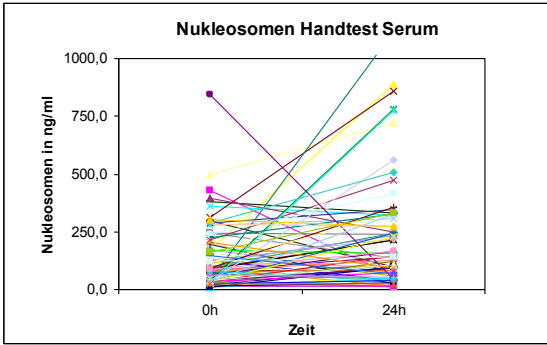


Abbildung 22 Kinetiken der **Nukleosomen im ELISA im Serum** im Verlaufe eines Tages nach Therapie

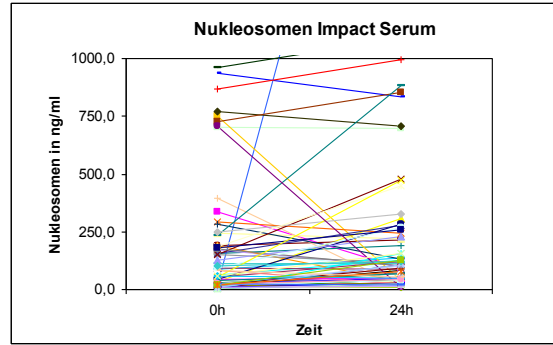


Abbildung 23 Kinetiken der **Nukleosomen im Impact im Serum** im Verlaufe eines Tages nach Therapie

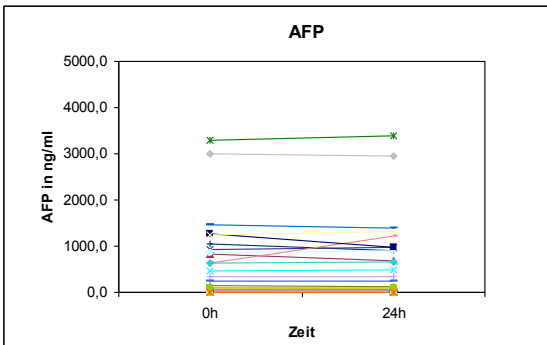


Abbildung 24 Kinetiken der **AFP-Konzentration** im Verlaufe eines Tages nach Therapie

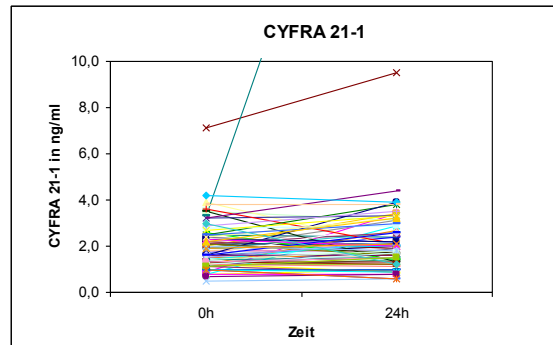


Abbildung 25 Kinetiken der **CYFRA21-1-Konzentration** im Verlaufe eines Tages nach Therapie

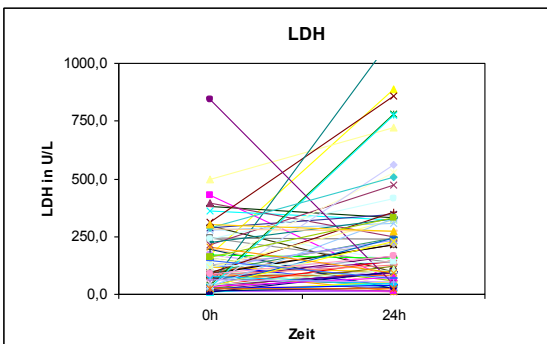


Abbildung 26 Kinetiken der **LDH-Konzentration** im Verlaufe eines Tages nach Therapie

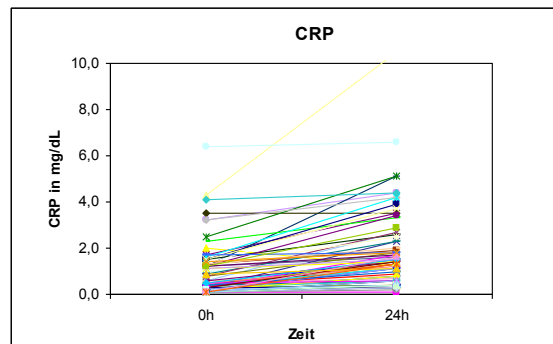


Abbildung 27 Kinetiken der **CRP-Konzentration** im Verlaufe eines Tages nach Therapie

4.2 Korrelation zwischen den einzelnen Biomarkern

In diesem Abschnitt werden die einzelnen in der Studie evaluierten Laborparameter miteinander korreliert. Dabei werden die Korrelationskoeffizienten (r-Werte) vor Therapiebeginn (0h-Wert) und am Tag nach der TACE-Therapie (24h-Wert) verglichen. Auf die anderen beiden Zeitpunkte drei und sechs Stunden nach Therapie wird verzichtet. In Tabelle 10 und Tabelle 11 sind die statistisch signifikanten Korrelationen grau hinterlegt, was einem r-Wert $> 0,25$ oder $< -0,25$ entspricht. Aufgrund der Vielzahl der Laborparameter sind die Nierenwerte nicht mit dargestellt.

Die Nukleosomen im ELISA korrelieren mit den Nukleosomen Impact im Serum vor und nach Therapie ($r = 0,36$ und $0,34$) und sie korrelieren 24 Stunden nach Therapie mit LDH ($r = 0,25$), CRP ($r = 0,43$), GGT ($r = 0,37$) und CHE ($r = 0,29$). CYFRA 21-1, Tumormarker und Zelltodmarker zugleich, korreliert vor und nach der TACE mit dem Lebertumormarker AFP ($r = 0,28$ und $0,40$), aber nur vor Therapiebeginn mit dem Zelltodparameter LDH ($r = 0,35$ und $0,02$). Die drei Leberenzyme GOT, GPT und GLDH korrelieren jeweils miteinander an beiden Zeitpunkten. Dagegen erreichen die Cholestaseparameter Bilirubin und GGT ($r = 0,20$ und $0,16$) keine signifikante Korrelation untereinander, wohingegen AP jeweils mit GGT ($r = 0,42$ und $0,49$) bzw. Bilirubin ($r = 0,43$ und $0,35$) signifikant korreliert. Auch die beiden Pankreaswerte Amylase und Lipase korrelieren vor und nach Therapie ($r = 0,55$ und $0,64$) sehr gut miteinander. Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin korrelieren jeweils mit hoher Signifikanz. Dabei erreichen Harnstoff und Harnsäure einen r-Wert von $0,50$ bei beiden Zeitpunkten, Harnstoff und Kreatinin $0,53$ prätherapeutisch und $0,51$ posttherapeutisch sowie Harnsäure und Kreatinin $0,68$ prätherapeutisch und $0,67$ posttherapeutisch. Alle signifikanten Korrelationen sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 grau hinterlegt.

NHS	1,00																		
NIS	0,36	1,00																	
NIP	0,09	0,78	1,00																
AFP	0,06	-0,05	-0,10	1,00															
CYFRA 21-1	0,04	0,35	0,42	0,28	1,00														
LDH	0,13	0,26	0,10	0,20	0,35	1,00													
CRP	0,22	0,11	0,00	0,19	0,41	-0,05	1,00												
GOT	-0,11	0,25	0,08	0,38	0,38	0,47	0,28	1,00											
GPT	0,16	0,30	0,09	0,25	0,23	0,22	0,14	0,70	1,00										
GLDH	0,11	0,30	0,09	0,14	0,30	0,19	0,32	0,66	0,57	1,00									
Bilirubin	-0,05	0,15	0,21	0,31	0,56	0,35	0,13	0,39	0,18	0,12	1,00								
GGT	0,11	0,27	0,11	0,37	0,24	-0,01	0,38	0,47	0,45	0,68	0,20	1,00							
AP	0,09	0,31	0,19	0,31	0,34	0,27	0,31	0,49	0,14	0,28	0,43	0,42	1,00						
Amylase	-0,12	-0,05	-0,08	0,13	-0,01	0,19	-0,18	0,26	0,11	0,19	0,02	0,11	0,24	1,00					
Lipase	-0,19	-0,08	-0,12	0,27	0,00	0,33	-0,12	0,22	0,03	0,03	0,22	0,07	0,12	0,55	1,00				
CHE	0,09	-0,11	-0,07	-0,33	-0,38	-0,45	-0,09	-0,46	-0,12	0,03	-0,53	0,11	-0,42	-0,27	-0,37	1,00			
0 Stunden	NHS	NIS	NIP	AFP	CYF	LDH	CRP	GOT	GPT	GLDH	Bili	GGT	AP	Amy	Lip	CHE			

Tabelle 10 Korrelationskoeffizienten (r-Werte) der Laborparameter ohne Nierenwerte vor Therapiebeginn

Nukl_H_S	1,00																		
Nukl_I_S	0,34	1,00																	
Nukl_I_P	-0,25	0,59	1,00																
AFP	0,10	-0,12	-0,04	1,00															
CYFRA 21-1	-0,10	0,10	0,43	0,40	1,00														
LDH	0,25	0,26	0,05	-0,06	0,02	1,00													
CRP	0,43	0,22	-0,07	0,19	-0,04	0,22	1,00												
GOT	0,06	0,23	0,08	0,03	-0,21	0,53	0,45	1,00											
GPT	0,14	0,13	-0,07	-0,14	-0,41	0,38	0,28	0,74	1,00										
GLDH	0,11	0,34	0,10	-0,08	-0,28	0,59	0,42	0,84	0,66	1,00									
Bilirubin	0,16	0,04	0,07	0,14	0,17	-0,14	0,03	-0,07	-0,18	-0,23	1,00								
GGT	0,37	0,28	0,09	0,32	0,03	0,00	0,46	0,18	0,12	0,28	0,16	1,00							
AP	0,01	0,20	0,23	0,27	0,40	-0,04	0,32	0,05	-0,18	0,00	0,35	0,49	1,00						
Amylase	-0,11	-0,09	-0,02	0,02	0,07	-0,15	-0,23	-0,11	-0,10	-0,17	0,12	0,02	0,04	1,00					
Lipase	-0,16	-0,02	0,13	0,23	0,32	-0,20	-0,25	-0,27	-0,38	-0,33	0,14	0,02	-0,06	0,64	1,00				
CHE	0,29	0,08	-0,21	-0,39	-0,49	0,13	0,09	-0,07	0,18	0,18	-0,57	0,03	-0,40	-0,25	-0,37	1,00			
24 Stunden	NHS	NIS	NIP	AFP	CYF	LDH	CRP	GOT	GPT	GLDH	Bili	GGT	AP	Amy	Lip	CHE			

Tabelle 11 Korrelationskoeffizienten (r-Werte) der Laborparameter ohne Nierenwerte 24 Stunden nach Therapiebeginn

4.3 Korrelation zwischen den Biomarkern und dem Therapieansprechen

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Laborparameter und das Ansprechen des hepatozellulären Karzinoms auf die transarterielle Chemoembolisation verglichen. Hierfür wurde das Therapieansprechen in zwei Gruppen, die Responder und die Non-Responder, unterteilt. Die Responder (N=32) setzten sich dabei aus Patienten mit Remission (N=2) und Stable Disease (N=30) zusammen, Non-Responder waren Patienten mit einer Progression (N=39). Das Therapieansprechen wurde wie in Kapitel 3.3 beschrieben bestimmt. Bei der Korrelation zwischen Laborparameter und Therapieansprechen mussten 6 Therapien ausgeschlossen werden, da diese einen Tag nach ihrer TACE zusätzlich eine RFA bekommen haben und dadurch die posttherapeutische Bildgebung beeinflusst war. Daher wurden von den insgesamt 77 erfolgten Chemoembolisationen 71 Therapien evaluiert, wovon 32 Therapien zu einem Ansprechen des Tumors führten und 39 Therapien kein Ansprechen des Tumors aufzeigten (Tabelle 12). Bei dieser Auswertung wurden Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin nicht berücksichtigt.

	Anzahl	Prozent
Responder	32	45,0
Non-Responder	39	55,0
	71	100

Tabelle 12 Therapieansprechen der Patienten mit transarterieller Chemoembolisation

In Abbildung 28 bis Abbildung 43 sind die Verläufe der einzelnen Laborparameter innerhalb des ersten Tages nach der transarteriellen Chemoembolisation anhand von dot-plot-Grafiken dargestellt, wobei die beiden Gruppen des Therapieansprechens unterschieden werden. Dabei sind signifikante Unterschiede mit ★ gekennzeichnet. Die weißen Punkte stehen hierbei für die Responder, die schwarzen Punkte für die Non-Responder. Zudem sind in Tabelle 13 alle dazugehörigen Mediane, 75. Perzentilen, 95. Perzentilen und die Bandbreite aller vier bestimmten Zeitpunkte, in die beiden Gruppen des Therapieansprechens unterteilt, aufgeführt.

Zunächst werden die Nukleosomen näher betrachtet. Vergleicht man beide Gruppen bei den manuell gemessenen Nukleosomen, so wird hier ersichtlich, dass 24 Stunden nach der TACE ein deutlicher Unterschied beim Median der beiden Gruppen besteht. Non-Responder weisen mit einem Median von 231,1 ng/mL einen eindeutig höheren Nukleosomenwert auf, als Responder mit 81,8 ng/mL, was auch statistisch signifikant ist ($p = 0,0022$) (Abbildung 28).

Aber in der Dotplot-Grafik wird auch klar, dass sich die Wertelagen der beiden Gruppen überlappen, so dass keine eindeutige Unterscheidung im Einzelfall möglich ist. An den anderen drei bestimmten Zeitpunkten zeigt sich jedoch noch kein signifikanter Unterschied. Vor Therapiebeginn (80,7 ng/mL vs. 107,5 ng/mL) sowie nach drei (72,6 ng/mL vs. 67,5 ng/mL) und sechs Stunden (65,2 vs. 57,2 ng/mL) weisen Non-Responder und Responder ähnliche Wertelagen auf. Hierbei wird auch erkennbar, dass in beiden Gruppen die Nukleosomen in den ersten sechs Stunden abfallen. Vergleicht man nun die beiden Gruppen vor und 24 Stunden nach Therapie so entdeckt man einen Unterschied. Bei den Respondern ist der Median im Verlauf des ersten Tages von 107,5 ng/mL auf 81,8 ng/mL abgefallen, wohingegen bei den Non-Respondern der Median von 80,7 ng/mL auf 231,1 ng/mL nahezu um das Dreifache angestiegen ist.

Die automatisiert mit dem Impact bestimmten Nukleosomenwerte zeigen dagegen etwas andere Wertelagen auf. Sowohl im Serum als auch im Plasma findet sich schon vor Therapiebeginn eine statistische Signifikanz im Hinblick auf das Therapieansprechen, wobei aber auch hier eine deutliche Überlappung der Wertelagen in den dot-plot-Grafiken (Abbildung 29 und Abbildung 30) zu sehen ist. Die Gruppe der Responder weisen prätherapeutisch jeweils einen deutlich höheren Median auf (Serum: 158 ng/mL; Plasma: 71,9 ng/mL) als die Gruppe der Non-Responder (Serum: 46 ng/mL; Plasma: 10,2 ng/mL). Im Serum gleichen sich die beiden Gruppen nach 24 Stunden an (106 ng/mL vs. 104 ng/mL). Damit ergibt sich auch hier die Tatsache, dass Responder im Verlauf des ersten Tages nach Therapie fallende Nukleosomenwerte aufweisen und Non-Responder steigende Nukleosomenwerte.

Die konstanten Wertelagen des AFP zeigen sich auch in dieser Auswertung, denn zu allen vier Zeitpunkten weisen Responder und Non-Responder statistisch signifikante Unterschiede bei diesem Biomarker auf. Zudem ändert sich der Median in beiden Gruppen über den ersten posttherapeutischen Tag kaum, was auch in Abbildung 31 deutlich wird. Zu allen vier Zeitpunkten sieht man bei der Gruppe der Non-Responder einen in etwa doppelt so hohen Median als bei den Respondern. So beträgt der Median bei den Respondern prätherapeutisch 4,4 ng/mL und bei den Non-Respondern 7,9 ng/mL, wobei der p-Wert gleich 0,0114 ist.

Bei CYFRA 21-1 hingegen sind nur die Wertelagen beider Gruppen zu den Zeitpunkten drei und sechs Stunden nach der Chemoembolisation statistisch knapp signifikant ($p = 0,0411$)

unterschiedlich. Bei beiden Gruppen sinken die Mediane nach sechs Stunden und steigen nach 24 Stunden wieder an (Abbildung 32).

Der Zelltodparameter LDH und der Entzündungsparameter CRP sind im Hinblick auf das Therapieansprechen zu keinem der bestimmten Zeitpunkte signifikant. Beim LDH steigen sowohl die Mediane bei den Respondern als auch bei den Non-Respondern 24 Stunden nach Therapie stark an. Die Mediane des LDH sind bei beiden Gruppen sehr ähnlich (Abbildung 33), jedoch entdeckt man beim CRP hier deutliche Unterschiede zu allen Zeitpunkten (Abbildung 34). Trotzdem erreicht das CRP nicht das erforderliche Signifikanzniveau.

Hinsichtlich der drei Leberenzyme GOT, GPT und GLDH fand sich folgendes: Während GPT und GLDH nicht zur Prädiktion des Therapieansprechens geeignet sind, weisen für die GOT Non-Responder statistisch signifikant höhere Medianwerte zu den Zeitpunkten nach drei ($p = 0,0242$) und sechs Stunden ($p = 0,0254$) auf als Responder (Abbildung 35).

Im Gegensatz zum Bilirubin zeigen die beiden Cholestaseparameter GGT und AP in beiden Gruppen zu allen vier Zeitpunkten signifikante Unterschiede im Hinblick auf das Therapieansprechen nach TACE. Dabei überzeugt vor allem das AP nach 24 Stunden ($p = 0,0056$). Ähnlich dem AFP bleibt auch die alkalische Phosphatase im Verlaufe des ersten Tages nach Therapie in beiden Gruppen relativ konstant, wobei die Non-Responder höhere Wertelagen aufweisen als Responder (Abbildung 40). Ebenso verhalten sich die Wertelagen der GGT bei beiden Gruppen auf stabilem Niveau (Abbildung 39).

Weder die beiden Pankreasenzyme Amylase und Lipase noch die CHE eignen sich zu einer prädiktiven Aussage im Verlaufe des ersten Tages nach einer TACE in Bezug auf das Therapieansprechen.

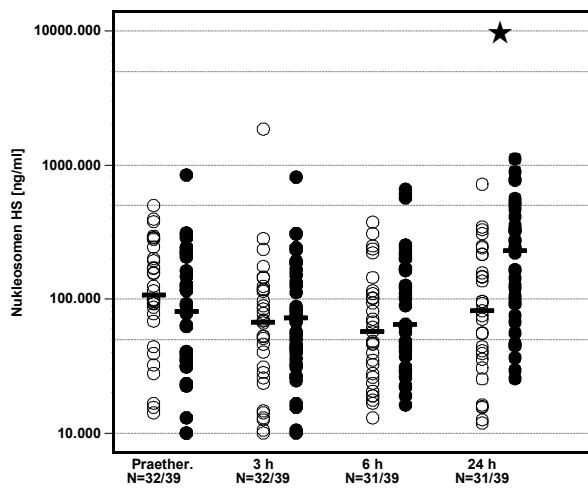


Abbildung 28 Verteilung der **Nucleosomen-Konzentrationen ELISA Serum** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

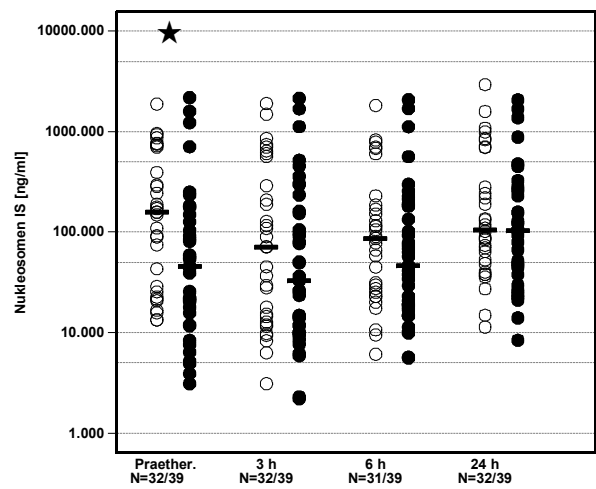


Abbildung 29 Verteilung der **Nucleosomen-Konzentrationen Impact Serum** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

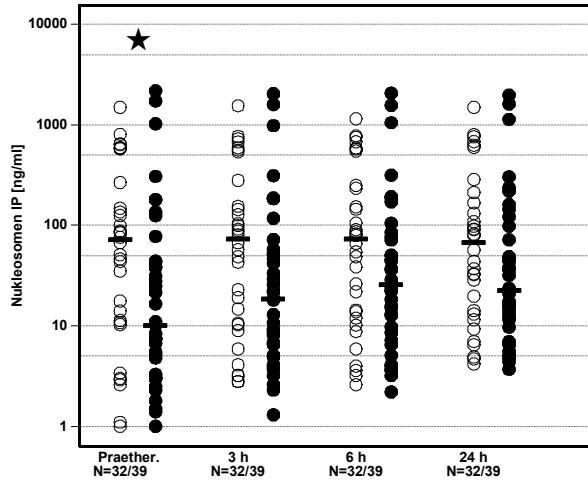


Abbildung 30 Verteilung der **Nucleosomen-Konzentrationen Impact Plasma** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

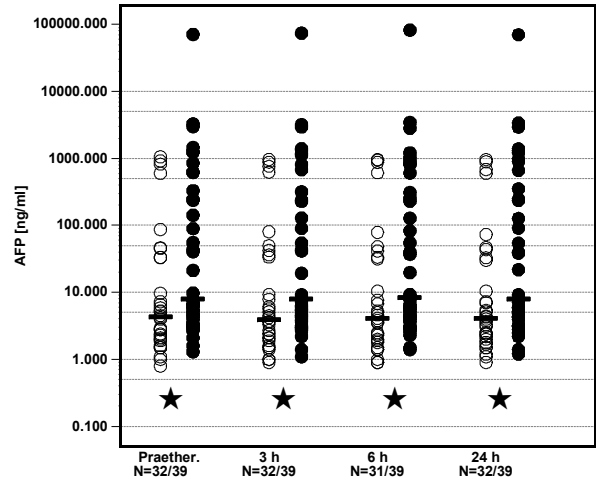


Abbildung 31 Verteilung der **AFP-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

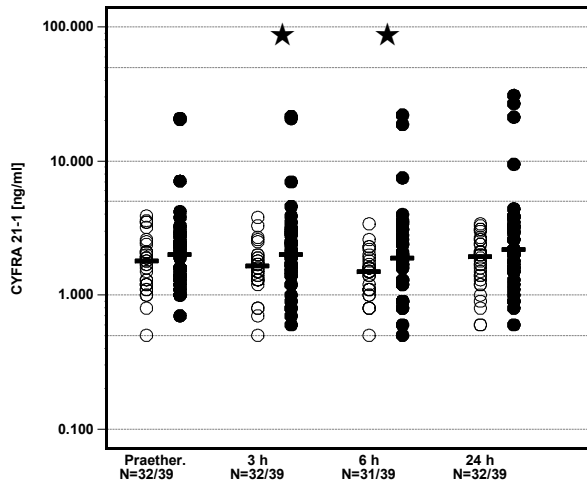


Abbildung 32 Verteilung der **CYFRA 21-1-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

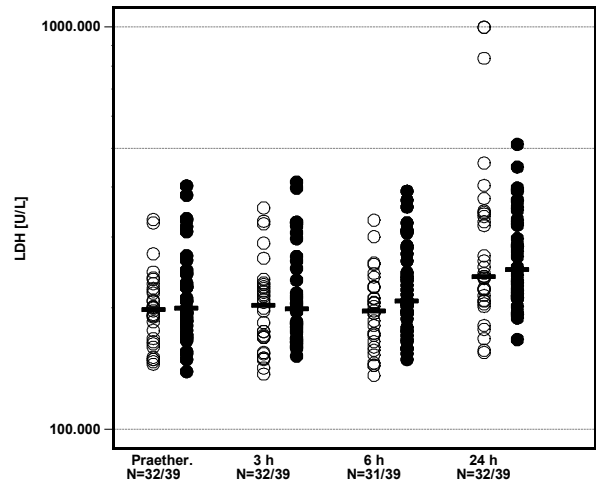


Abbildung 33 Verteilung der **LDH-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

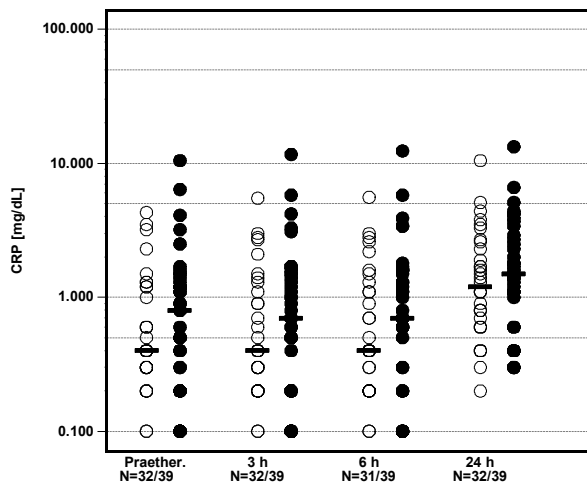


Abbildung 34 Verteilung der **CRP-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

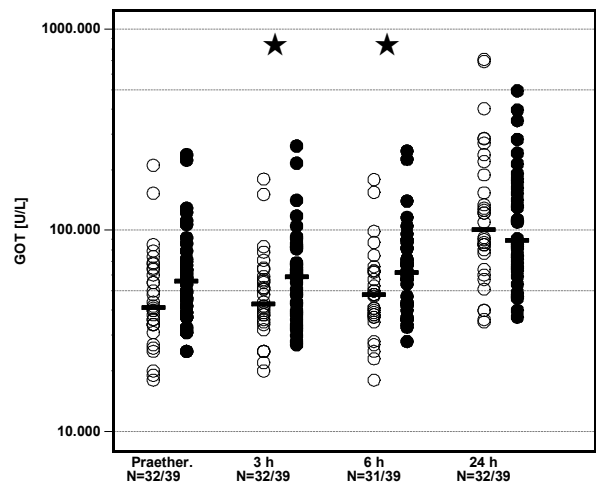


Abbildung 35 Verteilung der **GOT-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

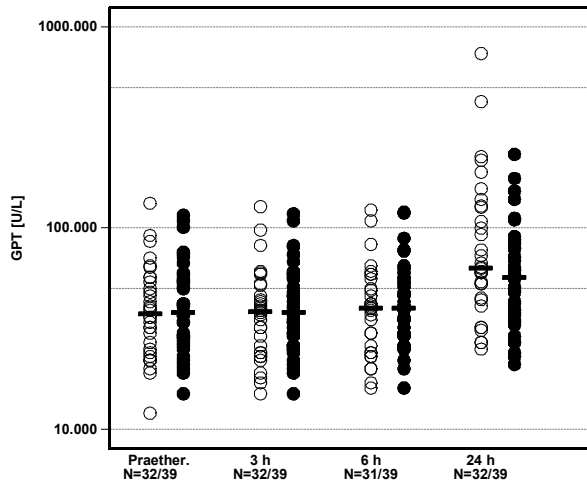


Abbildung 36 Verteilung der **GLDH-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

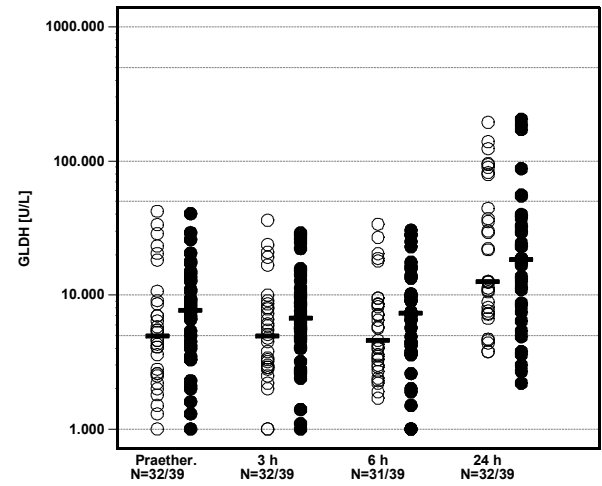


Abbildung 37 Verteilung der **GPT-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

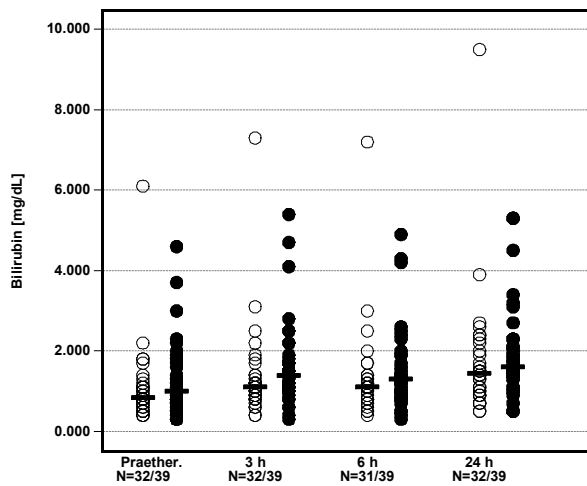


Abbildung 38 Verteilung der **Bilirubin-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

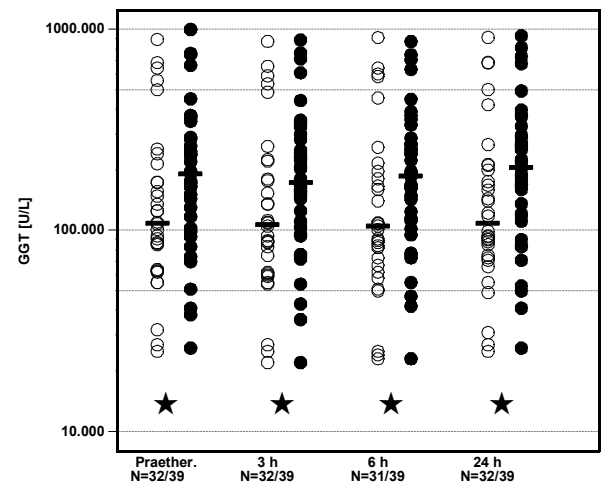


Abbildung 39 Verteilung der **gammaGT-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

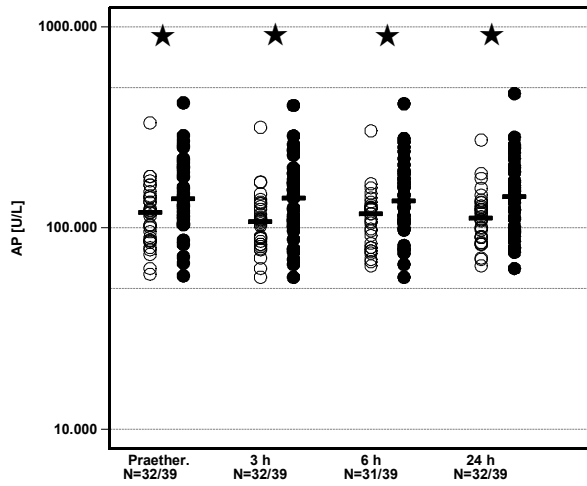


Abbildung 40 Verteilung der **AP-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

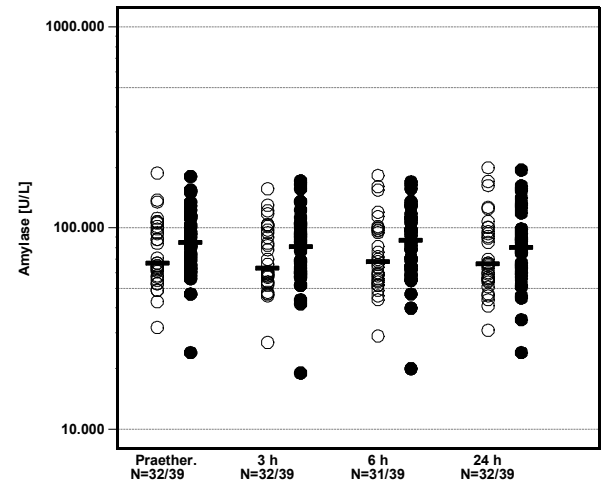


Abbildung 41 Verteilung der **Amylase-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

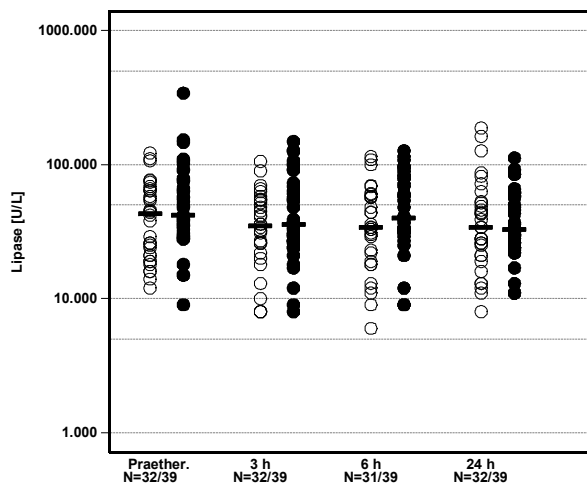


Abbildung 42 Verteilung der **Lipase-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

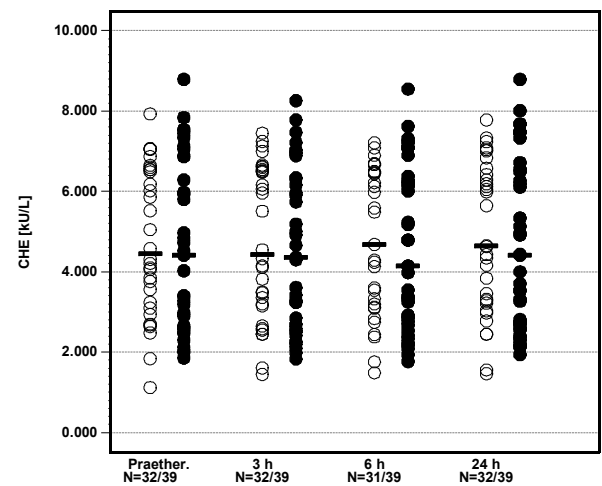


Abbildung 43 Verteilung der **Cholinesterase-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung von Respondern (○) und Non-Respondern (●)

Laborparameter	Zeit	Ansprechen	Median	75%	95%	Bandbreite	p-Wert
Nukleosomen ELISA Serum	0h	Responder	107,5	223,7	395,8	14,2 - 499,9	0,1422
		Non-Responder	80,7	206,5	312,3	<10 - 846,0	
	3h	Responder	67,5	118,1	283,7	<10 - 1861,3	0,4152
		Non-Responder	72,6	166,5	310,6	<10 - 813,4	
	6h	Responder	57,2	109,8	308,9	13,0 - 375,2	0,1647
		Non-Responder	65,2	169,3	607,5	16,2 - 660,1	
24h	Responder	81,8	216,2	346,1	11,9 - 720,1	0,0022	
	Non-Responder	231,1	354,6	895,2	25,6 - 1116,5		
Nukleosomen Impact Serum	0h	Responder	158	548,5	959	13,4 - 1889	0,0105
		Non-Responder	46	150	1597	3,1 - 2193	
	3h	Responder	71,7	428,5	1490	3,1 - 1912	0,2598
		Non-Responder	33	162	1690	2,2 - 2148	
	6h	Responder	86,9	186	828	6,1 - 1830	0,2539
		Non-Responder	46,6	185	1700	5,6 - 2079	
24h	Responder	106	489	1589	11,4 - 2949	0,4631	
	Non-Responder	104	268	1688	8,4 - 2071		
Nukleosomen Impact Plasma	0h	Responder	71,9	207,5	809	0,6 - 1505	0,0235
		Non-Responder	10,2	44,1	1735	0,6 - 2196	
	3h	Responder	73,9	217,5	771	2,8 - 1557	0,0628
		Non-Responder	18,6	58	1598	1,3 - 2045	
	6h	Responder	72,9	242	783	2,6 - 1158	0,1215
		Non-Responder	25,8	77,6	1566	2,2 - 2068	
24h	Responder	68,2	190,5	800	4,2 - 1499	0,1406	
	Non-Responder	22,6	98,5	1617	3,7 - 1988		
AFP	0h	Responder	4,4	33,3	923	0,8 - 1059	0,0114
		Non-Responder	7,9	331	3293	1,3 - 71221	
	3h	Responder	4	35	883	0,9 - 965	0,0084
		Non-Responder	8	319	3193	1,1 - 73955	
	6h	Responder	4,1	33,6	950	0,9 - 957	0,0146
		Non-Responder	8,3	310	3456	1,4 - 82861	
24h	Responder	4,2	31,6	895	0,9 - 964	0,0100	
	Non-Responder	7,9	352	3392	1,2 - 70228		

Laborparameter	Zeit	Ansprechen	Median	75%	95%	Bandbreite	p-Wert
CYFRA 21-1	0h	Responder	1,8	2,3	3,6	0,5 - 3,9	0,3488
		Non-Responder	2	2,8	20,5	0,7 - 20,9	
	3h	Responder	1,7	1,9	3,3	0,5 - 3,8	0,0411
		Non-Responder	2	2,9	20,8	0,6 - 21,6	
	6h	Responder	1,5	1,8	2,6	0,5 - 3,4	0,0411
		Non-Responder	1,9	2,8	18,8	0,5 - 22,1	
24h	Responder	2	2,5	3,3	0,6 - 3,4	0,1005	
	Non-Responder	2,2	3,5	26,9	0,6 - 31,0		
LDH	0h	Responder	198,5	222,5	326	145 - 332	0,2876
		Non-Responder	200	245	382	139 - 403	
	3h	Responder	203,5	227,5	329	137 - 355	0,5402
		Non-Responder	199	262	398	152 - 412	
	6h	Responder	197	226	301	136 - 331	0,0931
		Non-Responder	208	273	371	149 - 391	
24h	Responder	240	340,5	837	155 - 1062	0,7462	
	Non-Responder	250	332	449	167 - 511		
CRP	0h	Responder	0,4	1,2	3,5	<0,1 - 4,3	0,4237
		Non-Responder	0,8	1,4	6,4	<0,1 - 10,5	
	3h	Responder	0,4	1,2	3	<0,1 - 5,5	0,3596
		Non-Responder	0,7	1,5	5,8	<0,1 - 11,7	
	6h	Responder	0,4	1,3	3	<0,1 - 5,6	0,2993
		Non-Responder	0,7	1,6	5,8	<0,1 - 12,4	
24h	Responder	1,2	2,5	5,1	0,2 - 10,5	0,3607	
	Non-Responder	1,5	2,9	6,6	0,3 - 13,3		
GOT	0h	Responder	41,5	64,5	153	18 - 211	0,0840
		Non-Responder	56	72	224	25 - 238	
	3h	Responder	43	58	151	20 - 180	0,0242
		Non-Responder	59	83	216	27 - 263	
	6h	Responder	48	63	155	18 - 179	0,0254
		Non-Responder	62	82	226	28 - 248	
24h	Responder	101	204,5	694	35 - 710	0,5556	
	Non-Responder	89	163	398	37 - 495		

Laborparameter	Zeit	Ansprechen	Median	75%	95%	Bandbreite	p-Wert
GPT	0h	Responder	37,5	55,5	92	12 - 133	0,6521
		Non-Responder	38	56	109	15 - 116	
	3h	Responder	38,5	49	98	15 - 128	0,5593
		Non-Responder	38	57	109	15 - 118	
	6h	Responder	40	56	109	16 - 123	0,6788
		Non-Responder	40	56	119	16 - 120	
24h	Responder	63,5	128	426	25 - 740	0,1375	
	Non-Responder	57	84	177	21 - 233		
GLDH	0h	Responder	5	8,9	33,6	1 - 42,3	0,1502
		Non-Responder	7,7	13	29,3	1 - 40,6	
	3h	Responder	5	8,4	23,8	1 - 36,2	0,1568
		Non-Responder	6,7	11,3	28,1	1 - 29,2	
	6h	Responder	4,6	8,6	27	1,7 - 33,9	0,1508
		Non-Responder	7,3	13,4	28,4	1 - 30,5	
24h	Responder	12,7	62,1	140	3,8 - 195	0,9217	
	Non-Responder	18,4	32,8	187	2,2 - 206		
BILI	0h	Responder	0,9	1,2	2,2	0,4 - 6,1	0,2760
		Non-Responder	1	1,7	3,7	0,3 - 4,6	
	3h	Responder	1,1	1,4	3,1	0,4 - 7,3	0,0930
		Non-Responder	1,4	1,8	4,7	0,3 - 5,4	
	6h	Responder	1,1	1,4	3	0,4 - 7,2	0,2178
		Non-Responder	1,3	1,9	4,3	0,3 - 4,9	
24h	Responder	1,5	2,1	3,9	0,5 - 9,5	0,2309	
	Non-Responder	1,6	2,1	5,3	0,5 - 5,3		
GGT	0h	Responder	109	194,5	684	25 - 892	0,0344
		Non-Responder	192	290	761	26 - 1007	
	3h	Responder	107	200,5	656	22 - 873	0,0340
		Non-Responder	174	301	764	22 - 888	
	6h	Responder	105	197	643	23 - 911	0,0270
		Non-Responder	186	288	748	23 - 871	
24h	Responder	108,5	205,5	686	25 - 912	0,0265	
	Non-Responder	206	297	812	26 - 930		

Laborparameter	Zeit	Ansprechen	Median	75%	95%	Bandbreite	p-Wert
AP	0h	Responder	119,5	143,5	181	59 - 334	0,0231
		Non-Responder	140	202	289	58 - 421	
	3h	Responder	108	130	170	57 - 317	0,0187
		Non-Responder	141	175	288	57 - 408	
	6h	Responder	118	127	166	65 - 305	0,0141
		Non-Responder	137	185	279	57 - 416	
24h	Responder	112,5	131,5	187	65 - 275	0,0056	
	Non-Responder	143	191	283	63 - 468		
Amylase	0h	Responder	67	100,5	138	32 - 188	0,1120
		Non-Responder	85	115	155	24 - 181	
	3h	Responder	63,5	100	130	27 - 157	0,1654
		Non-Responder	81	105	165	19 - 172	
	6h	Responder	68	100	161	29 - 183	0,1039
		Non-Responder	87	113	164	20 - 170	
24h	Responder	66,5	98,5	171	31 - 200	0,3316	
	Non-Responder	80	99	162	24 - 195		
Lipase	0h	Responder	43	65	111	12 - 122	0,2271
		Non-Responder	42	76	153	9 - 342	
	3h	Responder	35	54,5	90	8 - 106	0,3257
		Non-Responder	36	69	128	8 - 149	
	6h	Responder	34	58	109	6 - 115	0,1473
		Non-Responder	40	78	115	9 - 127	
24h	Responder	34	52,5	163	8 - 188	0,7287	
	Non-Responder	33	59	92	11 - 112		
CHE	0h	Responder	4,4	6,5	7,1	1,1 - 7,9	0,6356
		Non-Responder	4,4	6,9	7,8	1,9 - 8,8	
	3h	Responder	4,4	6,5	7,3	1,5 - 7,5	0,6274
		Non-Responder	4,4	6,3	7,8	1,8 - 8,3	
	6h	Responder	4,7	6,5	7,1	1,5 - 7,2	0,7585
		Non-Responder	4,2	6,4	7,6	1,8 - 8,6	
24h	Responder	4,6	6,5	7,3	1,5 - 7,8	0,6522	
	Non-Responder	4,4	6,6	8	1,9 - 8,8		

Tabelle 13 Mediane, 75. und 95. Perzentile und die Bandbreite aller absoluten Laborparameter im Vergleich der beiden Gruppen Responder und Non-Responder mit den jeweiligen p-Werten berechnet mit dem Wilcoxon-Test (signifikante p-Werte grau hinterlegt)

Zur übersichtlicheren Darstellung der einzelnen p-Werte aller gemessenen Laborparameter werden in Tabelle 14 die anhand eines Wilcoxon-Tests berechneten p-Werte abgebildet und die signifikanten p-Werte sind grau hinterlegt. Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass die

manuell bestimmten Nukleosomenwerte wie bereits oben erwähnt im Serum nach 24 Stunden eine deutliche Signifikanz aufweisen. Weitere signifikante Laborparameter sind die beiden mit dem Impact gemessenen prätherapeutischen Nukleosomenwerte in Plasma und Serum, CYFRA 21-1 und GOT nach 3 und 6 Stunden, sowie der Tumormarker AFP und die Cholestaseparameter GGT und AP zu allen gemessenen Zeitpunkten.

	0h	3h	6h	24h
Nukleosomen ELISA Serum	0,1422	0,4152	0,1647	0,0022
Nukleosomen Impact Serum	0,0105	0,2598	0,2539	0,4631
Nukleosomen Impact Plasma	0,0235	0,0628	0,1215	0,1406
AFP	0,0114	0,0084	0,0146	0,0100
CYFRA 21-1	0,3488	0,0411	0,0411	0,1005
LDH	0,2876	0,5402	0,0931	0,7462
CRP	0,4237	0,3596	0,2993	0,3607
GOT	0,0840	0,0242	0,0254	0,5556
GPT	0,6521	0,5593	0,6788	0,1375
GLDH	0,1502	0,1568	0,1508	0,9217
BILI	0,2760	0,0930	0,2178	0,2309
GGT	0,0344	0,0340	0,0270	0,0265
AP	0,0231	0,0187	0,0141	0,0056
Amylase	0,1120	0,1654	0,1039	0,3316
Lipase	0,2271	0,3257	0,1473	0,7287
CHE	0,6356	0,6274	0,7585	0,6522

Tabelle 14 p-Werte der einzelnen Laborparameter im Vergleich zum Therapieansprechen

Zur genaueren Veranschaulichung ausgesuchter Laborparameter zur Bestimmung des Therapieansprechens werden in Abbildung 44 bis Abbildung 55 die Kinetiken einiger Parameter aller Patienten separat in den beiden Gruppen dargestellt. Die Kinetiken der Gruppe der Responder befinden sich jeweils auf der linken Seite und die Kinetiken der Gruppe der Non-Responder auf der rechten Seite. Nur die Kinetiken der jeweiligen prätherapeutischen und 24 Stunden Werte wurden zur besseren Übersichtlichkeit der einzelnen Grafiken berücksichtigt. Als Anstieg wurde ein um 25% höherer Wert als der Ausgangswert definiert. Im Gegensatz dazu bezeichnet ein Abfall einen um 25% niedrigeren Wert als den Ausgangswert. Ein Wert zwischen einem Anstieg und Abfall um weniger als 25% wurde als stabil definiert (Tabelle 15).

Aus Abbildung 44 und Abbildung 45 wird ersichtlich, dass die mit dem ELISA gemessenen Nukleosomen bei der Gruppe der Non-Responder in den meisten Fällen nach 24 Stunden ansteigen, wohingegen die Gruppe der Responder häufiger abfallende Nukleosomenwerte im ELISA aufweist (Tabelle 13): Während in der Gruppe der Responder 22,6 % einen Anstieg und 51,6 % einen Abfall nach 24 Stunden zeigten, wiesen in der Gruppe der Non-Responder 74,4 % ansteigende und 10,3 % abfallende Werte 24 Stunden nach TACE auf.

Ein ähnliches Verlaufsmuster zeigen die mit dem Impact im Serum gemessenen Nukleosomen, denn Patienten in der Gruppe der Non-Responder zeigten posttherapeutisch überwiegend ansteigende Werte (71,8 % mit Anstieg vs. 10,3 % mit Abfall). Bei der Gruppe der Responder detektierten wir eine ähnliche Anzahl von Patienten mit einem posttherapeutischen Anstieg bzw. Abfall (31,3 % vs. 21,9 %) (Abbildung 46 und Abbildung 47).

Dagegen bleiben die Werteverläufe der einzelnen Patienten beim AFP auf sehr stabilem Niveau. Nur bei einem Patienten stieg der Ausgangswert um mehr als 25 % an, und zwar in der Gruppe der Non-Responder (Abbildung 48 und Abbildung 49).

Bei CYFRA 21-1 wurden ähnliche Werteverläufe wie bei den Nukleosomen im Serum entdeckt, wobei die Unterschiede nicht so eindeutig waren. Bei den Respondern zeigten 21,9 % einen Anstieg und 18,8 % einen Abfall, bei den Non-Respondern zeigten 38,5 % einen Anstieg und 5,1 % einen Abfall (Abbildung 50 bis Abbildung 51).

Betrachtet man die beiden Gruppen anhand der beiden Parameter LDH und CRP, so fällt hierbei auf, dass in beiden Gruppen nur ansteigende Verläufe in diesem kurzen Zeitraum auftreten. Bei keinem der Patienten wurden bei diesen Parametern abfallende Werteverläufe beobachtet, wohingegen bei den Respondern 46,9 % beim LDH sowie 96,9 % beim CRP und bei den Non-Respondern 38,5 % beim LDH sowie 84,6 % beim CRP ansteigende Werteverläufe aufwiesen (Abbildung 52 bis Abbildung 55).

		Abfall $\geq 25\%$	Anstieg $\geq 25\%$
NHS	Responder	51,6 %	22,6 %
	Non-Responder	10,3 %	74,4 %
NIS	Responder	21,9 %	31,3 %
	Non-Responder	10,3 %	71,8 %
AFP	Responder	0 %	0 %
	Non-Responder	0 %	2,6 %
CYFRA 21-1	Responder	18,8 %	21,9 %
	Non-Responder	5,1 %	38,5 %
LDH	Responder	0 %	46,9 %
	Non-Responder	0 %	38,5 %
CRP	Responder	0 %	96,9 %
	Non-Responder	0 %	84,6 %

Tabelle 15 Prozentualer Anteil der Patienten mit einem Abfall bzw. Anstieg um mindestens 25 % im Verlauf des ersten Tages nach TACE

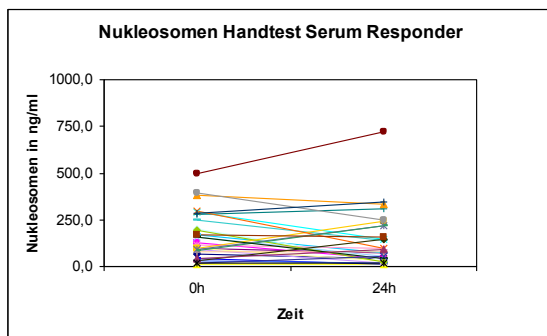


Abbildung 44 Kinetiken der **Nukleosomen im ELISA Serum** im Verlauf des ersten Tages bei Respondern

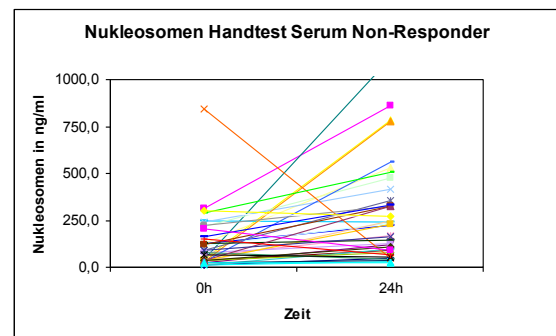


Abbildung 45 Kinetiken der **Nukleosomen im ELISA Serum** im Verlauf des ersten Tages bei Non-Respondern

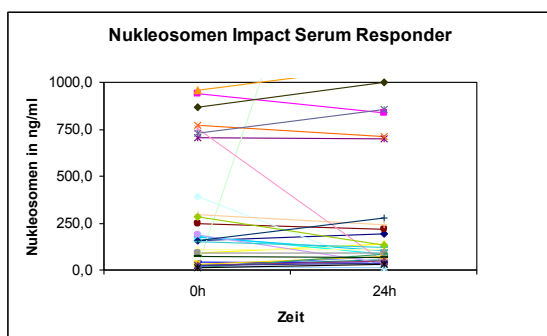


Abbildung 46 Kinetiken der **Nukleosomen im Impact Serum** im Verlauf des ersten Tages bei Respondern

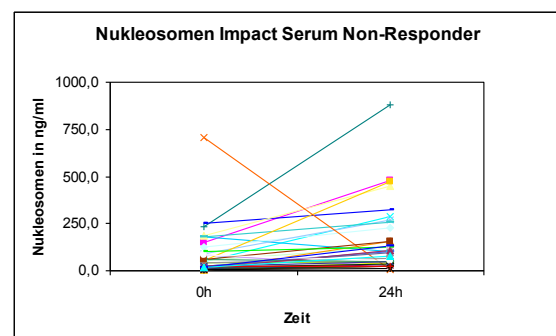


Abbildung 47 Kinetiken der **Nukleosomen im Impact Serum** im Verlauf des ersten Tages bei Non-Respondern

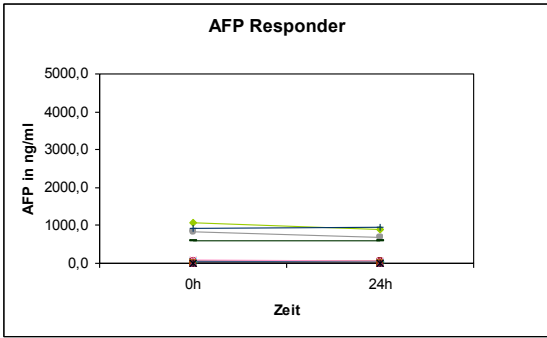


Abbildung 48 Kinetiken der **AFP-Konzentration** im Verlauf des ersten Tages bei Respondern

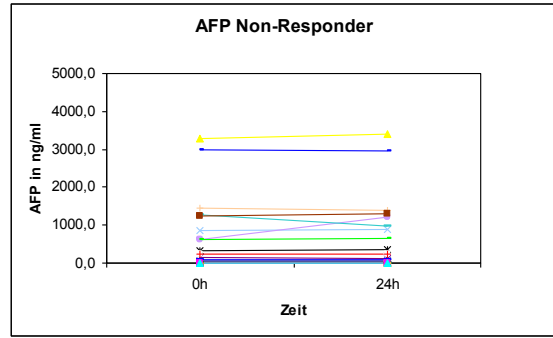


Abbildung 49 Kinetiken der **AFP-Konzentration** im Verlauf des ersten Tages bei Non-Respondern

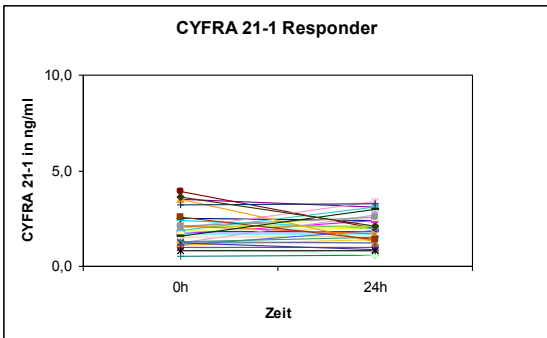


Abbildung 50 Kinetiken der **CYFRA 21-1-Konzentration** im Verlauf des ersten Tages bei Respondern

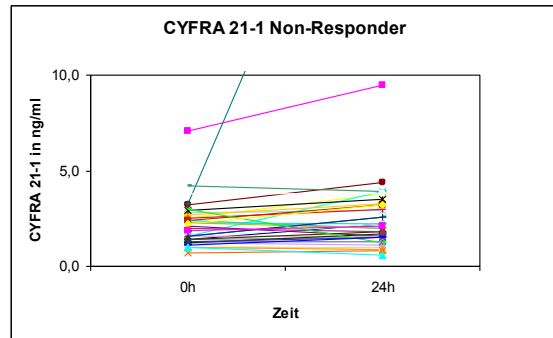


Abbildung 51 Kinetiken der **CYFRA 21-1-Konzentration** im Verlauf des ersten Tages bei Non-Respondern

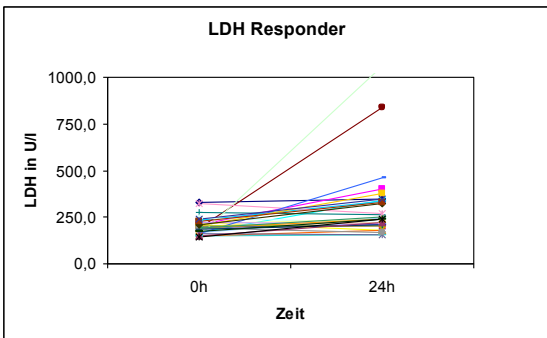


Abbildung 52 Kinetiken der **LDH-Konzentration** im Verlauf des ersten Tages bei Respondern

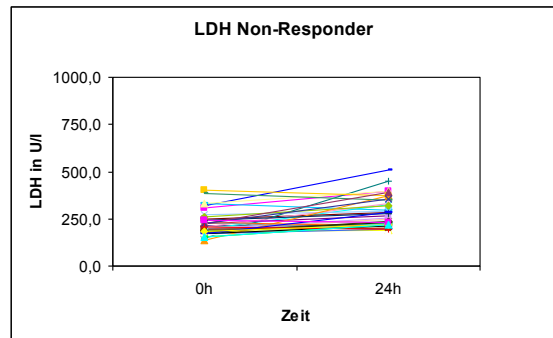


Abbildung 53 Kinetiken der **LDH-Konzentration** im Verlauf des ersten Tages bei Non-Respondern

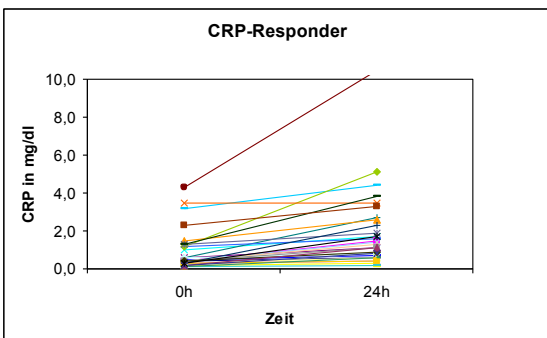


Abbildung 54 Kinetiken der **CRP-Konzentration** im Verlauf des ersten Tages bei Respondern

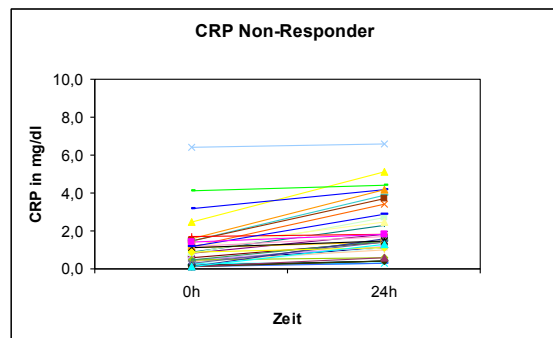


Abbildung 55 Kinetiken der **CRP-Konzentration** im Verlauf des ersten Tages bei Non-Respondern

Sowohl aus den Medianen aus Tabelle 13, wie auch den abgebildeten Kinetiken der Nukleosomen wird deutlich, dass Responder und Non-Responder einen unterschiedlichen Verlauf der Nukleosomen nach einer transarteriellen Chemoembolisation aufweisen. Daher wurden nicht nur die absoluten Nukleosomenwerte im Verlauf ausgewertet, sondern zusätzlich die Differenzen und prozentualen Veränderungen der einzelnen posttherapeutischen Werte zum prätherapeutischen Wert berechnet. Die prozentualen Veränderungen wurden gebildet, damit zu hohe Nukleosomenwerte nicht zu stark in die Bewertung mit einfließen. Die Ergebnisse des Log-Rank-Tests zu diesen p-Werten sind in der Tabelle 16 zusammengefasst, wobei signifikante Auswertungen wiederum grau hinterlegt sind. Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass die im Serum gemessenen Nukleosomen jeweils bei den Differenzen und Quotienten nach 6 und 24 Stunden eine statistische Signifikanz aufweisen. Vor allem nach 24 Stunden mit dem ELISA gemessen besteht jeweils ein p-Wert von $< 0,0001$. Zusätzlich sind die Nukleosomen im Plasma zu allen Zeitpunkten des prozentualen Abfalls, sowie die Lipase bei der Differenz nach 24 Stunden signifikant.

Laborparameter	Differenz			prozentuale Veränderung		
	3h-0	6h-0	24h-0	3h-0%	6h-0%	24h-0%
Nukleosomen ELISA Serum	0,0861	0,0103	<0,0001	0,0529	0,0055	<0,0001
Nukleosomen Impact Serum	0,0536	0,0061	0,0046	0,0543	0,0135	0,0008
Nukleosomen Impact Plasma	0,4286	0,0536	0,6152	0,0150	0,0054	0,0044
AFP	0,9171	0,1755	0,4250	0,1709	0,7495	0,8217
CYFRA 21-1	0,2474	0,1989	0,0856	0,3118	0,2055	0,2288
LDH	0,7418	0,2323	0,7815	0,8488	0,2058	0,7115
CRP	0,2666	0,1872	0,6355	0,1956	0,0975	0,6438
GOT	0,1907	0,1830	0,2876	0,7859	0,4928	0,2408
GPT	0,4266	0,9811	0,0819	0,5395	0,8453	0,0508
GLDH	0,9677	0,7720	0,6071	0,8442	0,8085	0,2799
BILI	0,4136	0,8262	0,5357	0,4586	0,9811	0,9954
GGT	0,3670	0,9012	0,1068	0,9954	0,1777	0,2339
AP	0,6028	0,2035	0,1855	0,2825	0,1131	0,3174
Amylase	0,7416	0,4076	0,9355	0,6859	0,4352	0,8217
Lipase	0,4114	0,9481	0,0390	0,4559	0,7051	0,0732
CHE	0,8578	0,7540	0,6439	0,6944	0,7857	0,5138

Tabelle 16 p-Werte der einzelnen Laborparameter im Vergleich zum Therapieansprechen

Alle in den univariaten Analysen relevanten Biomarker vor und 24 Stunden nach TACE-Therapie wurden mit klinischen Faktoren in multivariaten Analysen ausgewertet. Als bestes Modell fand sich die Kombination aus Nukleosomen im ELISA Serum nach 24 Stunden, die alkalische Phosphatase nach 24 Stunden und der TACE-Zyklus. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Biomarker logarithmisch mit der Basis 2 eingeschlossen wurden (Tabelle 17).

	Koeffizient	Chi-Square	p-Wert	Odds-Ratio	95%-Konf. Intervall
NHS (24h; log2)	0,581	8,25	0,0041	1,79	1,20-2,66
AP (24h; log2)	1,561	6,62	0,0101	4,76	1,45-15,64
TACE-Zyklus	0,636	7,08	0,0078	1,89	1,18-3,02

Tabelle 17 Bestes Modell prädiktiver Biomarker für das Therapieansprechen

4.4 Korrelation zwischen dem Therapieansprechen in der Bildgebung und dem Gesamtüberleben

Für Ärzte und Patienten ist es von großem Interesse, ob man vom Therapieansprechen des Tumors auf die Überlebenszeit des Patienten schließen kann. Daher wurde im nächsten Schritt der Zusammenhang zwischen Therapieansprechen und Überleben näher betrachtet. Hierbei wird die Gruppe der Responder wieder getrennt in Patienten mit Remission und Stable Disease betrachtet. In diese Auswertung wurden alle Patienten mit einer zusätzlichen RFA am folgenden Tag miteinbezogen, da der 24 Stunden Wert in allen Fällen vor der RFA abgenommen wurde und somit kein Einfluss der RFA auf diesen Wert bestehen kann. Dagegen mussten zwei Patienten aufgrund einer Lebertransplantation ausgeschlossen werden, womit hier 48 Patienten ausgewertet wurden. Trotz der unterschiedlichen Anzahl an Therapien ergibt sich hierbei ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Therapieansprechen in der Bildgebung und Gesamtüberleben der Patienten ($p = 0,019$) (Abbildung 56). Es wird deutlich, dass Patienten mit Progression eine schlechtere Prognose haben, als Patienten mit stabiler Erkrankung oder Remission. Von den Patienten mit Remission ist im Beobachtungszeitraum keiner verstorben.

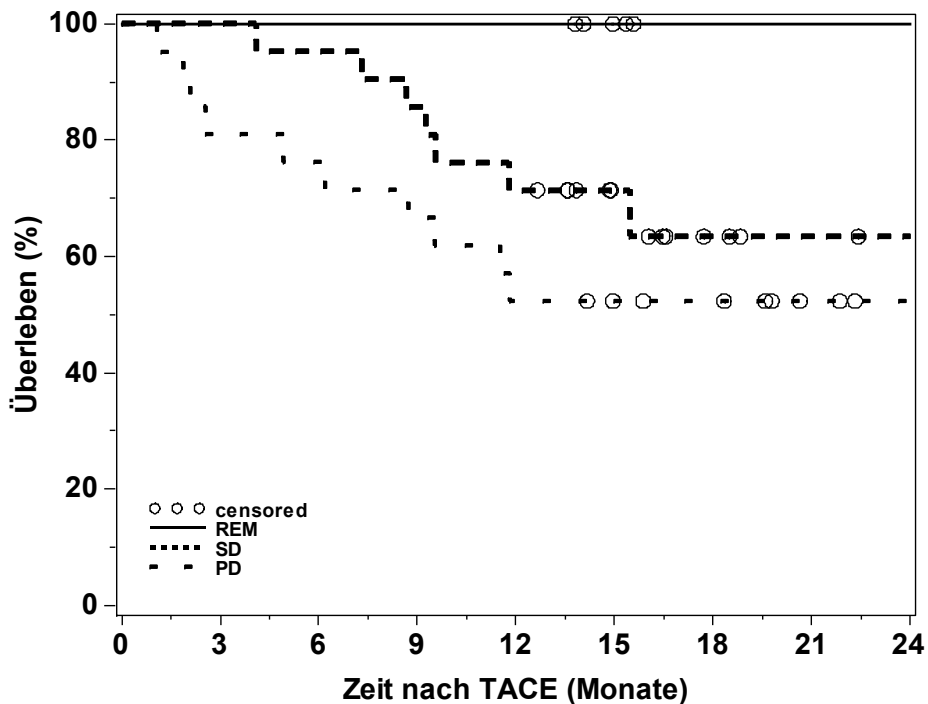


Abbildung 56 Kaplan-Meier-Kurve des Therapieansprechens

4.5 Korrelation zwischen den Biomarkern und der Ein-Jahresüberlebensrate

Im klinischen Alltag ist es wichtig, möglichst zuverlässige Prognosen für den einzelnen Patienten zu treffen. Die Prädiktion des Therapieansprechens ist ein wichtiger Bestandteil, um die Therapie zu stratifizieren und gegebenenfalls zu modifizieren. Die größte Relevanz für den Patienten besitzt das Überleben. Wie oben gezeigt korreliert in dieser Studie das Therapieansprechen mit der Prognose der Patienten (siehe Kapitel 4.4). Es stellte sich somit die Frage, ob diesselben Marker für die Prognose relevant sind, die für das Therapieansprechen detektiert wurden und ob diese zuverlässig eine Aussage über die Prognose treffen. Daher wurde anhand von Wilcoxon Berechnungen untersucht, ob mittels einzelner Laborparameter eine Aussage über das Ein-Jahresüberleben eines Patienten gemacht werden kann. Dabei wurde der Krankheitsverlauf der Patienten über ein Jahr nach ihrer ersten von mir erfassten Therapie festgehalten. Bei dieser Auswertung wurden auch Patienten berücksichtigt, die zusätzlich eine RFA nach der TACE erhalten haben. Die Radiofrequenzablation hatte keinen Einfluss auf die Laborparameter, da diese erst nach der letzten Blutabnahme erfolgt ist. Daher wurden insgesamt 48 Patienten ausgewertet.

Zu Beginn werden wieder die einzelnen Verläufe der Laborparameter innerhalb des ersten Tages nach der transarteriellen Chemoembolisation in Abbildung 57 bis Abbildung 72 anhand von dot-plot-Grafiken dargestellt. Hierbei werden Patienten unterschieden, die ein Jahr nach der ersten von mir erfassten TACE am Leben waren und Patienten, die im Verlaufe des ersten Jahres starben. Alle signifikanten Unterschiede sind mit ★ gekennzeichnet. In Tabelle 18 sind alle Mediane, die 25., 75. und 95. Perzentile, die Bandbreite und der dazugehörige p-Wert aufgezeigt. Der p-Wert wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests berechnet.

Hierbei zeigte sich bei den Nukleosomen im ELISA zu keinem der vier Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Ein-Jahresüberleben. Bei Patienten, welche das erste Jahr nach der TACE überlebten, lag der Median nach 24 Stunden mit 141,9 ng/mL sogar höher als bei Patienten die vorher verstorben waren (75,5 ng/mL). Vor Therapiebeginn lag der Median der Verstorbenen mit 111,5 ng/mL jedoch noch leicht höher als bei den Ein-Jahresüberlebenden mit 97,2 ng/mL, was aber nicht signifikant war ($p = 0,8956$) (Abbildung 57). Ebenfalls nicht signifikant zu allen vier Zeitpunkten waren die mit dem Impact gemessenen Nukleosomenwerte, wobei die im Serum gemessenen Nukleosomen in etwa das gleiche Verlaufsmuster aufwiesen wie die mit dem ELISA gemessenen (Abbildung 58 und Abbildung 59).

Dagegen zeigte sich beim AFP, wie bereits bei der Auswertung zum Therapieansprechen, an allen vier Zeitpunkten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Ein-Jahresüberlebens. Vor Therapiebeginn liegt der Median der Ein-Jahresüberlebenden bei 5 ng/mL, dagegen liegt er bei den Verstorbenen bei 92,8 ng/mL (Abbildung 60). Diese Wertelagen bleiben erneut stabil über den Verlauf des ersten Tages.

Ebenfalls signifikante Unterschiede beim Ein-Jahresüberleben wurden beim CYFRA 21-1 beobachtet. Vor allem drei Stunden nach Therapie beträgt der p-Wert 0,0015. Verfolgt man den Verlauf über den ersten Tag hinweg, so wird deutlich, dass beide Gruppen einen ähnlichen Verlauf nehmen, denn nach 24 Stunden kommt es jeweils zu einem Anstieg. Jedoch weist die Gruppe der Ein-Jahresüberlebenden jeweils niedrigere Wertelagen auf (Abbildung 61).

Überraschenderweise zeigte auch der Zelltodmarker LDH vor Therapiebeginn ($p = 0,0243$) und 3 Stunden nach Therapie ($p = 0,0074$) einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des

Ein-Jahresüberlebens. Zu Beginn der Therapie lag der Median bei den Ein-Jahresüberlebenden bei 195,5 U/L, bei den Verstorbenen bei 221 U/L. Jedoch stieg der Median bei den Ein-Jahresüberlebenden stärker an als bei der anderen Gruppe, so dass sich beide Mediane annäherten (Abbildung 62).

Als weiterer signifikanter Marker zur Auswertung zum Ein-Jahresüberleben erwies sich der Lebersyntheseparameter CHE. Da auch dieser Wert aufgrund seiner Halbwertszeit sehr stabile Werte aufweist, waren beim CHE alle Zeitpunkte statistisch signifikant. Die höchste Signifikanz erzielte dabei der Wert nach 24 Stunden ($p = 0,0020$), wobei Patienten, die im ersten Jahr nach der TACE verstarben, einen Median von 2,9 kU/L und die Ein-Jahresüberlebenden einen Median von 5,8 kU/L hatten (Abbildung 72).

Sowohl die Leberenzyme GOT, GPT und GLDH, als auch die Cholestaseparameter Bilirubin, GGT und AP sind für die Prognose des Ein-Jahresüberlebens in diesem Patientenkollektiv nicht relevant. Auch die übrigen Parameter CRP, Amylase und Lipase zeigten in dieser Auswertung keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Ein-Jahresüberleben.

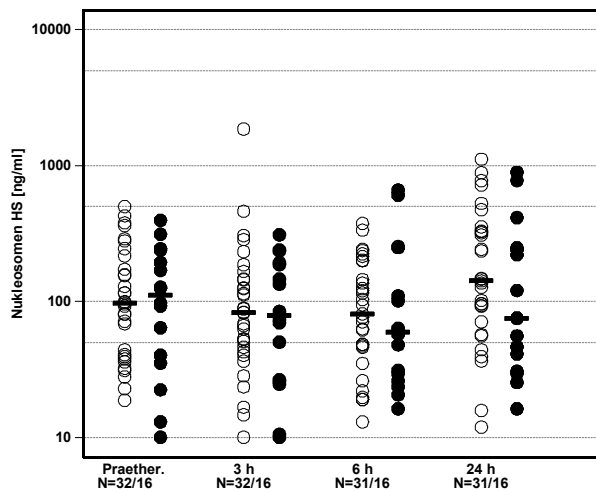


Abbildung 57 Verteilung der **Nucleosomen-Konzentrationen ELISA Serum** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

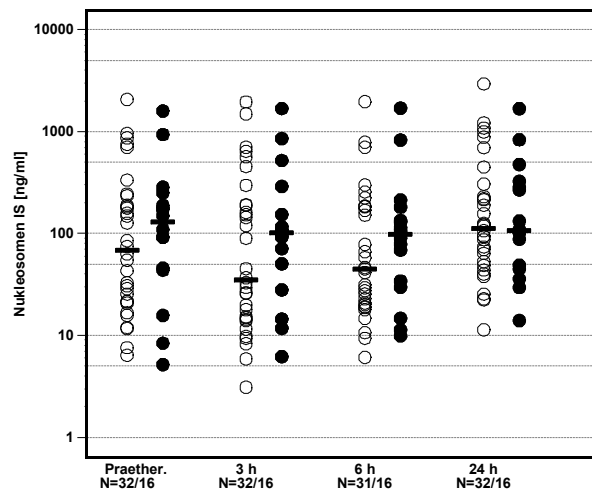


Abbildung 58 Verteilung der **Nucleosomen-Konzentrationen Impact Serum** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

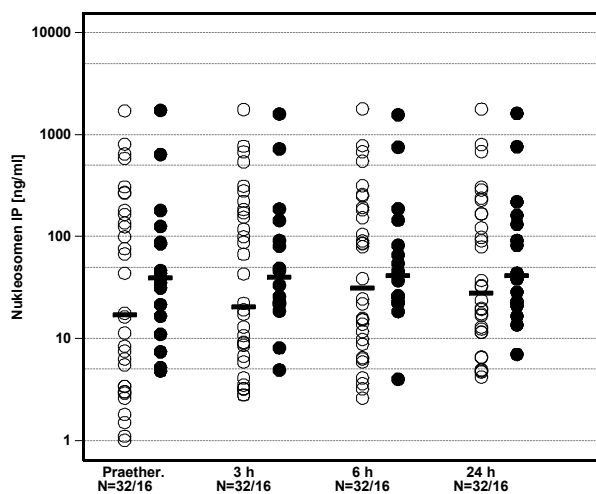


Abbildung 59 Verteilung der **Nucleosomen-Konzentrationen Impact Plasma** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

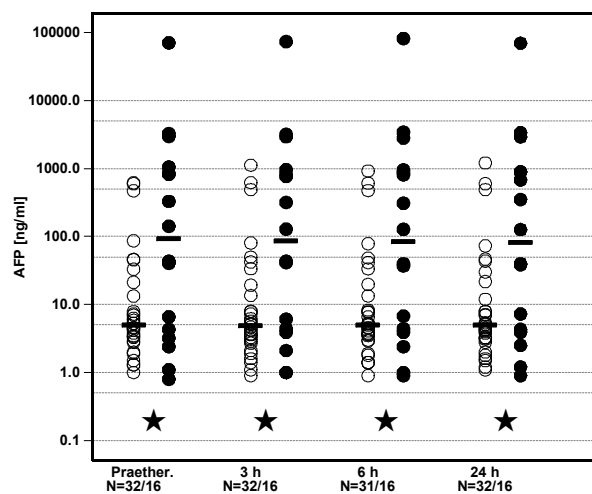


Abbildung 60 Verteilung der **AFP-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

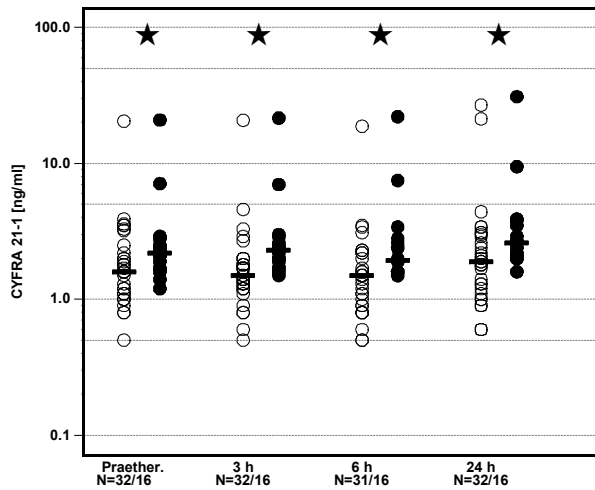


Abbildung 61 Verteilung der **CYFRA 21-1-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

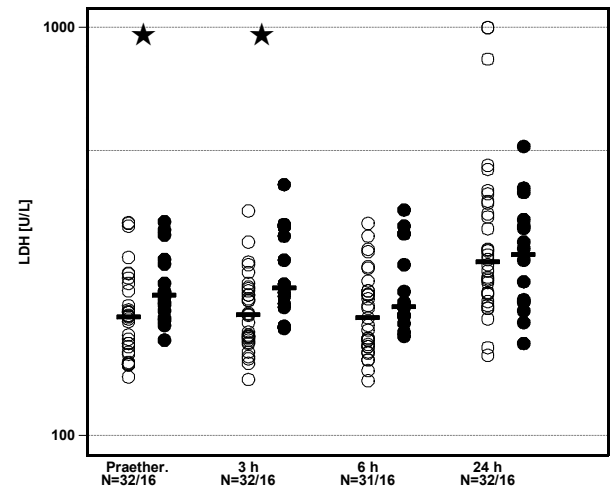


Abbildung 62 Verteilung der **LDH-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

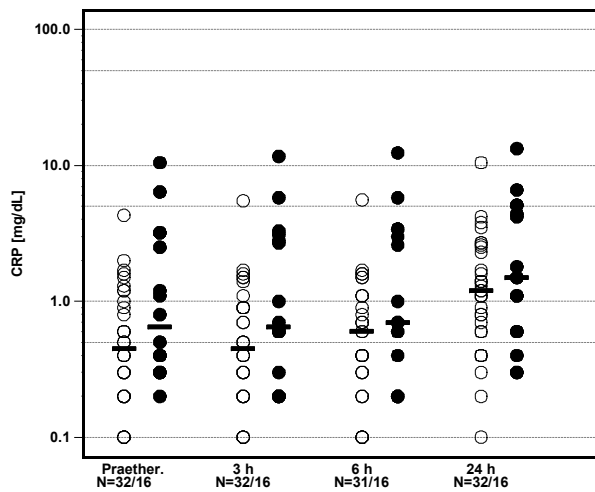


Abbildung 63 Verteilung der **CRP-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

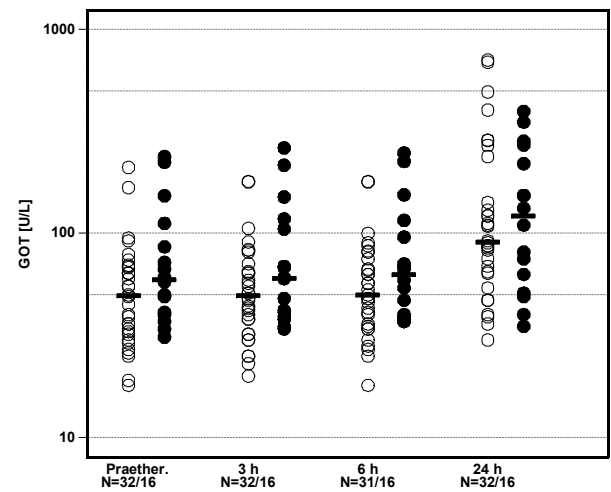


Abbildung 64 Verteilung der **GOT-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

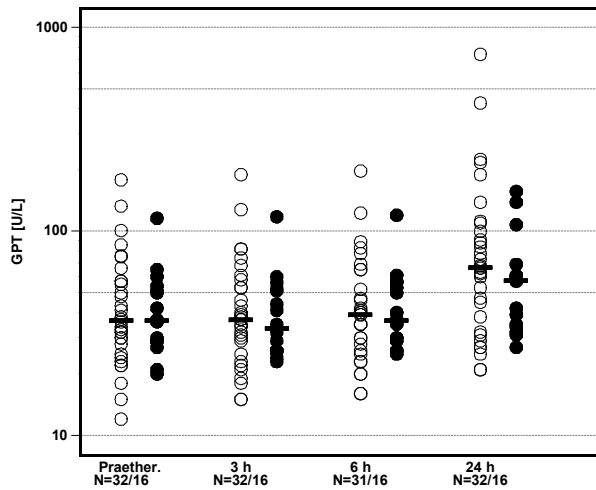


Abbildung 65 Verteilung der **GPT-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

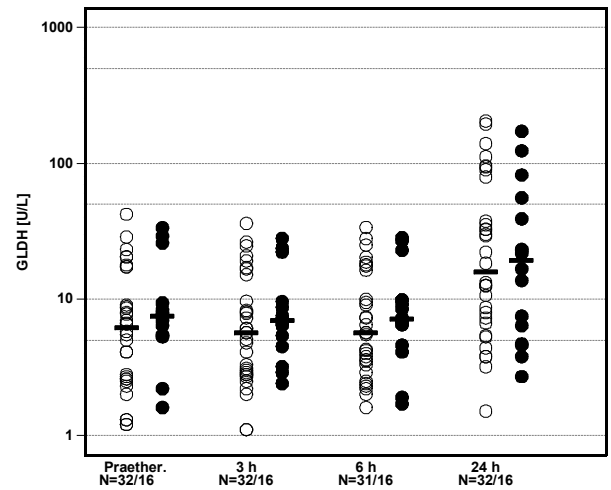


Abbildung 66 Verteilung der **GLDH-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

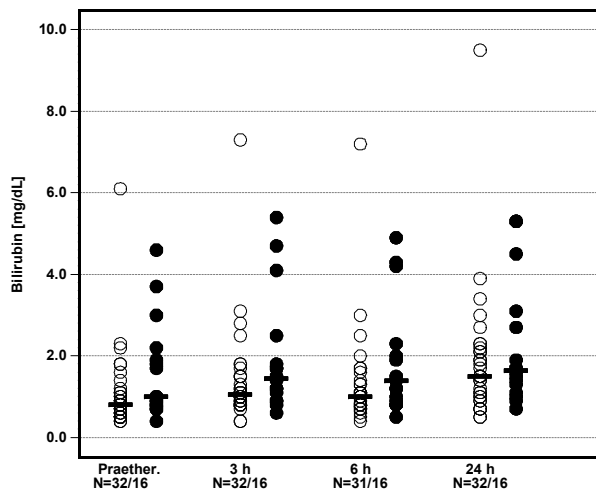


Abbildung 67 Verteilung der **Bilirubin-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

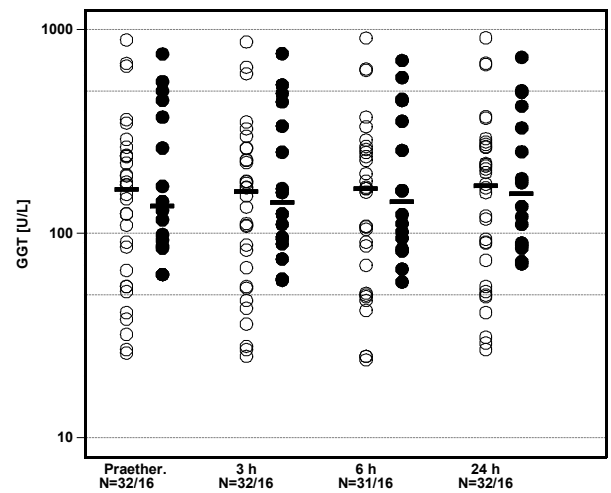


Abbildung 68 Verteilung der **gammaGT-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

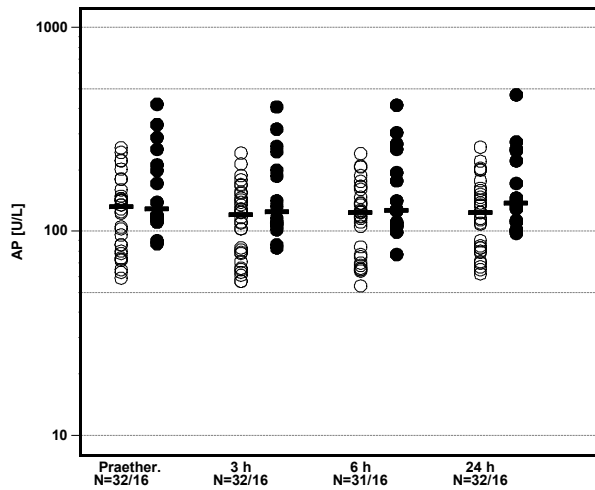


Abbildung 69 Verteilung der **alkal. Phosphatase-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

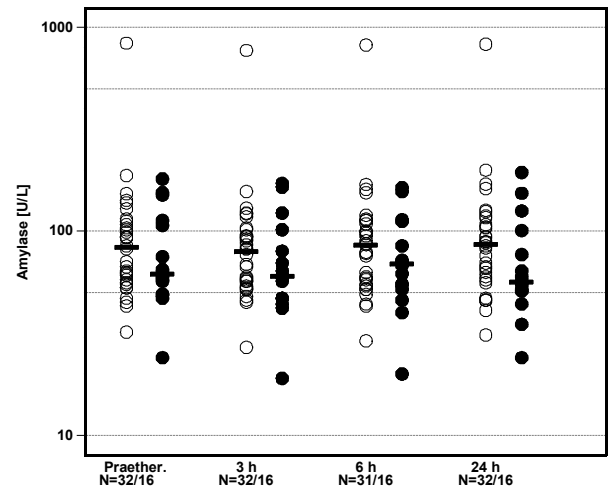


Abbildung 70 Verteilung der **Amylase-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

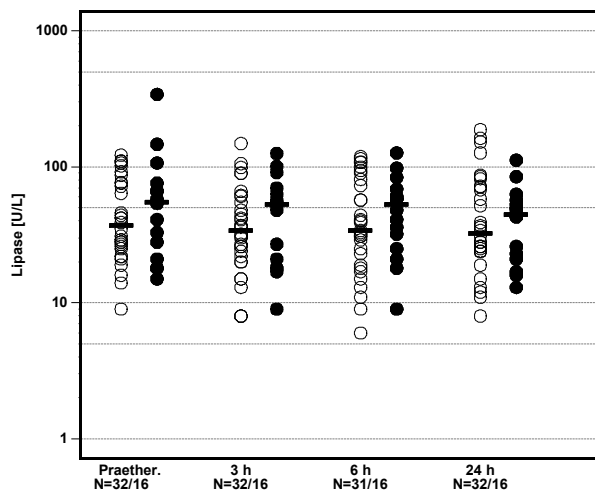


Abbildung 71 Verteilung der **Lipase-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

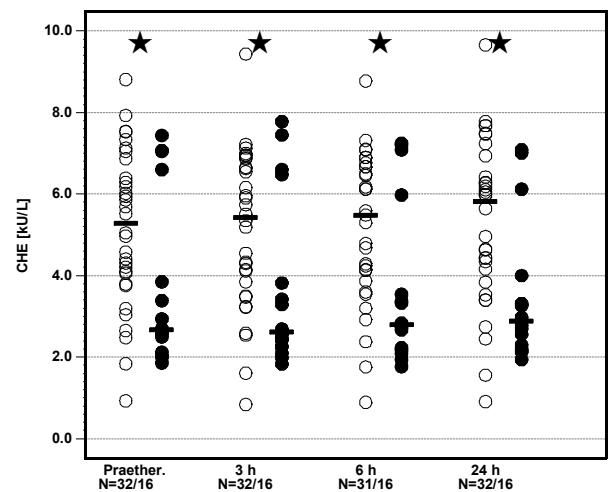


Abbildung 72 Verteilung der **Cholinesterase-Konzentrationen** während des ersten Tages nach der Behandlung bei Überleben des Patienten > 1 Jahr (○) und bei Überleben des Patienten < 1 Jahr (●)

Laborparameter	Zeit	1-JÜ	Median	25%	75%	95%	Bandbreite	p-Wert
Nukleosomen ELISA Serum	0h	Ja	97,2	40	194,8	427,9	18,8 - 499,9	0,8956
		Nein	111,5	37,8	216,2	395,8	10 - 395,8	
	3h	Ja	83,2	44,4	145,6	461,6	10 - 1861	0,9913
		Nein	79,2	26,2	190,2	310,6	10 - 310,6	
	6h	Ja	81,2	46,2	199,6	335,2	13 - 375,2	0,6453
		Nein	59,5	27,8	179,6	660,1	16,2 - 660,1	
	24h	Ja	141,9	70,9	330,6	886,6	11,9 - 1117	0,2127
		Nein	75,5	35,9	244,8	895,2	16,2 - 895,2	
Nukleosomen Impact Serum	0h	Ja	69	21,6	211,5	959	6,4 - 2075	0,5047
		Nein	130	44,9	220	1597	5,2 - 1597	
	3h	Ja	34,9	14,7	190,5	1490	3,1 - 1961	0,3877
		Nein	101,8	39,3	222	1690	6,2 - 1690	
	6h	Ja	45	20,1	185	787	6,1 - 1968	0,4588
		Nein	98,3	32,1	158	1700	9,9 - 1700	
	24h	Ja	113	50,9	268,5	1222	11,4 - 2949	0,9564
		Nein	106,5	47	305,5	1688	14 - 1688	
Nukleosomen Impact Plasma	0h	Ja	17	3,2	172,5	809	1 - 1718	0,3937
		Nein	39,4	13,8	106,8	1735	4,8 - 1735	
	3h	Ja	20,6	6,3	178	771	2,8 - 1773	0,3698
		Nein	40	22	117,9	1598	4,9 - 1598	
	6h	Ja	31,5	9,3	188,5	783	2,6 - 1800	0,5047
		Nein	41,4	24,3	113,7	1566	4 - 1566	
	24h	Ja	28,1	11,6	167,5	800	4,2 - 1782	0,3304
		Nein	41,2	21,8	147	1617	7 - 1617	
AFP	0h	Ja	5	3,1	17,3	603	1 - 622	0,0408
		Nein	92,8	3,8	958,5	71221	0,8 - 71221	
	3h	Ja	4,9	3	16,5	626	0,9 - 1129	0,0321
		Nein	86,2	4,2	891	73955	1 - 73955	
	6h	Ja	5	3	19,8	612	0,9 - 928	0,0368
		Nein	84	4,2	916,5	82861	0,9 - 82861	
	24h	Ja	5	3,2	16,9	600	1,1 - 1217	0,0367
		Nein	83,5	4,1	896,5	70228	0,9 - 70228	
CYFRA 21-1	0h	Ja	1,6	1,1	2,4	3,9	0,5 - 20,5	0,0294
		Nein	2,2	1,8	2,7	20,9	1,2 - 20,9	
	3h	Ja	1,5	1,2	1,9	4,6	0,5 - 20,8	0,0015
		Nein	2,3	1,8	2,8	21,6	1,5 - 21,6	
	6h	Ja	1,5	0,9	2,2	3,5	0,5 - 18,8	0,0036
		Nein	2	1,6	2,7	22,1	1,5 - 22,1	
	24h	Ja	1,9	1,3	3	21,3	0,6 - 26,9	0,0156
		Nein	2,6	2,1	3,7	31	1,6 - 31	

Laborparameter	Zeit	1-JÜ	Median	25%	75%	95%	Bandbreite	p-Wert
LDH	0h	Ja	195,5	162,5	231	331	139 - 332	0,0243
		Nein	221	198	266,5	334	171 - 334	
	3h	Ja	197,5	172	227,5	298	137 - 355	0,0074
		Nein	229,5	195,5	325	412	183 - 412	
	6h	Ja	194	165	226	308	136 - 331	0,0742
		Nein	206,5	196,5	287	357	175 - 357	
24h	Ja	266	222,5	360	837	157 - 1062	0,8439	
	Nein	278	212,5	332	511	168 - 511		
CRP	0h	Ja	0,5	0,2	1,1	2	0,1 - 4,3	0,1190
		Nein	0,7	0,4	2,9	10,5	0,2 - 10,5	
	3h	Ja	0,5	0,2	0,9	1,7	0,1 - 5,5	0,1213
		Nein	0,7	0,3	3	11,7	0,2 - 11,7	
	6h	Ja	0,6	0,3	1,1	1,7	0,1 - 5,6	0,1835
		Nein	0,7	0,3	3,2	12,4	0,2 - 12,4	
24h	Ja	1,2	0,7	2,4	4,2	0,1 - 10,5	0,3190	
	Nein	1,5	0,6	4,8	13,3	0,3 - 13,3		
GOT	0h	Ja	49,5	32,5	68,5	168	18 - 211	0,1178
		Nein	59,5	40,5	99	238	31 - 238	
	3h	Ja	49,5	35	68	179	20 - 180	0,1930
		Nein	60,5	40	111,5	263	34 - 263	
	6h	Ja	50	35	75	179	18 - 180	0,1605
		Nein	63	39,5	106	248	37 - 248	
24h	Ja	91	64,5	190	694	30 - 710	0,8269	
	Nein	121,5	57	246	398	35 - 398		
GPT	0h	Ja	36,5	26,5	57	133	12 - 179	0,8611
		Nein	36,5	29	52,5	116	20 - 116	
	3h	Ja	37	27	55,5	128	15 - 190	0,7844
		Nein	33,5	26	51,5	118	23 - 118	
	6h	Ja	39	26	65	123	16 - 198	0,9552
		Nein	36,5	29,5	54,5	120	25 - 120	
24h	Ja	66,5	35	105	426	21 - 740	0,3090	
	Nein	57,5	34,5	65	157	27 - 157		
GLDH	0h	Ja	6,2	2,6	13,2	28,8	1,2 - 42,3	0,3358
		Nein	7,6	5,5	8,9	33,6	1,6 - 33,6	
	3h	Ja	5,7	2,9	12,5	26,4	1,1 - 36,2	0,3196
		Nein	7	5	9,2	28,1	2,4 - 28,1	
	6h	Ja	5,7	3,3	16,4	28	1,6 - 33,9	0,3514
		Nein	7,2	5,6	9,9	28,4	1,7 - 28,4	
24h	Ja	15,9	7	58,6	195	1,5 - 206	0,8525	
	Nein	19,3	5,6	47,5	172	2,7 - 172		

Laborparameter	Zeit	1-JÜ	Median	25%	75%	95%	Bandbreite	p-Wert
BILI	0h	Ja	0,8	0,6	1,2	2,3	0,4 - 6,1	0,0686
		Nein	1	0,8	2,1	4,6	0,4 - 4,6	
	3h	Ja	1,1	0,9	1,5	3,1	0,4 - 7,3	0,1117
		Nein	1,5	1	2,2	5,4	0,6 - 5,4	
	6h	Ja	1	0,8	1,4	3	0,4 - 7,2	0,0681
		Nein	1,4	1	2,2	4,9	0,5 - 4,9	
24h	Ja	1,5	1	2,2	3,9	0,5 - 9,5	0,4114	
	Nein	1,7	1,2	2,9	5,3	0,7 - 5,3		
GGT	0h	Ja	164,5	60,5	241,5	684	26 - 892	0,5330
		Nein	137	90	412	761	63 - 761	
	3h	Ja	160,5	61,5	246	656	25 - 873	0,5047
		Nein	142	91,5	390	764	59 - 764	
	6h	Ja	166	51	259	643	24 - 911	0,5078
		Nein	143	89,5	403	707	58 - 707	
24h	Ja	171,5	64,5	270,5	686	27 - 912	0,5548	
	Nein	157	89	376	733	71 - 733		
AP	0h	Ja	132	83	154,5	244	59 - 257	0,1458
		Nein	129,5	114,5	232,5	421	87 - 421	
	3h	Ja	120,5	78,5	150	214	57 - 242	0,1055
		Nein	124,5	107,5	223	408	83 - 408	
	6h	Ja	124	75	161	209	54 - 241	0,1160
		Nein	127,5	108	223,5	416	77 - 416	
24h	Ja	124	83	155,5	221	62 - 259	0,0964	
	Nein	137,5	106,5	235,5	468	98 - 468		
Amylase	0h	Ja	83,5	57	110	188	32 - 839	0,4771
		Nein	62	53	110	181	24 - 181	
	3h	Ja	79,5	55,5	98,5	157	27 - 773	0,3525
		Nein	60,5	47	91	172	19 - 172	
	6h	Ja	86	55	113	170	29 - 821	0,3176
		Nein	69	53,5	98,5	164	20 - 164	
24h	Ja	86,5	59	112,5	200	31 - 829	0,0942	
	Nein	56,5	51	89	195	24 - 195		
Lipase	0h	Ja	37	25,5	76,5	111	9 - 122	0,6303
		Nein	55	24,5	71,5	342	15 - 342	
	3h	Ja	34	21	58	106	8 - 149	0,3357
		Nein	53	19,5	66,5	126	9 - 126	
	6h	Ja	34	19	81	115	6 - 119	0,4189
		Nein	53	28,5	65	127	9 - 127	
24h	Ja	32,5	24	71,5	163	8 - 188	1,0000	
	Nein	44,5	22	55	112	13 - 112		

Laborparameter	Zeit	1-JÜ	Median	25%	75%	95%	Bandbreite	p-Wert
CHE	0h	Ja	5,3	3,9	6,6	7,9	0,9 - 8,8	0,0161
		Nein	2,7	2,3	5,2	7,4	1,9 - 7,4	
	3h	Ja	5,4	3,7	6,8	7,2	0,8 - 9,4	0,0166
		Nein	2,6	2,3	5,2	7,8	1,8 - 7,8	
	6h	Ja	5,5	3,9	6,7	7,3	0,9 - 8,8	0,0153
		Nein	2,8	2,2	4,8	7,3	1,8 - 7,3	
	24h	Ja	5,8	4	6,7	7,8	0,9 - 9,7	0,0020
		Nein	2,9	2,3	3,7	7,1	1,9 - 7,1	

Tabelle 18 Mediane, 25., 75. und 95. Perzentile, Bandbreite aller gemessenen Laborparameter mit den dazugehörigen p-Werten in Korrelation zur Ein-Jahresüberlebensrate

	0h	3h	6h	24h
Nukleosomen ELISA Serum	0.8956	0.9913	0.6453	0.2127
Nukleosomen Impact Serum	0.5047	0.3877	0.4588	0.9564
Nukleosomen Impact Plasma	0.3937	0.3698	0.5047	0.3304
AFP	0.0408	0.0321	0.0368	0.0367
CYFRA 21-1	0.0294	0.0015	0.0036	0.0156
LDH	0.0243	0.0074	0.0742	0.8439
CRP	0.1190	0.1213	0.1835	0.3190
GOT	0.1178	0.1930	0.1605	0.8269
GPT	0.8611	0.7844	0.9552	0.3090
GLDH	0.3358	0.3196	0.3514	0.8525
BILI	0.0686	0.1117	0.0681	0.4114
GGT	0.5330	0.5047	0.5078	0.5548
AP	0.1458	0.1055	0.1160	0.0964
Amylase	0.4771	0.3525	0.3176	0.0942
Lipase	0.6303	0.3357	0.4189	10.000
CHE	0.0161	0.0166	0.0153	0.0020

Tabelle 19 p-Werte der einzelnen absoluten Laborwerte im Vergleich zum Ein-Jahresüberleben

In Tabelle 19 sind zur übersichtlicheren Darstellung der p-Werte alle anhand des Wilcoxon-Tests berechneten p-Werte zu den einzelnen Laborwerten dargestellt. In Tabelle 20 sind wie beim Therapieansprechen wiederum die Differenzen und der prozentuale Abfall an den verschiedenen Zeitpunkten abgebildet. Jedoch zeigen die Nukleosomen auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Überlebensgruppen. Lediglich AFP und CRP weisen zu je einem Zeitpunkt eine schwache statistische Signifikanz auf, was grau hinterlegt in der Tabelle zu erkennen ist.

	Differenz			prozentuale Veränderung		
	3h-0	6h-0	24h-0	3h-0%	6h-0%	24h-0%
Nukleosomen ELISA Serum	0.9043	0.9017	0.3874	0.9913	0.9195	0.5223
Nukleosomen Impact Serum	0.9913	0.5296	0.4909	0.8525	0.8311	0.4121
Nukleosomen Impact Plasma	0.4909	0.8269	0.8611	0.9216	0.5921	0.2888
AFP	0.0419	0.4056	0.4837	0.6539	0.8927	0.9913
CYFRA 21-1	0.2161	0.0855	0.2930	0.2885	0.1107	0.5181
LDH	0.5621	0.5668	0.2419	0.4909	0.4935	0.1341
CRP	0.7717	0.6313	0.8869	0.7297	0.4512	0.0311
GOT	0.8351	0.9552	0.1614	0.8697	0.6860	0.0557
GPT	0.6369	10.000	0.1256	0.5045	0.7447	0.1786
GLDH	0.5187	0.7533	0.2046	0.7182	0.5978	0.2290
BILI	0.5681	0.6681	0.5043	0.3629	0.5141	0.0677
GGT	0.6854	0.3453	0.0569	0.7019	0.9017	0.2248
AP	0.5545	0.9195	0.9215	0.7019	0.5223	0.9651
Amylase	0.6145	0.8750	0.4244	0.9738	0.9374	0.1458
Lipase	0.9128	0.5219	0.0919	0.5695	0.8136	0.1285
CHE	0.5920	0.9552	0.0556	0.9564	0.9552	0.3414

Tabelle 20 p-Werte der Differenzen und prozentualen Veränderungen der einzelnen Laborwerte zum prätherapeutischen Wert im Vergleich zum Ein-Jahresüberleben

4.6 Korrelation zwischen den Biomarkern und dem Gesamtüberleben

Neben dem Ein-Jahresüberleben wurde in dieser Studie zusätzlich das Gesamtüberleben separat ausgewertet. Mit Hilfe des Ein-Jahresüberlebens wurde ein definierter Zeitraum untersucht, bei dem entscheidend war, ob der Patient kürzer oder länger als ein Jahr nach der TACE Behandlung lebte. Im Gegensatz dazu wird mittels dem Gesamtüberleben ein längerer Zeitraum beobachtet und der zeitliche Abstand zwischen TACE und dem Tod des Patienten geht exakter in die Auswertung mit ein.

Beim Gesamtüberleben wurden ebenfalls die 48 Patienten mit ihrer ersten erfassten Therapie eingeschlossen. Zum Vergleich zweier Gruppen im Hinblick auf das Gesamtüberleben wurden unterschiedliche Grenzwerte betrachtet und zwar die Mediane und die 75. Perzentile sowie bei der CHE die 25. Perzentile. Dadurch wurde einerseits bewertet, ob einzelne Biomarker bei hohen oder niedrigen Werten eine bessere Aussage ermöglichen und gleichzeitig eine Überanpassung an das vorhandene Kollektiv (z.B. durch einen optimierten Grenzwert) vermeiden.

Dabei zeigten sich mehrere Laborparameter als statistisch signifikant (Tabelle 21) und zwar prätherapeutisch die Mediane von CYFRA 21-1 ($p = 0,098$), LDH ($p = 0,0153$) und CHE ($p = 0,0029$) und die 75. Perzentile von Bilirubin ($p = 0,0019$) und AFP ($p = 0,0037$). Bei den 24 Stundenwerten zeigten Bilirubin und LDH keine ausreichende Signifikanz mehr, dafür war aber der Median der Amylase ($p = 0,0489$) schwach signifikant. Mit einem p-Wert von 0,0003 bzw. 0,0320 waren jeweils CHE und CYFRA 21-1 nach 24 Stunden mit ihrem Median statistisch signifikant. Zusätzlich wurde wiederum die prozentuale Änderung des 24 Stundenwertes im Vergleich zum prätherapeutischen Wert ausgewertet, wobei das Doppelte und das Dreifache des Ausgangswertes betrachtet wurden. Hierbei waren CRP ($p = 0,0175$), Bilirubin ($p = 0,0428$), Amylase ($p = 0,0341$) und Lipase ($p = 0,0279$) signifikant.

	0h		24h		24h-0%	
	Median	75%	Median	75%	2	3
NHS	0,6750	0,6201	0,3331	0,9343	0,6531	0,8707
NIS	0,0676	0,6053	0,6106	0,2629	0,6142	0,8758
NIP	0,4894	0,6813	0,7734	0,8264	0,6312	0,1660
CYFRA 21-1	0,0098	0,2294	0,0320	0,5385	0,2756	0,9503
AFP	0,1156	0,0037	0,1216	0,0009	0,6986	0,7734
LDH	0,0153	0,4921	0,7729	0,4041	0,6546	0,5118
CRP	0,4198	0,0995	0,4655	0,0520	0,0175	0,1633
GOT	0,3821	0,0932	0,3596	0,5205	0,1016	0,4667
GPT	0,8068	0,4880	0,1677	0,3717	0,4145	0,1467
GLDH	0,1618	0,7219	0,4539	0,7981	0,2167	0,9625
Bilirubin	0,1269	0,0019	0,2569	0,2340	0,4153	0,0428
GGT	0,4747	0,2563	0,8376	0,7178	0,1539	0,9996
AP	0,7138	0,2117	0,1197	0,2117	0,6952	0,5975
Amylase	0,4006	0,8122	0,0489	0,6035	0,6217	0,0341
Lipase	0,7586	0,8175	0,3988	0,3658	0,4839	0,0279
CHE	0,0029	0,7741	0,0003	0,1956	0,1724	0,5113

Tabelle 21 p-Werte des Gesamtüberlebens in Korrelation zu den Laborparametern vor Therapie, 24 Stunden nach Therapie und der prozentualen Veränderungen nach 24 Stunden

In Tabelle 22 und Tabelle 23 sind alle Parameter mit den cut-off Werten in der linken Spalte aufgeführt, wobei sich der Median oben und die 75. Perzentile darunter befinden. Statt der 75. Perzentile ist bei der CHE jeweils die 25. Perzentile abgebildet. Des Weiteren ist hier jeweils der prozentuale Anteil der Patienten in der Spalte 1-JÜR aufgeführt, die mehr als ein Jahr nach der ersten erfassten Therapie mit dem jeweiligen Wert überlebten. In der Spalte KI sind die Konfidenzintervalle in Prozent angegeben und in der rechten Spalte befindet sich noch

einmal der p-Wert des Gesamtüberlebens, ermittelt nach dem log-rank Test, wobei signifikante Werte wiederum grau hinterlegt sind. Tabelle 22 beinhaltet die prätherapeutischen Werte und Tabelle 23 die Werte 24 Stunden nach der TACE.

Alle drei Verfahren der Nukleosomenmessung zeigen keine Signifikanz mit dem Gesamtüberleben.

Beim AFP war die 75. Perzentile des prätherapeutischen Wertes signifikant ($p = 0,0037$). 77,1 % der Patienten, deren AFP-Wert unterhalb der 75. Perzentile (46 ng/mL) lag, überlebten länger als ein Jahr, wohingegen bei den Patienten, die oberhalb der 75. Perzentile lagen, nur 38,5 % der Patienten länger als ein Jahr nach Therapie noch lebten.

Ein weiterer signifikanter Parameter war das CYFRA 21-1, wobei hier jeweils die Mediane des prätherapeutischen und 24 Stunden Wertes signifikant waren. So überlebten beispielsweise 83,3 % der Patienten das erste Jahr nach der TACE, die unterhalb des Medians von 1,9 ng/mL lagen, und nur 50 % der Patienten, die oberhalb des Medians lagen.

Das Bilirubin zeigte hier überraschenderweise ebenfalls prätherapeutisch einen signifikanten p-Wert von 0,0019 bei der 75. Perzentile (1,7 mg/dL). Von den Patienten unterhalb dieses Grenzwertes überlebten 75,0 % das erste Jahr nach Therapie und oberhalb dieses Grenzwertes überlebten lediglich 41,7 %.

Die höchsten Signifikanzwerte wurden allerdings mit dem Median der CHE (4,4 kU/L) nach 24 Stunden erreicht ($p = 0,0003$), wobei hier beachtet werden muss, dass sich höhere Werte als prognostisch günstiger erweisen. Von den Patienten unterhalb dieses Medians überlebten 43,5 % das erste Jahr nach der Chemoembolisation und 88,0 % überlebten dieses erste Jahr mit CHE-Werten oberhalb dieses Grenzwertes.

Die weiteren Laborparameter können der Tabelle 22 und der Tabelle 23 entnommen werden.

Laborparameter		n	1-JÜR	KI	p-Wert
NHS (98 ng/mL)	<	24	66,7%	[44,3-81,7]	0,6750
	≥	24	66,7%	[44,3-81,7]	
NHS (202 ng/mL)	<	36	66,7%	[48,8-79,5]	0,6210
	≥	12	66,7%	[33,7-86,0]	

Laborparameter		n	1-JÜR	KI	p-Wert
NIS (92 ng/mL)	<	23	78,3%	[55,4-90,3]	0,0676
	≥	25	56,0%	[34,8-72,7]	
NIS (234 ng/mL)	<	36	66,7%	[48,8-79,5]	0,6053
	≥	12	66,7%	[33,7-86,0]	
NIP (33 ng/mL)	<	24	70,8%	[48,4-84,9]	0,4894
	≥	24	62,5%	[40,3-78,4]	
NIP (136 ng/mL)	<	35	62,9%	[44,8-76,5]	0,6813
	≥	13	76,9%	[44,2-91,9]	
CYFRA 21-1 (1,9 ng/mL)	<	24	83,3%	[61,5-93,4]	0,0098
	≥	24	50,0%	[29,1-67,8]	
CYFRA 21-1 (2,5 ng/mL)	<	35	68,6%	[50,5-81,2]	0,2294
	≥	13	61,5%	[30,8-81,8]	
AFP (5,6 ng/mL)	<	23	78,3%	[55,4-90,3]	0,1156
	≥	25	56,0%	[34,8-72,7]	
AFP (46 ng/mL)	<	35	77,1%	[59,5-87,9]	0,0037
	≥	13	38,5%	[14,1-62,8]	
LDH (202 U/L)	<	25	84,0%	[62,8-93,7]	0,0153
	≥	23	47,8%	[26,8-66,1]	
LDH (243 U/L)	<	36	69,4%	[51,7-81,8]	0,4921
	≥	12	58,3%	[27,0-80,1]	
CRP (0,5 mg/dL)	<	23	69,6%	[46,6-84,2]	0,4198
	≥	25	64,0%	[42,2-79,4]	
CRP (1,2 mg/dL)	<	34	70,6%	[52,2-83,0]	0,0995
	≥	14	57,1%	[28,4-78,0]	
GOT (55 U/L)	<	24	70,8%	[48,4-84,9]	0,3821
	≥	24	62,5%	[40,3-78,4]	
GOT (72 U/L)	<	36	72,2%	[54,5-84,0]	0,0932
	≥	12	50,0%	[20,8-73,6]	
GPT (37 U/L)	<	24	66,7%	[44,3-81,7]	0,8068
	≥	24	66,7%	[44,3-81,7]	
GPT (57 U/L)	<	36	63,9%	[46,1-77,2]	0,4880
	≥	12	75,0%	[40,8-91,2]	
GLDH (6,9 U/L)	<	24	75,0%	[52,6-87,9]	0,1618
	≥	24	58,3%	[36,4-75,0]	
GLDH (9,4 U/L)	<	36	66,7%	[48,8-79,5]	0,7219
	≥	12	66,7%	[33,7-86,0]	
Bilirubin (0,9 mg/dL)	<	22	77,3%	[53,7-89,8]	0,1269
	≥	26	57,7%	[36,8-73,9]	
Bilirubin (1,7 mg/dL)	<	36	75,0%	[57,5-86,1]	0,0019
	≥	12	41,7%	[15,2-66,5]	

Laborparameter		n	1-JÜR	KI	p-Wert
GGT (152 U/L)	<	24	62,5%	[40,3-78,4]	0,4747
	≥	24	70,8%	[48,4-84,9]	
GGT (263 U/L)	<	35	71,4%	[53,4-83,5]	0,2563
	≥	13	53,8%	[24,8-76,0]	
AP (135 U/L)	<	24	66,7%	[44,3-81,7]	0,7138
	≥	24	66,7%	[44,3-81,7]	
AP (180 U/L)	<	35	71,4%	[53,4-83,5]	0,2117
	≥	13	53,8%	[24,8-76,0]	
Amylase (73 U/L)	<	25	60,0%	[38,4-76,1]	0,4006
	≥	23	73,9%	[50,9-87,3]	
Amylase (108 U/L)	<	35	65,7%	[47,6-78,9]	0,8122
	≥	13	69,2%	[37,3-87,2]	
Lipase (42 U/L)	<	24	70,8%	[48,4-84,9]	0,7586
	≥	24	62,5%	[40,3-78,4]	
Lipase (76 U/L)	<	35	65,7%	[47,6-78,9]	0,8175
	≥	13	69,2%	[37,3-87,2]	
CHE (4,3 kU/L)	<	23	47,8%	[26,8-66,1]	0,0029
	≥	25	84,0%	[62,8-93,7]	
CHE (2,65 kU/L)	<	11	27,3%	[6,5-53,9]	0,0002
	≥	37	75,7%	[61,4-88,5]	

Tabelle 22 Prozentualer Anteil der Ein-Jahresüberlebenden mit verschiedenen cut-offs prätherapeutisch. Oben ist der Median, unten die 75. Perzentile der jeweiligen Parameter (Ausnahme CHE mit 25. Perzentile) und in der rechten Spalte der p-Wert

Laborparameter		n	1-JÜR	KI	p-Wert
NHS (121 ng/mL)	<	23	56,5%	[34,3-73,8]	0,3331
	≥	24	75,0%	[52,6-87,9]	
NHS (321 ng/mL)	<	35	62,9%	[44,8-76,5]	0,9343
	≥	12	75,0%	[40,8-91,2]	
NIS (109 ng/mL)	<	24	66,7%	[44,3-81,7]	0,6106
	≥	24	66,7%	[44,3-81,7]	
NIS (285 ng/mL)	<	35	68,6%	[50,5-81,2]	0,2629
	≥	13	61,5%	[30,8-81,8]	
NIP (33 ng/mL)	<	24	70,8%	[48,4-84,9]	0,7734
	≥	24	62,5%	[40,3-78,4]	
NIP (162 ng/mL)	<	35	65,7%	[47,6-78,9]	0,8264
	≥	13	69,2%	[37,3-87,2]	
CYFRA 21-1 (2,1 ng/mL)	<	23	82,6%	[60,1-93,1]	0,0320
	≥	25	52,0%	[31,2-69,2]	
CYFRA 21-1 (3 ng/mL)	<	35	68,6%	[50,5-81,2]	0,5385
	≥	13	61,5%	[30,8-81,8]	

Laborparameter		n	1-JÜR	KI	p-Wert
AFP (5,3 ng/mL)	<	23	78,3%	[55,4-90,3]	0,1216
	≥	25	56,0%	[34,8-72,7]	
AFP (47 ng/mL)	<	36	77,8%	[60,4-88,2]	0,0009
	≥	12	33,3%	[10,3-58,8]	
LDH (266 U/L)	<	23	69,6%	[46,6-84,2]	0,7729
	≥	25	64,0%	[42,2-79,4]	
LDH (343 U/L)	<	35	62,9%	[44,8-76,5]	0,4041
	≥	13	76,9%	[44,2-91,9]	
CRP (1,3 mg/dL)	<	22	68,2%	[44,6-83,4]	0,4655
	≥	26	65,4%	[44,0-80,3]	
CRP (2,6 mg/dL)	<	35	71,4%	[53,4-83,5]	0,0520
	≥	13	53,8%	[24,8-76,0]	
GOT (91 U/L)	<	23	69,6%	[46,6-84,2]	0,3596
	≥	25	64,0%	[42,2-79,4]	
GOT (220 U/L)	<	35	68,6%	[50,5-81,2]	0,5205
	≥	13	61,5%	[30,8-81,8]	
GPT (61 U/L)	<	24	54,2%	[32,7-71,4]	0,1677
	≥	24	79,2%	[57,0-90,8]	
GPT (91 U/L)	<	35	62,9%	[44,8-76,5]	0,3717
	≥	13	76,9%	[44,2-91,9]	
GLDH (15 U/L)	<	23	69,6%	[46,6-84,2]	0,4539
	≥	25	64,0%	[42,2-79,4]	
GLDH (29 U/L)	<	29	62,1%	[42,1-76,9]	0,7981
	≥	19	73,7%	[47,9-88,1]	
Bilirubin (1,6 mg/dL)	<	25	72,0%	[50,1-85,8]	0,2569
	≥	23	60,9%	[38,3-77,4]	
Bilirubin (2,3 mg/dL)	<	36	69,4%	[51,7-81,8]	0,2340
	≥	12	58,3%	[27,0-80,1]	
GGT (172 U/L)	<	24	66,7%	[44,3-81,7]	0,8376
	≥	24	66,7%	[44,3-81,7]	
GGT (274 U/L)	<	35	68,6%	[50,5-81,2]	0,7178
	≥	13	61,5%	[30,8-81,8]	
AP (126 U/L)	<	24	75,0%	[52,6-87,9]	0,1197
	≥	24	58,3%	[36,4-75,0]	
AP (163 U/L)	<	35	71,4%	[53,4-83,5]	0,2117
	≥	13	53,8%	[24,8-76,0]	
Amylase (69 U/L)	<	23	52,2%	[30,5-70,0]	0,0489
	≥	25	80,0%	[58,4-91,1]	
Amylase (105 U/L)	<	35	62,9%	[44,8-76,5]	0,6035
	≥	13	76,9%	[44,2-91,9]	

Laborparameter		n	1-JÜR	KI	p-Wert
Lipase (37 U/L)	<	24	75,0%	[52,6-87,9]	0,3988
	≥	24	58,3%	[36,4-75,0]	
Lipase (63 U/L)	<	35	62,9%	[44,8-76,5]	0,3658
	≥	13	76,9%	[44,2-91,9]	
CHE (4,4 kU/L)	<	23	43,5%	[23,3-62,1]	0,0003
	≥	25	88,0%	[67,3-96,0]	
CHE (2,8 kU/L)	<	12	33,3%	[10,3-58,8]	0,0005
	≥	36	75,0%	[60,4-88,2]	

Tabelle 23 Prozentualer Anteil der Ein-Jahresüberlebenden mit verschiedenen cut-offs 24 Stunden nach Therapie. Oben ist der Median, unten die 75. Perzentile der jeweiligen Parameter (Ausnahme CHE mit 25. Perzentile) und in der rechten Spalte der p-Wert

In Abbildung 73 bis Abbildung 82 sind für einige Laborparameter die Kaplan-Meier-Überlebenskurven abgebildet. Hierfür wurden jeweils die Mediane oder in einzelnen Fällen die 25. (CHE) oder 75. Perzentile (AFP) als cut-off verwendet.

Bei den manuell bestimmten Nukleosomen besteht kein signifikanter Zusammenhang zum Gesamtüberleben (Abbildung 74).

Für das AFP hingegen sieht man einen Unterschied beim Verlauf der beiden Gruppen (Abbildung 75 und Abbildung 76). Die Patienten mit einem sowohl prätherapeutisch als auch nach 24 Stunden höheren AFP-Wert haben eine schlechtere Prognose, was am niedrigeren Verlauf ihrer Kurve deutlich wird.

Die Überlebenskurve zum CYFRA 21-1 in Abbildung 77 und Abbildung 78 zeigen ebenfalls einen deutlichen Unterschied der beiden Gruppen. Prä- und posttherapeutisch haben Patienten mit einem höheren CYFRA 21-1-Wert als der Median ein schlechtere Prognose. Zu diesen beiden Zeitpunkte waren die Unterschiede signifikant ($p = 0,0098$ und $p = 0,0320$).

Beim Entzündungsparameter CRP wurden prä- und posttherapeutisch keine Unterschiede hinsichtlich des Überlebens festgestellt (Abbildung 79 und Abbildung 80).

In der nächsten Abbildung 81 ist die Überlebenskurve für den Zelltodparameter LDH mit dem Median als Entscheidungskriterium abgebildet. Die Überlebenskurve der Patienten mit höheren Werten verläuft deutlich unterhalb der Kurve der Patienten mit niedrigeren Werten, was mit einem p-Wert von 0,0153 auch statistisch signifikant ist.

Die höchste Signifikanz im Hinblick auf das Gesamtüberleben erzielte jedoch der Lebersynthesemarker CHE im Median mit einem prätherapeutischen p-Wert von 0,0029 und einem posttherapeutischen p-Wert von 0,0003. Wählt man jedoch die 25. Perzentile als Grenzwert, so wird der Unterschied noch deutlicher. Eine klare Divergenz der beiden Gruppen ist sichtbar (Abbildung 82).

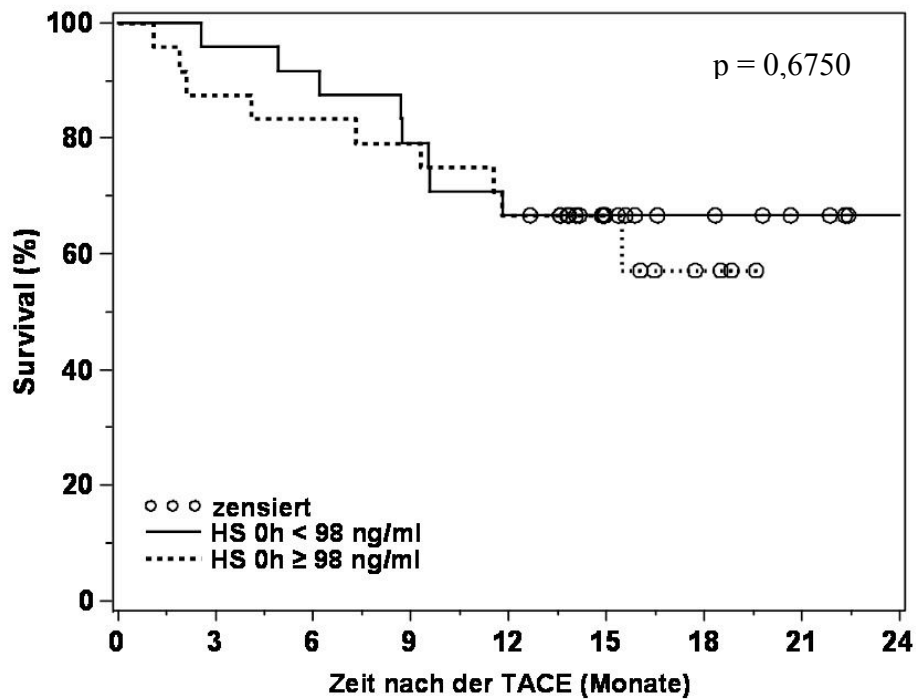


Abbildung 73 Kaplan-Meier-Kurve der manuell (ELISA) bestimmten prätherapeutischen Nukleosomen

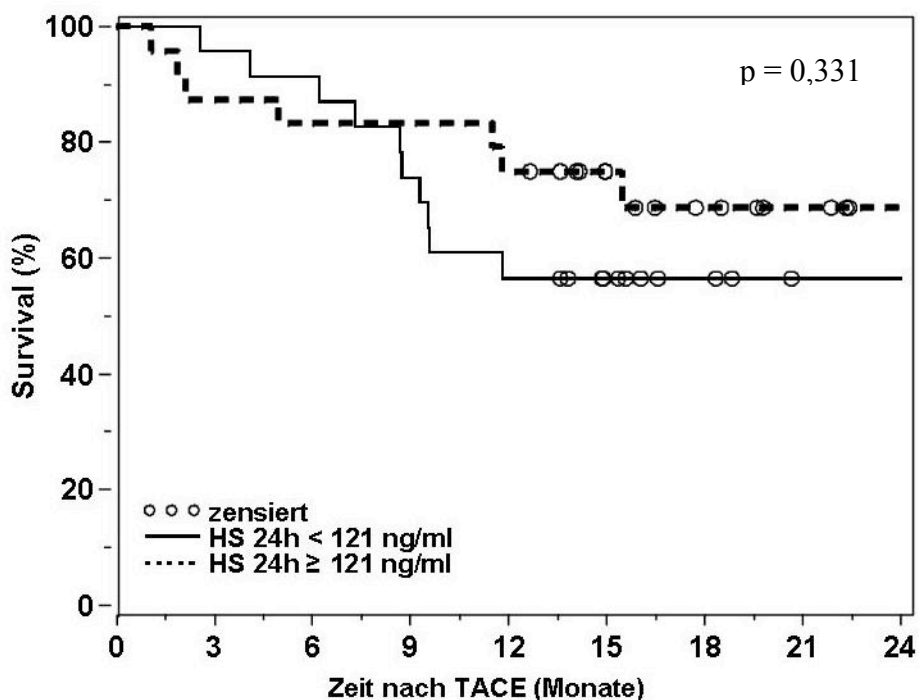


Abbildung 74 Kaplan-Meier-Kurve der manuell (ELISA) bestimmten Nukleosomen nach 24 Stunden

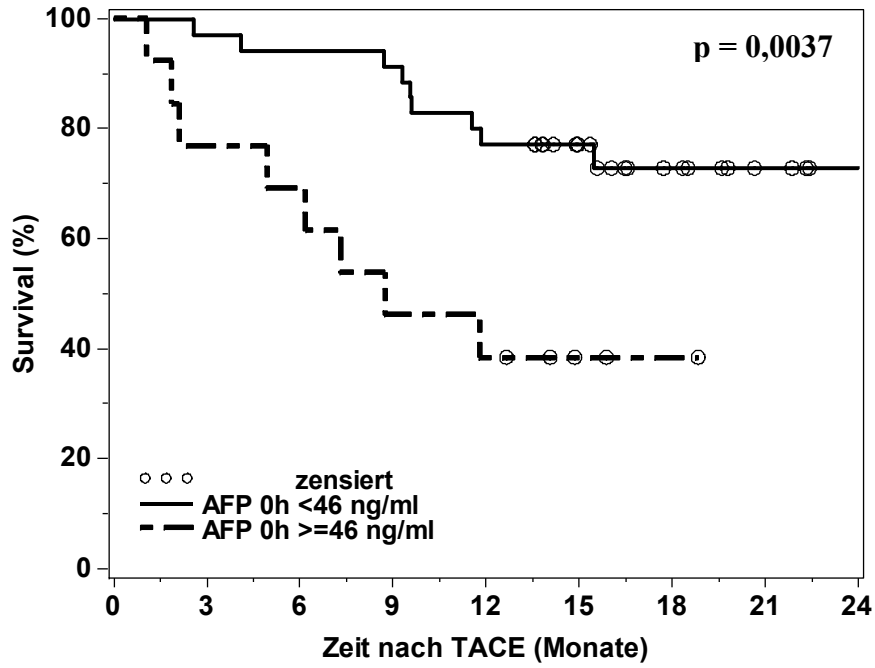


Abbildung 75 Kaplan-Meier-Kurve des prätherapeutischen AFP

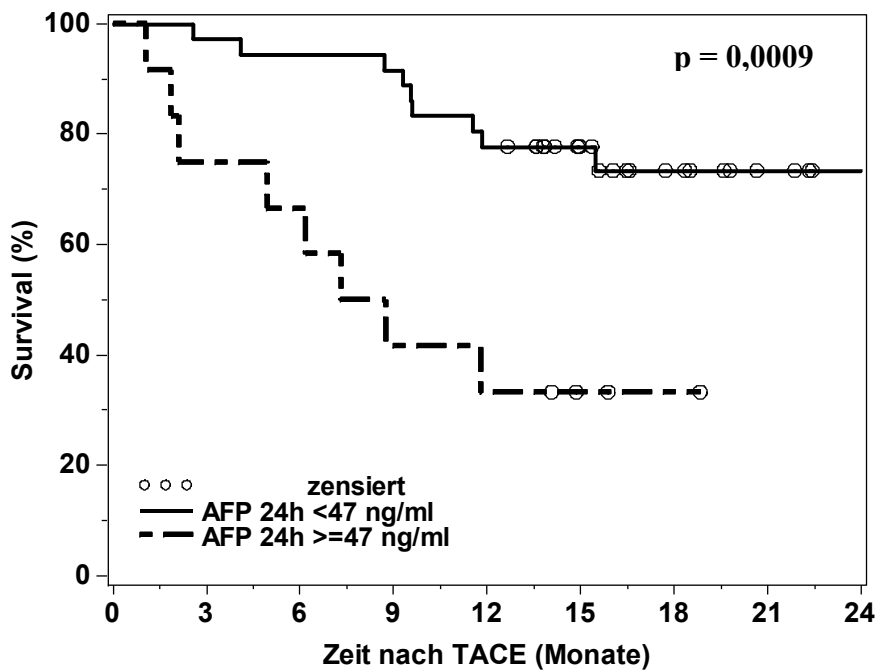


Abbildung 76 Kaplan-Meier-Kurve des AFP nach 24 Stunden

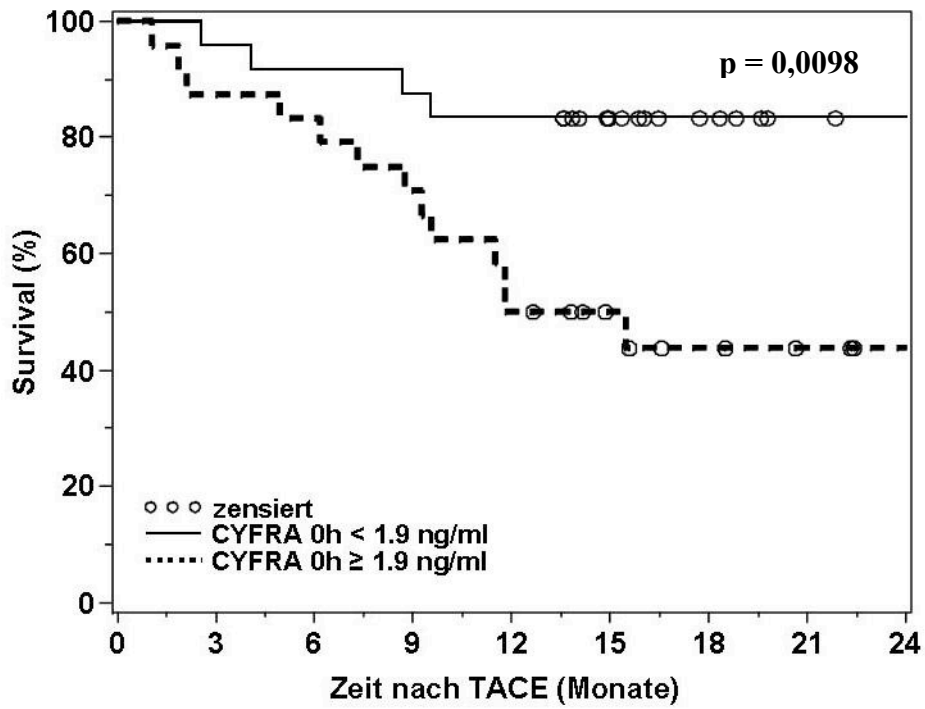


Abbildung 77 Kaplan-Meier-Kurve des prätherapeutischen CYFRA 21-1

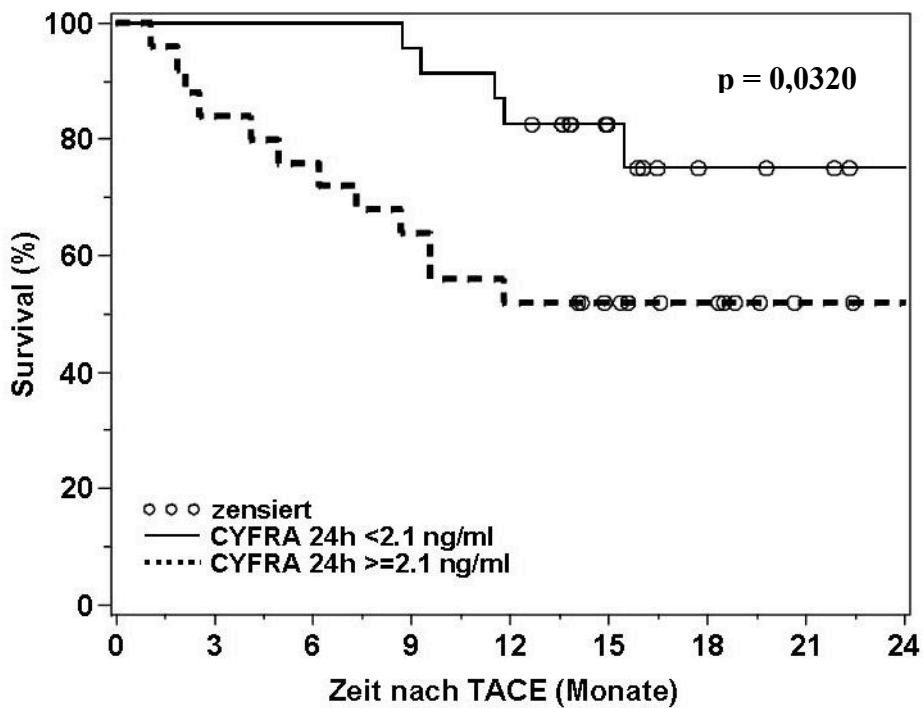


Abbildung 78 Kaplan-Meier-Kurve des CYFRA 21-1 nach 24 Stunden

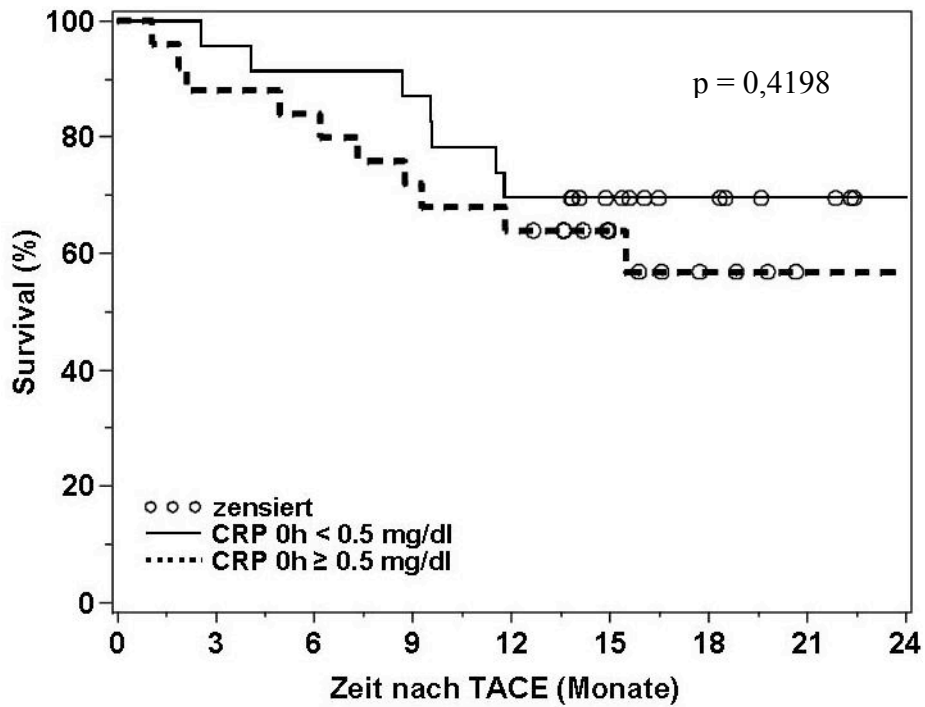


Abbildung 79 Kaplan-Meier-Kurve des prätherapeutischen CRP

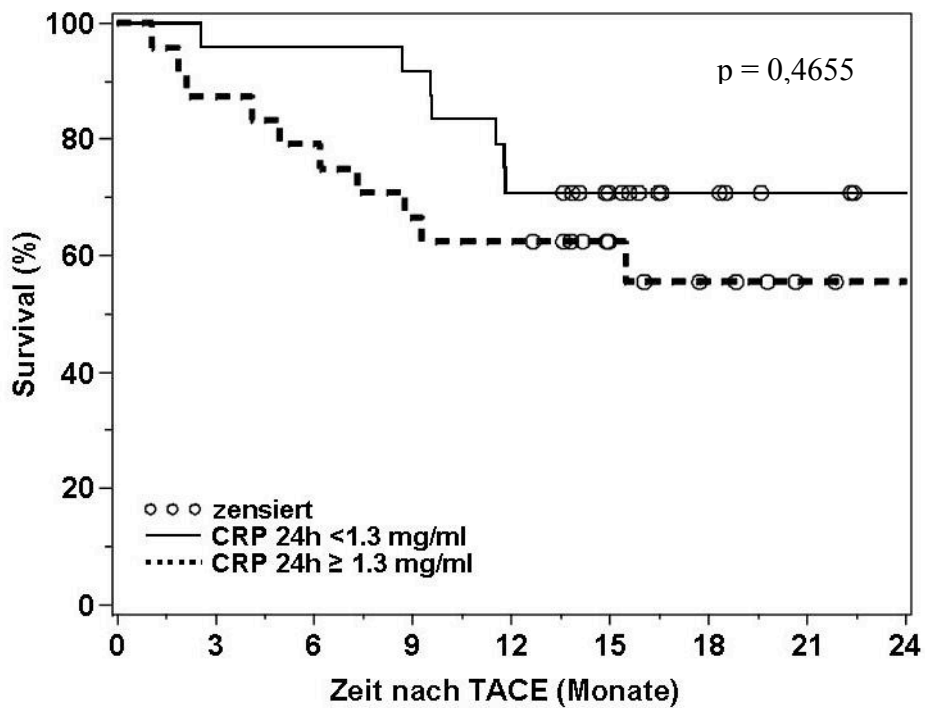


Abbildung 80 Kaplan-Meier-Kurve des CRP nach 24 Stunden

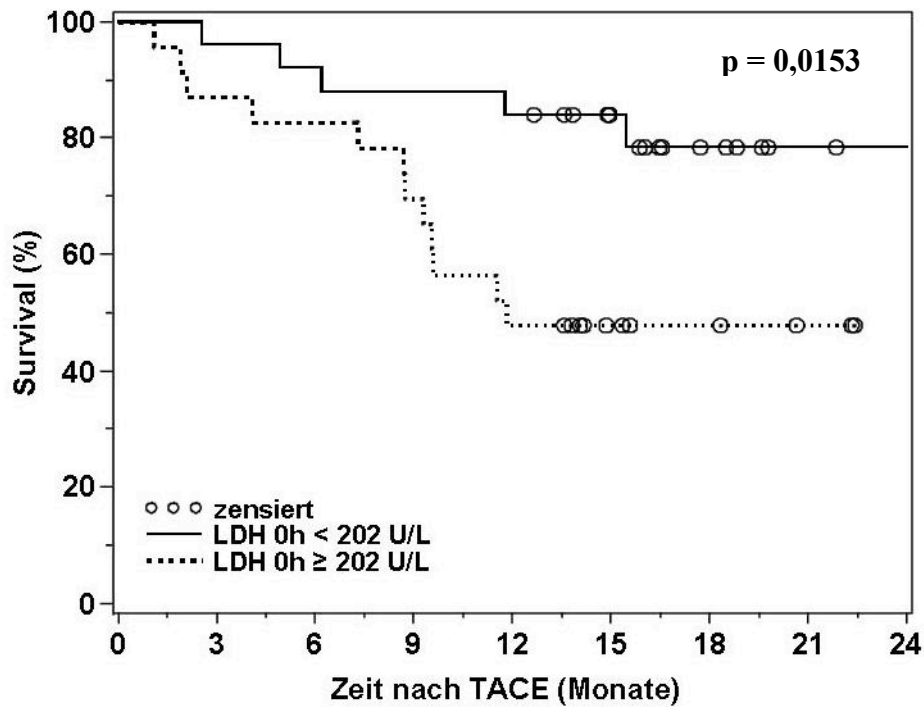


Abbildung 81 Kaplan-Meier-Kurve des prätherapeutischen LDH

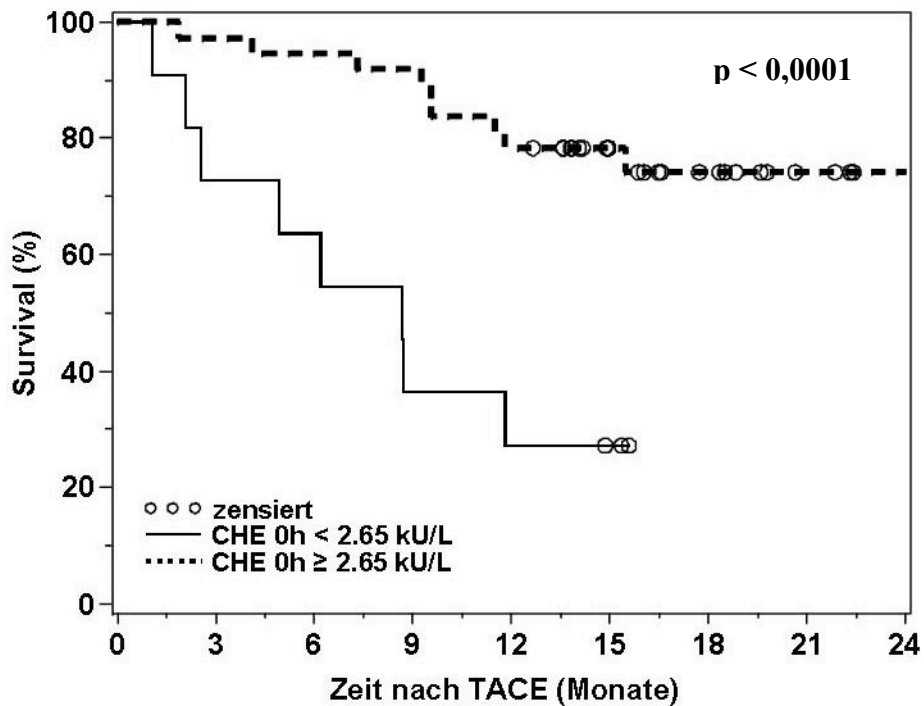


Abbildung 82 Kaplan-Meier-Kurve des prätherapeutischen CHE

Bei der Auswertung zum Gesamtüberleben zeigte die Einteilung nach dem T-Stadium keine signifikanten Unterschiede. Betrachtet man die einzelnen Stadien getrennt voneinander, so ergibt sich dabei ein p-Wert von 0,064. In der Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 83 wird deutlich, dass die wenigen Patienten in Stadium T2 alle überlebt haben und somit diese Kurve

oberhalb der Kurve der Patienten im Stadium T1 verläuft. Aber es wird auch ersichtlich, dass ein deutlicher Unterschied zur Gruppe der Patienten im Stadium T3 besteht.

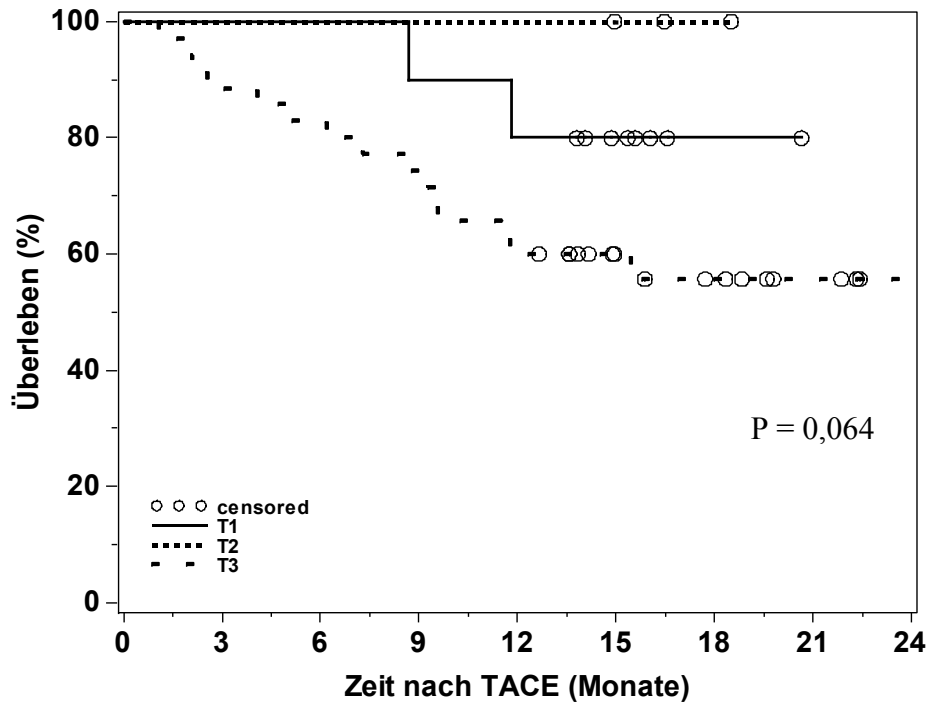


Abbildung 83 Kaplan-Meier-Kurve der T-Stadien

4.7 Multivariate Analyse

Um aus der Vielzahl der positiven Ergebnisse in den univariaten Analysen die relevanten Marker herauszufinden, die eine voneinander unabhängige prognostische Aussagekraft haben, führten wir eine multivariate Analyse mittels einer Cox Regressions-Analyse durch. In die Analyse gingen alle Laborparameter ein, die in den univariaten Untersuchungen ein signifikantes Ergebnis erzielten, und das T-Stadium. Dabei wurden bei den Laborparametern jeweils die Mediane und die 75. Perzentile der prätherapeutischen und 24 Stunden Werte ausgewertet. Bei der CHE wurde statt der 75. Perzentile die 25. Perzentile verwendet.

Nach dem Ausschlussverfahren wurden schrittweise diejenigen Laborparameter aus dem Modell entfernt, die nicht signifikant waren und zu keiner Verbesserung des Gesamtmodells beitrugen.

Insgesamt wurden zwei Modelle berechnet: Eines für alle Laborparameter und klinischen Faktoren, die schon vor Beginn der TACE-Therapie zur Verfügung standen. Dadurch sollte bereits vor der Therapie besser abzuschätzen sein, wie die Prognose des Patienten ist und ob eine TACE-Therapie sinnvoll ist. Ein weiteres Modell wurde für alle Laborparameter und klinischen Faktoren berechnet, die vor Beginn der TACE-Therapie und einen Tag danach (24h-Werte) vorhanden waren. Dadurch sollte der Einfluss der TACE-Therapie auf die Veränderung der Marker mit untersucht werden. Dieses Modell wäre dann nicht mehr für die Stratifizierung von Patienten für die TACE-Therapie, wohl aber für eine eventuelle zusätzliche Therapie oder eine Therapiemodifikation im weiteren Verlauf geeignet.

Im ersten multivariaten Modell, welches nur prätherapeutische Variablen berücksichtigt, blieben letztendlich nur zwei unabhängige prognostische Marker übrig:

- T-Stadium (T3 gegen T1 und T2)
- CHE (0 Stunden; 25. Perzentile)

Im zweiten multivariaten Modell, welches zusätzlich auch die 24h-Werte berücksichtigt, blieben insgesamt vier unabhängige prognostische Marker übrig:

- T-Stadium (T3 gegen T1 und T2)
- CHE (0 Stunden; 25. Perzentile)
- CYFRA 21-1 (24 Stunden; Median)
- LDH (0 Stunden; Median)

In Tabelle 24 und Tabelle 25 sind diese beiden Modelle mit Parameter Estimate, Chi-Square, p-Wert, Hazard Ratio, dem 95%-Konfidenzintervall und dem Akaike's Informations Kriterium (AIC) abgebildet. Parameter Estimate, Chi-Square, p-Wert und Hazard Ratio sind dabei ein Maß, wie stark der einzelne Parameter zum gesamten Modell beiträgt. Der AIC ist ein Maß für die Stärke des gesamten Modells. Je niedriger er ist, desto stärker ist die prognostische Aussagefähigkeit eines Modells. An den beiden Modellen lässt sich sehen, dass die zweite Version mit den 24h-Werten prognostisch etwas aussagekräftiger ist.

	Koeffizient	Chi-Square	P-Value	Hazard-Ratio	95%-Konf. Intervall	AIC
T3 gegen T1+T2	2,877	10,4	0,0012	17,8	3.1-101.9	102.8
CHE (0h; 25. Perzentile)	3,118	21,2	<0,0001	22,6	6.0-85.2	

Tabelle 24 Modell 1 mit ausschließlich prätherapeutischen Parametern

	Parameter Estimate	Chi-Square	p-Wert	Hazard-Ratio	95%-Konf. Intervall	AIC
T3 gegen T1+T2	3,881	15,3	<0,0001	48,5	7.0-337.9	96.8
CHE (0h; 25. Perzentile)	3,142	19,5	<0,0001	23,1	5.7-93.3	
CYFRA 21-1 (24h; Median)	1,183	4,1	0,0421	3,3	1.0-10.2	
LDH (0h; Median)	1,302	5,2	0,0219	3,7	1.2-11.2	

Tabelle 25 Modell 2 einschließlich prätherapeutischer und posttherapeutischer Parameter

Um die Ergebnisse noch anschaulicher und einfacher für die praktische Anwendung zu machen, wurde das erste Modell mit den beiden prätherapeutischen Markern T-Stadium und CHE zusätzlich mittels einer Mantel-Haenszel-Analyse ausgewertet. Hierfür wurde nun nicht mehr das Gesamtüberleben sondern das Ein-Jahresüberleben als Endpunkt herangezogen und alle Möglichkeiten der erhöhten und erniedrigten Einzelmarker detailliert in einer Mehrfeldertafel dargestellt.

Wie aus der untenstehenden Tabelle 26 ersichtlich ist, überlebten alle Patienten im Stadium T1 oder T2 mit einem nicht erniedrigten CHE-Wert das erste Jahr nach TACE-Therapie. Hingegen starben alle Patienten im Stadium T3 mit einem erniedrigten CHE-Wert im ersten Jahr nach TACE-Therapie. Somit hatten Patienten im Stadium T3 mit einem erniedrigten CHE-Wert ein 3,6 faches Risiko, im ersten Jahr nach TACE zu versterben, als Patienten im Stadium T3, die keinen erniedrigten CHE-Wert aufwiesen. Für Patienten mit einem T1 oder T2-Stadium HCC konnte kein relatives Risiko für das Versterben innerhalb des ersten Jahres nach TACE berechnet werden, da kein Patient mit einem nicht erniedrigten CHE-Wert in dieser Zeit verstarb. Mit einem p-Wert von $P=0.0002$ war die Mantel-Haenszel-Statistik hochsignifikant.

	CHE 25.Perzentile	Überlebt		Verstorben		Relatives Risiko	p-Wert
		N	%	N	%		
T1+T2	≥ 2,65 U/L	8	100	0	0,0	nicht möglich	0,052
	< 2,65 U/L	3	60,0	2	40,0		
T3	≥ 2,65 U/L	21	72,0	8	28,0	3,62	0,001
	< 2,65 U/L	0	0,0	6	100		

Tabelle 26 Mantel-Haenszel-Statistik der stärksten prädiktiven Faktoren.

5 Diskussion

Das hepatozelluläre Karzinom ist mit weltweit ungefähr 500.000 neuen Fällen pro Jahr die fünfthäufigste Ursache für eine maligne Erkrankung [MacSween 2002]. Da die meisten HCC aufgrund ihrer sehr späten Symptomatik erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden, kann die Mehrzahl der Patienten nicht in kurativer Absicht therapiert werden. Durch palliative Therapieansätze kann zwar eine Verlängerung des Überlebens der Patienten erreicht werden, trotzdem steht das hepatozelluläre Karzinom an dritter Stelle bei den krebisbedingten Todesursachen. Jedoch konnte durch die Einführung geeigneter Screening Programme bei Patienten mit bekannten Risikofaktoren, wie einer Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus, eine Diagnose des HCC in früheren Stadien erzielt werden [Ikai 2004].

Die transarterielle Chemoembolisation ist das am häufigsten genutzte Therapieverfahren bei Patienten, die einer kurativen Therapie, wie beispielsweise einer Resektion oder Lebertransplantation, nicht mehr zugänglich sind. In mehreren Studien konnte hier ein Überlebensvorteil gegenüber einer „best supportive care“ nachgewiesen werden [Llovet 2002; Bruix 2004]. Bei einer TACE wird durch die lokoregionäre Gabe des Chemotherapeutikums und der anschließenden Okklusion der Gefäße eine starke Wirkung im Tumor erzielt und gleichzeitig das umliegende Gewebe geschont. Aufgrund der regionalen Applikation kommt es seltener zu Nebenwirkungen als bei systemischer Gabe. Trotzdem entwickeln etwa 60-80% der Patienten nach einer TACE ein Postembolisationssyndrom mit Bauchschmerz, Ileus und Fieber. Zudem sterben ungefähr 4% der Patienten nach einer TACE [Bruix 2004]. Um solche Nebeneffekte einer TACE zu vermeiden, werden prädiktive und prognostische Marker benötigt, die frühzeitig anzeigen, ob eine TACE erfolgreich sein wird oder besser auf eine andere Therapie gewechselt werden sollte. Im Verlaufe der letzten Jahre wurden neue Therapien entwickelt, wie beispielsweise die SIRT oder die systemische Chemotherapie mit Sorafenib, auf die bei ungünstigem Therapieansprechen nach TACE zurückgegriffen werden kann. Außerdem könnte durch geeignete prätherapeutische Werte schon vor der ersten TACE-Therapie der Nutzen einer solchen Therapie diskutiert werden. Wie notwendig solche Marker sind, wird deutlich, wenn man den derzeitigen Stand einer Therapiebeurteilung betrachtet. Das Ansprechen der Therapie wird mit bildgebenden Verfahren, wie CT oder MRT, kontrolliert. Allerdings vergehen meist viele Wochen bis Monate, bis die Therapieeffizienz mit Hilfe der bildgebenden Verfahren abgeschätzt werden kann. Zusätzlich wird durch die Behandlung Lipiodol im Tumorgewebe gespeichert. Da Lipiodol im CT hyperdens zur Darstellung kommt, wird die objektive Beurteilung der aktuellen Tumorgöße erschwert. Auf

der anderen Seite ist im MRT die Lipidolspeicherung nicht so gut zu erkennen. Daher ist keines der beiden bildgebenden Verfahren optimal zur Therapieevaluation nach einer TACE geeignet. Zudem ist die bildgebende Diagnostik oft nicht standardisiert: Sie ist stark abhängig von verschiedenen Techniken, variiert deutlich zwischen unterschiedlichen Begutachtern und deren Erfahrungsgrad [Vogl 2002]. Ein einfach durchzuführender, günstiger Labortest, der früher als die bildgebenden Verfahren den Erfolg einer transarteriellen Chemoembolisation anzeigen könnte, wäre höchst wünschenswert. Zudem könnte man durch geeignete Prognosemarker die Überlebenschancen der Patienten bestimmen.

Wirkmechanismus der transarteriellen Chemoembolisation

Bei einer transarteriellen Chemoembolisation wird das Chemotherapeutikum direkt in die Leber injiziert und anschließend wird die verwendete Arterie okkludiert. Die Okklusion der Arterie ist möglich, da die Blutversorgung der Leber hauptsächlich aus der Pfortader stammt, wohingegen der Tumor meist aus der Leberarterie versorgt wird. Dadurch ergeben sich zwei Vorteile: Es können höhere Dosen des Chemotherapeutikums in den Tumor injiziert werden, da das Chemotherapeutikum nicht in die Blutzirkulation gelangt, und zusätzlich wird durch die Okklusion eine längere Kontaktzeit des Chemotherapeutikums mit dem Tumorgewebe erreicht [Bruix 2004, Vogl 2009].

Jedoch zeigen sich bei einer transarteriellen Chemoembolisation, wie auch bei anderen Chemotherapien, Unterschiede im Therapieansprechen des Tumors. Einige Patienten profitieren von einer solchen Therapie, andere Patienten hingegen sprechen kaum oder gar nicht darauf an.

Nach Injektion des Chemotherapeutikums induziert dieses im Tumorgewebe, aber auch im umliegenden Lebergewebe, den apoptotischen und nekrotischen Zelltod [Lu 2008]. Als Chemotherapeutika sind Doxorubicin und Cisplatin am weitesten verbreitet [Bruix 2004]. Im Universitätsklinikum München-Großhadern wird vor allem das Anthrazyklin Epirubicin verwendet, da es weniger kardiotoxisch wirkt als Doxorubicin [Ozkan 2004]. Die beiden Anthrazykline Doxorubicin und Epirubicin erzielen ihre letale Wirkung einerseits über die Freisetzung freier Radikale, welche zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt. Die ROS binden an intrazelluläre Komponenten und zerstören die gebundenen Zellbestandteile. Andererseits binden sich die Anthrazykline an die Topoisomerase II und produzieren somit vermehrt Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA [Ozkan 2004]. Dagegen induziert Cisplatin die Apoptose vor allem durch Aktivierung des CD95/Fas/Apo-1

Systems und über Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien. Im Folgenden kommt es zu einer Hemmung der DNA-Replikation durch Querverknüpfungen zwischen den beiden DNA-Strängen, die dadurch funktionsunfähig werden. Der Zellstoffwechsel kommt zum Erliegen und die Zelle leitet die Apoptose ein [Friesen 1999].

Um das unterschiedliche Therapieansprechen von Patienten in gleichen Tumorentitäten besser beurteilen zu können, müssen Veränderungen auf zellulärer Ebene genauer betrachtet werden. Beim hepatozellulären Karzinom können Tumorsuppressorgene wie p53 inhibiert sein und Tumoronkogene wie NF- κ B überexprimiert sein [Fabregat 2009]. Diese Proteine regulieren Zellzyklus, Proliferation und Apoptose. Durch Mutationen von Proteinen des Apoptosepfades im Verlaufe der Tumorgenese kann es zu einer Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika kommen [Fabregat 2009].

Die individuellen Unterschiede in der Therapie auf molekularer Ebene beginnt man erst seit wenigen Jahren zu verstehen. Dies ermöglicht in Zukunft die Perspektive, molekulare Analysen vor Gabe einer Chemotherapie durchzuführen und die Therapie auf diesem Wege zu optimieren. Ein erstes erfolgreiches Medikament der molekularen Therapie war Sorafenib, weitere Medikamente, wie Sunitinib, Erlotinib in Kombination mit Bevacizumab und mTOR Inhibitoren werden in weiteren Studien auf ihre Wirksamkeit überprüft [Wörns 2010]. Umso wichtiger ist es daher, in jedem individuellen Fall die Effektivität der Therapie zuverlässig und frühzeitig abschätzen zu können.

Wahl des Patientenkollektivs

In dieser Arbeit wurden 50 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom in eine prospektive Studie aufgenommen. Den Antrag zu dieser Studie hatte die Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilian-Universität München zuvor bewertet und genehmigt. Während der gesamten Behandlungsdauer wurden diese Patienten intensiv durch mich betreut, was zu einer ausgezeichneten Compliance fast aller Patienten führte. Die Sammlung der Blutproben der verschiedenen Studienteilnehmer an den vier verschiedenen Zeitpunkten ist zu den vorgegebenen Zeiten erfolgt und bis auf eine Ausnahme vollständig. Ein Merkmal dieser klinischen Studie zeigt sich dadurch, dass einzig Patienten ausgeschlossen wurden, die eine Studienteilnahme ablehnten oder bei denen ein Zweitumor diagnostiziert wurde. Des Weiteren verfügt diese Studie über eine komplette klinische Dokumentation der teilnehmenden Patienten. Nur in sehr seltenen Fällen verweigerten Patienten ihre Teilnahme

an der Studie bzw. waren bei einer ihrer darauffolgenden Therapien nicht bereit, wieder daran teilzunehmen.

In dieser Studie wurden nicht nur Patienten mit ihrer ersten TACE sondern auch Patienten mit einer fortgeschrittenen Anzahl an TACE-Therapien berücksichtigt, um den klinischen Alltag möglichst genau abzubilden. Denn vor der Gabe einer TACE muss jeweils neu entschieden werden, ob aufgrund der klinischen Situation eine erneute TACE sinnvoll erscheint.

Alle Studienteilnehmer erhielten im Universitätsklinikum Großhadern eine transarterielle Chemoembolisation und konnten bei komplikationslosem Verlauf das Klinikum am nächsten Tag bereits verlassen. Aufgrund dieser Tatsache war es leider nicht möglich, einen längeren Beobachtungszeitraum beurteilen zu können. Da die Nukleosomenfreisetzung bei früheren Studien auch nach 48 Stunden deutlich erhöht war und erst nach etwa einer Woche wieder die prätherapeutischen Werte erreichte, wäre es interessant gewesen, den weiteren Verlauf der Nukleosomen über die erste Woche nach der TACE zu evaluieren. Zudem hätte man dann auch den Einfluss von Nebenwirkungen **auf die Nukleosomenfreisetzung beobachten können**.

Der Vorteil der in dieser Studie untersuchten Patientengruppen liegt in der großen Homogenität der Kollektive und ihrer Therapie. Lediglich wenige Patienten erhielten zusätzlich eine RFA oder erhielten nach ihrer TACE-Behandlung eine Lebertransplantation.

Präanalytische Vorgehensweise während der prospektiven Studie

In dieser prospektiven Studie wurde besonderer Wert auf eine sorgfältige Erhebung der klinischen Daten und auf ein akkurates präanalytisches Vorgehen gelegt. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Blutentnahmen im normalen klinischen Ablauf vorgenommen werden konnten. Nach Möglichkeit wurden sie mit anfallenden Routineabnahmen kombiniert. Alle abgenommenen Serum- und Plasmaproben wurden standardisiert weiterverarbeitet. In vielen klinischen Studien wird ein standardisiertes Vorgehen als wenig relevant betrachtet, obwohl es eine deutliche Auswirkung auf die Messergebnisse haben kann. Aus diesem Grund wurden alle Blutabnahmen von mir selbstständig durchgeführt, innerhalb ein bis maximal zwei Stunden abzentrifugiert, stabilisiert und bis zum Einfrieren kühl gelagert. Auch die Messungen der Nukleosomenkonzentrationen mit dem ELISA im Serum erfolgten nach einem standardisierten Vorgehen. Dazu wurden jeweils alle tiefgefrorenen Serumproben eines Patienten aufgetaut und innerhalb eines Testdurchlaufes analysiert. Die anderen

Laborparameter wurden durch erfahrene medizinisch technische Assistentinnen des Instituts für klinische Chemie des Universitätsklinikums München weiterverarbeitet. Am Elecsys 2010 der Firma Roche Diagnostics wurden AFP und CYFRA 21-1 sowie am High-End Analyser AU 2700 des Herstellers Beckman Coulter die übrigen Routineparameter nach standardisiertem Vorgehen gemessen. Dadurch wurde der Einfluss präanalytischer und analytischer Störgrößen minimiert.

Bestimmung der Nukleosomenkonzentration

Im Rahmen dieser Studie wurden Nukleosomen global bestimmt, unabhängig ob sie aus benignen oder malignen Zellen stammen. Neben den Nukleosomen untersuchten andere Forschungsgruppen auch freie DNA im Blut. In einzelnen Studien ist es gelungen, nur aus malignen Zellen freigesetzte DNA zu bestimmen, so z.B. beim Nasopharynxkarzinom, welches mit Epstein-Barr-Virus-Infektionen assoziiert ist. Lo et al. untersuchte die Konzentration von EBV-DNA mit PCR im Plasma von Patienten mit Nasopharynxkarzinom vor und nach Tumorresektion sowie während einer Radiotherapie [Lo 1999, Lo 2000 A]. Ein Abfall der EBV-DNA unter die Nachweisgrenze nach einer Operation korrelierte mit einer vollständigen Entfernung des Tumors. Patienten mit weiterhin nachweisbaren Mengen an EBV-DNA zeigten hingegen eher einen rasch progredienten Tumor an. Bei den meisten Patienten fielen die Konzentrationen an EBV-DNA während der Radiotherapie ab. Konstant niedrige Werte waren mit einer Remission assoziiert, während erneute Anstiege eine Progression des Tumors vorhersagten [Lo 1999].

Andere Studien versuchten zirkulierende Nukleosomen im Plasma zu bestimmen. In einer Studie von Kuroi et al. zeigte sich bei Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mamakarzinoms und einer Chemotherapie ein Anstieg der zirkulierenden Nukleosomen bereits 24 Stunden nach Beginn der Chemotherapie. Außerdem wiesen Patientinnen mit einem Mamakarzinom höhere Werte auf als gesunde Probanden. Nach Mastektomie kam es zu einem Abfall der Nukleosomenwerte im Plasma [Kuroi 2001].

Neben der Bestimmung im Plasma untersuchten mehrere Studien die Eigenschaften der zirkulierenden Nukleosomen im Serum. Hierbei zeigte sich bei Patienten mit Pankreaskarzinomen und kolorektalen Karzinomen, welche mit einer Radiochemotherapie behandelt wurden, ein charakteristischer Anstieg im Verlaufe der Therapie. Nach einem Anstieg innerhalb des ersten Tages und einem Maximum nach zwei bis fünf Tagen, kam es zu

einem Abfall der Nukleosomenwerte, wobei der Verlauf eine prognostische Aussagekraft hat [Kremer 2005; Kremer 2006]. Ähnliche Werteverläufe zeigten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und Chemotherapiebehandlung. Hierbei kam es nach einer Woche zu einem starken Abfall der Nukleosomenwerte. Zunächst stiegen die Nukleosomen bei Patienten mit einer Remission an, wohingegen Patienten ohne Ansprechen auf die Therapie fallende Nukleosomen aufwiesen [Müller 2006].

In mehreren Studien untersuchten Holdenrieder et al. die prognostische und prädiktive Aussagekraft von zirkulierenden Nukleosomen bei Patienten mit Lungenkarzinom und ihren unterschiedlichen Therapien. Bei Patienten mit fortgeschrittenem nicht kleinzelligem Lungenkarzinom haben Nukleosomen prädiktive Wertigkeit und eignen sich für die frühzeitige Abschätzung des Ansprechens einer Chemotherapie bereits nach einmaliger Therapiegabe [Holdenrieder 2004 C, 2006 B, 2008, 2009].

Generell kann zirkulierende DNA in verschiedenen Formen im Blut vorkommen. Am häufigsten findet man die nukleosomale DNA vor. Des Weiteren existiert die DNA in Form von freier, ungebundener DNA, assoziiert mit anderen Proteinen oder eingeschlossen in apoptotischen Körperchen [Jahr 2001, Holdenrieder 2009, Wimberger 2010].

Bisher stellte die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction; PCR) den Goldstandard bei der Bestimmung sowohl virus-spezifischer DNA als auch normaler DNA dar. Bei einem Vergleich der DNA-Messung durch PCR und der Bestimmung von Nukleosomen mittels ELISA korrelierten die Ergebnisse beider Methoden im Serum und Plasma sowohl bei singulären Werten als auch insbesondere in den Longitudinal-Verläufen von Patienten mit einem Pankreaskarzinom während Radiochemotherapie sowie von Patienten nach einem Schlaganfall [Holdenrieder 2005 B]. So kann man davon ausgehen, dass die Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen mittels kostengünstigem, schnell durchführbarem ELISA klinisch ähnlich aussagekräftig zur teureren und aufwändigeren PCR sind. Damit könnten Nukleosomen einen sinnvollen und im Gegensatz zur Bildgebung standardisiert messbaren Marker darstellen, um die Effizienz einer transarteriellen Chemoembolisation frühzeitig abzuschätzen.

In dieser Studie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Stieber und der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) ein neues Testverfahren zur automatisierten Detektion

der Nukleosomenkonzentration im Serum oder Plasma mit dem Impact-Analyser untersucht. Mögliche Fehlerquellen der manuellen Nukleosomen ELISA-Methode (Handtest) z.B. durch Fehler beim Pipetieren können hierbei vermieden werden. Ebenso ist dieses Testverfahren zeitaufwändiger als ein automatisiertes Messverfahren. Daher ist derzeit ein automatisiertes Testverfahren mit Hilfe des Impact der Firma Roche Diagnostics in einigen Studien parallel zum ELISA evaluiert worden. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei der automatisierten Methode Fänger- und Detektions-Antikörper vertauscht und andere Puffer zur Anwendung kamen. Das erklärt auch, dass in unserer Studie zwar eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Messverfahren im Serum gefunden wurde, die wir jedoch deutlich besser erwartet hatten. In den nächsten Jahren sind weitere Verbesserungen und Studien notwendig, um das neue automatisierte Testverfahren zu optimieren und seine klinische Aussagekraft auszutesten. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie vor allem die mit dem bewährten ELISA-Testverfahren erhobenen Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

Freisetzungsmuster der Parameter vor Therapiebeginn

In Tumoren ist die Homöostase zwischen Zellneubildung und Zelltod gestört. In Folge der massiven Zellproliferation im Tumorgewebe kommt es jedoch auch zu vermehrtem Zelltod. Allerdings zeigen die verschiedenen Individuen und verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Zellumsätze [Holdenrieder 2001 B]. Einer der Hauptmechanismen, der zum Untergang der Tumorzellen führt, ist der programmierte Zelltod. Daher sollten in Patienten mit malignen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden höhere Wertelagen bei Zelltodparametern, wie den zirkulierenden Nukleosomen, vorliegen. Des Weiteren könnten Patienten mit größeren Tumoren höhere Wertelagen an Nukleosomen aufweisen. Bei gesunden Probanden wurde ein Median von etwa 60 ng/mL detektiert [Wu 2002 A], wohingegen bei Patienten mit HCC in dieser Studie ein medianer Wert von 97,8 ng/mL gemessen wurde.

Der Zelltodmarker CYFRA 21-1 ist bei Patienten mit Lungenkarzinom ein anerkannter Tumormarker [Stieber 2001]. Dabei werden die Cytokeratin 19-Fragmente in epithelialen Zellen der Lunge exprimiert und anschließend beim Absterben der Zelle in die Blutzirkulation freigegeben [Broers 1988]. Bei hepatozellulären Karzinomzelllinien konnte Wu et al. die Expression der mRNA für Cytokeratin 19-Fragmente in drei von fünf Zelllinien nachweisen [Wu 2002 B]. Zudem konnte in Patienten mit fortgeschrittenem HCC ein erhöhter Wert an CYFRA 21-1 festgestellt werden [Uenishi 2006]. Daher wurde in dieser Studie CYFRA 21-1

mitbestimmt, wobei prätherapeutisch im Median kein Unterschied zwischen den Tumorstadien erkennbar war. Der Median aller Patienten lag zwar unterhalb des Referenzbereiches von 2,0 ng/ml, jedoch befanden sich die Werte einiger Patienten oberhalb dieses Referenzbereiches.

Da das α_1 -Fetoprotein derzeit der beste verfügbare Tumormarker beim HCC ist, wurde dieser Laborparameter im Rahmen dieser Studie ebenfalls untersucht. Mit einer Sensitivität von 41% bis zu 65% sowie einer Spezifität von 80% bis zu 94% ist seine Aussagekraft im Hinblick auf Screeninguntersuchungen jedoch eingeschränkt und ein Screening sollte nur in Kombination mit einer Ultraschalluntersuchung durchgeführt werden. Auch die Diagnose eines HCC sollte nur in Zusammenhang mit bildgebenden Verfahren gestellt werden [Sturgeon 2010]. Bei größeren Tumoren wurden in einer Studie von Farinati et al. auch höhere AFP-Werte beobachtet, wobei die Werte dennoch sehr heterogen verteilt waren [Farinati 2006]. In der vorliegenden Studie waren die AFP-Medianwerte des Tumorstadiums 3 nahezu identisch mit dem der Tumorstadien 1 und 2. Damit korreliert die Bildung von AFP nicht mit der Tumorgroße, was bedeuten könnte, dass die Produktion des AFP mit der Aggressivität des Tumors einhergeht. In der Studie von Farinati et al. wurde bei Patienten mit Pfortaderthrombose und/oder extrahepatischen Metastasen mit statistischer Signifikanz ein höherer AFP-Wert festgestellt, als bei Patienten ohne diese beiden Merkmale. Diese beiden Merkmale sprechen eher für einen aggressiveren Tumor.

Freisetzungsmuster von Nukleosomen während der transarteriellen Chemoembolisation

Das Ziel einer antineoplastischen Therapie ist die Zerstörung von malignen Zellen, um das weitere Wachstum des Tumors zu verhindern und ihn nach Möglichkeit zu verkleinern. Hierzu gehört die Chemotherapie, welche unterschiedliche Formen des Zelltods auslösen kann. Nach Behandlung mit einer transarteriellen Chemoembolisation kommt es zu einer hohen Konzentration der zytotoxischen Substanzen im applizierten Gebiet und hierbei zu einem schnellen nekrotischen Zelltod. Leicht geschädigte Zellen gehen in einen Ruhezustand über und starten Reperaturprozesse. Sind diese Reperaturprozesse nicht erfolgreich, kommt es zu einem verlangsamten Zelltod mit biomorphologischen Kennzeichen der Apoptose [Plati 2011]. Neben der medikamentösen Wirkung führt auch die Ischämie, welche während der TACE erzielt wird, zum apoptotischen Zelltod [Geiger 2007].

Im Laufe dieser Apoptose werden Nukleosomen in die Blutzirkulation freigegeben. Daher müssten nach einer TACE vermehrt Nukleosomen im Blut nachweisbar sein. Jedoch werden bei einer TACE nicht nur maligne Zellen zerstört, sondern auch benignes benachbartes Lebergewebe. Daher wurden bei der Messung der Nukleosomenkonzentration neben den malignen Zellen vermutlich zusätzlich gesunde Zellen gemessen, welche aus Endothelzellen oder auch Immunzellen stammen können [Jahr 2001]. In mehreren Studien wurde nach einer Chemotherapie oder Radiotherapie ein Anstieg der Nukleosomen nach Beginn der Therapie nachgewiesen [Holdenrieder 2001 B; Kremer 2005; Cheng 2009]. Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass 24 Stunden nach Erhalt der TACE ein Anstieg der Nukleosomenkonzentration im ELISA im Serum erfolgte, nachdem diese zunächst nach 3 bzw. 6 Stunden abgefallen war. Der initiale Abfall der Nukleosomenwerte innerhalb des ersten Tages wurde ebenfalls bei Patienten mit Pankreaskarzinom und Radiochemotherapie beobachtet [Kremer 2005].

Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass die Zelle zunächst versucht den Schaden an der DNA zu reparieren. Der Reperaturprozess findet in der G₀-Phase des Zellzyklus statt, bei dem der Zellzyklus gestoppt wird. Bei erfolgreicher Reperatur wird der Zellzyklus über die G₁-Phase zur S-Phase fortgesetzt. Ist eine Reparatur nicht möglich, setzt mit einer zeitlichen Verzögerung die Apoptose ein [Leist 1997; Sionov 1999]. Anschließend werden vielfältige Apoptoseprodukte in die Blutzirkulation freigesetzt. Dieser Mechanismus kann den zunächst auftretenden Abfall der Nukleosomenkonzentration und den nach 24 Stunden erfolgenden teilweise steilen Anstieg gut erklären. Leider war es in dieser Studie nicht möglich die Patienten über einen längeren Zeitraum zu beobachten, da sie bereits am ersten Tag nach der Chemoembolisation bei komplikationslosem Verlauf das Krankenhaus verlassen durften. Denn es wäre interessant gewesen, die Nukleosomenkonzentration im Verlauf der ersten Woche zu verfolgen, um die Dauer und Ausprägung des Anstiegs sowie die Abfallgeschwindigkeit in den folgenden Tagen in die Bewertung miteinbeziehen zu können.

Freisetzungsmuster der weiteren Laborparameter während der transarteriellen Chemoembolisation

Die gemessenen Laborparameter können im Hinblick auf Schnelligkeit und Stärke ihrer Veränderung in drei Gruppen eingeteilt werden.

Einen sehr schnellen Anstieg sowie Abfall weisen die Apoptosemarker und Entzündungsparameter auf. Der schnelle Anstieg von CYFRA21-1 lässt sich mit dem

Absterben der Tumorzellen gut erklären [Broers 1988]. Durch die Induktion der Apoptose werden aus den Zellen Zellbestandteile, beispielsweise Cytokeratinfragmente, freigesetzt und gelangen in die Blutzirkulation [Sheard 2002]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich vergleichbar mit den im Serum gemessenen Nukleosomen bereits nach 24 Stunden ein starker Anstieg des Apoptosemarkers CYFRA 21-1. Ebenso fand sich beim Entzündungsparameter CRP nach 24 Stunden ein starker Anstieg, was für eine leichte Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes sprechen könnte.

Die zweite Gruppe beinhaltet Biomarker, die einen mäßigen Anstieg aufweisen. Hierzu zählen die Leberparameter GOT, GPT und GLDH sowie die LDH. Aus dem Anstieg der Leberparameter kann man erkennen, dass das Lebergewebe durch die TACE geschädigt wird. Jedoch fallen diese Werte in einer Studie von Sacco et al. im Verlaufe der nächsten Wochen innerhalb der Regenerationsphase wieder auf ein normales Niveau. Trotz des kurzzeitigen Anstieges ist von einer stabilen Leberfunktion über mehrere Zyklen einer TACE auszugehen [Sacco 2009]. Die drei Nierenwerte Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin steigen im Verlaufe des ersten Tages ebenfalls nur leicht an, was durch die Ausscheidung des Chemotherapeutikums bedingt sein könnte.

In der dritten Gruppe befinden sich Werte, deren Veränderungen sehr träge und langsam ablaufen. Zu diesen robusten Laborwerten zählen der Tumormarker AFP und der Lebersynthesemarker CHE. Im Gegensatz zum Anstieg von GOT, GPT und GLDH zeigt die CHE stabile Wertelagen innerhalb des ersten Tages. Diese Tatsache ist der längeren Halbwertszeit von AFP (ca 5-7 Tage) und der CHE von ca. 10 Tagen geschuldet [Dörner 2003].

Korrelation von klassischen Laborparametern und Nukleosomen

Prätherapeutisch zeigte, außer den maschinell bestimmten Nukleosomenwerten aus dem Serum, kein weiterer Biomarker eine ausreichende Korrelation mit den manuell bestimmten Nukleosomenkonzentrationen, wobei diese Korrelation schwach war. Allerdings fand sich posttherapeutisch nach 24 Stunden ein anderes Bild. Hier korrelierten CRP, GGT, CHE und LDH mit den Nukleosomenkonzentrationen. Bemerkenswerterweise korrelierten die Zelltodparameter Nukleosomen, CYFRA 21-1 und LDH kaum miteinander. Prätherapeutisch zeigte sich eine Korrelation zwischen LDH und CYFRA 21-1, welche jedoch 24 Stunden

nach Therapie nicht mehr vorhanden war. Genau entgegengesetzt verhielt es sich bei Nukleosomen und LDH, wobei die Korrelation jedoch äußerst schwach war.

Dagegen war es zu erwarten, dass jeweils die Leberparameter GOT, GPT und GLDH, die Pankreaswerte Amylase und Lipase und die Nierenwerte Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure sowohl prätherapeutisch als auch 24 Stunden nach TACE miteinander korrelierten.

Korrelation der Nukleosomenkonzentration mit bildgebenden Verfahren

Bis zum heutigen Tage ist ein Therapieansprechen nach transarterieller Chemoembolisation bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom erst nach einigen Wochen bis Monaten anhand der radiologischen Bildgebung möglich, denn die transarterielle Chemoembolisation führt erst nach einer zeitlichen Verzögerung zu makroskopischen Veränderungen im Tumorgewebe. Außerdem sind die bildgebenden Untersuchungen sehr teuer und stark abhängig von Untersucher und Technik. Ein biochemischer Marker mit hoher Tumorspezifität und einer Kinetik im Serum, die den Therapieerfolg widerspiegelt, wäre daher sehr nützlich. So könnte die Effizienz einer Therapie frühzeitig abgeschätzt und eine Therapie moduliert werden. Dies würde für Patienten von hohem individuellem Nutzen sein, da unerwünschte Nebenwirkungen ausbleiben würden und auf andere Therapieverfahren wie SIRT und Sorafenib gewechselt werden könnte. Nukleosomen sind zwar nicht tumorspezifisch, sie haben aber eine kurze Halbwertszeit unter physiologischen Bedingungen [Gauthier 1996] und zeigen charakteristische Verläufe während der ersten Woche einer Chemotherapie. Sie können das Ansprechen auf eine Chemotherapie beim Bronchialkarzinom [Holdenrieder 2001 C, Holdenrieder 2004 B], bei Pankreaskarzinom [Kremer 2005] und bei akuter lymphatischer Leukämie [Müller 2006] in der initialen Phase gut vorhersagen. Wir prüften deshalb die Hypothese, ob Nukleosomen eine frühzeitigere Beurteilung des Therapieansprechens auch in der initialen Phase einer transarteriellen Chemoembolisation bei einem hepatozellulären Karzinom darstellen.

Daher wurden in dieser Studie die gemessenen Laborparameter mit dem Therapieansprechen verglichen. Zur Evaluation des Therapieansprechens wurden teilweise mehrere Therapiesitzungen pro Patient in die Auswertungen einbezogen, so dass letztendlich insgesamt 77 Therapien ausgewertet wurden. Ebenso wurde nicht jeder Patient mit seiner ersten TACE erfasst, sondern erst zu späteren Zeitpunkten, was in der Auswertung berücksichtigt wurde.

Die Einteilung der Patienten in die beiden Gruppen, Responder und Non-Responder, wurde anhand der vorliegenden radiologischen Befunde vorgenommen. Diese Befunde wurden von verschiedenen erfahrenen Radiologen des Universitätsklinikums Großhadern erstellt. In der überwiegenden Anzahl der Befunde war die Einteilung in die beiden Gruppen eindeutig vorzunehmen und wurde nur durch mich persönlich anhand der vorliegenden Befunde ausgeführt. In Ausnahmefällen wurde die Einteilung nach Rücksprache mit den Radiologen durchgeführt.

Des Weiteren wurde das Therapieansprechen mittels zweier Modalitäten, dem CT und dem MRT, ermittelt. Da es nur in zwei der 77 Behandlungen zu einer Remission des Tumors kam, wurden diese beiden Befunde zur Gruppe der Stable Disease-Patienten hinzugerechnet und diese Gruppe wurde als Responder bezeichnet. Bei der Gruppe der Non-Responder folgte 24 Stunden nach der TACE ein steiler Anstieg der Nukleosomenkonzentration im ELISA, wohingegen die Responder einen leichten Abfall der Nukleosomen im ELISA vorwiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse bestimmten wir zusätzlich die Differenz und prozentuale Veränderung nach 24 Stunden im Vergleich zum prätherapeutischen Wert. Hierbei wurde eine noch stärkere Signifikanz festgestellt ($p < 0,0001$). Eigentlich würde man bei einem guten Therapieansprechen eine hohe Zelltodrate und damit einen Anstieg der Nukleosomenkonzentration erwarten. Ebenso erwartet man bei Tumoren, die nicht auf eine Chemotherapie ansprechen, eher eine Resistenz gegenüber dem Medikament und somit ebenfalls keinen Anstieg der Nukleosomenkonzentration. Jedoch wurden diese beiden Vermutungen in mehreren Studien widerlegt: Es konnte in diversen Tumorentitäten an Patienten mit bereits fortgeschrittenen Tumorerkrankungen wiederholt nachgewiesen werden, dass die Nukleosomen bei einem guten Therapieansprechen nach der Therapie eher abfallen und bei schlechtem Ansprechen meist ansteigen [Kuroi 2001; Holdenrieder 2001 B; Holdenrieder 2004 C; Trejo-Becerril 2005; Kremer 2005].

Die höheren Werte der Nukleosomen bei schlechtem Ansprechen könnten auf ein aggressiveres Wachstum des Tumors und eine höhere Proliferationsrate während einer TACE mit konsekutiv erhöhter Nukleosomenfreisetzung zurückzuführen sein. Weiterhin könnte eine bessere Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen vorliegen, welche einerseits für eine bessere Verteilung des Chemotherapeutikums verantwortlich ist und andererseits eine erhöhte Freisetzung von Nukleosomen in die Zirkulation ermöglicht. Ebenso könnte ein ineffektiver Abbau und eine insuffiziente Elimination zirkulierender Nukleosomen verantwortlich sein.

Die hohen Nukleosomenkonzentrationen im Anschluss an eine TACE könnten ein initiales Ansprechen auf die Therapie andeuten, weisen aber ein hohes Risiko zu erneutem Wachstum und baldiger Progression auf. Auf diese Weise könnten höhere Nukleosomenkonzentrationen in der initialen Phase der Therapie mit hoher Tumoraggressivität und ineffektiver Therapie verbunden sein. Auf der anderen Seite könnten niedrigere Nukleosomenwerte im Anschluss an eine TACE auf weniger aggressive und langsamer wachsende Tumore hinweisen. Diese Tumoren würden aufgrund der niedrigeren Zelltodraten weniger Nukleosomen an die Zirkulation freisetzen. Außerdem wird davon ausgegangen, dass eine effektive Elimination der Nukleosomen vor und nach Freisetzung in die Zirkulation mit einem besser funktionierendem Immunsystem assoziiert ist. Dies könnte zu einem langsameren Fortschreiten des Tumors und einem besseren Therapieansprechen führen [Müller 2006; Holdenrieder und Stieber 2009]. Daher könnten niedrigere Nukleosomenkonzentrationen nach dem ersten Tag der Therapie mit einem effektiven Therapieansprechen und längerem progressionsfreien Intervall assoziiert sein.

Korrelation weiterer Laborparameter mit der bildgebenden Diagnostik

Der epitheliale Marker CYFRA 21-1 hat wegen seiner kurzen Halbwertszeit von nur wenigen Stunden im Blut [Sheard 2002] auch Potential zur frühzeitigen Evaluierung der Therapieeffizienz bei Chemotherapien. Bei Karzinomen in der Lunge, im HNO-Bereich oder im Ovar ist CYFRA 21-1 bereits als prädiktiver Marker der Therapieeffizienz beschrieben worden [Stieber 2001; Gadduci 2001; Holdenrieder 2009 A]. Allerdings weisen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom eher geringe Wertelagen auf und zeigen somit eher keine Assoziation mit dieser Tumorentität [Uenishi 2006]. Ein Grund ist die charakteristische Expression von Zytokeratinen der einzelnen Zellen. In hepatischen Zellen wird vor allem Zytokeratin 8 und 18 exprimiert nicht aber das für CYFRA 21-1 entscheidende Zytokeratin 19 [Moll 1992]. Auch in dieser Studie fanden sich bei den Patienten niedrige Wertelagen und CYFRA 21-1 konnte nicht als Indikator für die Therapieeffizienz nach TACE bei HCC nachgewiesen werden.

Überraschenderweise zeigten zwei andere Biomarker signifikante Unterschiede zwischen den Responder-Gruppen: Für die beiden Parameter GGT und AP wurden zu allen 4 Zeitpunkten höhere Enzymaktivitäten in Patienten mit schlechtem Therapieansprechen gefunden. Da beide Biomarker von den Gallengängchen anliegenden Zellen freigesetzt werden, kann diese

Beobachtung auf die Wirksamkeit des Chemotherapeutikums oder die durch die Erkrankung stärker veränderte Organstruktur zurückzuführen sein.

Weiterhin wurde eine statistische Signifikanz für den Tumormarker AFP als prädiktiver Marker für die Therapieeffizienz nach einer transarteriellen Chemoembolisation an allen 4 bestimmten Zeitpunkten entdeckt. Dieses homogene Muster entsteht durch die lange Halbwertszeit des AFP von 5-7 Tagen [Yao 2007]. Daher hat die TACE keinen so frühzeitigen Effekt auf die AFP-Konzentration. Hier wäre es interessant zu untersuchen, welche Veränderungen sich mehrere Wochen nach der TACE beim AFP ergeben, was in dieser Studie nicht möglich war, da die Patienten zuvor entlassen wurden. Hier könnte untersucht werden, ob ein Anstieg bzw. Abfall der AFP-Konzentration nach mehreren Wochen mit einem negativen bzw. positiven Therapieansprechen assoziiert ist.

Multivariates Modell zur Prädiktion des Therapieansprechens

Zur Verbesserung der prädiktiven Aussagekraft führten wir zusätzlich multivariate Analysen durch. Hierbei zeigte sich die Kombination aus Nukleosomen im ELISA nach 24 Stunden, AP nach 24 Stunden und der TACE-Zyklus als bestes prädiktives Modell.

Korrelation des Therapieansprechens in der bildgebenden Diagnostik und dem Gesamtüberleben

Die Evaluation des Therapieansprechens mittels bildgebender Diagnostik ist noch nicht standardisiert. Einige Gruppen bevorzugen die CT aufgrund der besseren Detektion des Lipiodols, andere hingegen die MRT, da anhand dieser Modalität die Größe des Tumors genauer bestimmt werden kann [Vogl 2002]. Des Weiteren ist die Bildgebung abhängig von der Erfahrung des Untersuchers und der Qualität der radiologischen Geräte. Zudem ist die genaue Beurteilung der radiologischen Aufnahmen nicht geklärt.

Das Therapieansprechen onkologischer Therapien wird in der Bildgebung meist anhand der RECIST-Kriterien beurteilt, in der nur die eindimensionale Änderung der Tumorgöße berücksichtigt wird [Forner 2009]. Allerdings ist bei lokoregionären Therapieverfahren nicht nur die Tumorgößenänderung entscheidend, sondern auch das Ausmaß der Tumornekrose im Gewebe. Daher wird von der EASL empfohlen, das Ausmaß des Rückgangs der lebenden Tumorzellen zu berücksichtigen [Bruix 2001]. In dieser Studie wurde bei strittigen Fällen nach den RECIST-Kriterien deshalb auch das Ausmaß der Gewebnekrose berücksichtigt.

Beim HCC ist jedoch nicht immer das Karzinom der limitierende Faktor, sondern auch die Leberzirrhose ist in 20-30% Ursache für den Tod eines Patienten [Llovet 2002]. Daher muss ein Therapieansprechen im Tumor nicht unbedingt gleich bedeutend sein mit einem längeren Überleben. Des Weiteren könnte ein regredienter Tumor aggressiver werden und später eine Progredienz aufweisen. Daher ist in vielen Studien untersucht worden, ob ein Therapieansprechen mit dem Überleben des Patienten korreliert. In einer Studie von Ebied et al. überlebten Responder signifikant länger als Non-Responder. Hier wurden die Patienten jedoch anhand von drei Merkmalen dem Therapieansprechen zugeteilt. Neben der Veränderung der Tumorgroße wurden die Nekroserate im Tumor und das Auftreten neuer Tumorherde mitbeurteilt. Alle Merkmale wurden mittels CT bewertet [Ebied 2003]. Dagegen wurde in einer Studie von Artinyan et al. kein Vorteil bei partieller Remission im Hinblick auf das Überleben der Patienten gefunden. Allerdings waren in dieser Studie auch Patienten mit hepatisch metastasierten neuroendokrinen Karzinom eingeschlossen [Artinyan 2008]. In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Therapieansprechen und Prognose nachgewiesen werden.

Korrelation der Laborparameter mit dem Überleben der Patienten

Allerdings zählt für einen Kliniker sowie für den Patienten weniger die prädiktive Aussagekraft eines Biomarkers hinsichtlich des Therapieansprechens als vielmehr die prognostische Wertigkeit eines Biomarkers, um die Überlebenschancen eines Patienten abzuschätzen. Denn trotz guten Ansprechens auf die Chemotherapie sterben einige Patienten frühzeitig. Daher wurde im Rahmen dieser Studie nicht nur eine Korrelation der Laborparameter mit dem Therapieansprechen in der bildgebenden Diagnostik untersucht, sondern auch eine Korrelation der Laborparameter mit dem 1-Jahresüberleben bzw. dem Gesamtüberleben evaluiert. Das 1-Jahresüberleben wurde zusätzlich ausgewertet, da somit ein definierter Endpunkt vorlag. Mit dem Gesamtüberleben konnte dagegen eine multivariate Analyse durchgeführt werden.

In dieser Studie wurden von den 48 auswertbaren Patienten nur 18 bei ihrer ersten transarteriellen Chemoembolisation erfasst. 30 Patienten wurden erst bei einer der folgenden Therapiesitzungen in die Studie aufgenommen. Bei statistischen Berechnungen zeigte sich jedoch, dass die Anzahl der Therapien für unsere Auswertungen nicht von Bedeutung war. Daher konnten die 30 Patienten in dieser Auswertung berücksichtigt werden. Die Patienten wurden im Hinblick auf die prognostische Aussagekraft der einzelnen Biomarker nur mit

ihrer ersten von mir erfassten Therapie in die Auswertung eingeschlossen. Die folgenden Therapien blieben von der Auswertung ausgeschlossen.

Im Gegensatz zum Therapieansprechen zeigt die Nukleosomenkonzentration im ELISA keine statistische Signifikanz bei der Prognose eines Patienten nach transarterieller Chemoembolisation. Ebenso zeigten weder die Differenzen noch die prozentualen Veränderungen der Nukleosomen im Verlauf des ersten Tages nach TACE eine statistische Aussagekraft. Im Gegensatz dazu konnte eine Studie von Ren et al. eine prognostische Aussagekraft der Nukleosomen in Patienten mit HCC feststellen. Höhere Nukleosomenwerte vor chirurgischer Resektion hatten eine signifikant schlechtere Prognose. Die Nukleosomen wurden hier im Plasma bestimmt [Ren 2006]. Eine Studie von Sozzi et al. fand auch keine prognostische Relevanz von DNA in Patienten mit Lungenkarzinom [Sozzi 2001]. Dennoch konnte von anderen Studien gezeigt werden, dass DNA-Produkte beispielsweise in Lungenkarzinomen [Fournier 1995] oder in Mammakarzinomen [Silva 2002] eine prognostische Aussagekraft aufweisen. In einer weiteren Studie an 128 Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom, die mit einer Chemotherapie behandelt wurden, konnte sogar in multivariaten Analysen gezeigt werden, dass Patienten mit höheren Nukleosomenkonzentrationen vor dem Start der ersten Chemotherapie ein schlechteres Outcome hatten [Holdenrieder 2009]. Auch in Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom fand Gautschi et al. die Nukleosomen in Plasma und Serum als prognostische relevante Marker. In dieser Studie konnte aber keine prognostische Aussagekraft gefunden werden, weder prätherapeutisch oder posttherapeutisch, noch durch Differenzen oder prozentuale Veränderungen innerhalb eines Tages.

Als unabhängige prädiktive Faktoren vor Beginn der TACE gelten Tumorgröße, Gefäßinvasion, AFP-Spiegel, Child-Pugh Stadium, Bilirubin-Spiegel, Aszites, der Karnofsky Index und der Performance Status [Bruix 2004]. Auch zwei weitere Studien zeigten AFP und Tumorgröße als geeignete prognostischen Marker vor Therapiebeginn. In unserer Studie konnte der AFP-Wert ebenfalls an allen 4 Zeitpunkten als statistisch signifikanter Prognosemarker für das 1-Jahresüberleben und das Gesamtüberleben identifiziert werden.

Ebenso zeigten die beiden Zelltodmarker CYFRA 21-1 und LDH eine prognostisch relevante Signifikanz. Dabei war CYFRA 21-1 zu allen Zeitpunkten signifikant, vor allem aber posttherapeutisch. Dabei lagen die Werte der Patienten höher, die innerhalb eines Jahres

starben. In einer weiteren Studie konnte keine statistische Signifikanz für CYFRA 21-1 als prognostischer Marker gezeigt werden, wobei alle Patienten der japanischen Studie mit einer chirurgischen Resektion therapiert wurden, wohingegen in der vorliegenden Studie alle Patienten mit einer TACE therapiert wurden [Uenishi 2006]. Die höheren Werte des CYFRA 21-1 können durch einen größeren und aggressiveren Tumor bedingt sein. Zusätzlich können wie bei den Nukleosomen die Abbausysteme gesättigt und somit die Eliminierung der Abbauprodukte verzögert sein. Gleiches gilt für den Zelltodparameter LDH. Hier zeigten jedoch nur der prätherapeutische Wert und der 3 Stunden Wert statistische Signifikanz. In einer Studie von Chen et al. konnte eine prognostische Aussagekraft des Lebersynthesemarkers CHE nachgewiesen werden [Chen 2006]. In unserer Studie zeigte dieser Laborparameter die stärkste Signifikanz hinsichtlich des Überlebens an allen 4 Zeitpunkten. Insbesondere Patienten mit CHE-Werten unterhalb der 25. Perzentile hatten eine schlechtere Prognose.

Multivariate Prognosemodelle

Beim hepatozellulären Karzinom wurden schon mehrere Staging Systeme evaluiert, jedoch wurde bis heute kein optimales System zur Bestimmung der Prognose gefunden [Henderson 2003; Collette 2008; Camma 2008]. Auch für die TACE existiert kein akzeptiertes Prognosemodell. Es wurden zwar einige Studien bereits durchgeführt, bei denen unabhängige prädiktive Faktoren vor Beginn einer TACE entdeckt wurden [Bruix 2004], jedoch konnten diese in keinem geeigneten Modell zusammengefasst werden. Innerhalb dieser Studie überprüften wir, ob anhand der gemessenen Biomarker ein aussagekräftiges Prognosemodell erstellt werden kann. Daher führten wir multivariate Analysen durch, um aus der Vielzahl der positiven Ergebnisse in den univariaten Analysen die relevanten Marker herauszufinden, die eine voneinander unabhängige prognostische Aussagekraft haben.

Unsere Überlegungen waren hierbei, in einem ersten Schritt ein möglichst aussagekräftiges Modell zu finden, in das nur prätherapeutische Laborwerte und klinische Faktoren einbezogen wurden. Damit könnte man bereits vor Therapiebeginn entscheidende Hinweise auf die Erfolgsaussichten der TACE bekommen. Bei diesen Auswertungen blieben letztendlich nur zwei Parameter im Modell, das T-Stadium und der prätherapeutische CHE-Wert, wobei ein hohes Stadium und ein niedriger CHE-Wert prognostisch ungünstig waren.

In einem zweiten Schritt bezogen wir auch alle Laborparameter in die Auswertung mit ein, die 24h nach TACE verfügbar waren und somit schon einen Einfluss der TACE-Therapie widerspiegeln. Mit diesem Modell könnte schon früh eingeschätzt werden, ob im weiteren Therapieverlauf eine Veränderung oder Ergänzung vorgenommen werden sollte. Hierbei wurden wieder das T-Stadium sowie der prätherapeutische CHE-Wert und als weitere Variable der 0h-Wert der LDH und der 24h-Wert von CYFRA 21-1 als unabhängige prognostische Marker identifiziert. Nach dem AIC, der die Stärke eines prognostischen Modells bewertet, wies das zweite Modell eine etwas stärkere Aussagekraft als das erste auf.

Die unabhängige, prognostische Aussagefähigkeit der Tumorgroße konnte in beiden Modellen dieser Studie bestätigt werden. Dagegen konnte der Tumormarker AFP zwar ebenfalls eine statistische Signifikanz im Hinblick auf das 1-Jahresüberleben und das Gesamtüberleben in der univariaten Analyse zeigen, war jedoch nicht aussagekräftig genug, um als unabhängiger Marker im multivariaten Prognosemodell zu bleiben. Aufgrund der sehr guten Ergebnisse für den Lebersynthesemarker CHE, wie bereits durch Chen et al. beschrieben, sollte dieser Marker in zukünftigen Studien mehr beachtet werden [Chen 2006].

In der Mantel-Haenszel-Analyse wurden für das erste Modell in einer Mehrfeldertafel alle Möglichkeiten der T-Stadien (T1 und T2 versus T3) und der erniedrigten oder nicht erniedrigten prätherapeutischen CHE-Werte (bei einem cut-off von 2,65 kU/L) detailliert für das Einjahres-Überleben als Endpunkt dargestellt. Dabei konnte anschaulich gezeigt werden, dass alle Patienten im Tumorstadium 3 mit erniedrigten CHE-Werten ($< 2,65$ kU/L) innerhalb des ersten Jahres nach der TACE verstorben sind. Im Gegensatz dazu lebten alle Patienten in den Tumorstadien 1 und 2 mit nicht erniedrigten CHE-Werten ($\geq 2,65$ kU/L) länger als ein Jahr. Zudem hatten Patienten im Stadium T3 mit einem erniedrigten CHE-Wert ein 3.6 faches Risiko, im ersten Jahr nach TACE zu versterben, als Patienten im Stadium T3, die keinen erniedrigten CHE-Wert aufwiesen.

Aufgrund dieser sehr eindrücklichen Ergebnisse sollten diese beiden Parameter in größeren, prospektiven Studien weiter untersucht werden, um die Tauglichkeit in der klinischen Routine zu testen. Somit wäre bereits vor Therapiebeginn für einen Teil der Patienten eine genaue prognostische Aussage möglich und man könnte z.B. bei Patienten mit niedrigen CHE-Werten und fortgeschrittenem Tumorstadium auf die TACE-Therapie verzichten und andere Therapieoptionen, wie beispielsweise Sorafenib, in Erwägung ziehen.

Wenn sich die Ergebnisse dieser explorativen, prospektiven Untersuchung in zukünftigen Validierungsstudien bestätigen, wäre die Kombination von klinischen Faktoren und Biomarkern ein attraktives Werkzeug für eine individuellere Behandlung von HCC-Patienten mit TACE-Therapie.

6 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom steht an fünfter Stelle der häufigsten Karzinome weltweit und an dritter Stelle der karzinombedingten Todesfälle. Da diese Tumorentität oft erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird, kann in den meisten Fällen nicht mehr in kurativer Absicht therapiert werden. In fortgeschrittenen Stadien ist die transarterielle Chemoembolisation die Therapie der Wahl. Allgemein wird bei Chemotherapien versucht, die Zellhomöostase, die bei Tumoren zugunsten der Zellneubildung verschoben ist, wieder herzustellen. So wird während einer TACE gezielt ein massiver Zelltod innerhalb der Leber induziert. Bei einer TACE kann es jedoch auch zu unerwünschten Nebenwirkungen durch die Toxizität der Chemotherapeutika kommen. Die Beurteilung des Therapieansprechens einer TACE wird nach heutigem Standard mittels bildgebender Verfahren vorgenommen. Die Bildgebung ermöglicht jedoch oft erst nach 1-2 Monaten eine Aussage über das Therapieansprechen. Zudem ist die Beurteilung stark von der subjektiven Erfahrung des Untersuchers abhängig. Somit wäre es von großem Vorteil, objektive Biomarker zur Verfügung zu haben, die frühzeitig den Erfolg einer TACE anzeigen. Anhand dieser Biomarker könnte man das therapeutische Konzept früher anpassen und die Nebenwirkungen einer erfolglosen Therapie vermeiden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Aussagekraft verschiedener Laborparameter, inklusive der Zelltodmarker Nucleosomen und CYFRA 21-1 sowie Leber- und Tumorspezifische Parameter, hinsichtlich des Therapieansprechens und des Überlebens der Patienten untersucht. Dazu wurden Serum- und Plasmaproben von insgesamt 50 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom sowie insgesamt 77 Therapiesitzungen gewonnen.

Bei vielen Patienten wurde ein Anstieg von Nucleosomen, CYFRA 21-1, LDH, den Leberwerten und weiteren Laborparametern bereits 24 Stunden nach transarterieller Chemoembolisation beobachtet. Des Weiteren korrelierten die Nucleosomen, AFP, GGT und AP mit dem Therapieansprechen, wobei vor allem die prozentuale Veränderung der Nucleosomen nach 24 Stunden eine starke statistische Signifikanz aufwies. In Kombination mit der alkalischen Phosphatase nach 24 Stunden und des TACE-Zyklus kann die prognostische Aussagekraft gesteigert werden.

Im Hinblick auf die 1-Jahresüberlebensrate stellten CHE, AFP, LDH und CYFRA 21-1 die beste prognostische Aussagekraft in univariaten Untersuchungen dar. In multivariaten

Analysen konnten für die prätherapeutische Stratifizierung der Patienten das Tumorstadium und der CHE-Wert als unabhängige prognostische Variable identifiziert werden. Wenn auch die 24h-Werte in die Auswertung miteinbezogen wurden, ergab sich ein Modell aus dem Tumorstadium, dem prätherapeutischen CHE- und LDH-Wert sowie dem 24h-Wert von CYFRA 21-1 als unabhängige prognostische Faktoren, welches eine etwas höhere prognostische Gesamtaussagekraft aufwies. Mittels einer Mantel-Haenszel Analyse der prätherapeutischen Variable Tumorstadium und CHE-Wert konnten Patientengruppen mit sehr guter und schlechter Prognose identifiziert werden.

Nukleosomen stellen somit einen einfachen und günstigen Laborparameter dar, der sich zum Therapiemonitoring während einer transarteriellen Chemotherapie eignet. Daneben sind auch die Tumor- und Leber-spezifischen Marker AFP, GGT und vor allem die AP in Kombination mit dem TACE-Zyklus für die Beurteilung des Therapieansprechens hilfreich. Für die Einschätzung der Prognose stehen mit der CHE, LDH und CYFRA 21-1 aussagekräftige Lebersynthese- und Zelltodmarker zur Verfügung. Wenn sich die Ergebnisse dieser explorativen, prospektiven Untersuchung in zukünftigen Validierungsstudien bestätigen, können diese Biomarker als wertvolles laborchemisches Instrument dienen, um das therapeutische Vorgehen bei HCC-Patienten mit einer Tumorerkrankung individuell zu optimieren.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi E**, Maeda T, Matsumata T, Shirabe K, Kinukawa N, Sugimachi K, Tsuneyoshi M.
Risk factors for intrahepatic recurrence in human small hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 108(3): 768–775 (1995).
- Adinolfi A**, Adinolfi M, Lessof.
Alpha-feto-protein during development and in disease.
J Med Genet. 12(2): 138-151 (1975).
- Amaravadi RK**, Thompson CB.
The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment.
Clin Cancer Res. 13(24): 7271-7279 (2007).
- Amoura Z**, Chabre H, Koutouzov S, Lotton C, Cabrespines A, Bach JF, Jacob L.
Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria.
Arthritis Rheum. 37(11): 1684–1688 (1994).
- Amoura Z**, Piette JC, Chabre H, Cacoub P, Papo T, Wechsler B, Bach JF, Koutouzov S.
Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity.
Arthritis Rheum. 40(12): 2217-2225 (1997).
- Amoura Z**, Koutouzov S, Piette JC.
The role of nucleosomes in lupus.
Curr Opin Rheumatol. 12(5): 369–373 (2000).
- Arii S**, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, Makuuchi M, Nakamura Y, Okita K, Yamada R.
Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan.
Hepatology. 32(6): 1224-1229 (2000).
- Artinyan A**, Nelson R, Soriano P, Chung V, Retseck J, Reynolds J, Marx H, Kim J, Wagman L.
Treatment response to transcatheter arterial embolization and chemoembolization in primary and metastatic tumors of the liver.
HPB (Oxford). 10(6): 396-404 (2008).
- Ashkenazi A**, Dixit VM.
Death receptors: signaling and modulation.
Science. 281(5381): 1305-1308 (1998).
- Assumpcao L**, Choti M, Pawlik TM, Gecshwind JF, Kamel IR.
Functional MR imaging as a new paradigm for image guidance.
Abdom Imaging. 234(6): 675-685 (2009).
- Atamaniuk J**, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, Mueller MM.
Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells.
Eur J Appl Physiol. 104(4): 711–717 (2008).
- Ayyappan AP**, Jhaveri KS.
CT and MRI of hepatocellular carcinoma: an update.
Expert Rev Anticancer Ther. 10(4): 507-519 (2010).

- Barbare JC**, Bouché O, Bonnetain F, Raoul JL, Rougier P, Abergel A, Boige V, Denis B, Blanchi A, Pariente A, Milan C, Bedenne L.
Randomized controlled trial of tamoxifen in advanced hepatocellular carcinoma.
J Clin Oncol. 23(19): 4338-4346 (2005).
- Barry M**, Bleackley RC.
Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death.
Nat Rev Immunol. 2(6): 401-409 (2002).
- Baylin SB**, Ohm JE.
Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?
Nat Rev Cancer. 6(2): 107-116 (2006).
- Beiter T**, Fragasso A, Hudemann J, Niess AM, Simon P.
Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo.
Clin Chem. 57(4): 633-636 (2011).
- Benoit M**, Fenollar F, Raoult D, Mege JL.
Increased levels of circulating IL-16 and apoptosis markers are related to the activity of Whipple's disease.
PLoS ONE. 2(6): e494 (2007).
- Bismuth H**, Chiche L, Adam R, Castaing D, Diamond T, Dennison A.
Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients.
Ann Surg. 218(2): 145-151 (1993).
- Bratton DL**, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM.
Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase.
J Biol Chem. 272(42): 26159-26165 (1997).
- Bressac B**, Kew M, Wands J, Ozturk M.
Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa.
Nature. 350(6317): 429-431 (1991).
- Brinkmann V**, Zychlinsky A.
Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs.
Nat Rev Microbiol. 5(8): 577-582 (2007).
- Broers JL**, Ramaekers FC, Rot MK, Oostendorp T, Huysmans A, van Muijen GN, Wagenaar SS, Vooijs GP.
Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies.
Cancer Res. 48(11): 3221-3229 (1988).
- Brown DB**, Cardella JF, Sacks D, Goldberg SN, Gervais DA, Rajan D, Vedantham S, Miller DL, Brountzos EN, Grassi CJ, Towbin RB.
Quality improvement guidelines for transhepatic arterial chemoembolization, embolization, and chemotherapeutic infusion for hepatic malignancy.
J Vasc Interv Radiol. 17(2 Pt 1): 225-232 (2006).
- Brown DB**, Chapman WC, Cook RD, Kerr JR, Gould JE, Pilgram TK, Darcy MD.
Chemoembolization of hepatocellular carcinoma: patient status at presentation and outcome over 15 years at a single center.
AJR Am J Roentgenol. 190(3): 608-615 (2008).
- Bruix J**, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J.
Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver.
J Hepatol. 35(3): 421-430 (2001).

- Bruix J**, Sala M, Llovet JM.
Chemoembolization for hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 127(5 Suppl 1): 179–188 (2004).
- Bruix J**, Sherman M.
Management of hepatocellular carcinoma.
Hepatology 42(5): 1208–1236 (2005).
- Bruix J**, Hessheimer AJ, Forner A, Boix L, Vilana R, Llovet JM.
New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma.
Oncogene. 25(27): 3848–3856 (2006).
- Bugianesi E**, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M.
Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 123(1): 134–140 (2002).
- Burlingame RW**, Boey ML, Starkebaum G, Rubin RL.
The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus.
J Clin Invest. 94(1): 184–192 (1994).
- Burlingame RW**, Volzer MA, Harris J, Du Clos TW.
The effect of acute phase proteins on clearance of chromatin from the circulation of normal mice.
J Immunol. 156(12): 4783–4788 (1996).
- Camma C**, Di Marco V, Cabibbo G, Latteri F, Sandonato L, Parisi P, Enea M, Attanasio M, Galia M, Alessi N, Licata A, Latteri MA, Craxi A.
Survival of patients with hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a comparison of BCLC, CLIP and GRETCH staging systems.
Aliment Pharmacol Ther. 28(1): 62–75 (2008).
- Campisi J**, d'Adda di Fagagna F.
Cellular senescence: when bad things happen to good cells.
Nat Rev Mol Cell Biol. 8(9): 729–740 (2007).
- Capurro M**, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J.
Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 125(1): 89–97 (2003).
- Carr BI**.
Hepatic arterial 90Yttrium glass microspheres (Therasphere) for unresectable hepatocellular carcinoma: interim safety and survival data on 65 patients.
Liver Transpl. 10(2 Suppl 1): 107–110 (2004).
- Carr BI**, Kanke F, Wise M, Satomura S.
Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States.
Dig Dis Sci. 52(3): 776–782 (2007).
- Castedo M**, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G.
Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition.
Oncogene. 23(16): 2825–2837 (2004).
- Castellano L**, Calandra M, Del Vecchio Blanco C, de Sio I.
Predictive factors of survival and intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma in cirrhosis after percutaneous ethanol injection: analysis of 71 patients.
J Hepatol. 27(5): 862–870 (1997).

Chami M, Gozuacik D, Saigo K, Capiod T, Falson P, Lecoœur H, Urashima T, Beckmann J, Gougeon ML, Claret M, le Maire M, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P.
Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis.
Oncogene. 19(25): 2877-2886 (2000).

Chan HL, Tse CH, Mo F, Koh J, Wong VW, Wong GL, Lam Chan S, Yeo W, Sung JJ, Mok TS.
High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma.
J Clin Oncol. 26(2): 177-182 (2008).

Chen YJ, Yeh SH, Chen JT, Wu CC, Hsu MT, Tsai SF, Chen PJ, Lin CH.
Chromosomal changes and clonality relationship between primary and recurrent hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 119(2): 431-440 (2000).

Cheng C, Omura-Minamisawa M, Kang Y, Hara T, Koike I, Inoue T.
Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy.
Cancer Sci. 100(2): 303-309 (2009).

Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C.
A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire.
J Hepatol. 31(1): 133-141 (1999).

Chipuk JE, Green DR.
p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death.
J Clin Immunol. 23(5): 355-361 (2003).

Cillo U, Bassanello M, Vitale A, Grigoletto FA, Burra P, Fagioli S, D'Amico F, Ciarleglio FA, Boccagni P, Brolese A, Zanusi G, D'Amico DF.
The critical issue of hepatocellular carcinoma prognostic classification: which is the best tool available?
J Hepatol. 40(1): 124-131 (2004).

Claudon M, Cosgrove D, Albrecht T, Bolondi L, Bosio M, Calliada F, Correas JM, Darge K, Dietrich C, D'Onofrio M, Evans DH, Filice C, Greiner L, Jäger K, Jong N, Leen E, Lencioni R, Lindsell D, Martegani A, Meairs S, Nolsøe C, Piscaglia F, Ricci P, Seidel G, Skjoldbye B, Solbiati L, Thorelius L, Tranquart F, Weskott HP, Whittingham T.
Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS) - update 2008.
Ultraschall Med. 29(1): 28-44 (2008).

Collette S, Bonnetain F, Paoletti X, Doffoel M, Bouché O, Raoul JL, Rougier P, Masskouri F, Bedenne L, Barbare JC.
Prognosis of advanced hepatocellular carcinoma: comparison of three staging systems in two French clinical trials.
Ann Oncol. 19(6): 1117-1126 (2008).

Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Massironi S, Colucci A, Conte D, Duca P.
Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review.
Am J Gastroenterol. 101(3): 513-523 (2006).

Daniele B, Bencivenga A, Megna AS, Tinessa V.
Alpha-fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 127(5 Suppl 1): 108-112 (2004).

Degli Esposti M, Dive C.
Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak.
Biochem Biophys Res Commun. 304(3): 455-461 (2003).

Deligezer U, Yaman F, Darendeliler E, Dizdar Y, Holdenrieder S, Kovancilar M, Dalay N.
Post-treatment circulating plasma BMP6 mRNA and H3K27 methylation levels discriminate metastatic prostate cancer from localized disease.
Clin Chim Acta. 411(19-20): 1452-1456 (2010).

Devadas S, Das J, Liu C, Zhang L, Roberts AI, Pan Z, Moore PA, Das G, Shi Y.
Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells.
Immunity. 25(2): 237-247 (2006).

Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Balladore E, Terracciano L, Sangiovanni A, Iavarone M, Colombo M, Jang JJ, Yu E, Jin SY, Morengi E, Park YN, Roncalli M.
The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma.
J Hepatol. 50(4): 746-754 (2009).

Dörner K.
Klinische Chemie und Hämatologie.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 7. Auflage (2009).

Ebied OM, Federle MP, Carr BI, Pealer KM, Li W, Amesur N, Zajko A.
Evaluation of responses to chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma.
Cancer. 97(4): 1042-1050 (2003).

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A.
AJCC cancer staging handbook, 7th edition.
Springer-Verlag, New York (2010).

El Khaddari S, Gaudin JL, Abidi H, Picaud G, Rode A, Souquet JC.
Chemoembolization in hepatocellular carcinoma: multivariate analysis of survival prognostic factors after the first session.
Gastroenterol Clin Biol. 26(8-9): 728-734 (2002).

Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R, Mueller SC, von Ruecker A.
Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators.
Int J Cancer. 122(1): 138-143 (2008 A).

Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Kahl P, Perabo FG, Büttner R, Müller SC, Ruecker A.
Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: a prognostic entity.
Cancer Lett. 264(2): 274-280 (2008 B).

Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, Perabo FG, Mueller SC, von Ruecker A, Bastian PJ.
Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer.
J Urol. 181(1): 363-371 (2009).

El-Serag HB, Mason AC.
Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States.
N Engl J Med. 340(10): 745-750 (1999).

Emlen W, Burdick G.
Clearance and organ localization of small DNA anti-DNA immune complexes in mice.
J Immunol 140(6): 1816-1822 (1988).

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S.
A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.
Nature. 391(6662): 43-50 (1998).

Espada J, Esteller M.
DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment.
Semin Cell Dev Biol. 21(2): 238-246 (2010).

Fabregat I.

Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells.
World J Gastroenterol. 15(5): 513-520 (2009).

Fadeel B, Gleiss B, Högstrand K, Chandra J, Wiedmer T, Sims PJ, Henter JI, Orrenius S, Samali A.
Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression.
Biochem Biophys Res Commun. 266(2): 504-511 (1999 A).

Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B.
Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?
Biochem Biophys Res Commun. 266(3): 699-717 (1999 B).

Farinati F, Rinaldi M, Gianni S, Naccarato R.
How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system.
Cancer. 89(11): 2266-2273 (2000).

Farinati F, Marino D, De Giorgio M, Baldan A, Cantarini M, Cursaro C, Rapaccini G, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegnù L, Zoli M, Borzio F, Bernardi M, Trevisani F.
Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither?
Am J Gastroenterol. 101(3): 524-532 (2006).

Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Destouni A, Michailidis Y, Vrettou C, Douroudos II, Avloniti A, Chatzinikolaou A, Taxildaris K, Kanavakis E, Papassotiriou I, Kouretas D.
Time of sampling is crucial for measurement of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise.
Clin Biochem. 43(16-17): 1368-1370 (2010).

Finkelstein SD, Marsh W, Demetris AJ, Swalsky PA, Sasatomi E, Bonham A, Subotin M, Dvorchik I.
Microdissection-based allelotyping discriminates de novo tumor from intrahepatic spread in hepatocellular carcinoma.
Hepatology. 37(4): 871-879 (2003).

Fisher RA, Kulik LM, Freise CE, Lok AS, Shearon TH, Brown RS Jr, Ghobrial RM, Fair JH, Olthoff KM, Kam I, Berg CL; A2ALL Study Group.
Hepatocellular carcinoma recurrence and death following living and deceased donor liver transplantation.
Am J Transplant. 7(6): 1601-1608 (2007).

Forner A, Hessheimer AJ, Isabel Real M, Bruix J.
Treatment of hepatocellular carcinoma.
Crit Rev Oncol Hematol. 60(2): 89-98 (2006).

Forner A, Ayuso C, Varela M, Rimola J, Hessheimer AJ, de Lope CR, Reig M, Bianchi L, Llovet JM, Bruix J.
Evaluation of tumor response after locoregional therapies in hepatocellular carcinoma: are response evaluation criteria in solid tumors reliable?
Cancer. 115(3): 616-623 (2009).

Fournie GJ.

Circulating DNA and lupus nephritis.
Kidney Int. 33(2): 487-497 (1988).

Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, Lauque D, Carles P.
Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours.
Cancer Lett. 91(2): 221-227 (1995).

Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Erkek E, Bozdogan O, Peinado H, Niveleau A, Mao JH, Balmain A, Cano A, Esteller M.
A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors.
Cancer Res. 64(16): 5527-5534 (2004).

- Freeman RB**, Wiesner RH, Edwards E, Harper A, Merion R, Wolfe R.
Results of the first year of the new liver allocation plan.
Liver Transpl. 10(1): 7–15 (2004).
- Gadducci A**, Ferdeghini M, Cosio S, Fanucchi A, Cristofani R, Genazzani AR.
The clinical relevance of serum CYFRA 21-1 assay in patients with ovarian cancer.
Int J Gynecol Cancer. 11(4): 277-282 (2001).
- Gal S**, Fidler C, Lo YM, Taylor M, Han C, Moore J, Harris AL, Wainscoat JS.
Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR.
Br J Cancer. 90(6): 1211–1215 (2004).
- Ganne-Carrié N**, Trinchet JC.
Systemic treatment of hepatocellular carcinoma.
Eur J Gastroenterol Hepatol. 16(3): 275-281 (2004).
- Garcia-Olmo D**, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, Martinez E, Vallejo M.
Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis.
Histol Histopathol. 14(4): 1159–1164 (1999).
- Garcia-Olmo DC**, Ruiz-Piqueras R, Garcia-Olmo D.
Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue.
Histol Histopathol. 19(2): 575–583 (2004).
- Garg AD**, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P.
Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation.
Biochim et Biophys Acta. 1805(1): 53-71 (2010).
- Garrido C**, Kroemer G.
Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins.
Curr Opin Cell Biol. 16(6): 639-646 (2004).
- Gauthier VJ**, Tyler LN, Mannik M.
Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice.
J Immunol. 156(3): 1151–1156 (1996).
- Gautschi O**, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, Ratschiller D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A.
Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy.
J Clin Oncol. 22(20): 4157-4164 (2004).
- Geiger S**, Holdenrieder S, Stieber P, Hamann GF, Bruening R, Ma J, Nagel D, Seidel D.
Nucleosomes as a new prognostic marker in early cerebral stroke.
J Neurol. 254(5): 617-623 (2007).
- Gervais DA**, Kalva S, Thabet A.
Percutaneous image-guided therapy of intra-abdominal malignancy: imaging evaluation of treatment response.
Abdom Imaging. 34(5): 593-609 (2009).
- Glücksmann A**.
Cell deaths in normal vertebrate ontogeny.
Biological Reviews. 26(1): 59-86 (1951).
- Gomaa AI**, Khan SA, Leen EL, Waked I, Taylor-Robinson SD.
Diagnosis of hepatocellular carcinoma.
World J Gastroenterol. 15(11): 1301-1314 (2009).

Grunstein M.

Histone acetylation in chromatin structure and transcription.
Nature. 389(6649): 349-352 (1997).

Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF.

Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA.
J Neural Transm. 117(1): 1-4 (2010).

Hamilton SR, Aaltonen LA.

World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.
IARC Press, Lyon: pp. 158-172 (2000).

Helmberger T, Dogan S, Straub G, Schrader A, Jüngst C, Reiser M, Wagershauser T, Jakobs T, Hoffmann RT, Löhe F, Graeb C, Rau HG, Schauer R, Jauch KW, Caselmann WH, Göke B, Jüngst D.

Liver resection or combined chemoembolization and radiofrequency ablation improve survival in patients with hepatocellular carcinoma.
Digestion. 75(2-3): 104-112 (2007).

Henderson JM, Sherman M, Tavill A, Abecassis M, Chejfec G, Gramlich T.

AHPBA/AJCC consensus conference on staging of hepatocellular carcinoma: consensus statement.
HPB (Oxford). 5(4): 243-250 (2003).

Hengartner MO.

Apoptosis: Corraling the corpses.
Cell. 104(3): 325-328 (2001).

Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, El-Hefnawy T, Kelly L, Luketich JD, Godfrey TE.

Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies.
Clin Chem. 51(1): 113-118 (2005).

Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ.

Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes.
EMBO J. 23(10): 2134-2145 (2004).

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Fertig G, Fürst H, Schmeller N, Untch M, Seidel D.

Nucleosomes in serum as a marker for cell death.
Clin Chem Lab Med. 39(7): 596-605 (2001 A).

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Fürst H, Schalthorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D.

Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases.
Int J Cancer. 95(2): 114-120 (2001 B).

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmueller H, Busch M, von Pawel J, Schalthorn A, Nagel D, Seidel D.

Circulating nucleosomes in serum.
Ann N Y Acad Sci. 945: 93-102 (2001 C).

Holdenrieder S, Stieber P.

Apoptotic markers in cancer.
Clin Biochem. 37(7): 605-617 (2004 A).

Holdenrieder S, Stieber P.

Therapy control in oncology by circulating nucleosomes.
Ann N Y Acad Sci. 1022: 211-216 (2004 B).

Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Seidel D.

Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer.
Clin Cancer Res. 10(18 Pt 1): 5981-5987 (2004 C).

- Holdenrieder S**, Holubec L Jr, Topolcan O, Finek J, Stieber P.
Circulating nucleosomes and cytokeratin 19-fragments in patients with colorectal cancer during chemotherapy.
Anticancer Res. 25(3A): 1795-1801 (2005 A).
- Holdenrieder S**, Stieber P, Chan LY, Geiger S, Kremer A, Nagel D, Lo YM.
Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR.
Clin Chem. 51(8): 1544-1546 (2005 B).
- Holdenrieder S**, Eichhorn P, Beuers U, Samtleben W, Schoenermarck U, Zachoval R, Nagel D, Stieber P.
Nucleosomal DNA fragments in autoimmune diseases.
Ann N Y Acad Sci. 1075: 318-327 (2006 A).
- Holdenrieder S**, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Seidel D.
Early and specific prediction of the therapeutic efficiency in non-small cell lung cancer by nucleosomal DNA and cytokeratin-19 fragments.
Ann N Y Acad Sci. 1075: 244-275 (2006 B).
- Holdenrieder S**, von Pawel J, Dankelmann E, Duell T, Faderl B, Markus A, Siakavara M, Wagner H, Feldmann K, Hoffmann H, Raith H, Nagel D, Stieber P.
Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer.
Clin Cancer Res. 14(23): 7813-7821 (2008).
- Holdenrieder S**, von Pawel J, Dankelmann E, Duell T, Faderl B, Markus A, Siakavara M, Wagner H, Feldmann K, Hoffmann H, Raith H, Nagel D, Stieber P.
Nucleosomes and CYFRA 21-1 indicate tumor response after one cycle of chemotherapy in recurrent non-small cell lung cancer.
Lung Cancer. 63(1): 128-135 (2009 A).
- Holdenrieder S**, Stieber P.
Clinical use of circulating nucleosomes.
Crit Rev Clin Lab Sci. 46(1): 1-24 (2009 B).
- Hotchkiss RS**, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE.
Cell death.
N Engl J Med. 361(16): 1570-1583 (2009).
- Ikai I**, Arii S, Kojiro M, Ichida T, Makuuchi M, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Okita K, Omata M, Takayasu K, Yamaoka Y.
Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey.
Cancer. 101(4): 796-802 (2004).
- Imamura H**, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, Sugawara Y, Minagawa M, Takayama T, Kawasaki S, Makuuchi M.
Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy.
J Hepatol. 38(2): 200-207 (2003).
- Ishii H**, Okada S, Nose H, Okusaka T, Nagahama H, Nakayama H, Nakasuka H, Yoshimori M.
Predictive factors for recurrence after percutaneous ethanol injection for solitary hepatocellular carcinoma.
Hepatogastroenterology. 43(10): 938-943 (1996).
- Jahr S**, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R.
DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells.
Cancer Res. 61(4): 1659-1665 (2001).

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM.

Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 410(6828): 549-554 (2001).

Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E.

Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol*. 21(1): 165–170 (2002).

Kern MA, Breuhahn K, Schuchmann M, Schirmacher P.

Molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms: Ansatzpunkte für neue Therapien und prädiktive Pathologie.

Der Pathologe. 28(4): 261-268 (2007).

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4): 239-257 (1972).

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV.

Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 73(8): 2013-2026 (1994).

Khien VV, Mao HV, Chinh TT, Ha PT, Bang MH, Lac BV, Hop TV, Tuan NA, Don LV, Taketa K, Satomura S.

Clinical evaluation of lentil lectin-reactive alpha-fetoprotein-L3 in histology-proven hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers*. 16(2): 105-111 (2001).

Khorasanizadeh S.

The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 116(2): 259-272 (2004).

Kim T, Murakami T, Takahashi S, Tsuda K, Tomoda K, Narumi Y, Oi H, Sakon M, Nakamura H.

Optimal phases of dynamic CT for detecting hepatocellular carcinoma: evaluation of unenhanced and triple-phase images.

Abdom Imaging. 24(5): 473-480 (1999).

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME.

Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.

EMBO J. 14(22): 5579-5588 (1995).

Kolligs FT, Büchler P, Haraida S, Hoffmann R, Helmberger T, op den Winkel M, Tympner C, Zech C, Graeb C. *Manual Gastrointestinale Tumore: Primäre Lebermalignome*.

Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag, München (2010).

Kornberg RD, Lorch Y.

Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 98(3): 285-294 (1999).

Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T.

Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 101(10): 2087–2092 (2010).

Kremer A, Wilkowski R, Holdenrieder S, Nagel D, Stieber P, Seidel D.

Nucleosomes in pancreatic cancer patients during radiochemotherapy. *Tumour Biol*. 26(1): 44-49 (2005).

- Kremer A**, Holdenrieder S, Stieber P, Wilkowski R, Nagel D, Seidel D.
Nucleosomes in colorectal cancer patients during radiochemotherapy.
Tumour Biol. 27(5): 235-242 (2006).
- Kroemer G**, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death.
Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.
Cell Death Differ. 12 Suppl 2: 1463-1467 (2005).
- Kumada T**, Nakano S, Takeda I, Kiriya S, Sone Y, Hayashi K, Katoh H, Endoh T, Sassa T, Satomura S.
Clinical utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinoma: special reference to imaging diagnosis.
J Hepatol. 30(1): 125-130 (1999).
- Kuroi K**, Tanaka C, Toi M.
Plasma Nucleosome Levels in Node-Negative Breast Cancer Patients.
Breast Cancer. 6(4): 361-364 (1999).
- Kuroi K**, Tanaka C, Toi M.
Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients.
Int J Oncol. 19(1): 143-148 (2001).
- Kuropkat C**, Lippert BM, Werner JA.
Follow-up with serum CYFRA 21-1 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck.
Oncology. 63(3): 280-285 (2002).
- Lamerz R**, Runge M, Stieber P, Meissner E.
Use of serum PIVKA-II (DCP) determination for differentiation between benign and malignant liver diseases.
Anticancer Res. 19(4A): 2489-2493 (1999).
- Lee MN**, Jung EY, Kwun HJ, Jun HK, Yu DY, Choi YH, Jang KL.
Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF-beta pathway.
J Gen Virol. 83(Pt 9): 2145-2151 (2002 A).
- Lee TK**, Lau TC, Ng IO.
Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines.
Cancer Chemother Pharmacol. 49(1): 78-86 (2002 B).
- Lee S**, Ahn C, Ha T, Moon D, Choi K, Song G, Chung D, Park G, Yu Y, Choi N, Kim K, Kim K, Hwang S.
Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Korean experience.
J Hepatobiliary Pancreat Sci. 17(5): 539-547 (2010).
- Leist M**, Nicotera P.
The shape of cell death.
Biochem Biophys Res Commun. 236(1): 1-9 (1997).
- Leist M**, Jäättelä M.
Four deaths and funeral: from caspases to alternative mechanisms.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2(8): 589-598 (2001).
- Lencioni RA**, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, Frings H, Laubenberger J, Zuber I, Blum HE, Bartolozzi C.
Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection.
Radiology. 228(1): 235-240 (2003).
- Lencioni R**, Cioni D, Crocetti L, Franchini C, Pina CD, Lera J, Bartolozzi C.
Early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation.
Radiology. 234(3): 961-967 (2005).

Leung WT, Lau WY, Ho S, Chan M, Leung N, Lin J, Ho KC, Metreweli C, Johnson PJ, Li AK.
Selective internal radiation therapy with intra-arterial iodine-131-lipiodol in inoperable hepatocellular carcinoma.
J Nucl Med. 35(8): 1313–1318 (1994).

Li LY, Luo X, Wang X.
Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.
Nature. 412(6842): 95-99 (2001).

Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR.
Circulating nucleic acids and apoptosis.
Ann N Y Acad Sci. 945: 239–249 (2001).

Lieberman J, Fan Z.
Nuclear war: the granzyme A-bomb.
Curr Opin Immunol. 15(5): 553-559 (2003).

Ligato S, Mandich D, Cartun RW.
Utility of glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from other primary and metastatic lesions in FNA of the liver: an immunocytochemical study.
Mod Pathol. 21(5): 626-631 (2008).

Llovet JM, Brú C, Bruix J.
Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification.
Semin Liver Dis. 19(3): 329-338 (1999 A).

Llovet JM, Fuster J, Bruix J.
Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation.
Hepatology. 30(6): 1434–1440 (1999 B).

Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Solà R, Rodés J, Bruix J; Barcelona Liver Cancer Group.
Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial.
Lancet. 359(9319): 1734–1739 (2002).

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J.
Hepatocellular carcinoma.
Lancet. 362(9399): 1907–1917 (2003 A).

Llovet JM, Bruix J.
Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival.
Hepatology. 37(2): 429–442 (2003 B).

Llovet JM, Chen Y, Wurmbach W, Roayaie S, Fiel I, Schwartz M, Thung SN, Khitrov G, Zhang W, Villanueva A, Battiston C, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Friedman SL.
A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV-cirrhosis.
Gastroenterology. 131(6): 1758–1767 (2006).

Llovet JM, Bruix J.
Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008.
J Hepatol. 48 Suppl 1: 20-37 (2008).

Lo YM, Chan LY, Chan AT, Leung SF, Lo KW, Zhang J, Lee JC, Hjelm NM, Johnson PJ, Huang DP.
Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma.
Cancer Res. 59(21): 5452-5455 (1999).

- Lo YM**, Leung SF, Chan LY, Chan AT, Lo KW, Johnson PJ, Huang DP.
Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy of nasopharyngeal carcinoma.
Cancer Res. 60(9): 2351-2355 (2000).
- Lockshin RA**, Williams CM.
Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms.
J Insect Physiol. 10(4): 643-649 (1964).
- Lögters T**, Margraf S, Altrichter J, Cinatl J, Mitzner S, Windolf J, Scholz M.
The clinical value of neutrophil extracellular traps.
Med Microbiol Immunol. 198(4): 211–219 (2009).
- Lopez Hänninen E**, Vogl TJ, Bechstein WO, Guckelberger O, Neuhaus P, Lobeck H, Felix R.
Biphasic spiral computed tomography for detection of hepatocellular carcinoma before resection or orthotopic liver transplantation.
Invest Radiol. 33(4): 216-221 (1998).
- Lu W**, Li YH, He XF, Zhao JB, Chen Y, Mei QL.
Necrosis and apoptosis in hepatocellular carcinoma following low-dose versus high-dose preoperative chemoembolization.
Cardiovasc Intervent Radiol. 31(6): 1133-1140 (2008).
- Luger K.**
Structure and dynamic behaviour of nucleosomes.
Curr Opin Genet Dev. 13(2): 127-135 (2003).
- Luger K.**
Dynamic nucleosomes.
Chromosome Res. 14(1): 5-16 (2006).
- Ma C**, Bandukwala S, Burman D, Bryson J, Seccareccia D, Banerjee S, Myers J, Rodin G, Dudgeon D, Zimmermann C.
Interconversion of three measures of performance status: An empirical analysis.
Eur J Cancer. 46(18): 3175-3183 (2010).
- Macanovic M**, Lachmann PJ.
Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay.
Clin Exp Immunol. 108(2): 220–226 (1997).
- Mac Sween RNM**, Burt A, Portmann B.
Pathology of the Liver, 5th edition.
Churchill Livingstone, London, Edinburgh, New York (2007).
- Maebo A.**
Plasma DNA level as a tumor marker in primary lung cancer.
Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi. 28(8): 1085–1091 (1990).
- Mahnken AH**, Bruners P, Günther RW.
Local ablative therapies in HCC: percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation.
Dig Dis. 27(2): 148-156 (2009).
- Maiuri MC**, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G.
Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.
Nat Rev Mol Cell Biol. 8(9): 741-752 (2007).
- Marelli L**, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, Tibballs J, Meyer T, Patch DW, Burroughs AK.
Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies.
Cardiovasc Intervent Radiol. 30(1): 6-25 (2007).

- Marrero JA**, Lok AS.
Newer markers for hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 127(5 Suppl 1): 113–119 (2004).
- Mazzaferro V**, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L.
Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis.
N Engl J Med. 334(11): 693–699 (1996).
- Miller AB**, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A.
Reporting results of cancer treatment.
Cancer. 47(1): 207-214 (1981).
- Miranda KC**, Bond DT, McKee M, Skog J, Paunescu TG, Da Silva N, Brown D, Russo LM.
Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease.
Kidney Int. 78(2): 191–199 (2010).
- Moll R**, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R.
The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.
Cell. 31(1): 11–24 (1982).
- Moll UM**, Wolff S, Speidel D, Deppert W.
Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53.
Curr Opin Cell Biol. 17(6): 631-636 (2005).
- Müller S**, Holdenrieder S, Stieber P, Haferlach T, Schalhorn A, Braess J, Nagel D, Seidel D.
Early prediction of therapy response in patients with acute myeloid leukemia by nucleosomal DNA fragments.
BMC Cancer. 6: 143 (2006).
- Murakami T**, Mochizuki K, Nakamura H.
Imaging evaluation of the cirrhotic liver.
Semin Liver Dis. 21(2): 213–224 (2001).
- Nakashima T**, Kojiro M.
Hepatocellular carcinoma: An atlas of its pathology.
Springer-Verlag, Tokyo (1987).
- Neuhaus P**, Wittekind C.
Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltraktes II: Multimodale klinische Prognosemodelle bei HCC.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1.Auflage (2007).
- Okada S**, Shimada K, Yamamoto J, Takayama T, Kosuge T, Yamasaki S, Sakamoto M, Hirohashi S.
Predictive factors for postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 106(6): 1618–1624 (1994).
- 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. 56(4): 918-928 (1985).
- Okuda N**, Nakao A, Takeda S, Oshima K, Kanazumi N, Nonami T, Kurokawa T, Takagi H.
Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA during perioperative period in HCC.
Hepatogastroenterology. 46(25): 381-386 (1999).
- Ozkan A**, Fişkin K.
Epirubicin HCl toxicity in human-liver derived hepatoma G2 cells.
Pol J Pharmacol. 56(4): 435-444 (2004).
- Pandolfi PP**.
Histone deacetylases and transcriptional therapy with their inhibitors.
Cancer Chemother Pharmacol. 48 Suppl 1: 17-19 (2001).

- Parkin DM**, Bray F, Ferlay J, Pisani P.
Global cancer statistics, 2002.
CA Cancer J Clin. 55(2): 74-108 (2005).
- Pellicciari C**, Bottone MG, Biggiogera M.
Detection of apoptotic cells by annexin V labeling at electron microscopy.
Eur J Histochem. 41(3): 211-216 (1997).
- Plati J**, Bucur O, Khosravi-Far R.
Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy.
Integr Biol (Camb). 3(4): 279-296 (2011).
- Plattner H**, Hentschel J.
Taschenlehrbuch Zellbiologie.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1. Auflage (1997).
- Pompili M**, Riccardi L, Semeraro S, Orefice R, Elia F, Barbaro B, Covino M, Grieco A, Gasbarrini G, Rapaccini GL.
Contrast-enhanced ultrasound assessment of arterial vascularization of small nodules arising in the cirrhotic liver.
Dig Liver Dis. 40(3): 206-215 (2008).
- Portela A**, Esteller M.
Epigenetic modifications and human disease.
Nat Biotechnol. 28(10): 1057-1068 (2010).
- Rainer TH**, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, Lo YM.
Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke.
Clin Chem. 49(4): 562-569 (2003).
- Raoul JL**, Guyader D, Bretagne JF, Heautot JF, Duvauferrier R, Bourguet P, Bekhechi D, Deugnier YM, Gosselin M.
Prospective randomized trial of chemoembolization versus intra-arterial injection of ¹³¹I-labeled-iodized oil in the treatment of hepatocellular carcinoma.
Hepatology. 26(5): 1156-1161 (1997).
- Ren N**, Ye QH, Qin LX, Zhang BH, Liu YK, Tang ZY.
Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients.
World J Gastroenterol. 12(24): 3911-3914 (2006).
- Richards DA**, Boehm KA, Waterhouse DM, Wagener DJ, Krishnamurthi SS, Rosemurgy A, Grove W, Macdonald K, Gulyas S, Clark M, Dasse KD.
Gemcitabine plus CI-994 offers no advantage over gemcitabine alone in the treatment of patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study.
Ann Oncol. 17(7): 1096-1102 (2006).
- Rumore P**, Muralidhar B, Lin M, Lai C, Steinman CR.
Hemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA: oligonucleosome-like structure and clearance.
Clin Exp Immunol. 90(1): 56-62 (1992).
- Saar B**, Kellner-Weldon F.
Radiological diagnosis of hepatocellular carcinoma.
Liver Int. 28(2): 189-199 (2008).
- Sacco R**, Bertini M, Petruzzi P, Bertoni M, Bargellini I, Bresci G, Federici G, Gambardella L, Metrangolo S, Parisi G, Romano A, Scaramuzzini A, Tumino E, Silvestri A, Altomare E, Vignali C, Capria A.
Clinical impact of selective transarterial chemoembolization on hepatocellular carcinoma: a cohort study.
World J Gastroenterol. 15(15): 1843-1848 (2009).

- Saelens X**, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P.
Toxic proteins released from mitochondria in cell death.
Oncogene. 23(16): 2861-2874 (2004).
- Sakahira H**, Enari M, Nagata S.
Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.
Nature. 391(6662): 96-99 (1998).
- Sala M**, Llovet JM, Vilana R, Bianchi L, Solé M, Ayuso C, Brú C, Bruix J; Barcelona Clínic Liver Cancer Group.
Initial response to percutaneous ablation predicts survival in patients with hepatocellular carcinoma.
Hepatology. 40(6): 1352–1360 (2004).
- Sarasin FP**, Majno PE, Llovet JM, Bruix J, Mentha G, Hadengue A.
Living donor liver transplantation for early hepatocellular carcinoma: a life-expectancy and cost-effectiveness perspective.
Hepatology. 33(5): 1073–1079 (2001).
- Saraste A**, Pulkki K.
Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis.
Cardiovasc Res. 45(3): 528-537 (2000).
- Scaffidi C**, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME.
The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis.
J Biol Chem. 274(3): 1541-1548 (1999).
- Schöniger-Hekele M**, Müller C, Kutilek M, Oesterreicher C, Ferenci P, Gangl A.
Hepatocellular carcinoma in Central Europe: prognostic features and survival.
Gut. 48(1): 103-109 (2001).
- Schuler M, Green DR**.
Mechanisms of p53-dependent apoptosis.
Biochem Soc Trans. 29(Pt 6): 684-688 (2001).
- Schulte-Frohlinde E**, Gerbes A, Haraida S, Lersch C, Zech CJ, Löhe F, Berger H, Lamerz R, Stangl M.
Manual Gastrointestinale Tumore: Primäre Lebermalignome.
Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München (2006).
- Schwartz M**.
Liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma.
Liver Transpl. 10(2 Suppl 1): 81-85 (2004).
- Schwarzenbach H**, Stoehlmacher J, Pantel K, Goekkurt E.
Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer.
Ann N Y Acad Sci. 1137: 190-196 (2008).
- Shapiro RS**, Katz R, Mendelson DS, Halton KP, Schwartz ME, Miller CM.
Detection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: sensitivity of CT and ultrasonography.
J Ultrasound Med. 15(7): 497-502 (1996).
- Sheard MA**, Vojtesek B, Simickova M, Valik D.
Release of cytokeratin-18 and -19 fragments (TPS and CYFRA 21-1) into the extracellular space during apoptosis.
J Cell Biochem. 85(4): 670-677 (2002).
- Sherman M**.
The radiological diagnosis of hepatocellular carcinoma.
Am J Gastroenterol. 105(3): 610-612 (2010).

- Shiina S**, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, Ishikawa T, Koike Y, Yoshida H, Kawabe T, Omata M.
A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma.
Gastroenterology. 129(1): 122–130 (2005).
- Shiio Y**, Eisenman RN.
Histone sumoylation is associated with transcriptional repression.
Proc Natl Acad Sci U S A. 100(23): 13225-13230 (2003).
- Silva JM**, Silva J, Sanchez A, Garcia JM, Dominguez G, Provencio M, Sanfrutos L, Jareño E, Colas A, España P, Bonilla F.
Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease free survival.
Clin Cancer Res. 8(12): 3761–3766 (2002).
- Silva MA**, Hegab B, Hyde C, Guo B, Buckels JA, Mirza DF.
Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis.
Gut. 57(11): 1592-1596 (2008).
- Simpson RJ**, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S.
Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential.
Expert Rev Proteomics. 6(3): 267-283 (2009).
- Sionov RV**, Haupt Y.
The cellular response to p53: The decision between life and death.
Oncogene. 18(45): 6145-6157 (1999).
- Snowberger N**, Chinnakotla S, Lepe RM, Peattie J, Goldstein R, Klintmalm GB, Davis GL.
Alpha fetoprotein, ultrasound, computerized tomography and magnetic resonance imaging for detection of hepatocellular carcinoma in patients with advanced cirrhosis.
Aliment Pharmacol Ther. 26(9): 1187-1194 (2007).
- Sobin LH**, Gospodarowicz K, Wittekind C.
UICC: TNM classification of malignant tumors, 7th edition.
Wiley-Blackwell, Oxford (2009).
- Song TJ**, Ip EW, Fong Y.
Hepatocellular carcinoma: current surgical management.
Gastroenterology. 127(5 Suppl 1): 248–260 (2004).
- Sozzi G**, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, Pierotti MA, Tavecchio L.
Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients.
Cancer Res. 61(12): 4675–4678 (2001).
- Speidel D**, Helmbold H, Deppert W.
Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress.
Oncogene. 25(6): 940-953 (2006).
- Sperandio S**, de Belle I, Bredesen DE.
An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death.
Proc Natl Acad Sci U S A. 97(26): 14376-14381 (2000).
- Stieber P**, Dienemann H, Hasholzner U, Fabricius PG, Schambeck C, Weinzierl M, Poley S, Samtleben W, Hofmann K, Meier W.
Comparison of CYFRA 21-1, TPA and TPS in lung cancer, urinary bladder cancer and benign diseases.
Int J Biol Markers. 9(2): 82–88 (1994).
- Stieber P**.
Sensible use of tumor markers.
J Lab Med. 25(9-10): 327-336 (2001).

Stieber P.

<http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Institut-fuer-Klinische-Chemie/Onkologische-Labordiagnostik/de/einsatz-tm/Tumormarker/marker-cyfra.html> (2000).

Strahl BD, Allis CD.

The language of covalent histone modifications.
Nature. 403(6765): 41-45 (2000).

Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P.

The origin and mechanism of circulating DNA.
Ann N Y Acad Sci. 906: 161–168 (2000).

Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, Lamerz R, Fritsche HA, Gaarenstroom K, Bonfrer J, Ecke TH, Grossman HB, Hayes P, Hoffmann RT, Lerner SP, Löhle F, Louhimo J, Sawczuk I, Taketa K, Diamandis EP.
National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers.
Clin Chem. 56(6): 1-48 (2010).

Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK.

Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways.
Oncogene. 20(17): 2122-2133 (2001).

Sumida M, Ohto M, Ebara M, Kimura K, Okuda K, Hirooka N.

Accuracy of angiography in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma.
AJR Am J Roentgenol. 147(3): 531-536 (1986).

Takayasu K, Shima Y, Muramatsu Y, Goto H, Moriyama N, Yamada T, Makuuchi M, Yamasaki S, Hasegawa H, Okazaki N.

Angiography of small hepatocellular carcinomas: analysis of 105 resected tumors.
AJR Am J Roentgenol. 147: 525-529 (1986).

Taketa K, Okada S, Win N, Hlaing NK, Wind KM.

Evaluation of tumor markers for the detection of hepatocellular carcinoma in Yangon General Hospital, Myanmar.
Acta Med Okayama. 56(6): 317-320 (2002).

Tannapfel A, Wittekind C.

Pathologie des hepatozellulären Karzinoms.
Chir Gastroenterol. 19: 225-230 (2003).

Tanner JE.

Nucleosomes activate NF-kappaB in endothelial cells for induction of the proangiogenic cytokine IL-8.
Int J Cancer. 112(1): 155–160 (2004).

Tateishi R, Yoshida H, Shiina S, Imamura H, Hasegawa K, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Makuuchi M, Omata M.

Proposal of a new prognostic model for hepatocellular carcinoma: an analysis of 403 patients.
Gut. 54(3): 419-425 (2005).

Tateishi R, Yoshida H, Matsuyama Y, Mine N, Kondo Y, Omata M.

Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma: a systematic review.
Hepatol Int. 2(1): 17-30 (2008).

Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G.

Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death.
Cell Death Differ. 15(1): 3-12 (2008).

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG.
New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada.
J Natl Cancer Inst 92(3): 205-216 (2000).

Thomas L.

Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.
TH-Books Verlag, Frankfurt, 7. Auflage (2007).

Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT.
NLRs at the intersection of cell death and immunity.
Nat Rev Immunol. 8(5): 372-379 (2008).

Trapani JA, Smyth MJ.

Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.
Nat. Rev. Immunol. 2(10): 735-747 (2002).

Trejo-Becerril C, Oñate-Ocaña LF, Taja-Chayeb L, Vanoye-Carlo A, Cetina L, Duenas-Gonzalez A.
Serum nucleosomes during neoadjuvant chemotherapy in patients with cervical cancer. Predictive and prognostic significance.
BMC Cancer. 5: 65 (2005).

Uenishi T, Yamazaki O, Yamamoto T, Hirohashi K, Tanaka H, Tanaka S, Hai S, Ono K, Kubo S.
Clinical significance of serum cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21-1) in hepatocellular carcinoma.
J Hepatobiliary Pancreat Surg. 13(3): 239-244 (2006).

Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP.
Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.
Cytometry. 31(1): 1-9 (1998).

Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P.
The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.
Cell Death Differ. 9(10): 1031-1042 (2002).

Van Nieuwenhuijze AE, van Lopik T, Smeenk RJ, Aarden LA.

Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus.
Ann Rheum Dis. 62(1): 10-14 (2003).

Varela M, Real M, Burrell M, Forner A, Sala M, Brunet M, Ayuso C, Castells L, Montañá X, Llovet J, Bruix J.
Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics.
J Hepatol. 46(3): 474-481 (2007).

Vilana R, Bruix J, Bru C, Ayuso C, Sole M, Rodes J.

Tumor size determines the efficacy of percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma.
Hepatology. 16(2): 353-357 (1992).

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.

Surfing the p53 network.
Nature. 408(6810): 307-310 (2000).

Vogl TJ, Eichler K, Zangos S, Mack M, Hammerstingl R.

Hepatocellular carcinoma: Role of imaging diagnostics in detection, intervention and follow-up.
Rofo 174(11): 1358-1368 (2002).

Vogl TJ, Naguib NN, Nour-Eldin NE, Rao P, Emami AH, Zangos S, Nabil M, Abdelkader A.
Review on transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: palliative, combined, neoadjuvant, bridging, and symptomatic indications.
Eur J Radiol. 72(3): 505-516 (2009).

Vogt C.

Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*).
Jent und Gassman, Solothurn (1842).

Volk ML, Hernandez JC, Su GL, Lok AS, Marrero JA.

Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3.
Cancer Biomark. 3(2): 79-87 (2007).

Vossen JA, Buijs M, Kamel IR.

Assessment of tumor response on MR imaging after locoregional therapy.
Tech Vasc Interv Radiol. 9(3): 125-132 (2006).

Vousden KH, Lu X.

Live or let die: the cell's response to p53.
Nat Rev Cancer. 2(8): 594-604 (2002).

Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Bréchet C.

Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma.
Nature. 343(6258): 555-557 (1990).

Wang JH, Changchien CS, Hu TH, Lee CM, Kee KM, Lin CY, Chen CL, Chen TY, Huang YJ, Lu SN.

The efficacy of treatment schedules according to Barcelona Clinic Liver Cancer staging for hepatocellular carcinoma - Survival analysis of 3892 patients.
Eur J Cancer. 44(7): 1000-1006 (2008).

Wimberger P, Roth C, Pantel K, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, Schwarzenbach H.

Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients.
Int J Cancer. 128(11): 2572-2580 (2011).

Wörns MA, Galle PR.

Future perspectives in hepatocellular carcinoma.
Dig liver dis. 42 Suppl 3: 302-309 (2010).

Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT.

Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range.
Clin Chim Acta. 321(1-2): 77-87 (2002 A).

Wu F, Nishioka M, Fujita J, Murota M, Ohtsuki Y, Ishida T, Kuriyama S.

Expression of cytokeratin 19 in human hepatocellular carcinoma cell lines.
Int J Oncol. 20(1): 31-37 (2002 B).

Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G.

The apoptosis endonuclease and its regulation.
Semin Immunol. 4(6): 389-397 (1992).

Yao DF, Dong ZZ, Yao M.

Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma.
Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 6(3): 241-247 (2007).

Yoon SH, Lee JM, So YH, Hong SH, Kim SJ, Han JK, Choi BI.

Multiphasic MDCT enhancement pattern of hepatocellular carcinoma smaller than 3 cm in diameter: tumor size and cellular differentiation.
AJR Am J Roentgenol. 193(6): 482-489 (2009).

Yu SC, Yeung DT, So NM.

Imaging features of hepatocellular carcinoma.

Clin Radiol. 59(2): 145-156 (2004).

Yuen MF, Poon RT, Lai CL, Fan ST, Lo CM, Wong KW, Wong WM, Wong BC.

A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma.

Hepatology. 36(3): 687-691 (2002).

Zachariah R, Schmid S, Radpour R, Buerki N, Fan AX, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY.

Circulating cell-free DNA as a potential biomarker for minimal and mild endometriosis.

Reprod Biomed Online. 18(3): 407-411 (2009).

Zeerleder S, Zwart B, Wuillemin WA, Aarden LA, Groeneveld AB, Caliezi C, van Nieuwenhuijze AE, van Mierlo GJ, Eerenberg AJ, Lämmle B, Hack CE.

Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis.

Crit Care Med. 31(7): 1947-1951 (2003).

Zhang Y.

Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination.

Genes Dev. 17(22): 2733-2740 (2003).

Zhao H, Yao JL, Wang Y, Zhou KR.

Detection of small hepatocellular carcinoma: comparison of dynamic enhancement magnetic resonance imaging and multiphase multirow-detector helical CT scanning.

World J Gastroenterol. 13(8): 1252-1256 (2007).

Zhou L, Liu J, Luo F.

Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma.

World J Gastroenterol. 12(8): 1175-1181 (2006).

Zitt M, Müller HM, Rochel M, Schwendinger V, Zitt M, Goebel G, Devries A, Margreiter R, Oberwalder M, Zeillinger R, Ofner D.

Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative chemoradiation: a potential diagnostic tool for therapy monitoring.

Dis Markers. 25(3): 159-165 (2008).

Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G.

Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway.

Clin Cancer Res. 16(12): 3100-3104 (2010).

Zuber-Jerger I, Geissler M, Spangenberg HC, Mohr L, Weizsäcker F, Blum HE.

Local ablation of malignant lesions of the liver - potential applications and limitations of the different methods.

Z Gastroenterol. 42(1): 31-38 (2004).

8 Anhang

8.1 Einzelverläufe aller transarterieller Chemoembolisationen

Im Folgenden sind zusätzlich die Einzelverläufe aller in der Studie eingeschlossenen Patienten und ihrer einzelnen Therapien abgebildet. Alle Verläufe der einzelnen Laborparameter vor Beginn der Therapie, drei, sechs und 24 Stunden nach Therapie sind dargestellt. Pro Seite sind jeweils die Verläufe der Biomarker eines Patienten abgebildet. Dabei befinden sich oben links die absoluten Wertelagen und oben rechts die relativen Wertelagen der drei verschiedenen Nukleosomenmessungen. Die übrigen Werte wurden aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen in relativen Werten angegeben. Die Referenzwerte sind in jeder Graphik, wie auch bei den relativen Nukleosomenwerten, oben links integriert und beziehen sich auf den jeweils gemessenen Wert vor Therapiebeginn. Somit ist der prätherapeutische Wert aller relativen Werte eins. In der linken, mittleren Graphik werden die Verläufe von AFP, LDH, CYFRA 21-1 und CRP und in der rechten, mittleren Graphik die Verläufe der Parameter Amylase, Lipase und CHE veranschaulicht. Des Weiteren zeigt die Graphik links unten die Leberwerte GOT, GPT und GLDH die Graphik rechts unten Bilirubin, GGT und aP. Zusätzlich werden am Ende jeder Seite die Patienten mit Alter, Geschlecht, Therapienummer (aktuelle Nummer der in der Studie erfassten Therapien), Therapieart (alleinige TACE oder TACE in Kombination mit RFA) und Therapieansprechen beschrieben.

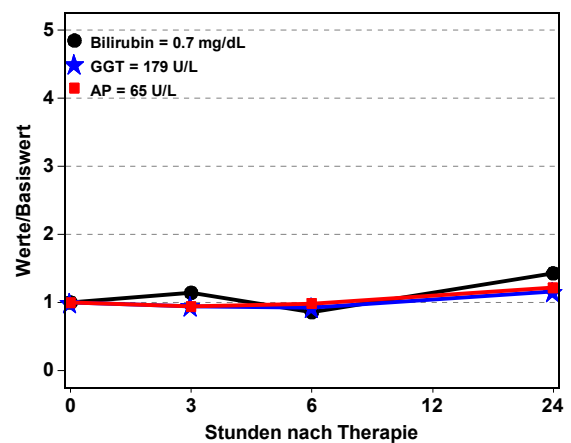
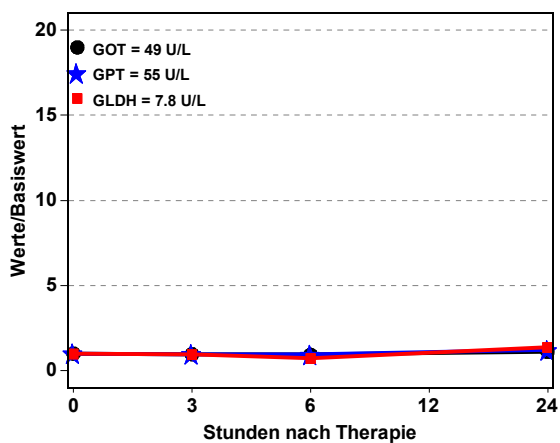
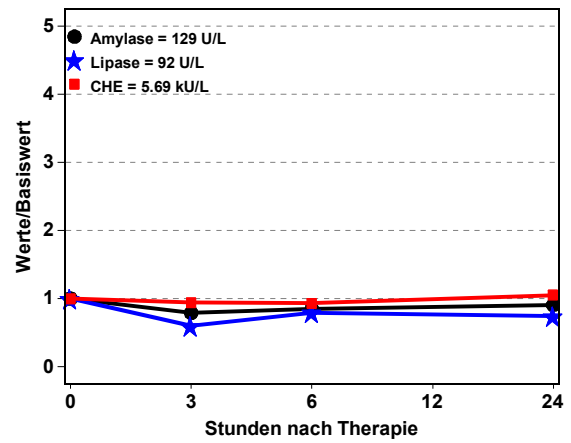
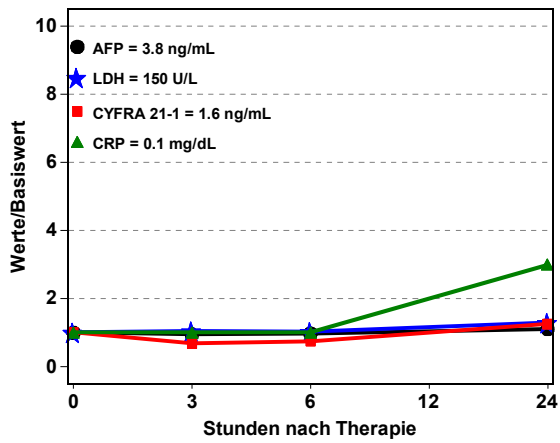
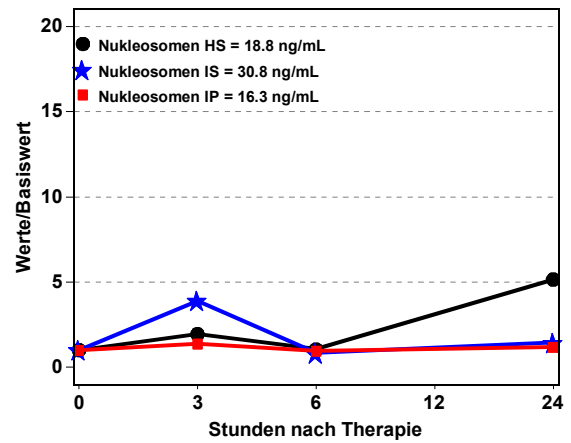
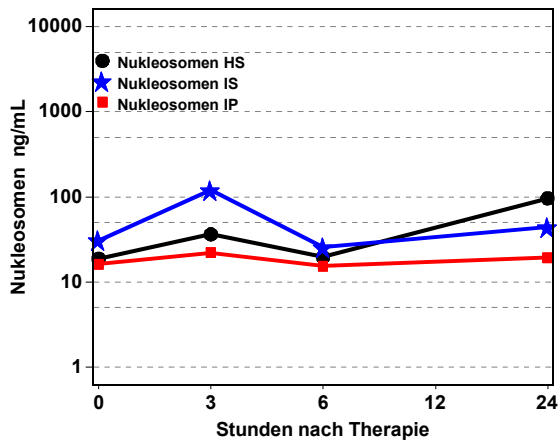


Abbildung 84 Patient 1, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation+RFA, Status: CR

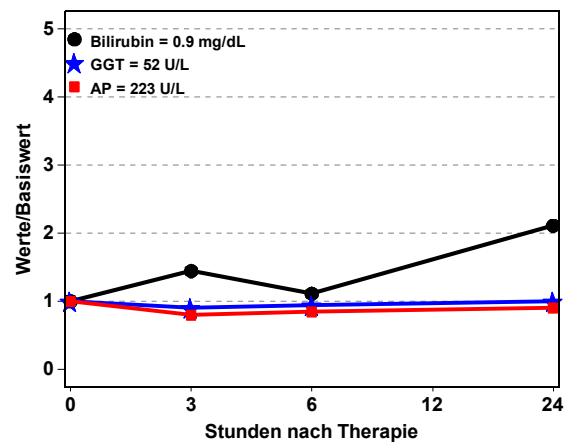
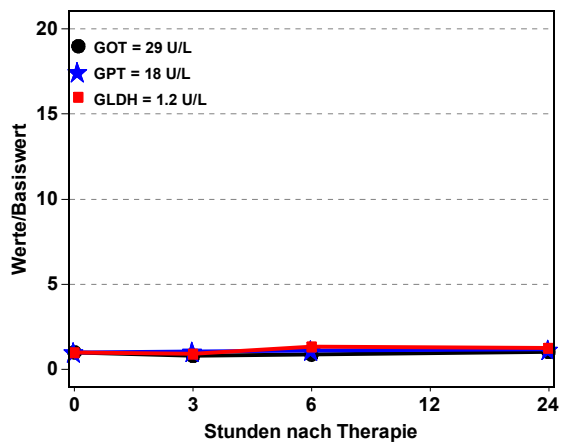
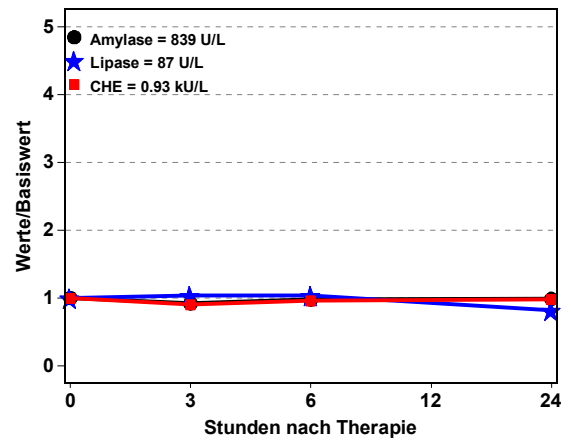
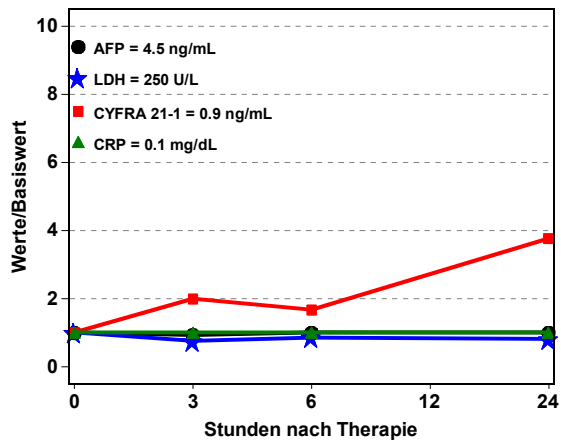
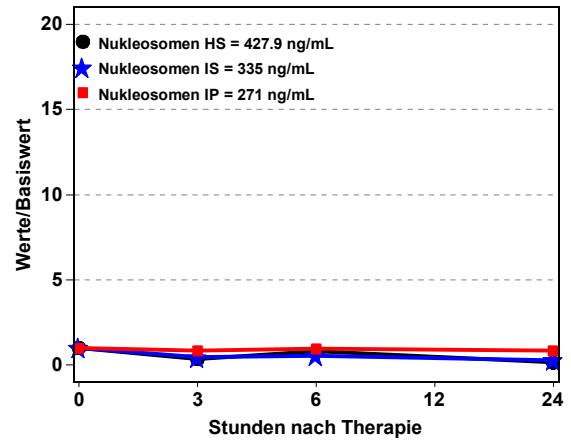
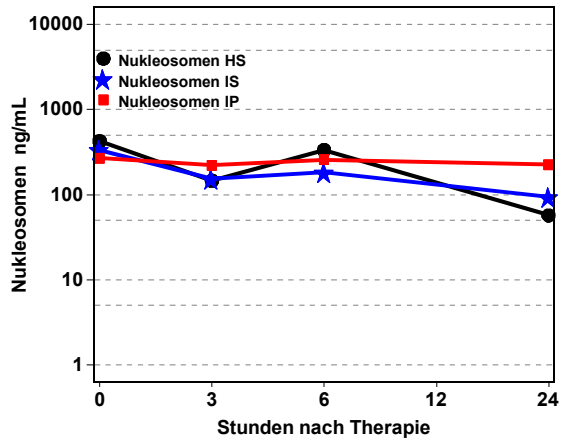


Abbildung 85 Patient 2, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation+RFA, Status: PR

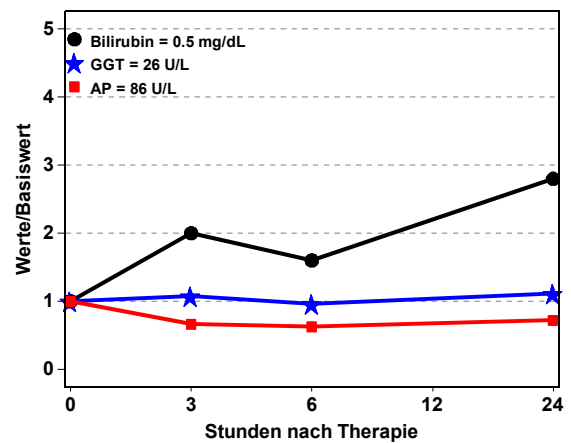
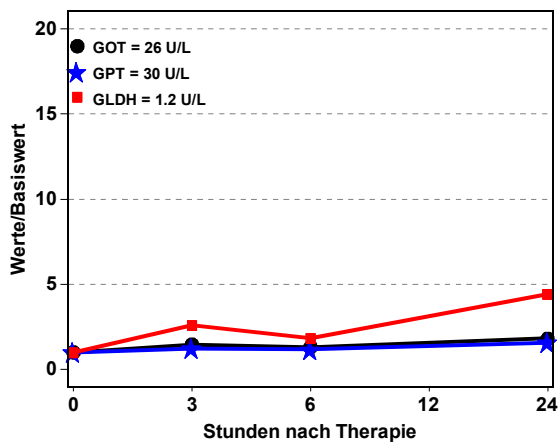
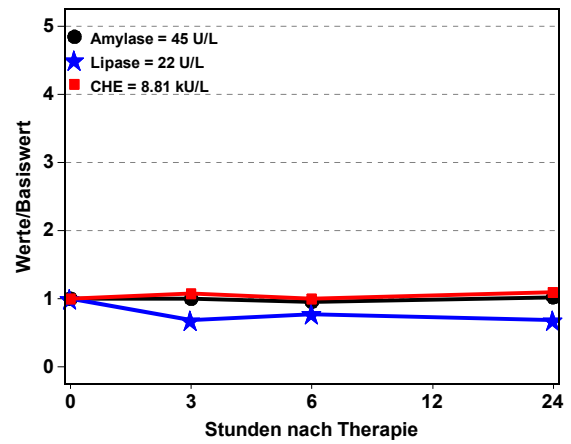
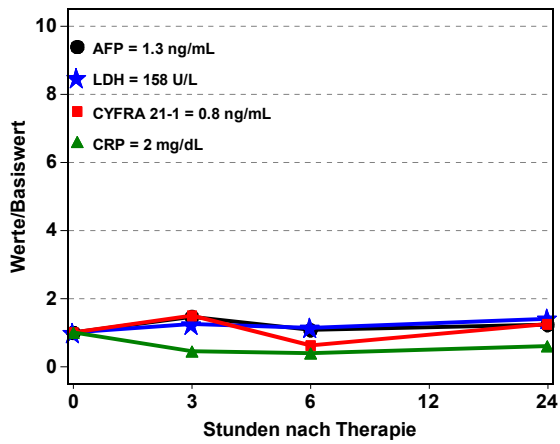
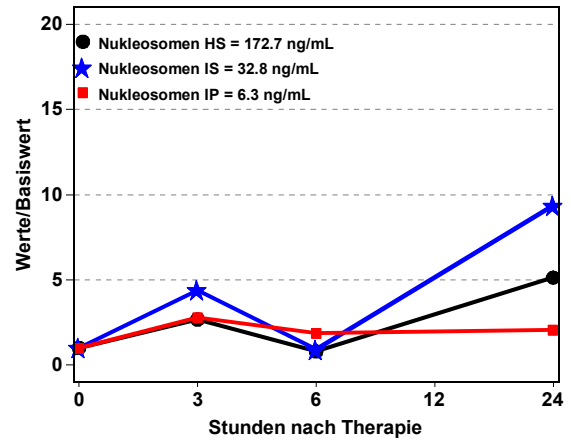
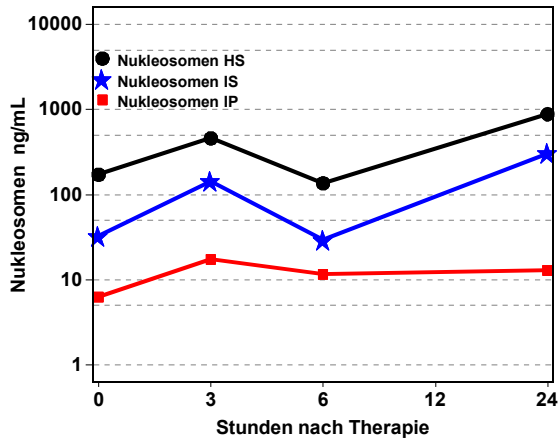


Abbildung 86 Patient 3, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation+RFA, Status: PR

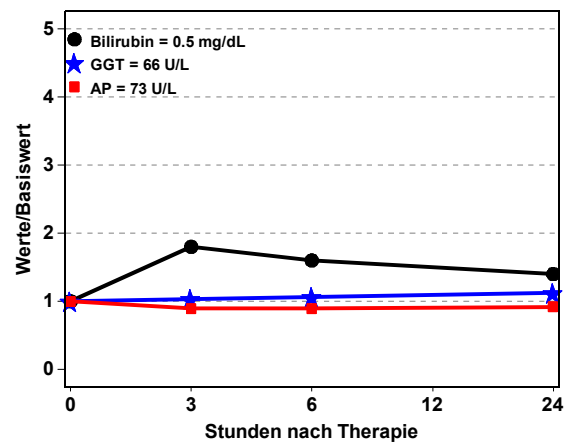
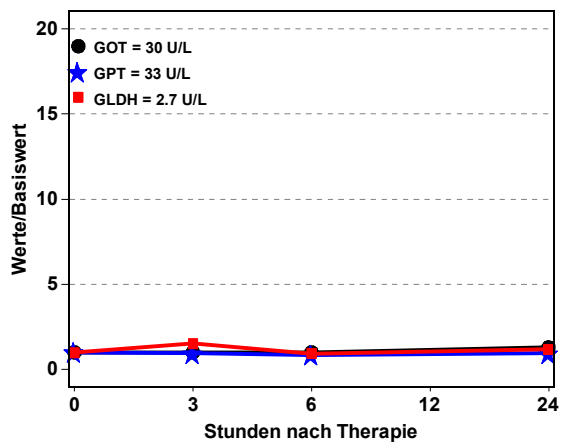
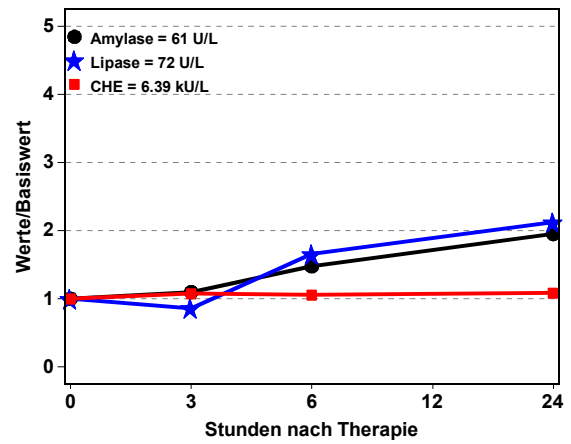
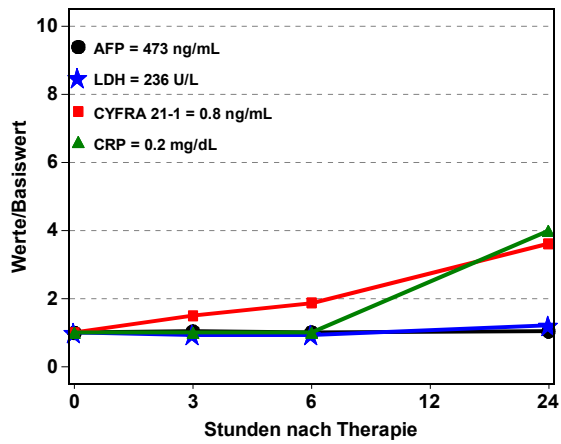
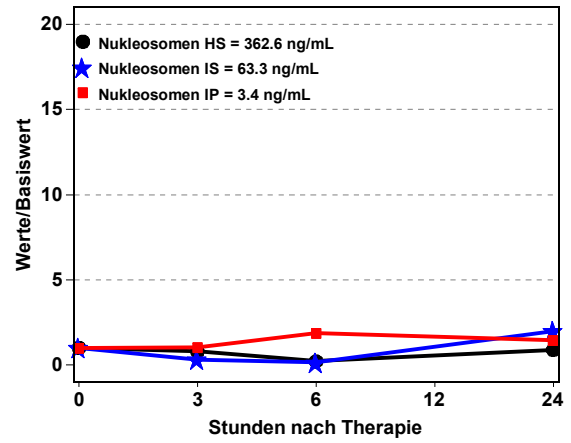
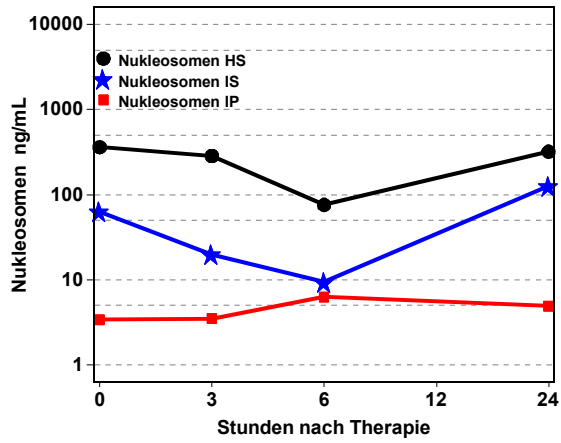


Abbildung 87 Patient 4, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation+RFA, Status: CR

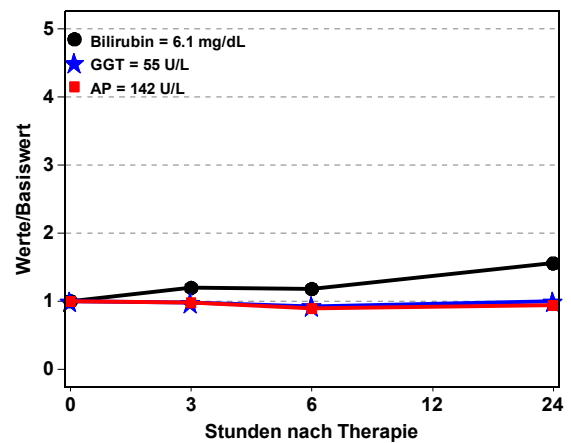
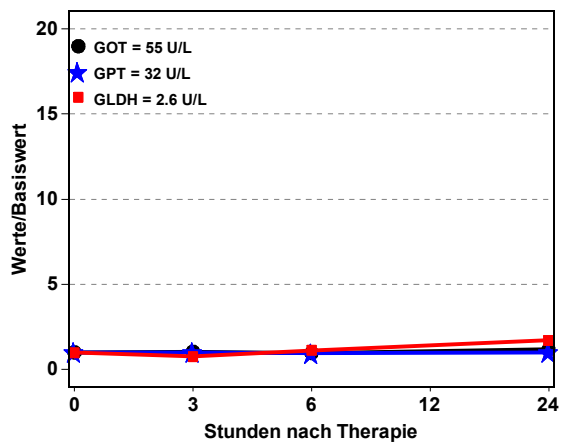
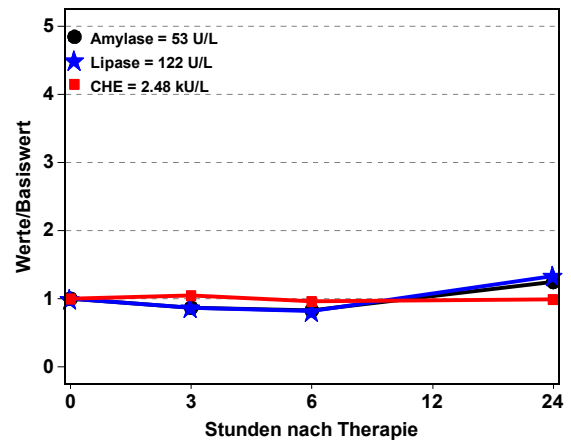
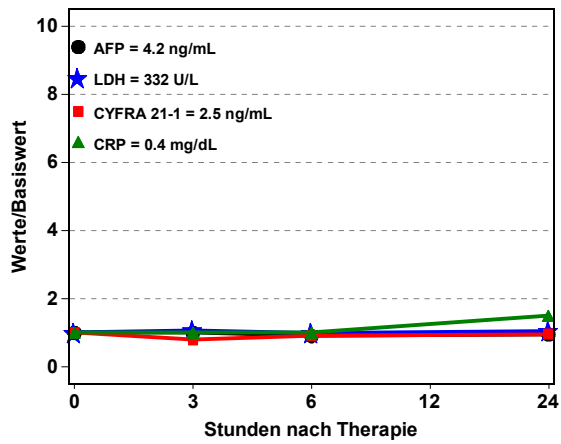
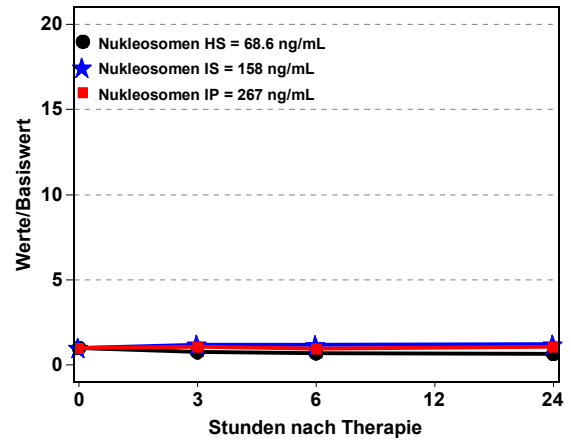
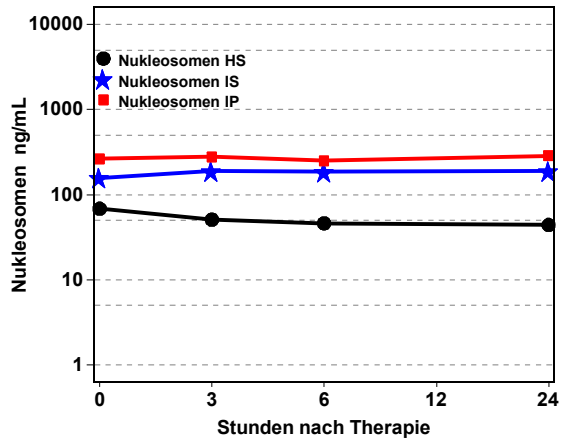


Abbildung 88 Patient 5, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PR

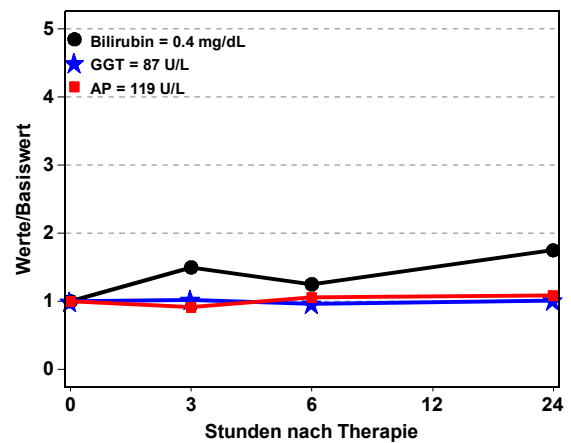
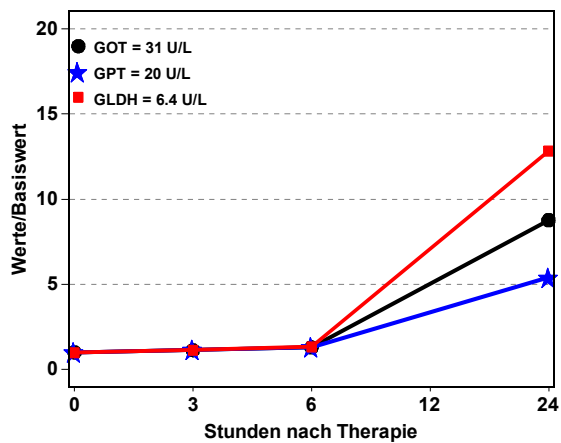
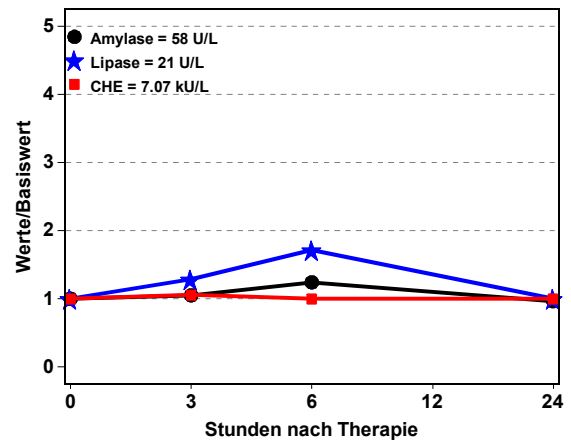
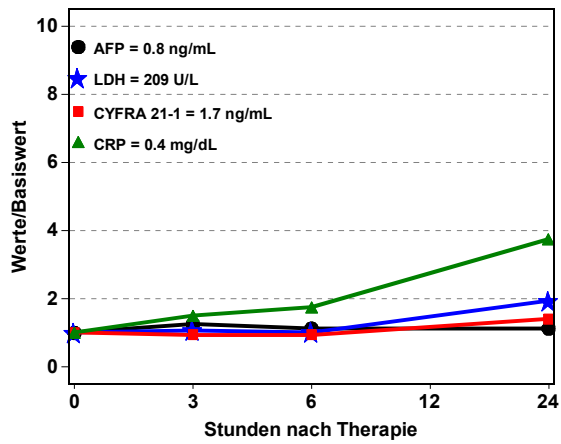
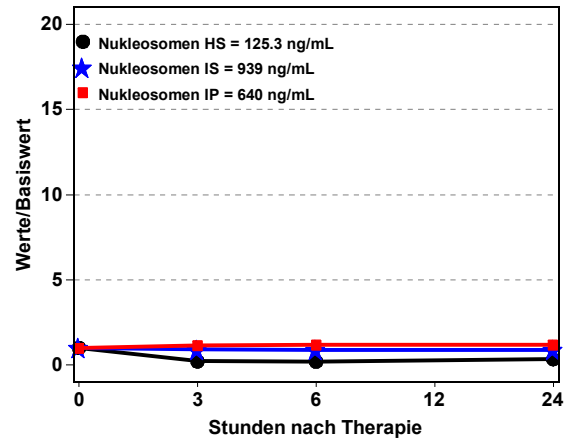
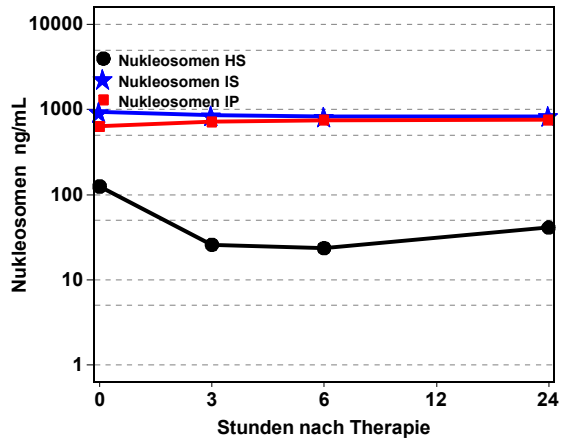


Abbildung 89 Patient 6, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

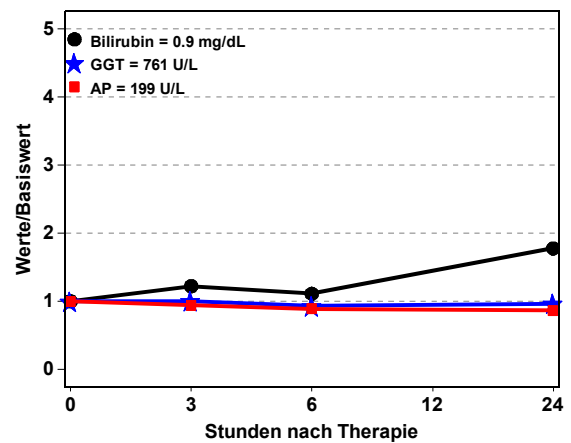
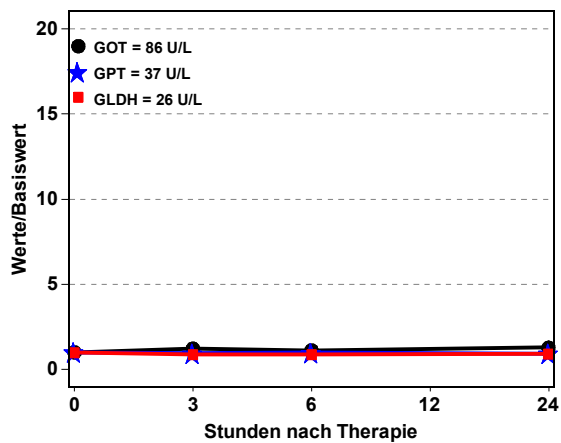
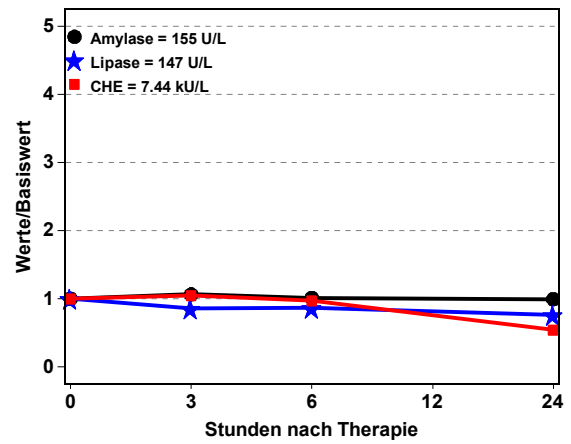
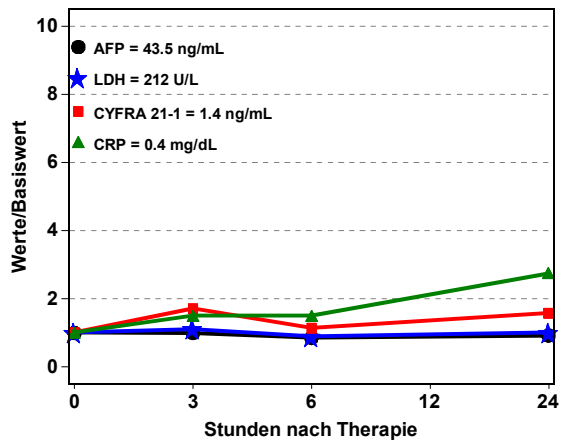
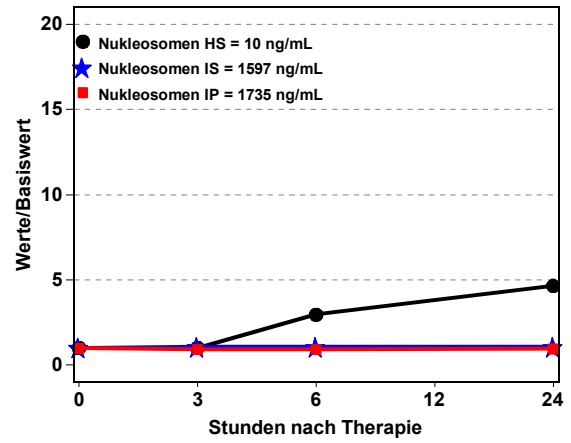
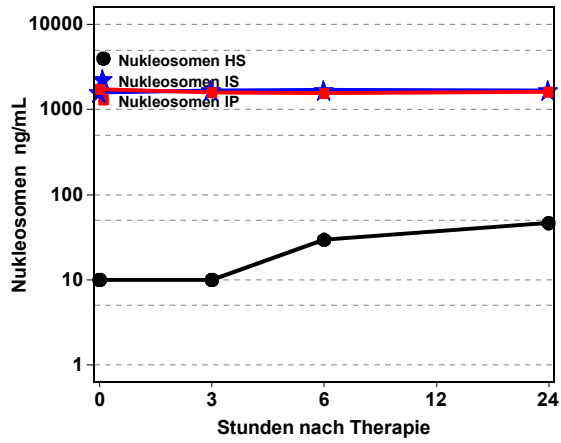


Abbildung 90 Patient 7, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

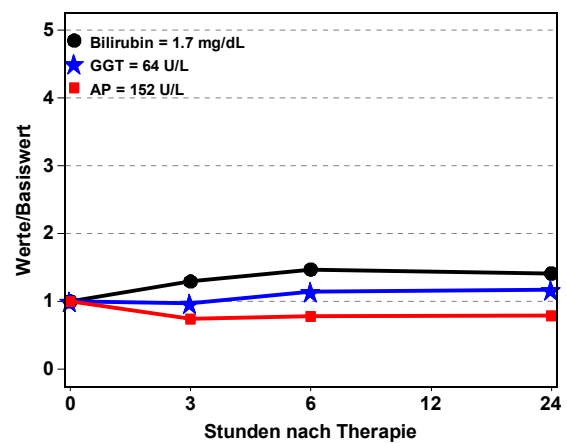
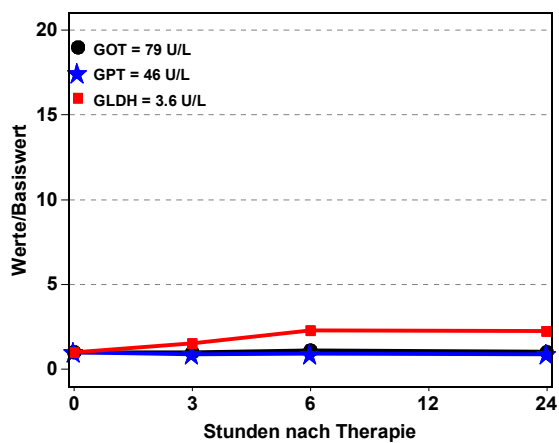
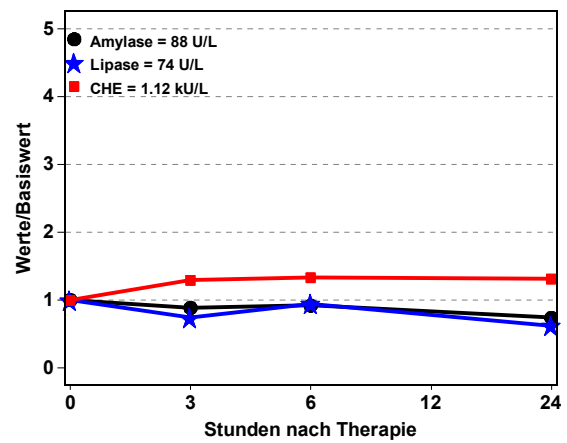
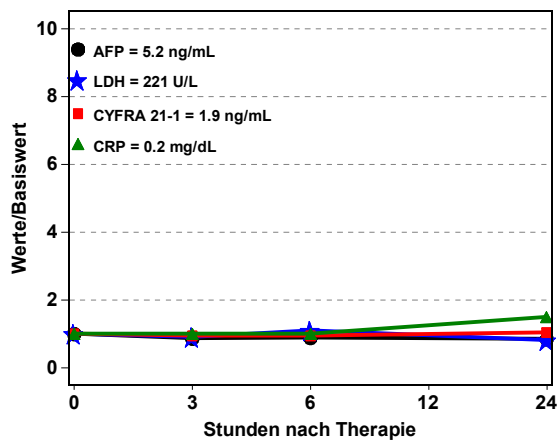
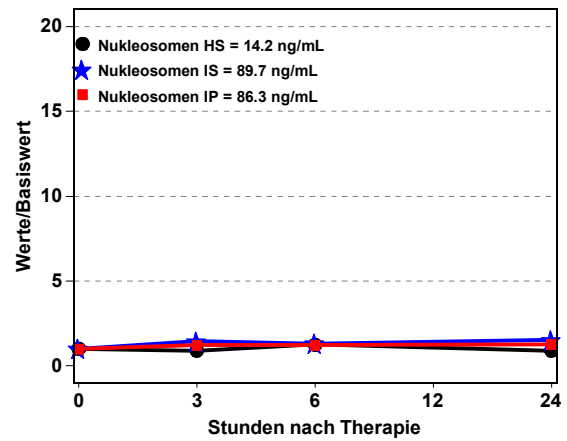
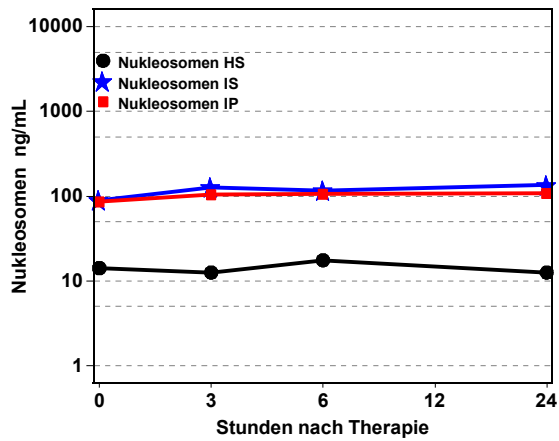


Abbildung 91 Patient 8, weiblich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

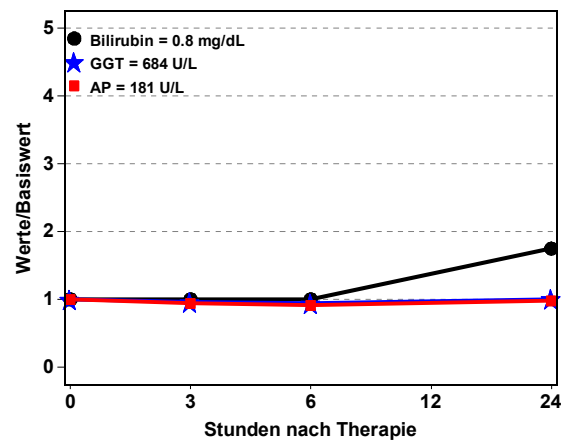
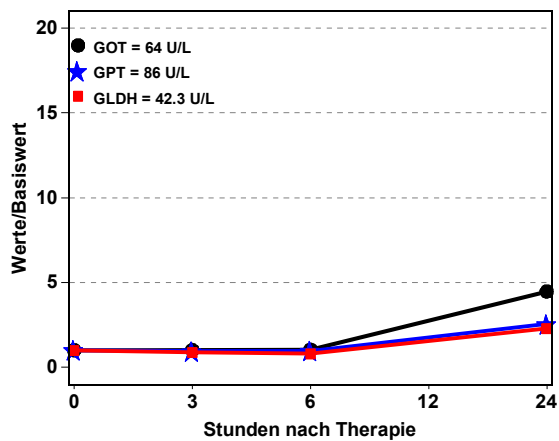
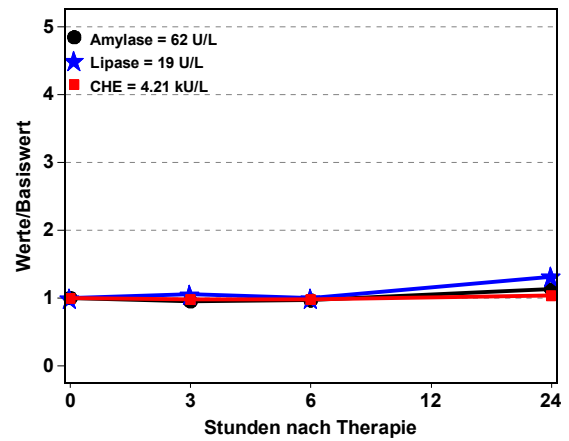
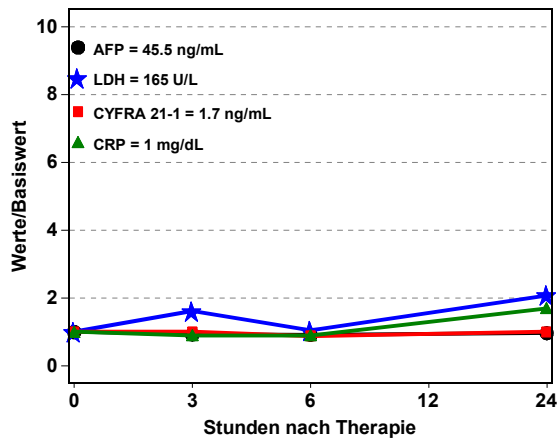
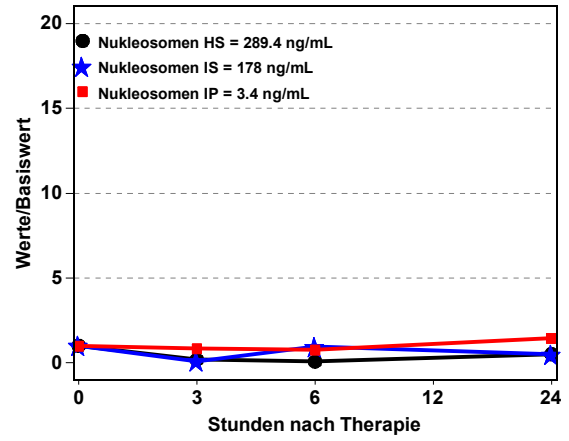
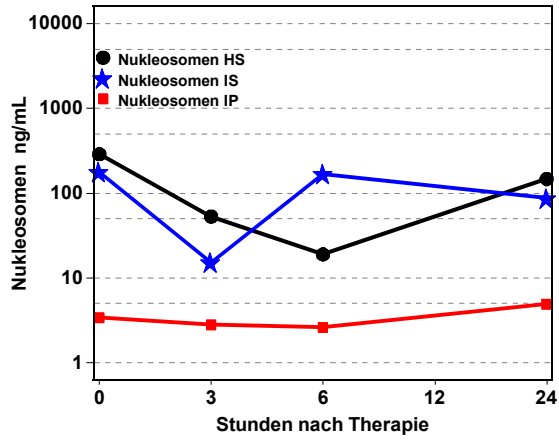


Abbildung 92 Patient 9, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

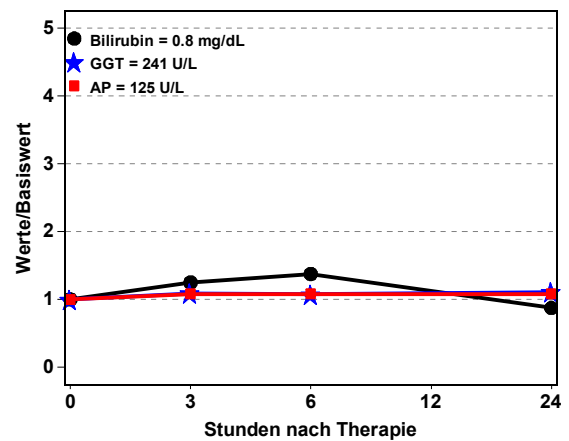
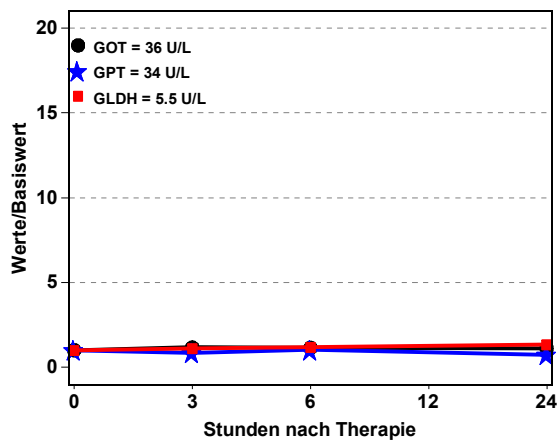
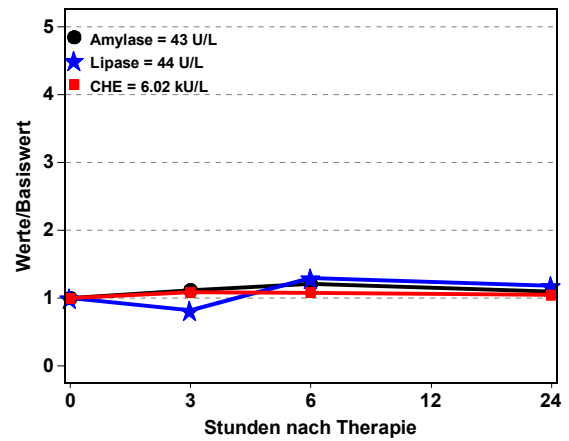
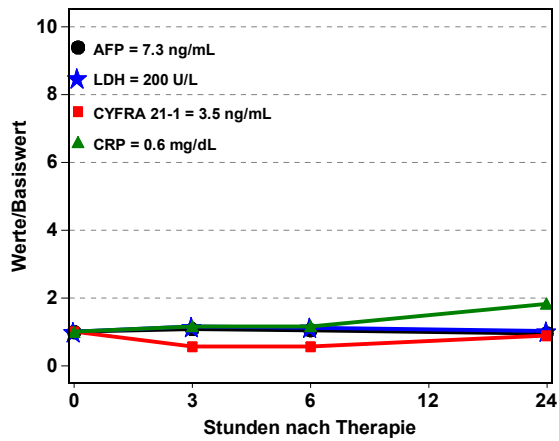
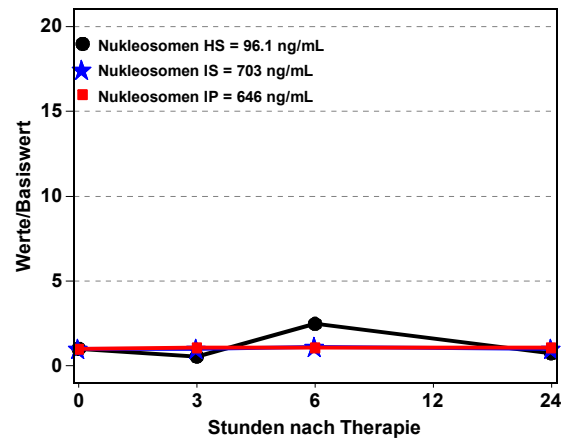
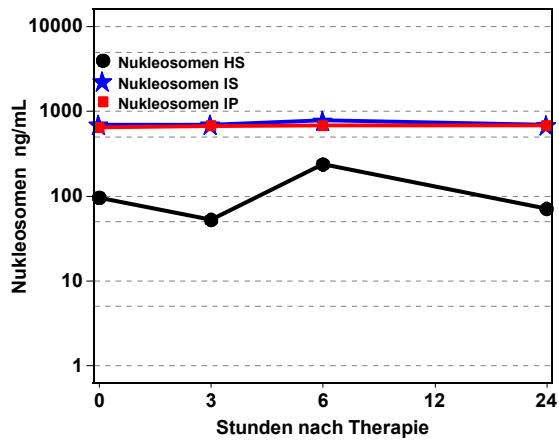


Abbildung 93 Patient 10, weiblich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

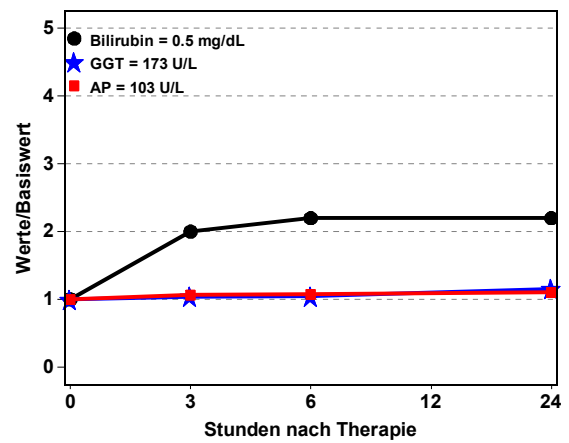
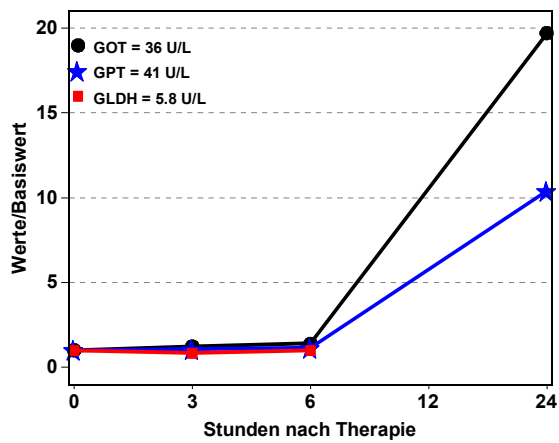
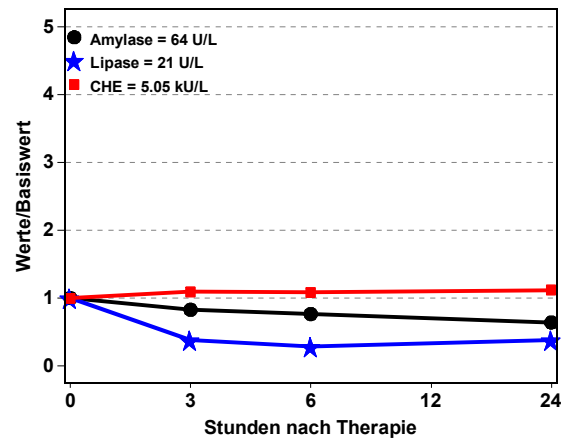
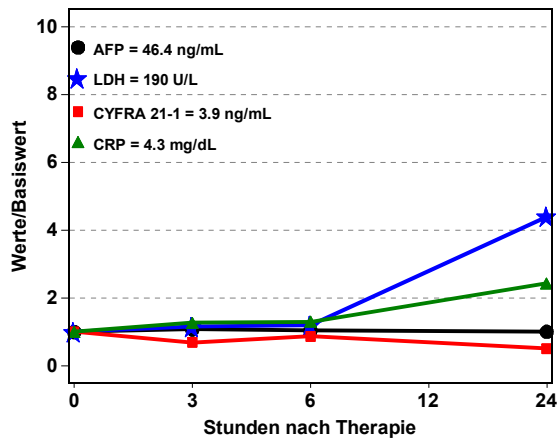
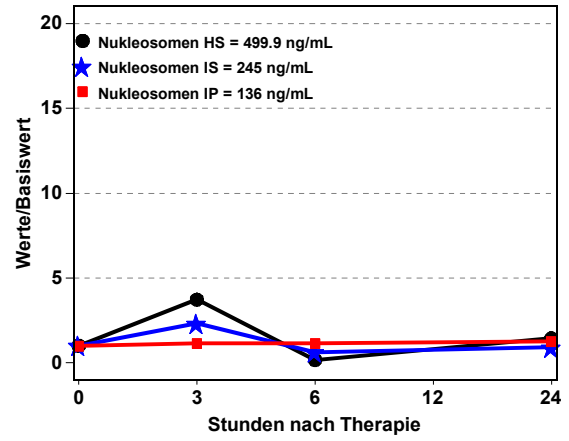
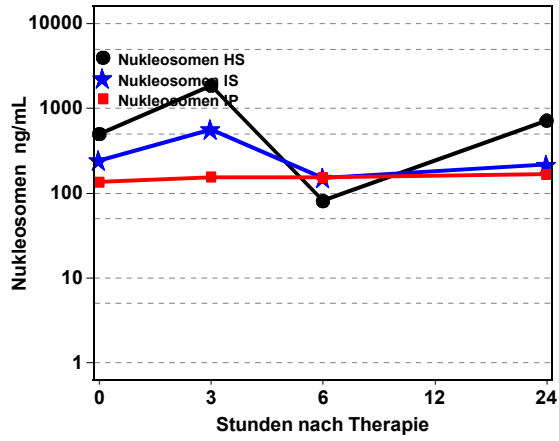


Abbildung 94 Patient 11, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

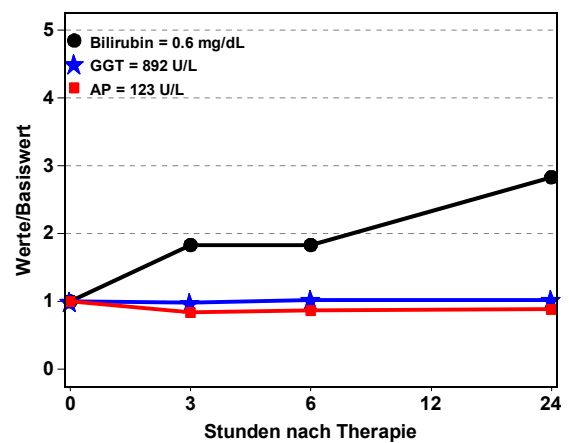
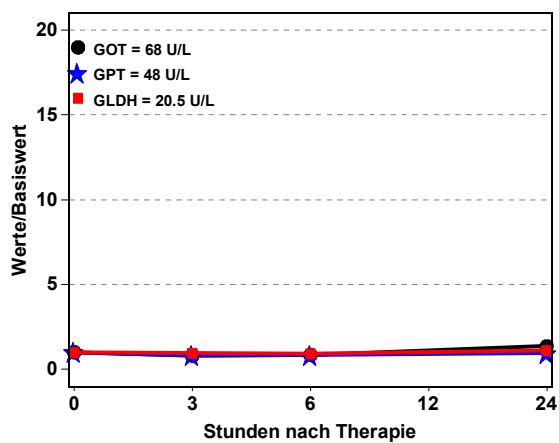
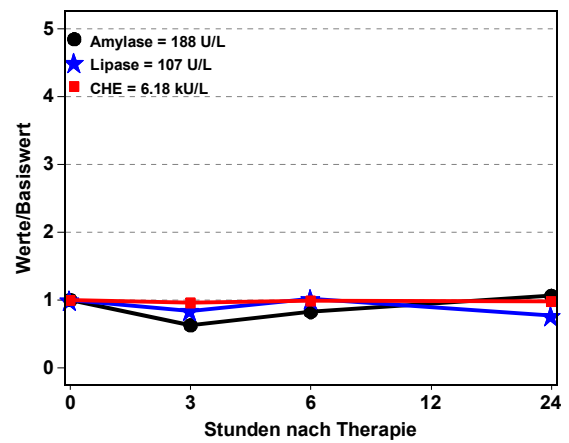
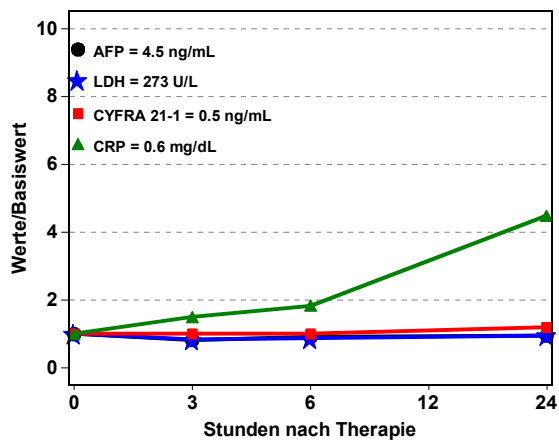
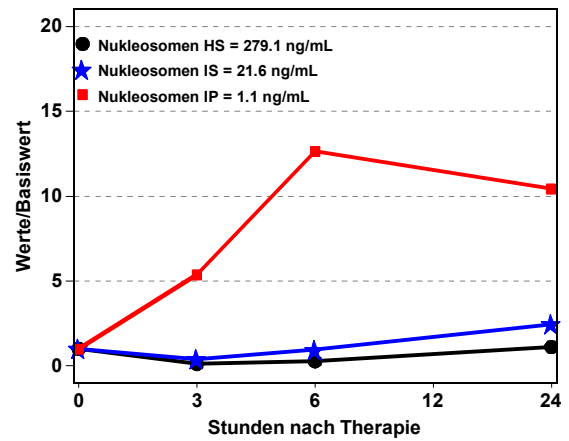
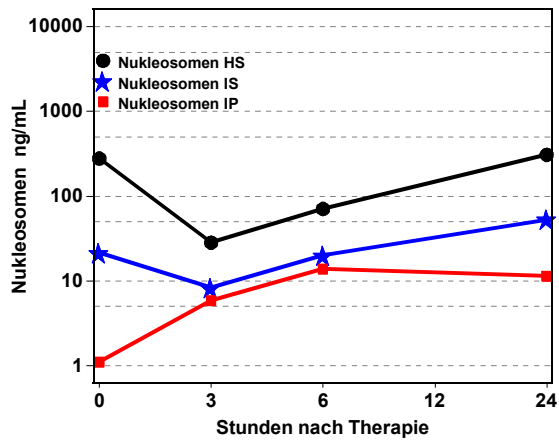


Abbildung 95 Patient 12, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

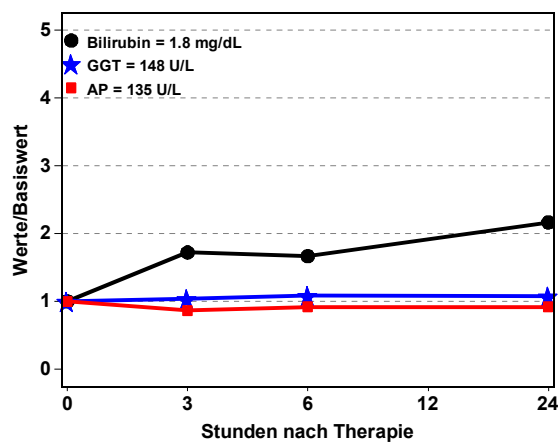
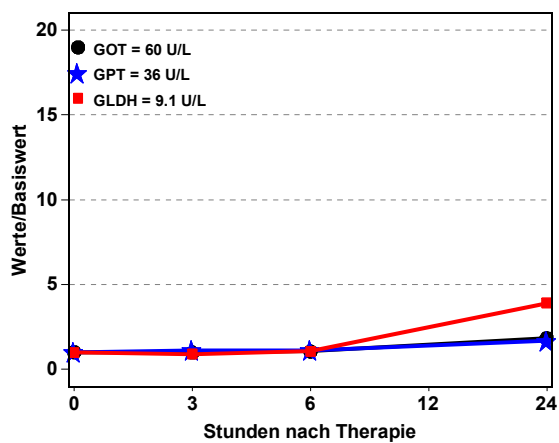
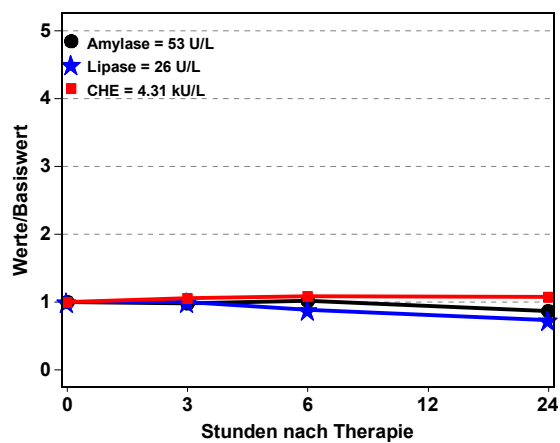
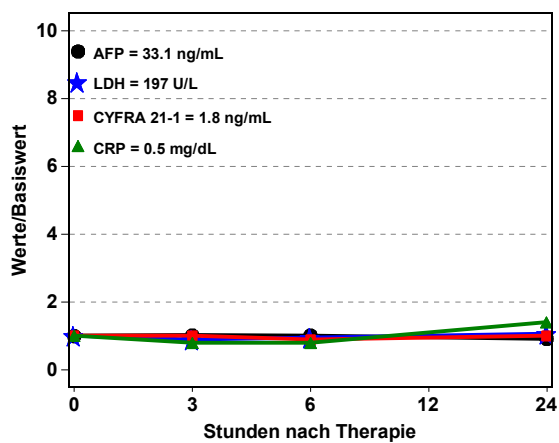
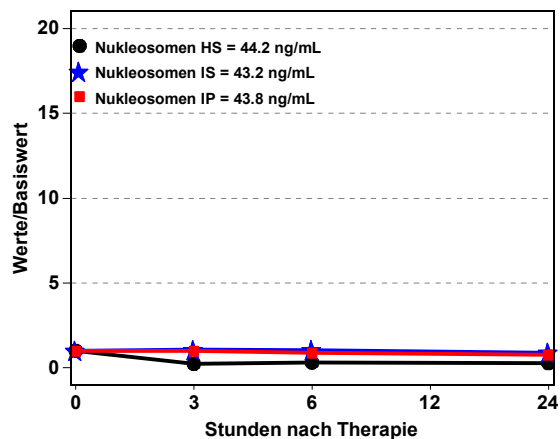
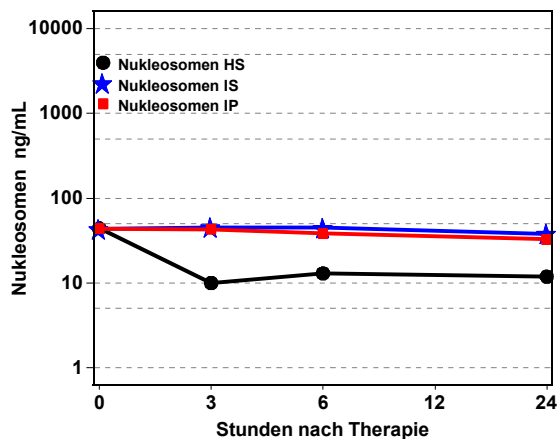


Abbildung 96 Patient 13, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

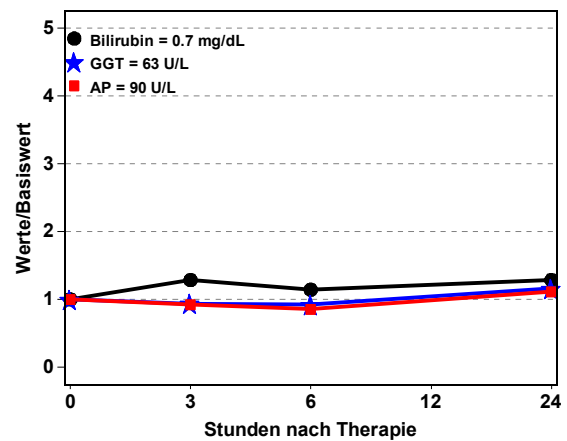
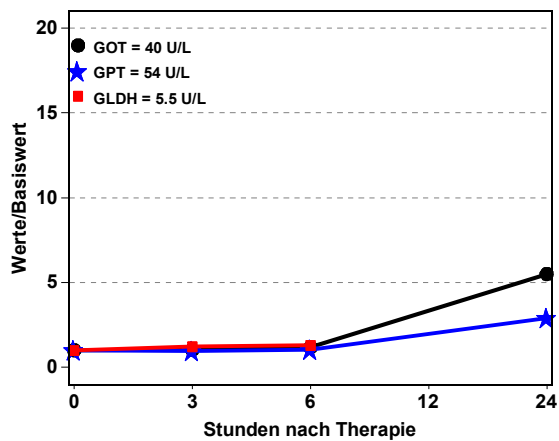
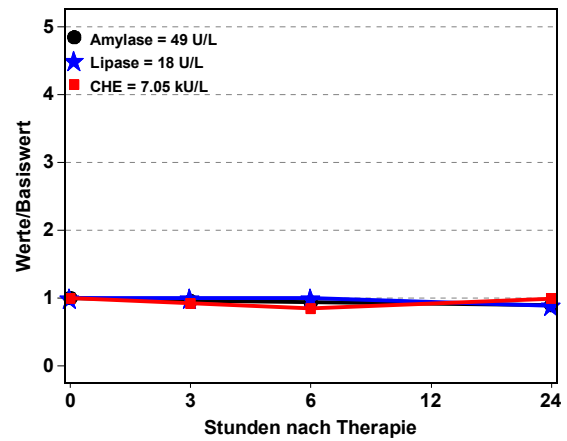
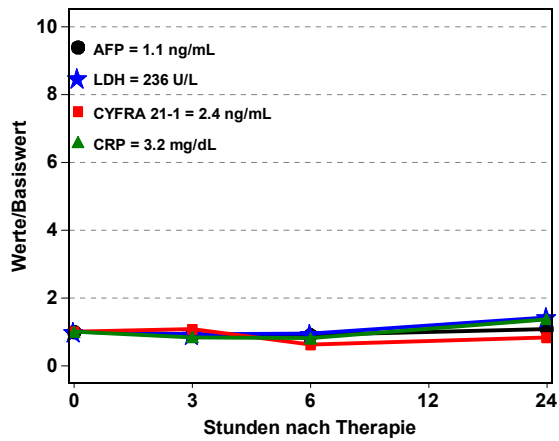
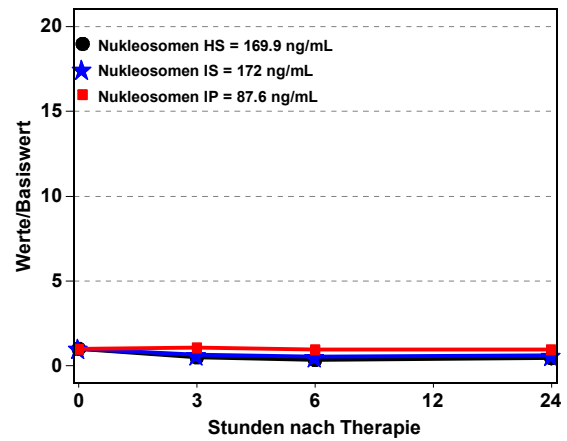
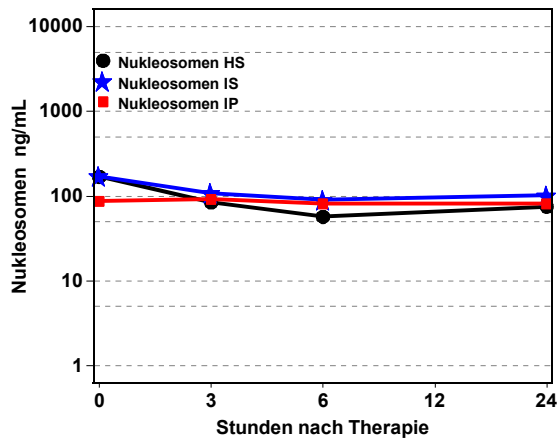


Abbildung 97 Patient 14, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

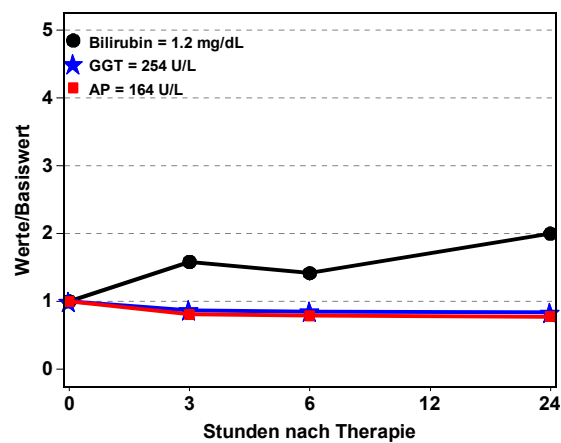
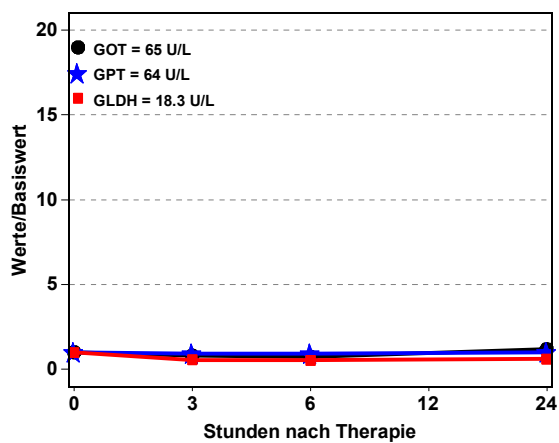
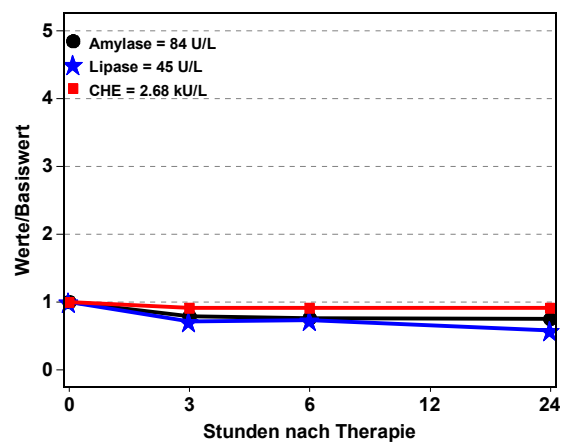
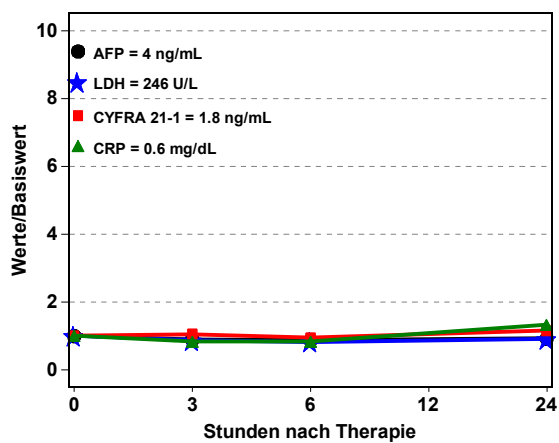
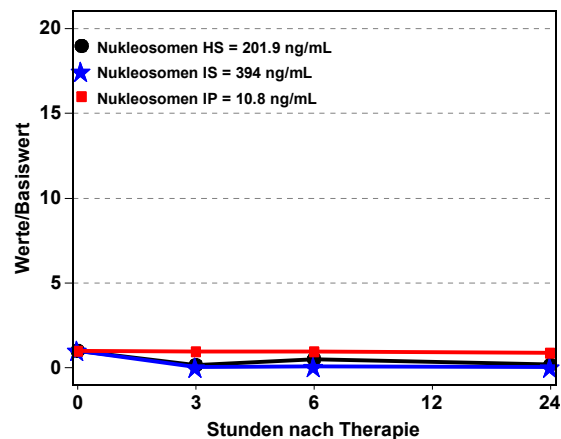
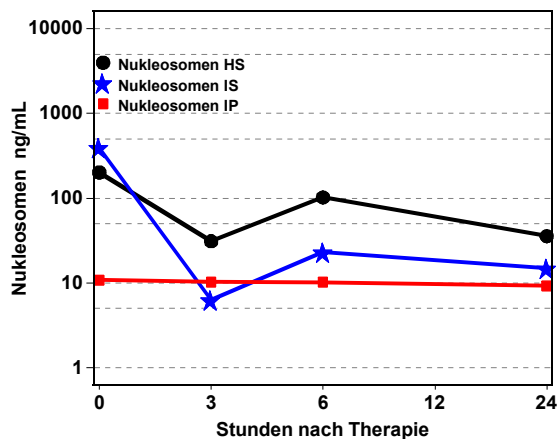


Abbildung 98 Patient 15, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

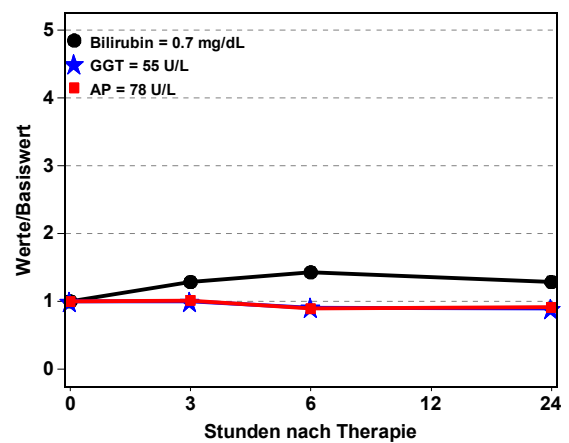
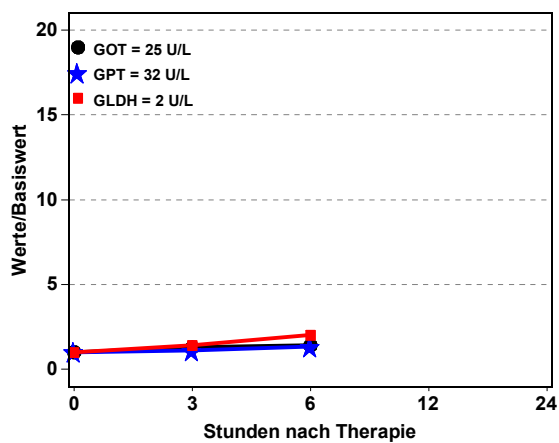
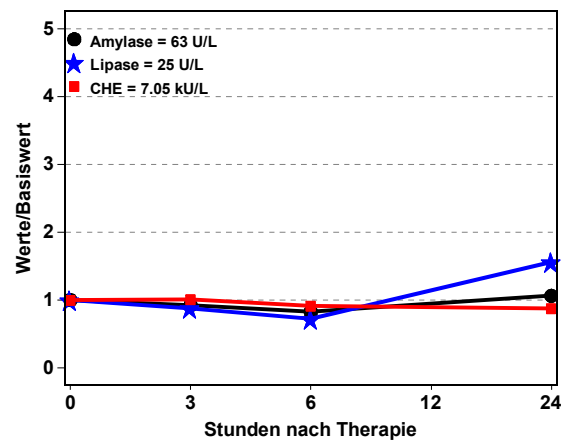
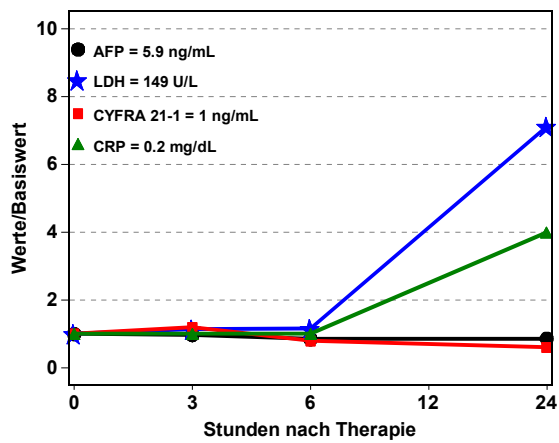
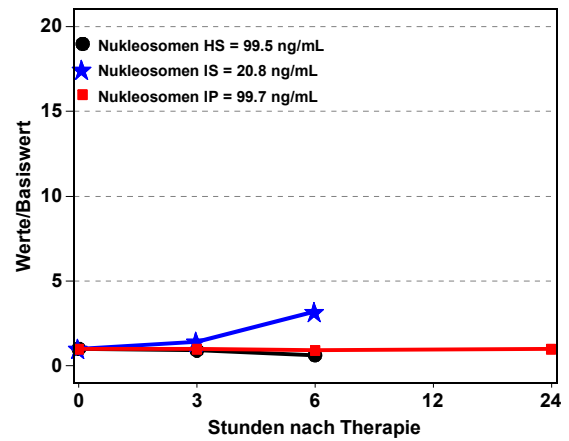
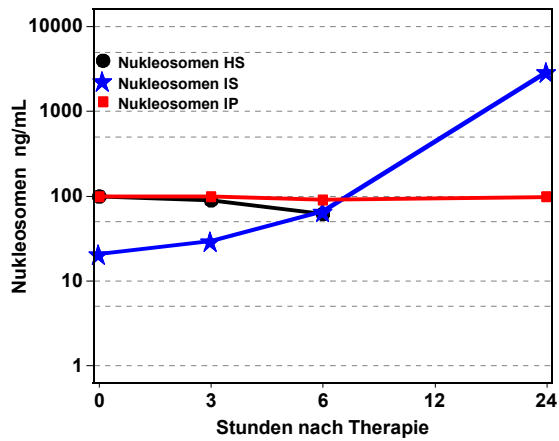


Abbildung 99 Patient 16, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

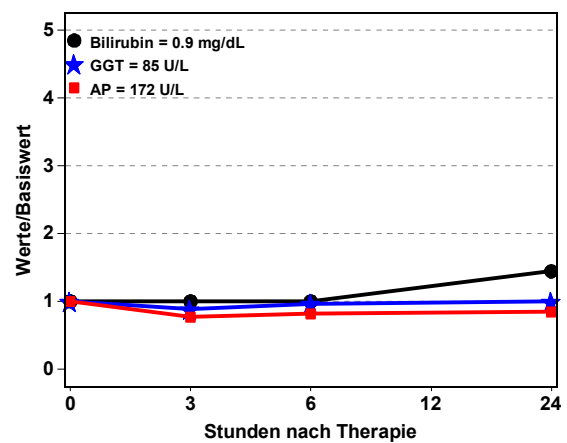
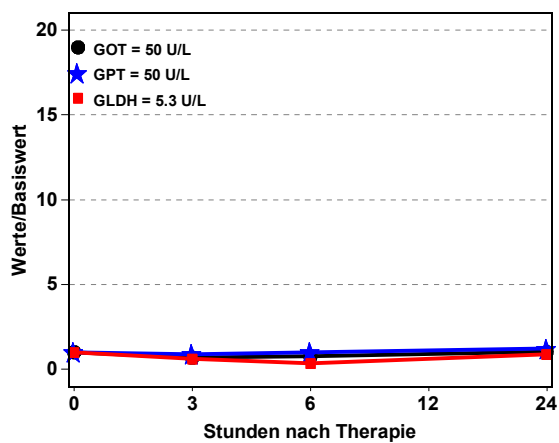
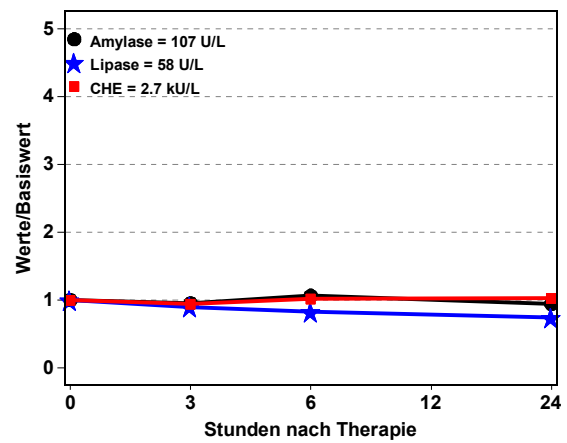
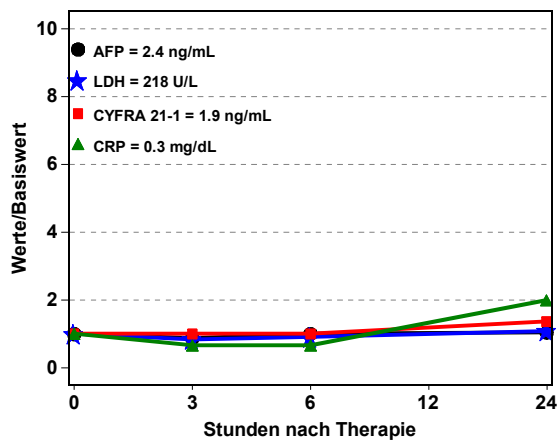
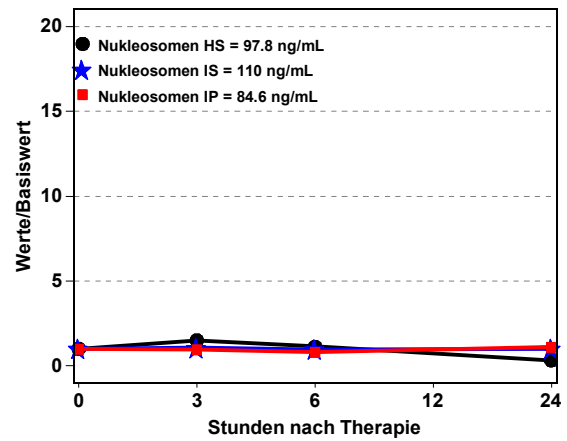
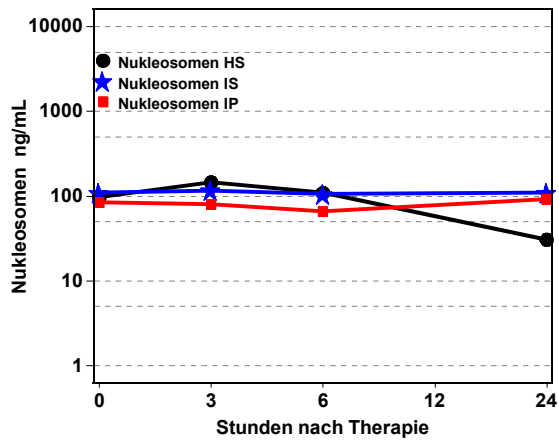


Abbildung 100 Patient 17, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

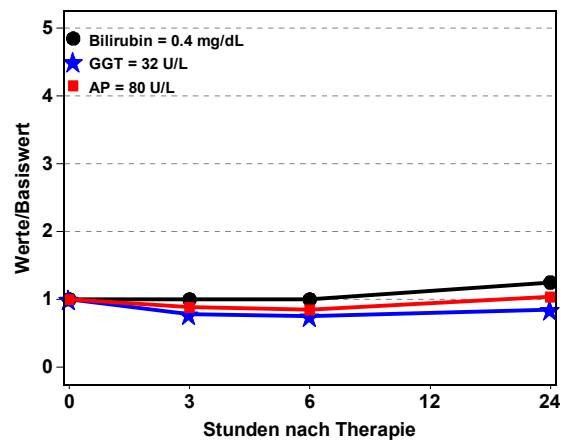
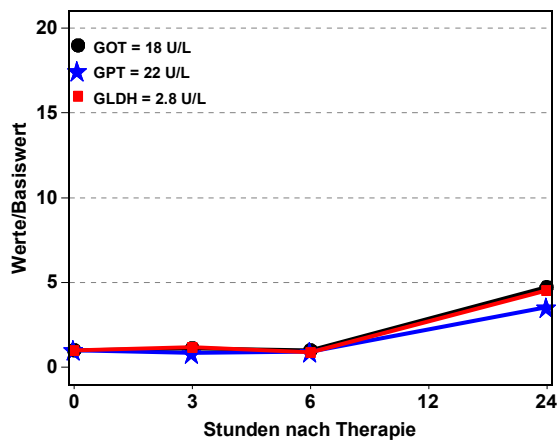
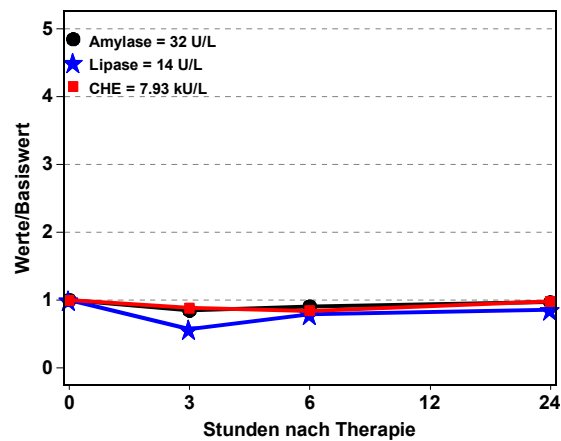
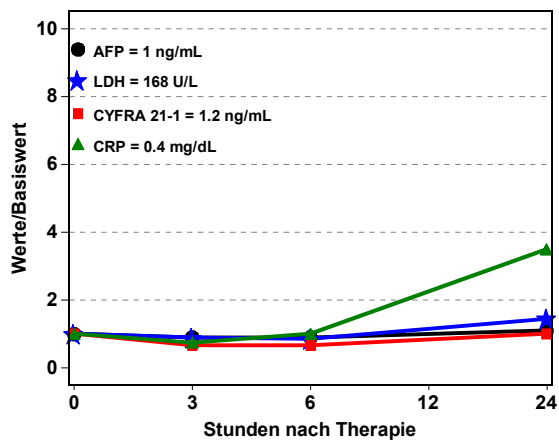
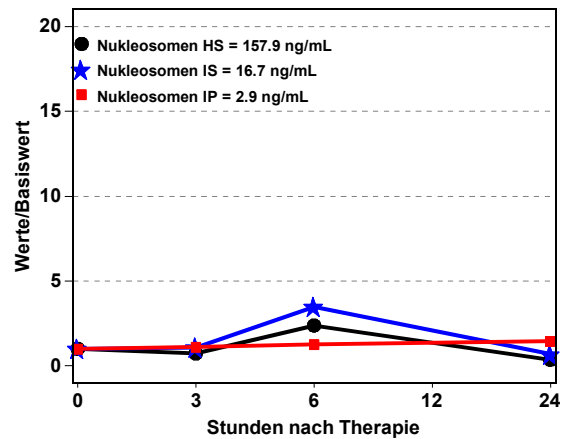
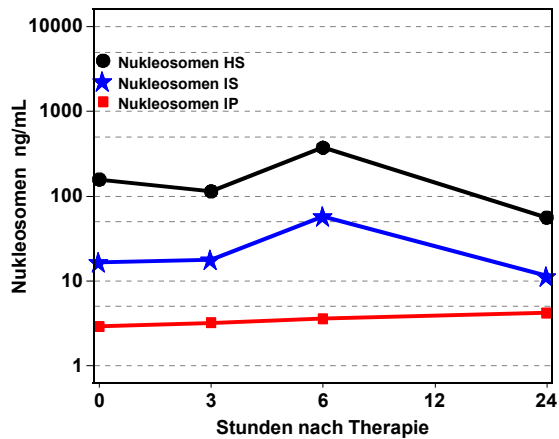


Abbildung 101 Patient 18, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

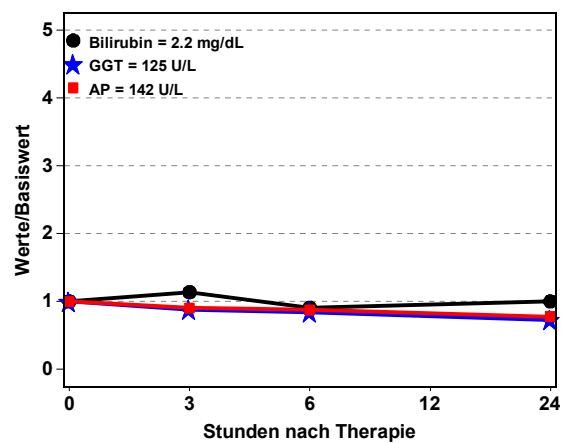
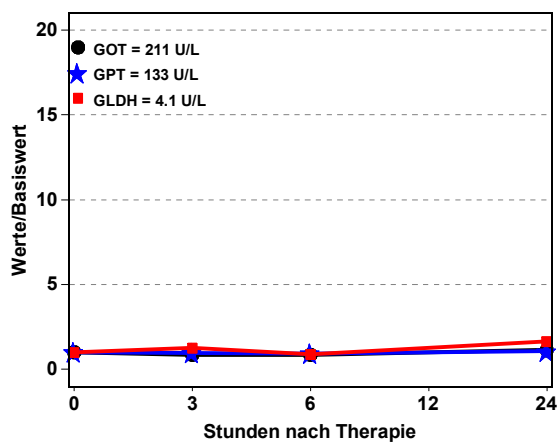
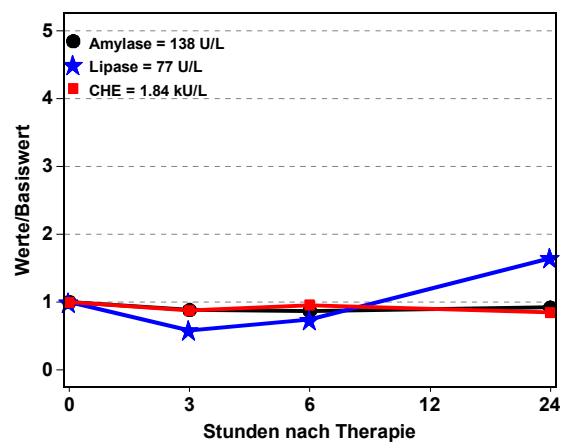
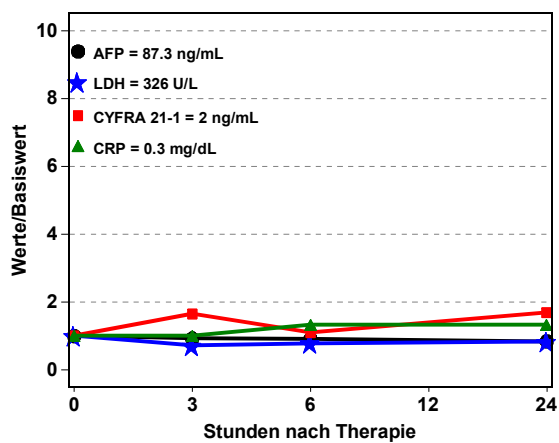
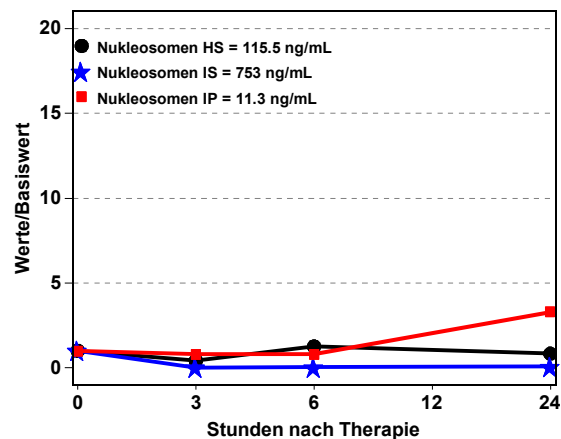
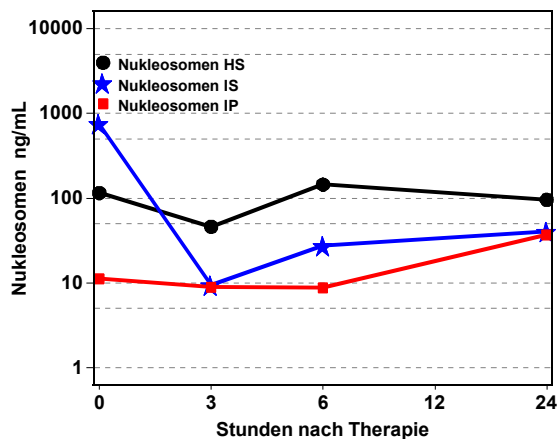


Abbildung 102 Patient 19, weiblich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

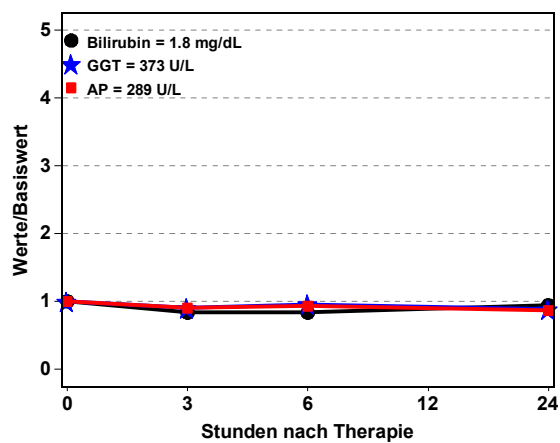
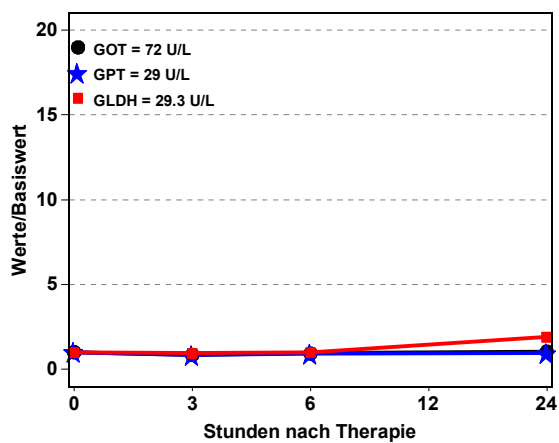
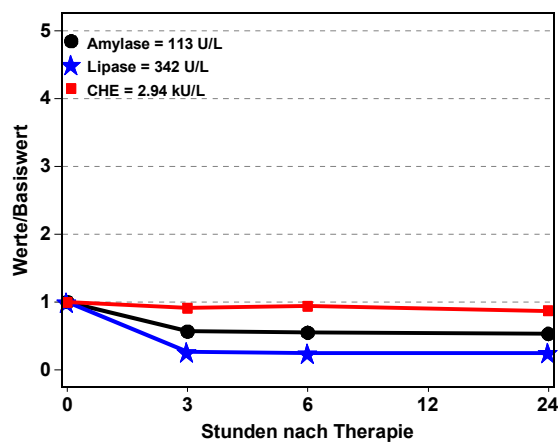
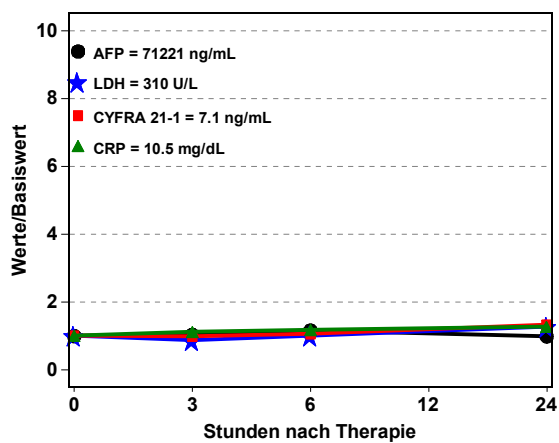
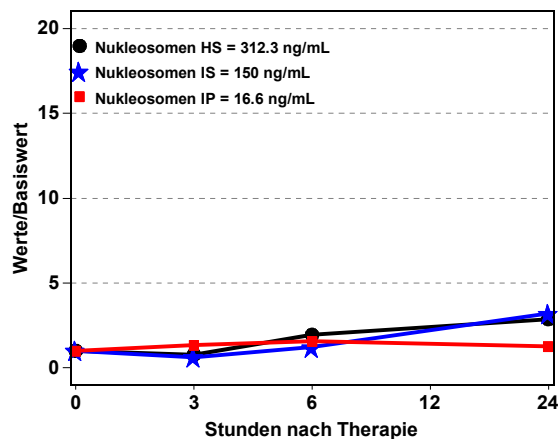
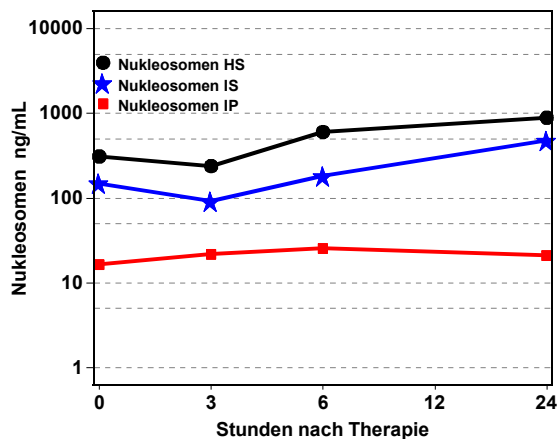


Abbildung 103 Patient 20, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

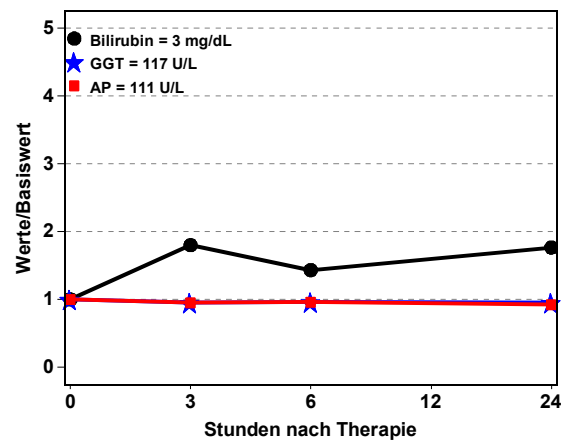
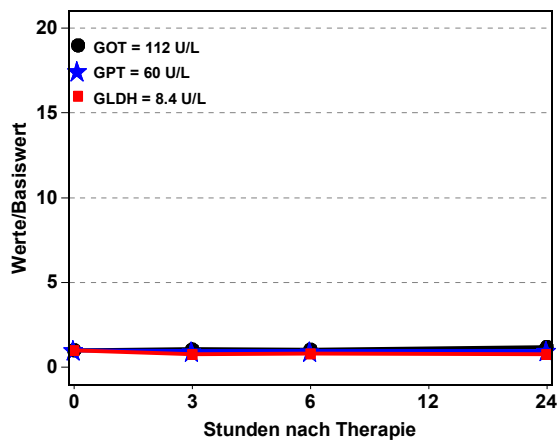
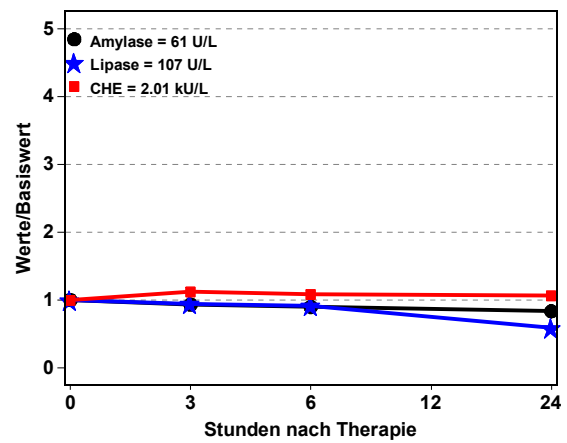
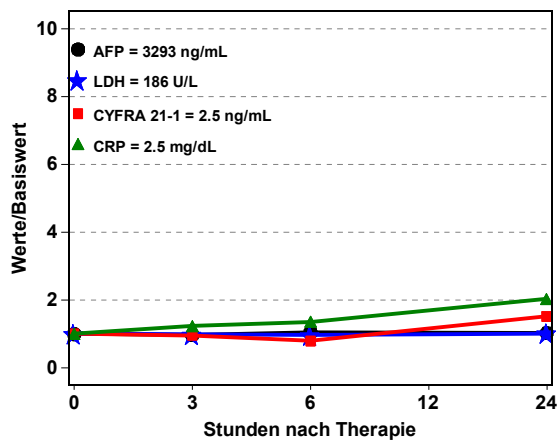
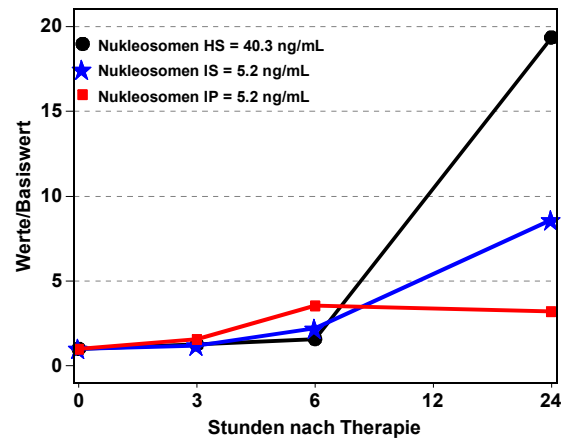
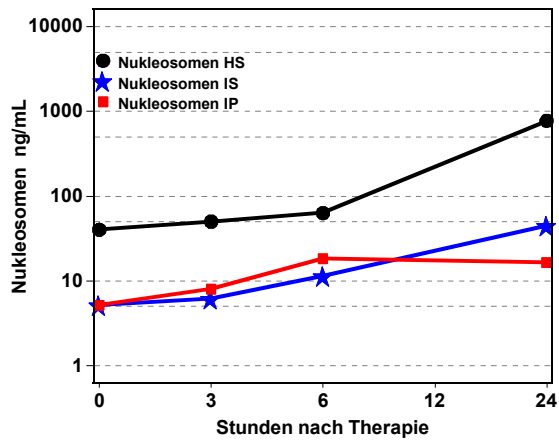


Abbildung 104 Patient 21, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

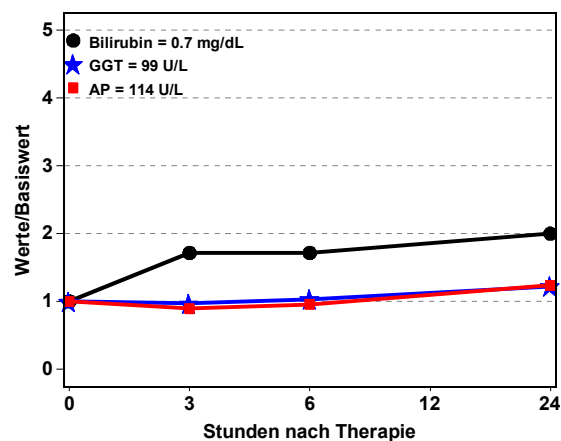
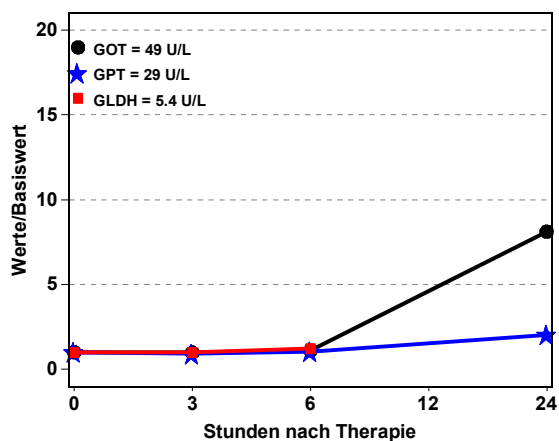
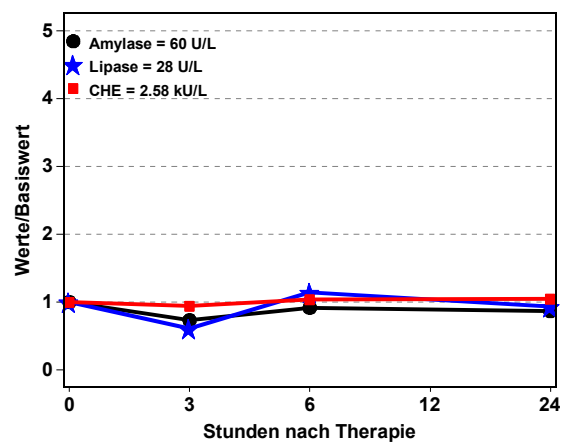
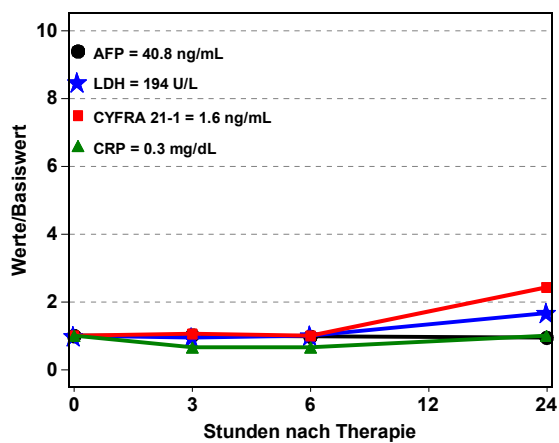
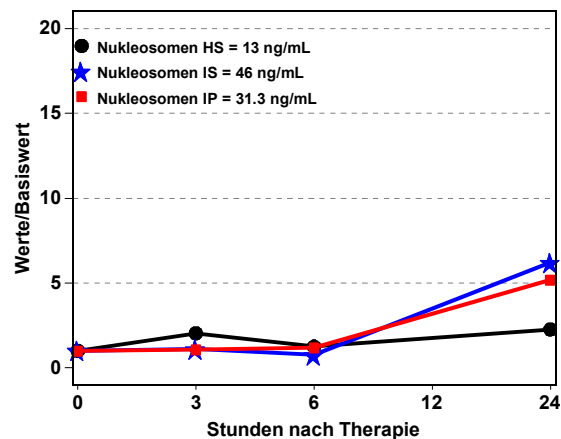
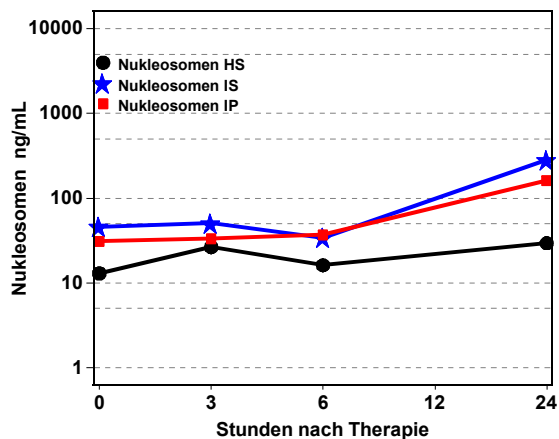


Abbildung 105 Patient 22, weiblich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

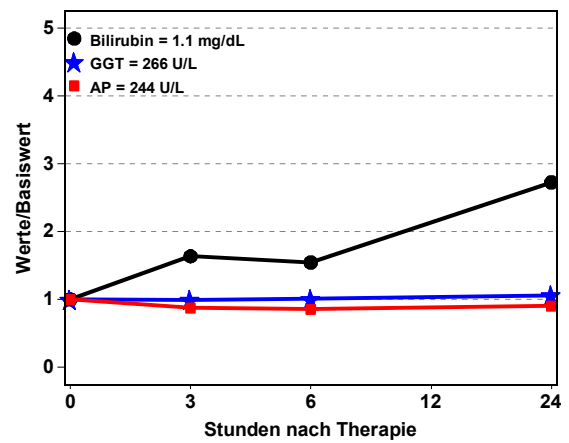
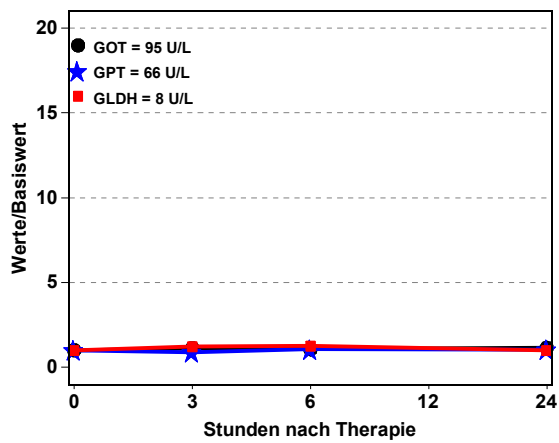
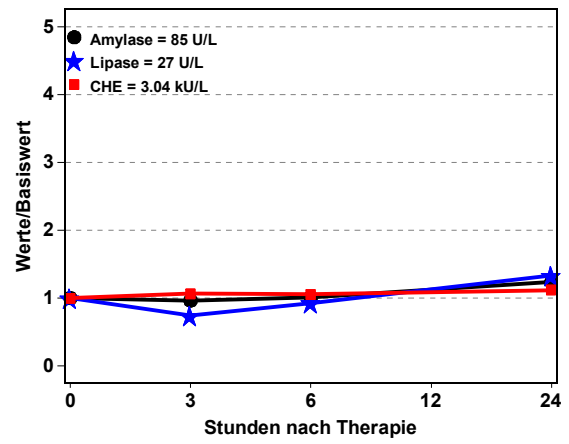
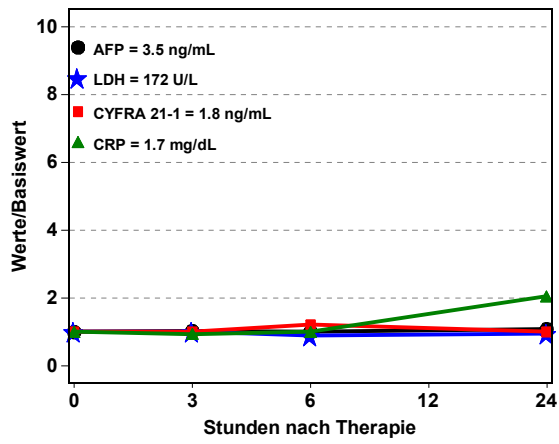
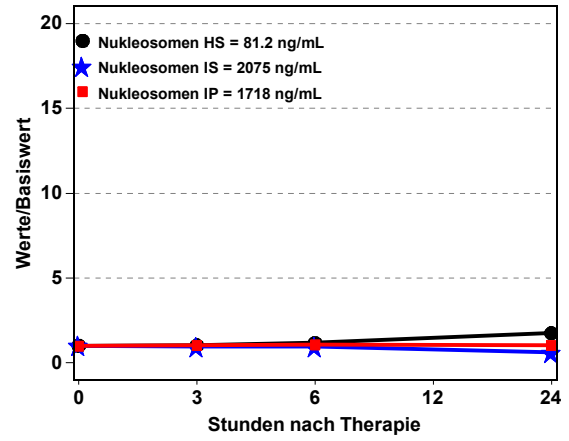
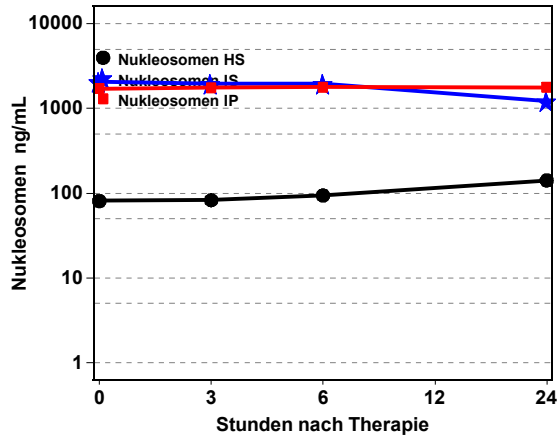


Abbildung 106 Patient 23, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation+RFA, Status: PD

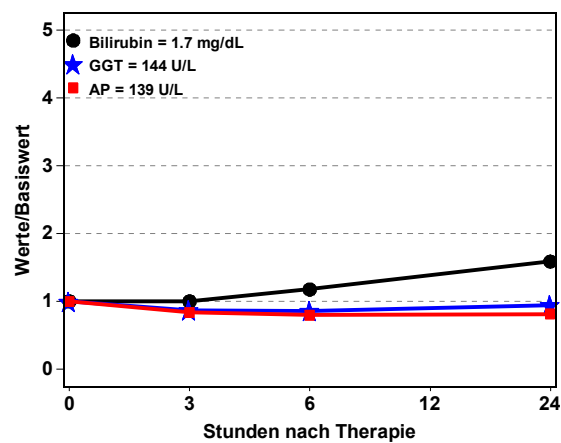
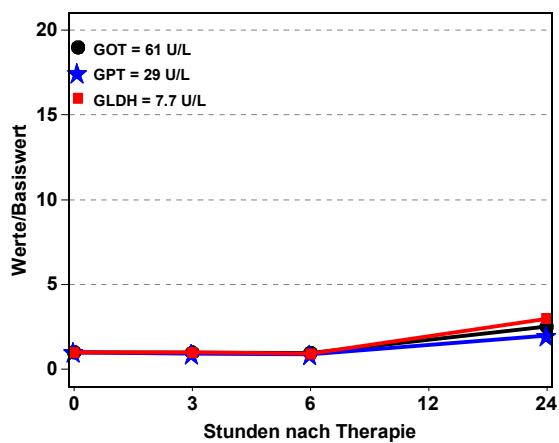
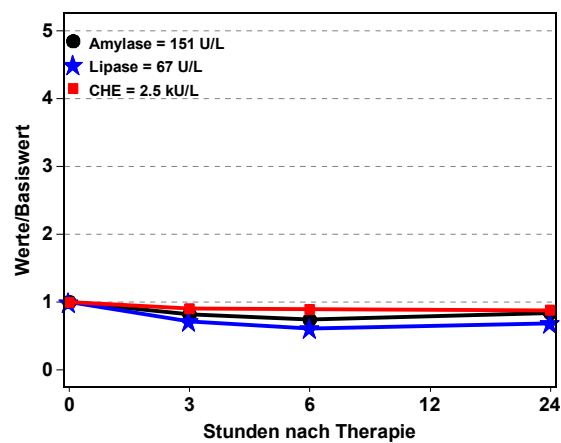
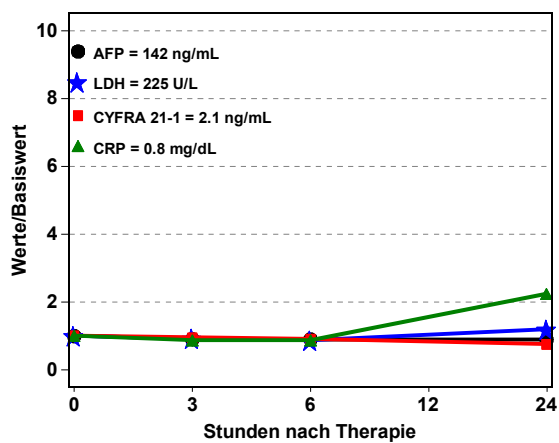
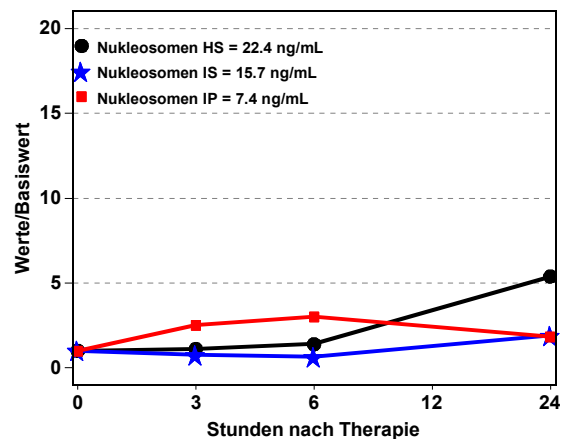
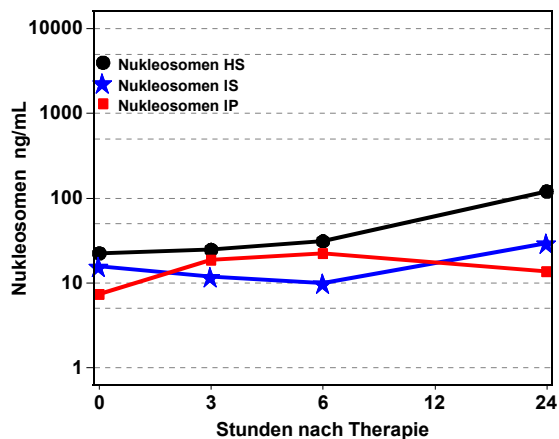


Abbildung 107 Patient 24, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

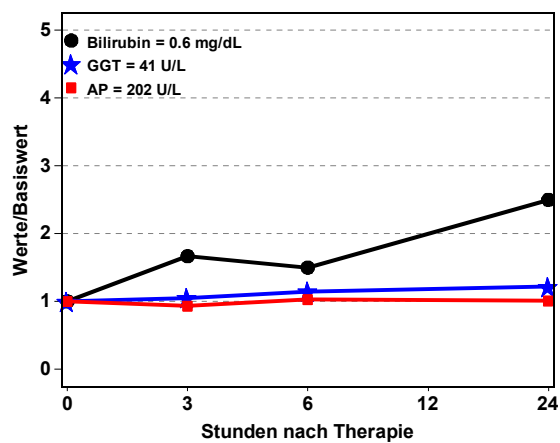
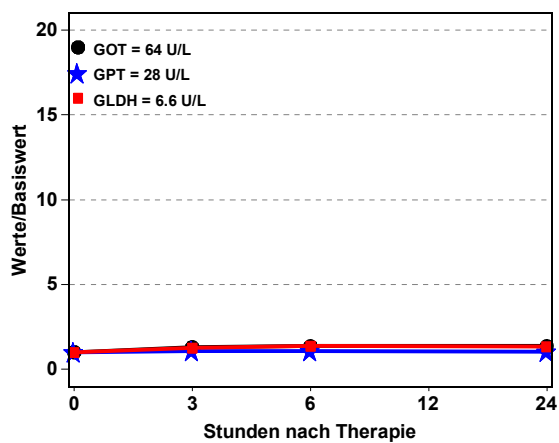
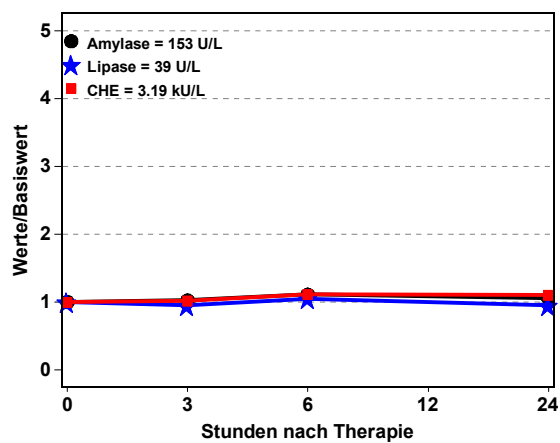
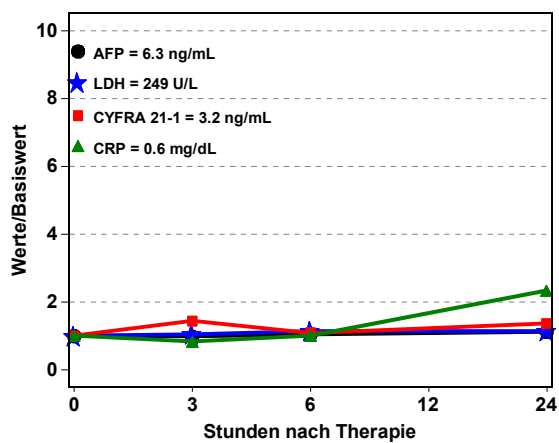
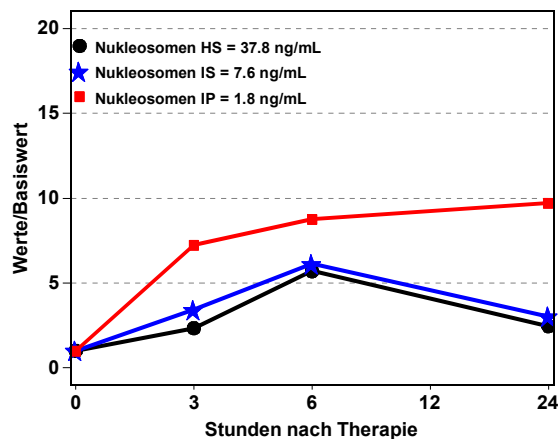
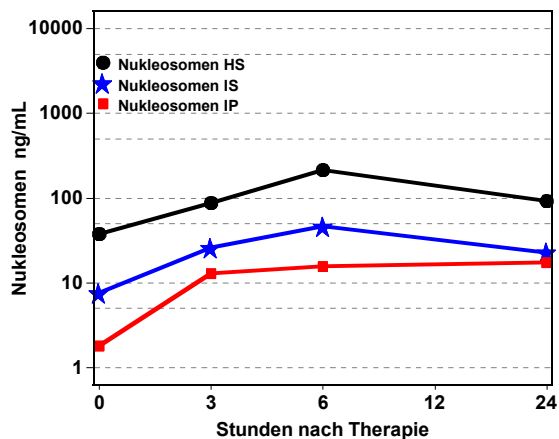


Abbildung 108 Patient 25, weiblich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

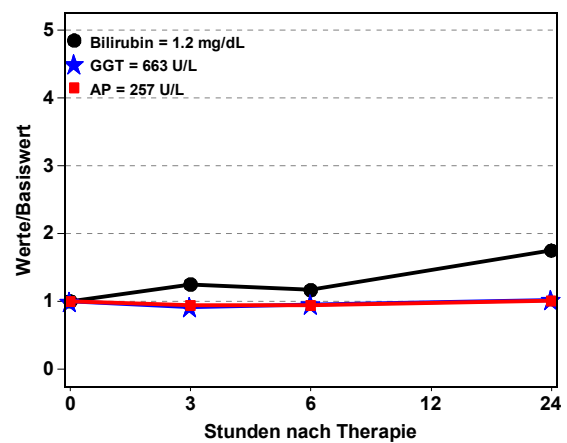
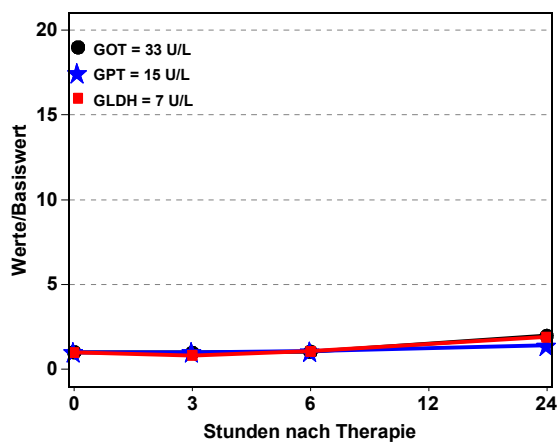
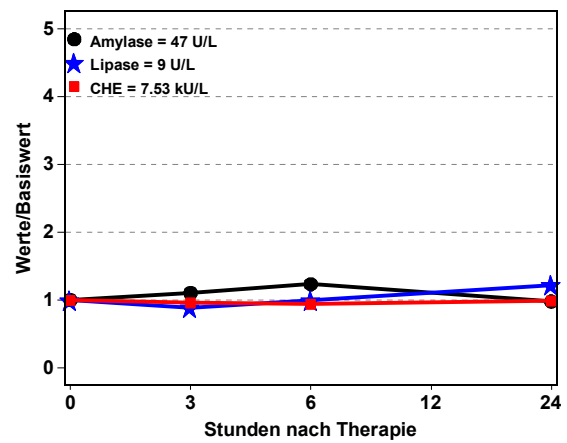
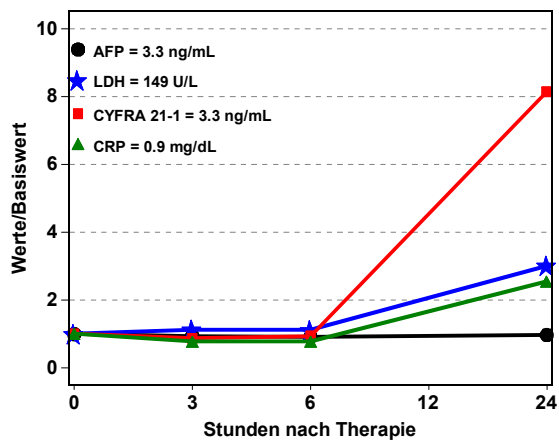
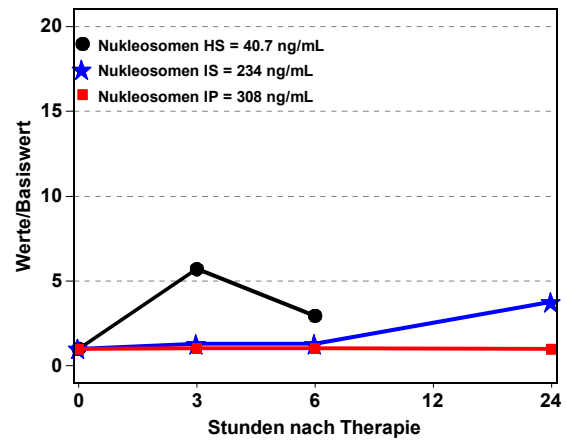
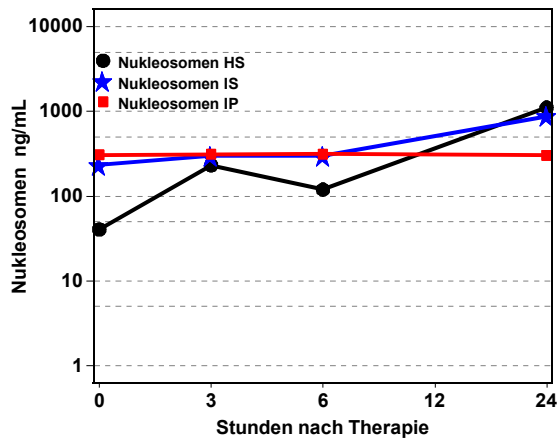


Abbildung 109 Patient 26, weiblich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

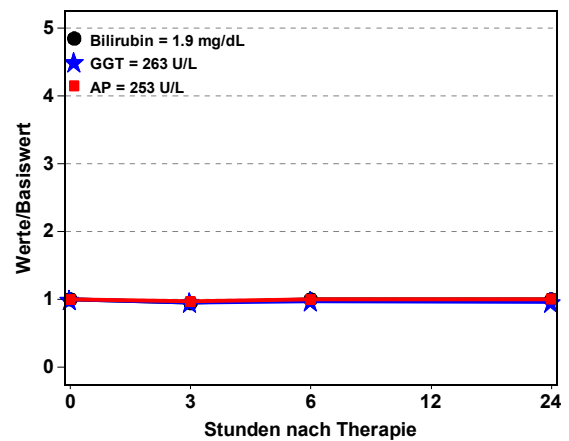
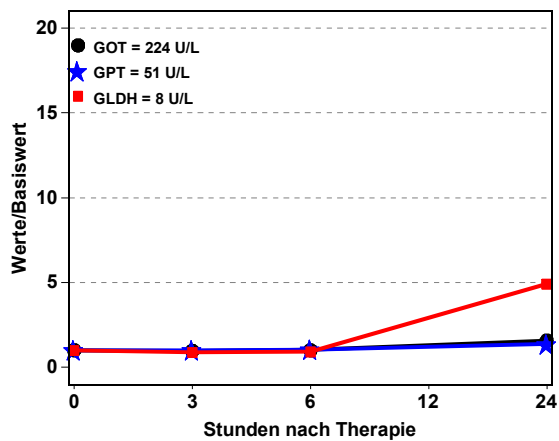
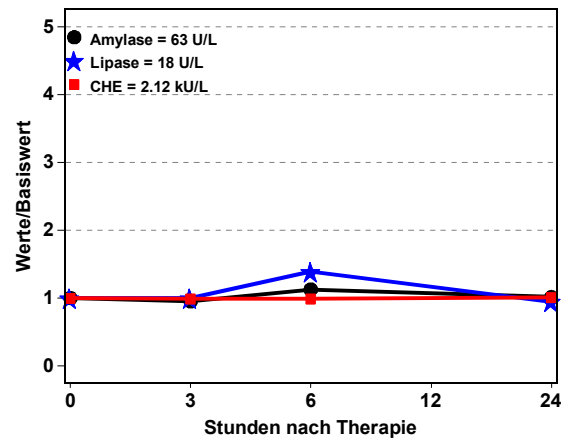
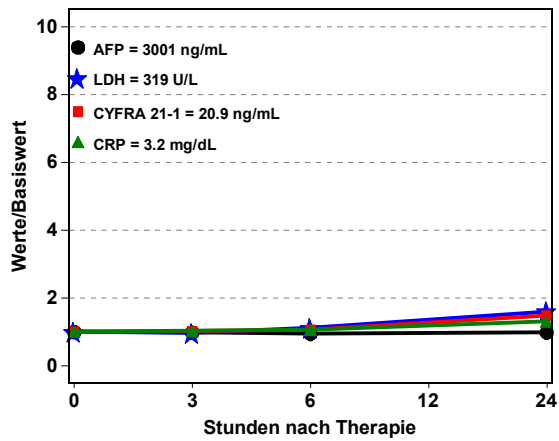
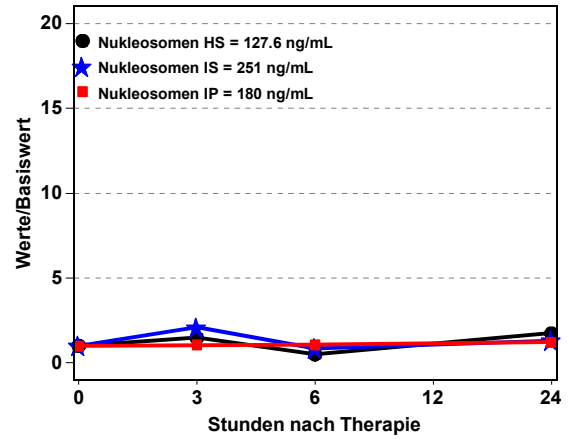
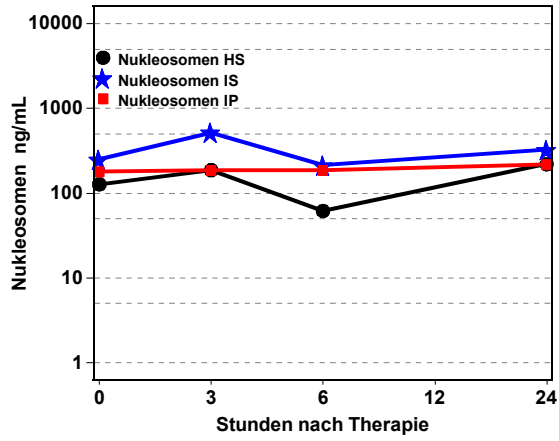


Abbildung 110 Patient 27, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

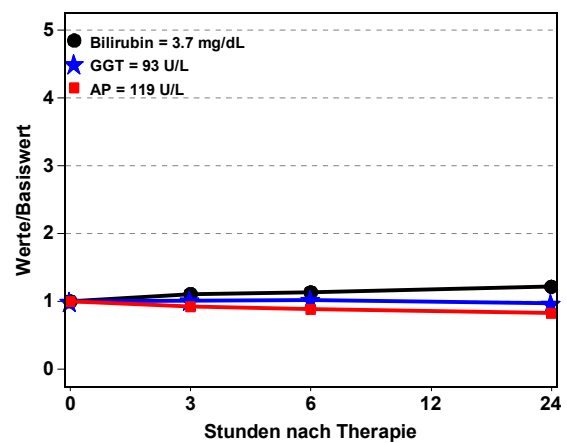
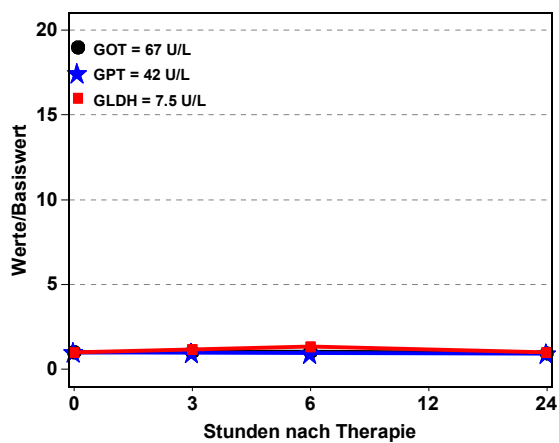
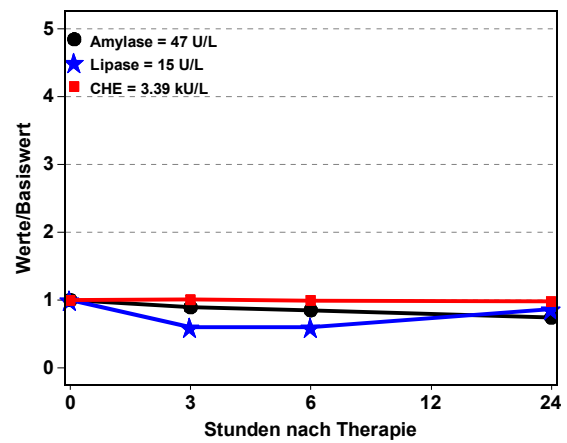
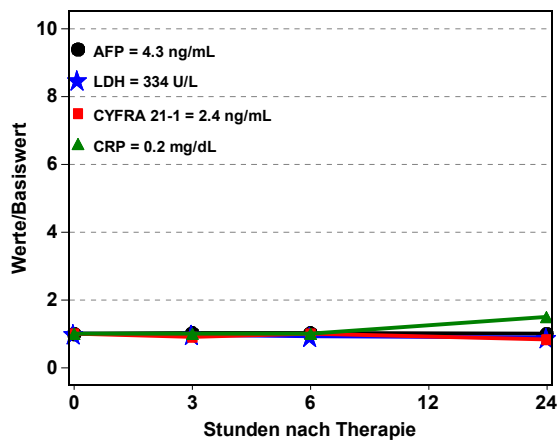
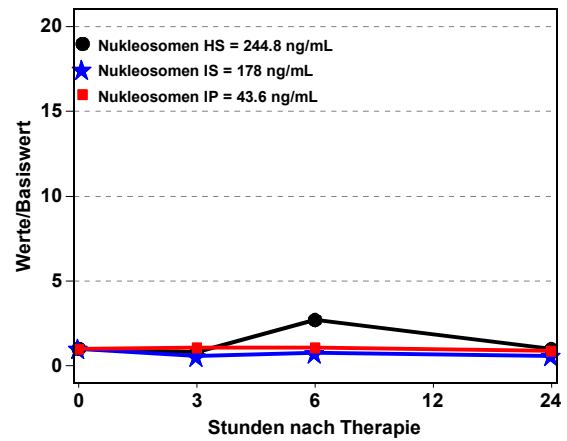
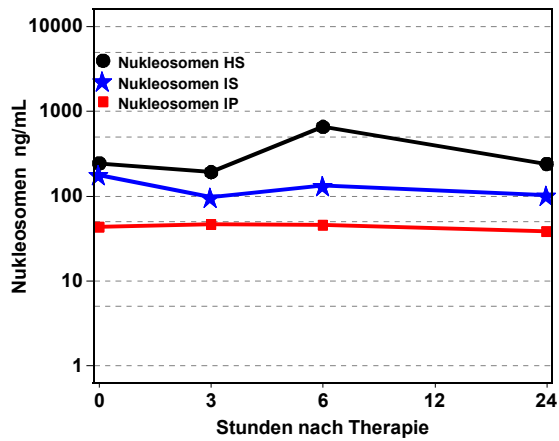


Abbildung 111 Patient 28, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

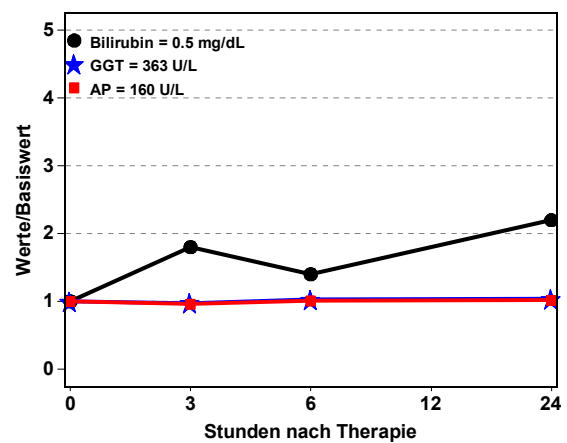
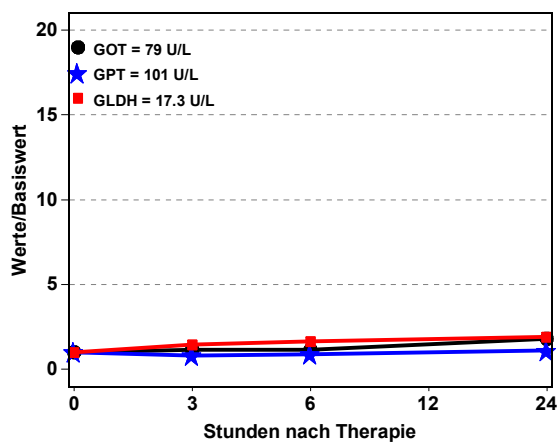
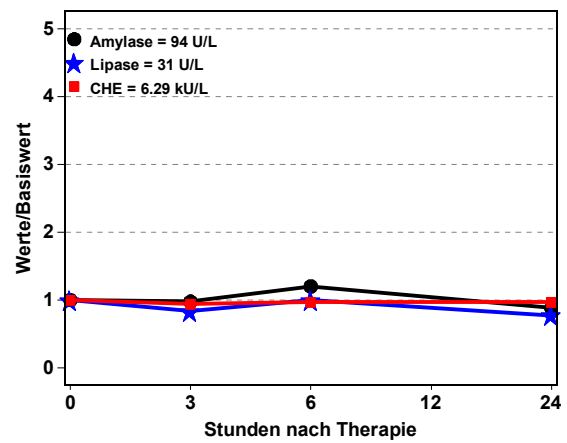
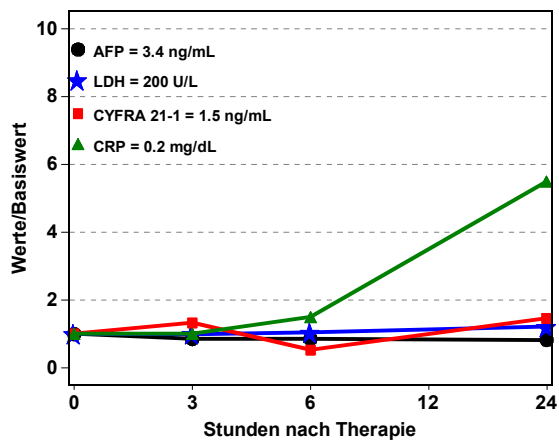
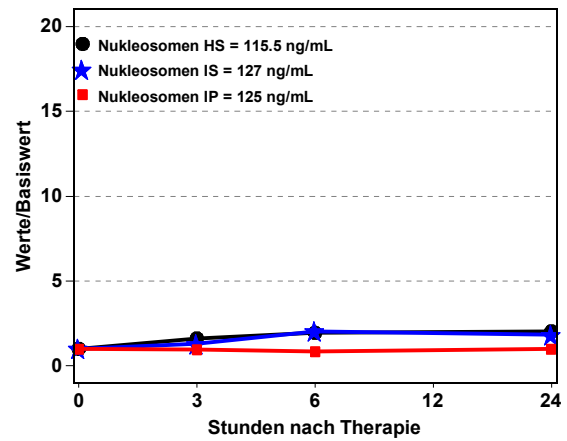
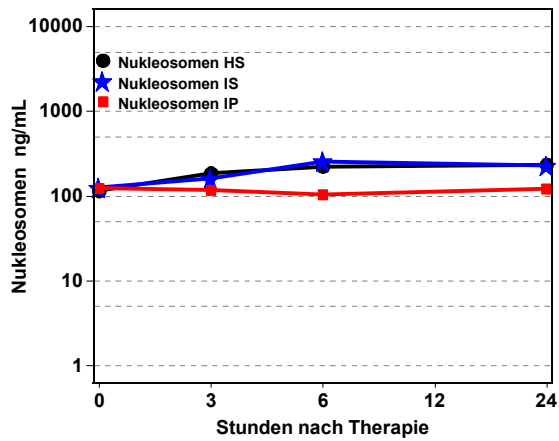


Abbildung 112 Patient 29, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

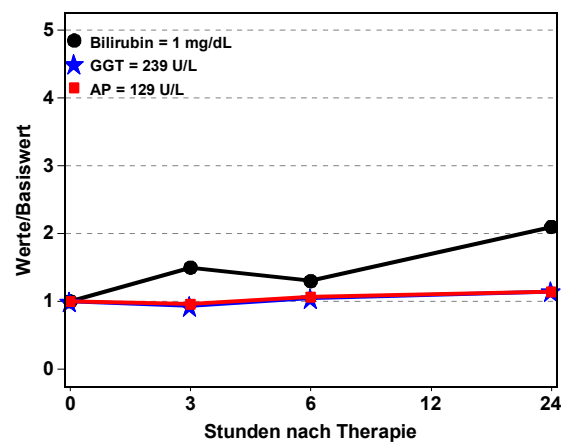
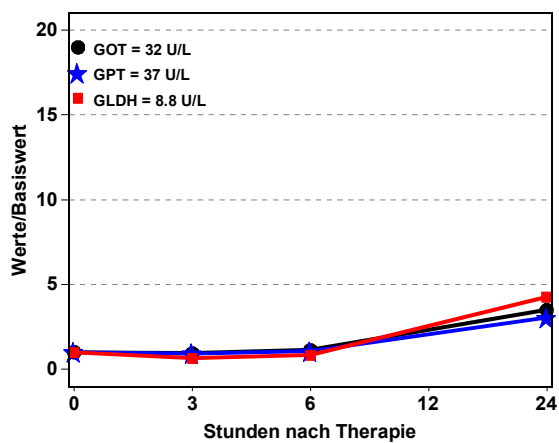
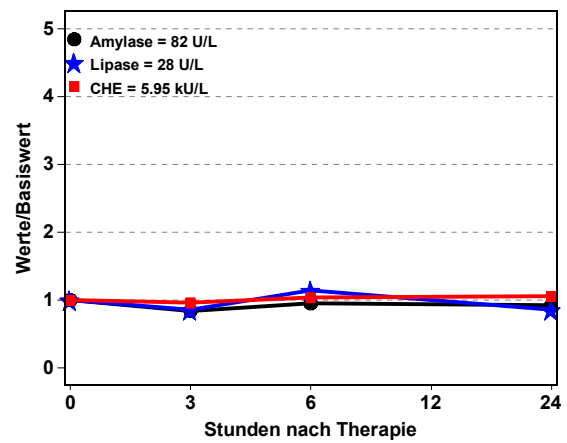
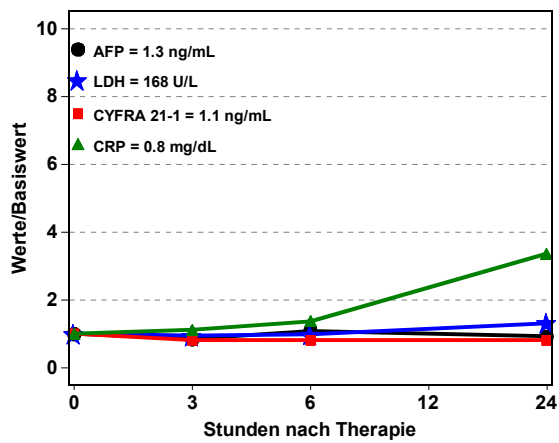
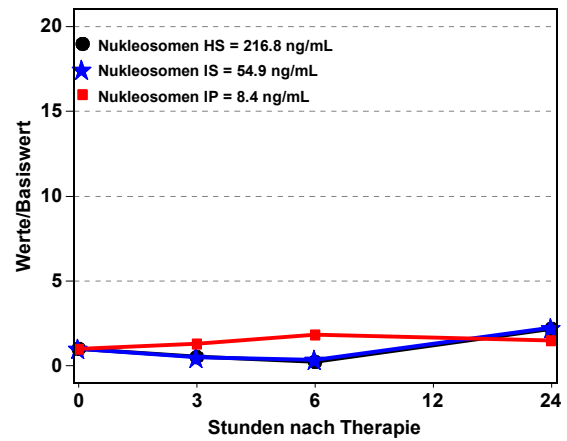
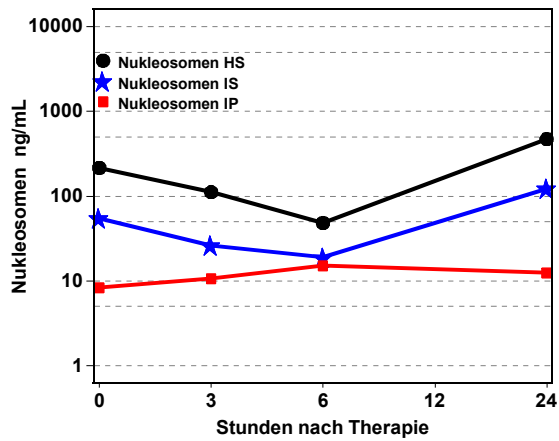


Abbildung 113 Patient 30, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

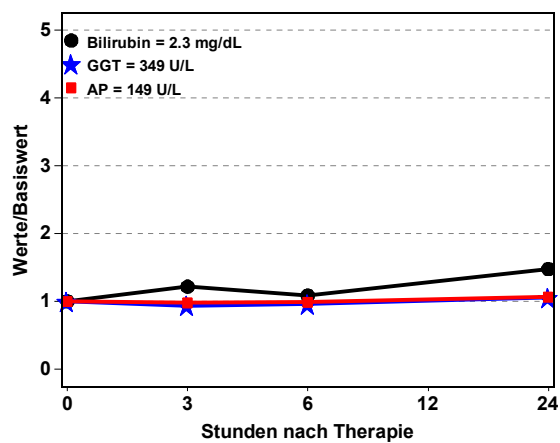
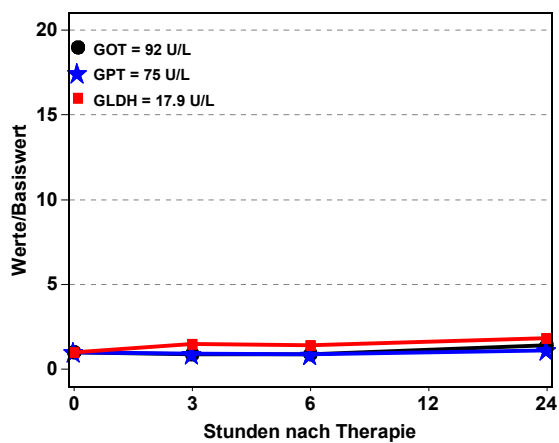
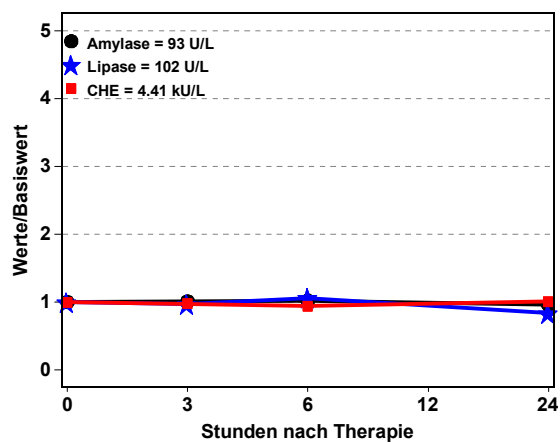
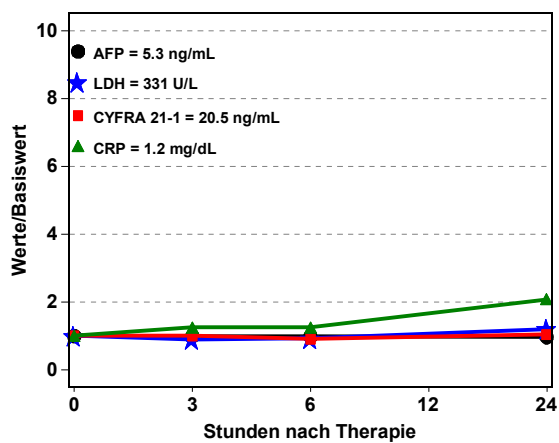
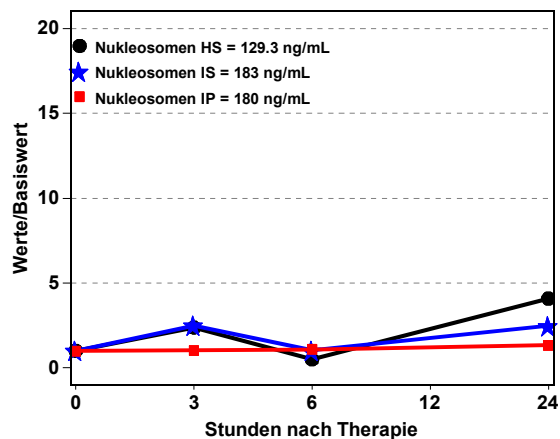
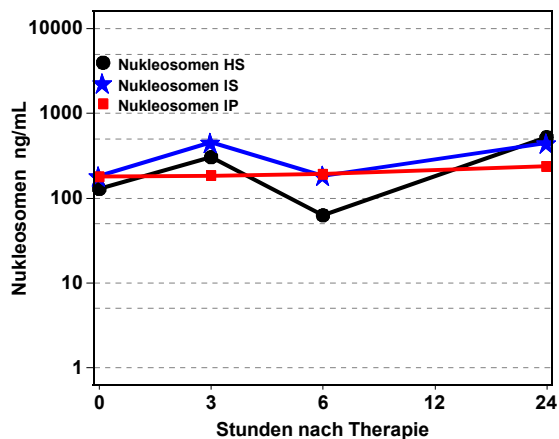


Abbildung 114 Patient 31, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

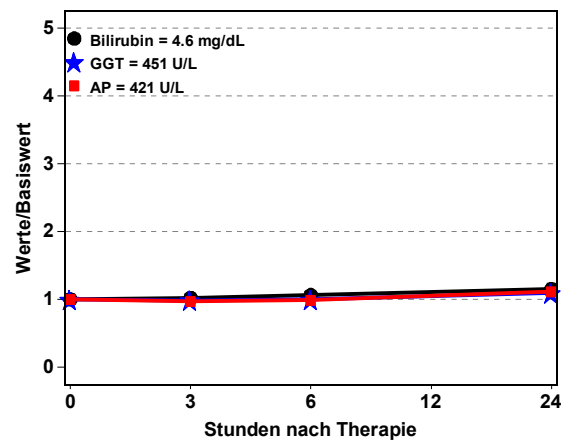
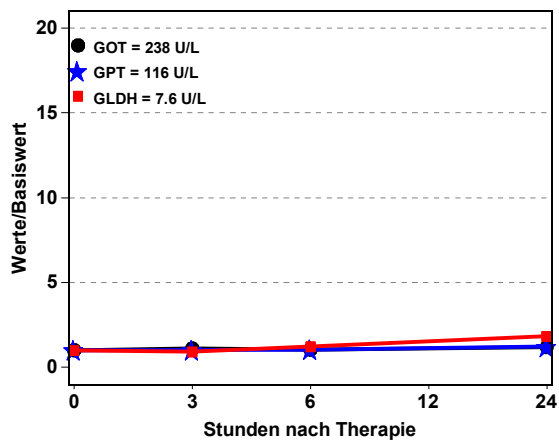
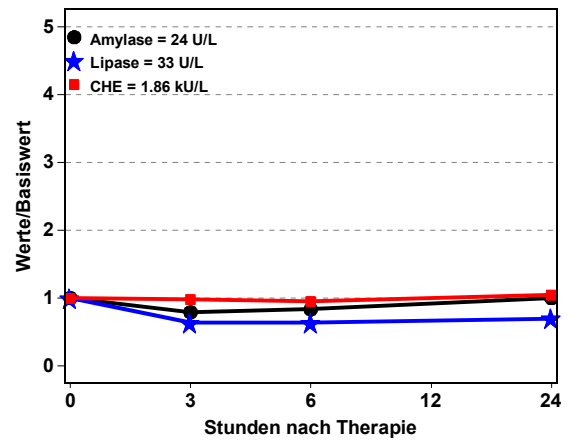
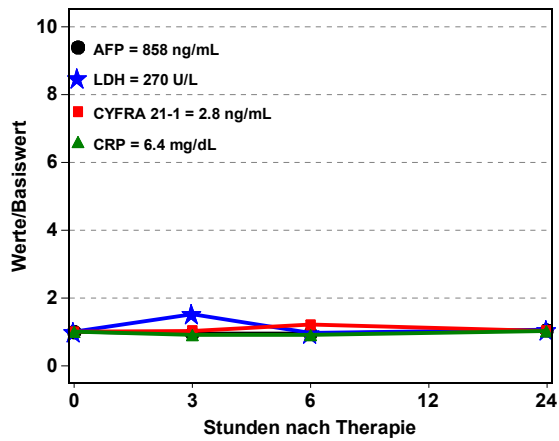
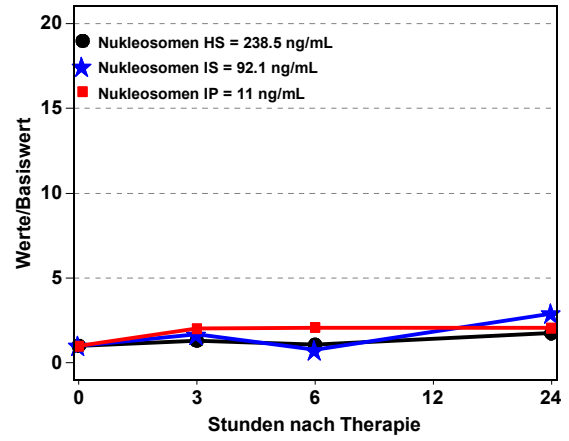
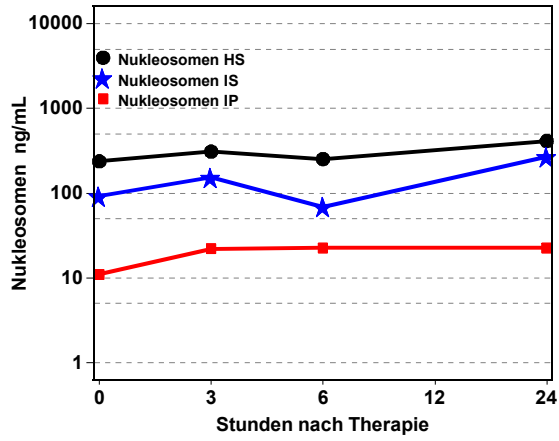


Abbildung 115 Patient 32, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

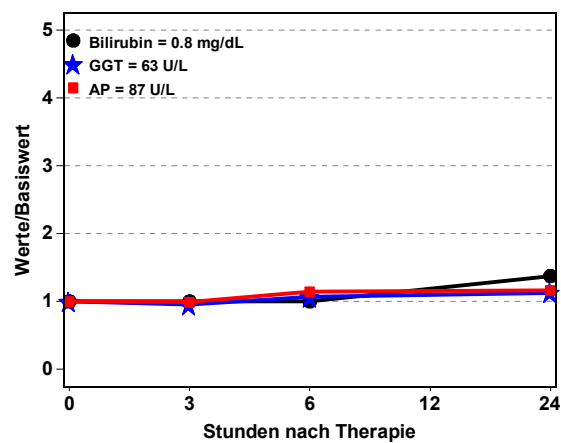
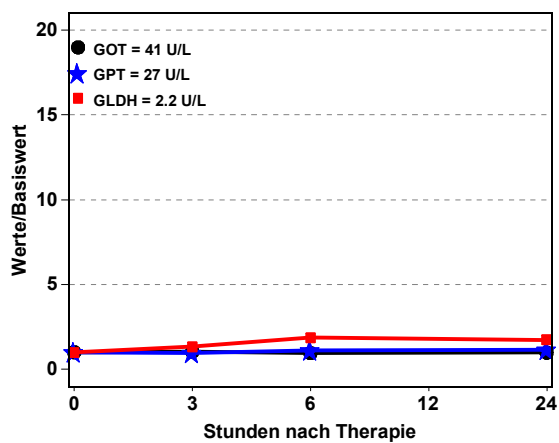
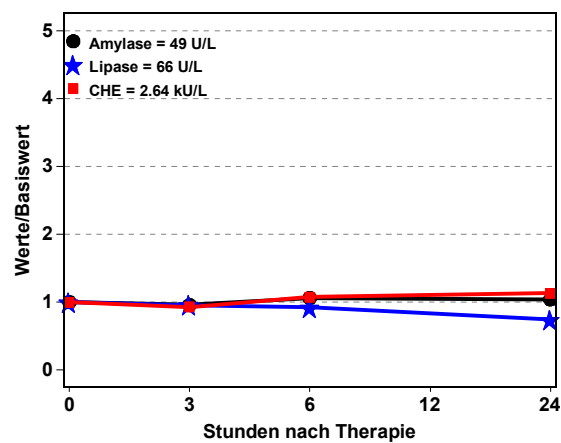
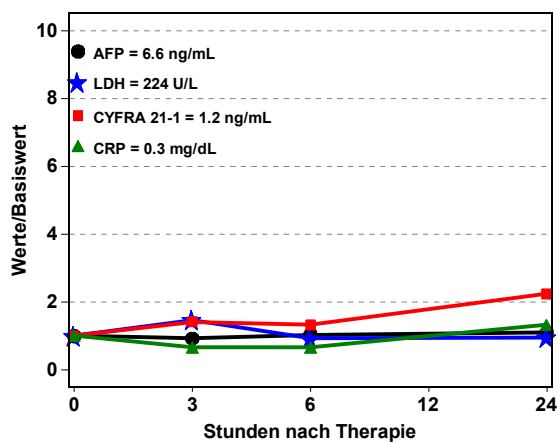
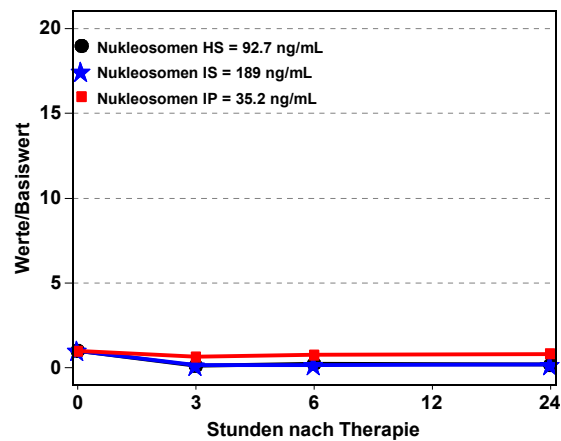
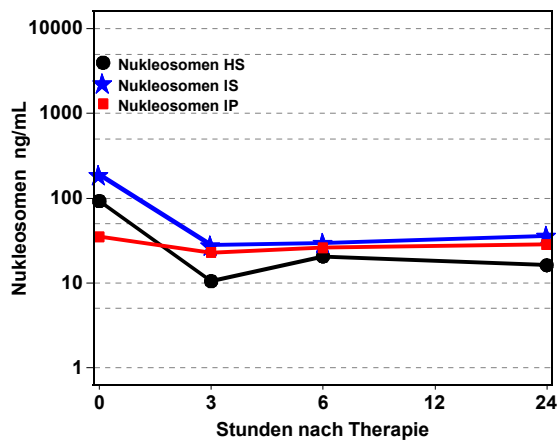


Abbildung 116 Patient 33, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

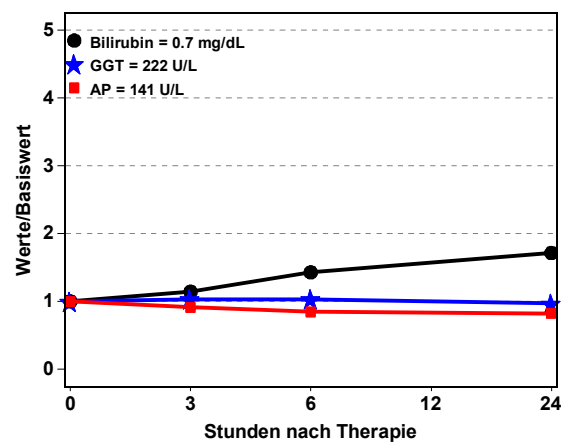
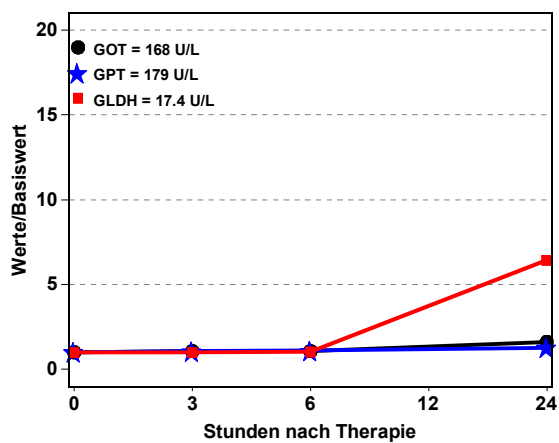
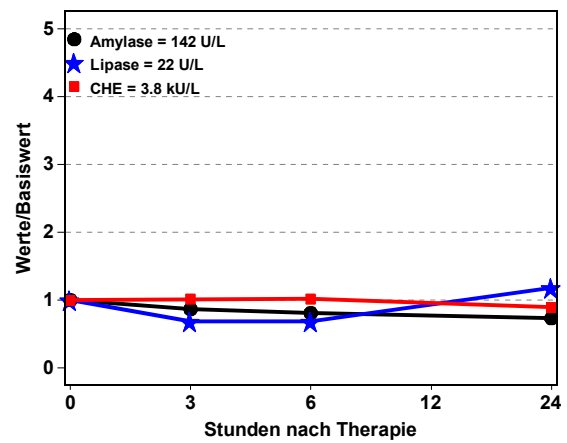
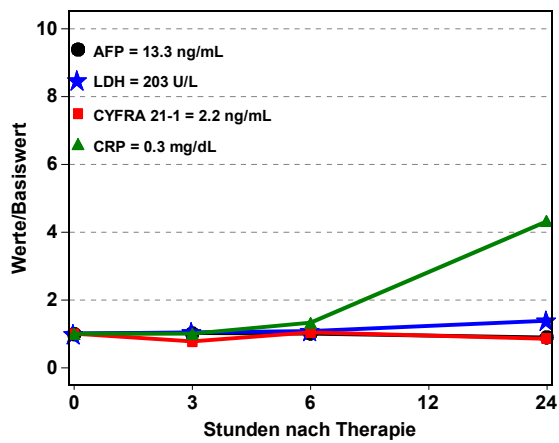
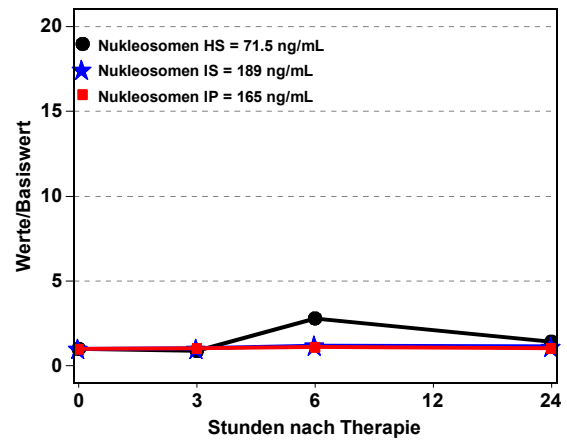
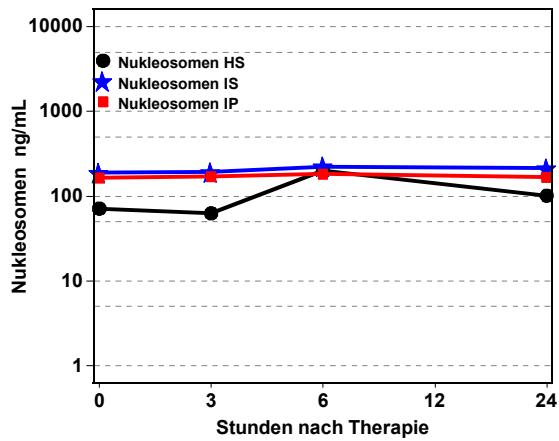


Abbildung 117 Patient 34, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation+RFA, Status: PR

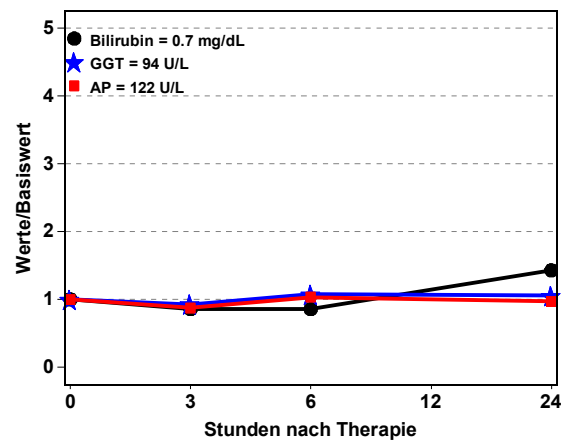
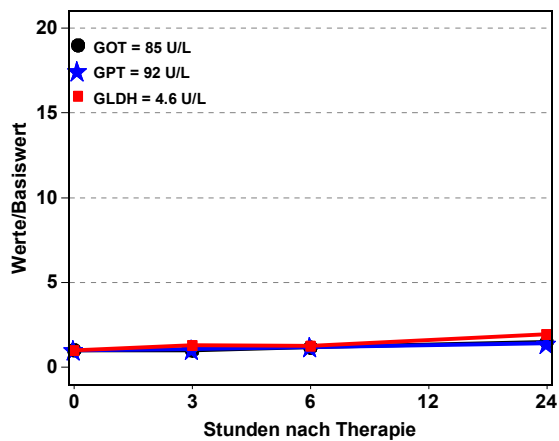
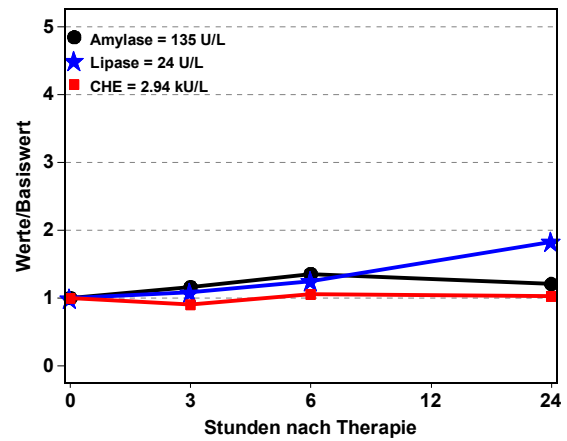
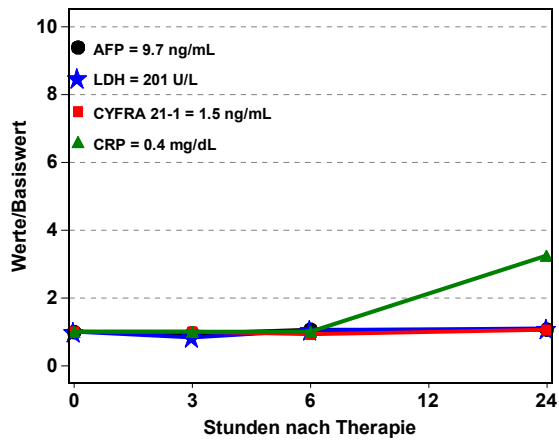
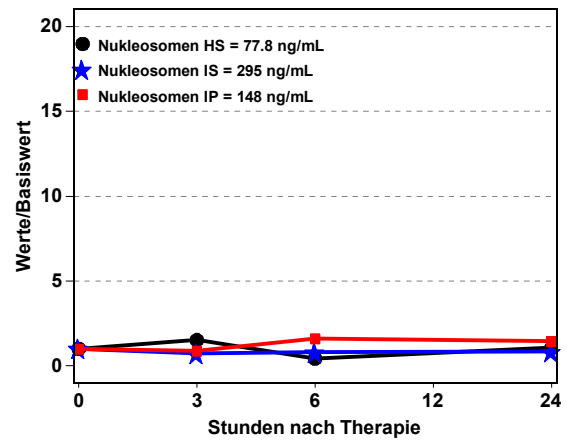
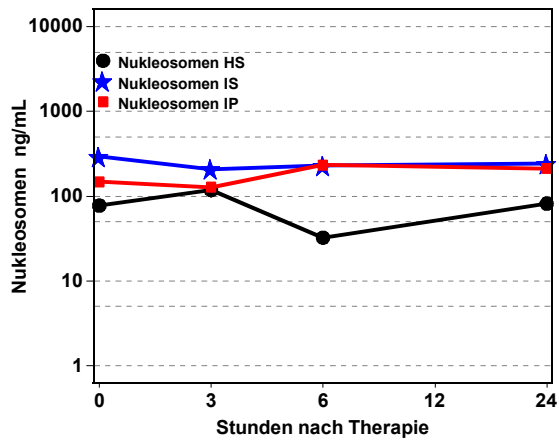


Abbildung 118 Patient 34, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation+RFA, Status: CR

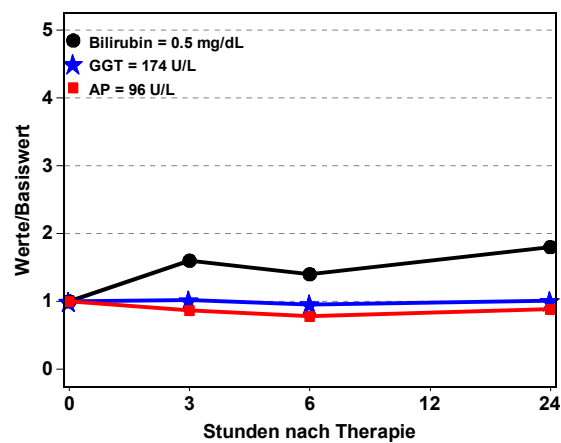
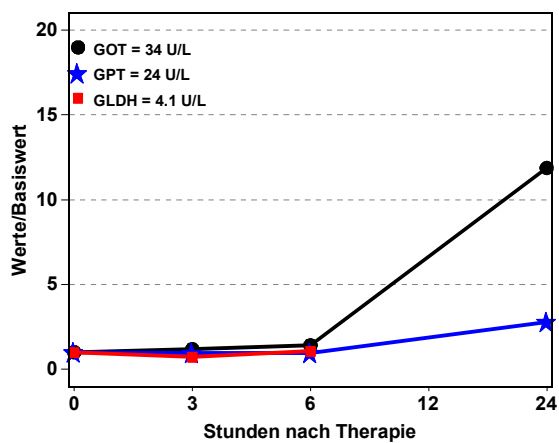
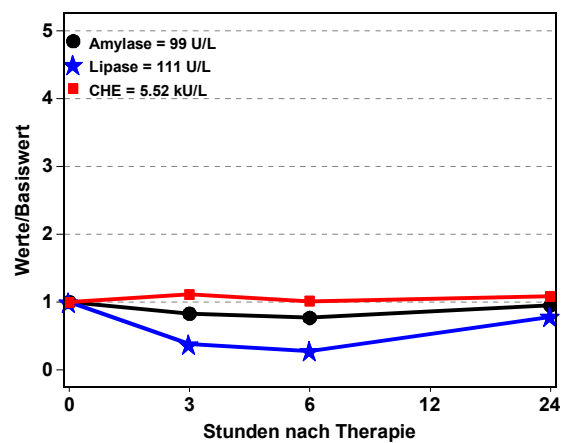
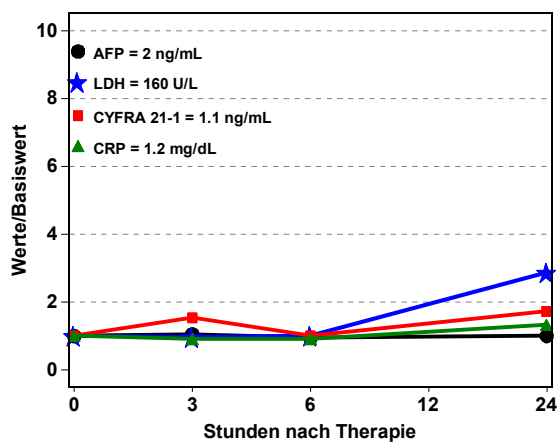
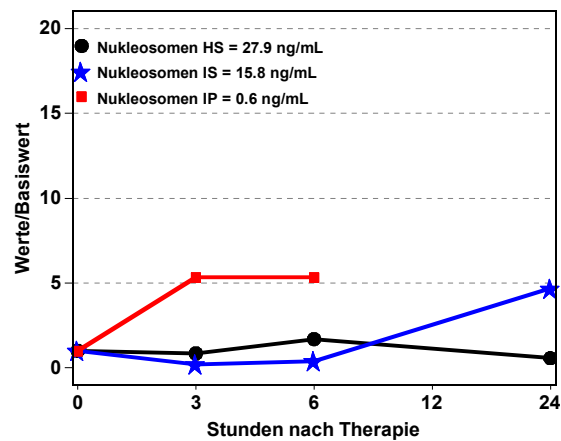
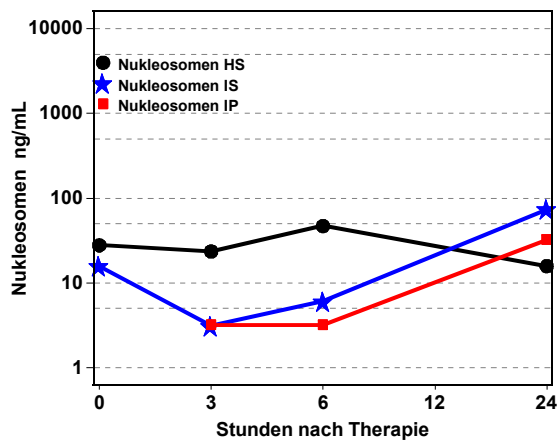


Abbildung 119 Patient 35, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

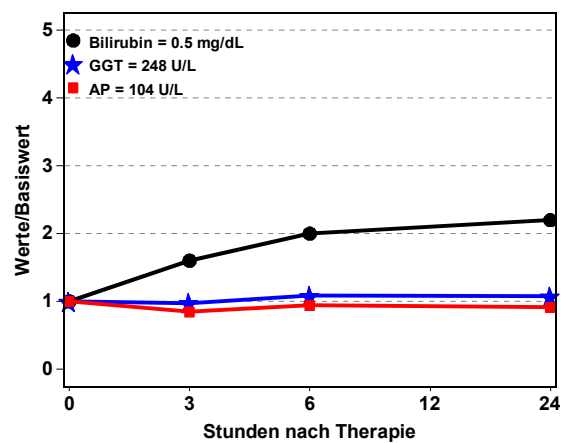
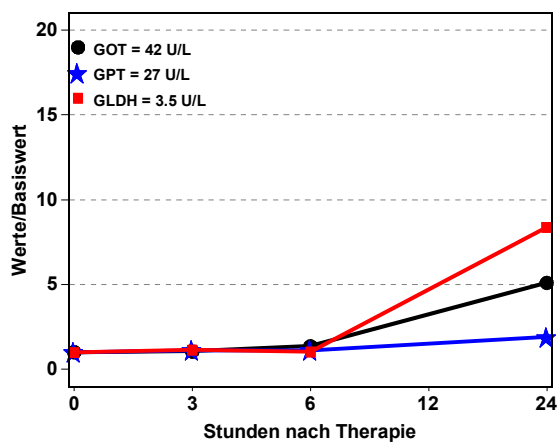
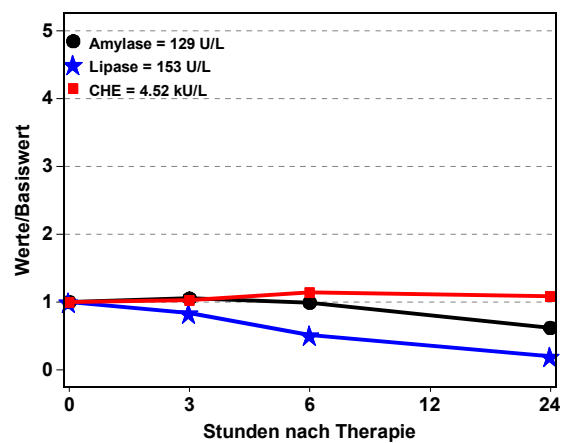
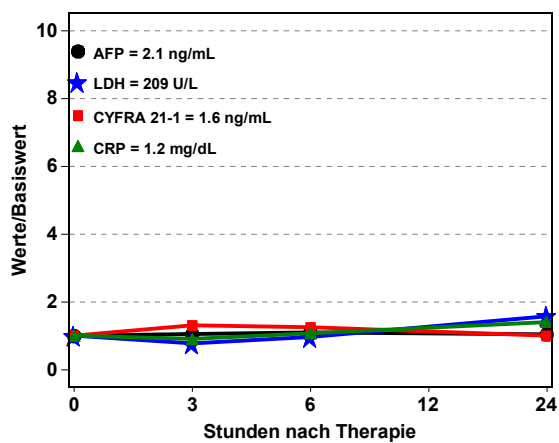
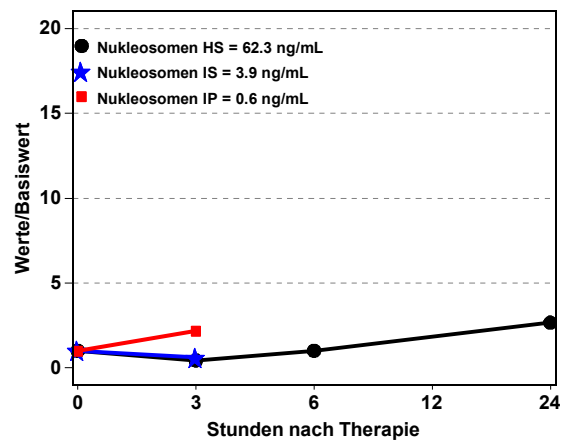
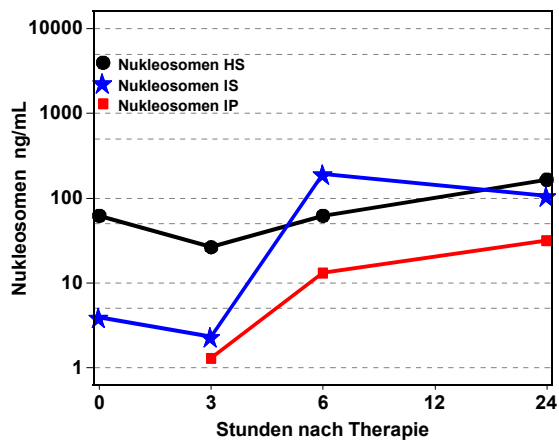


Abbildung 120 Patient 35, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

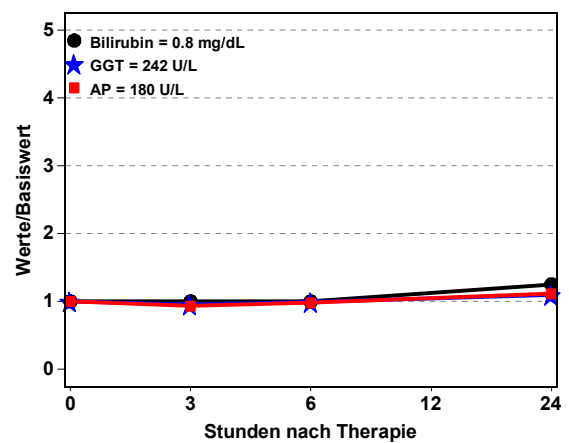
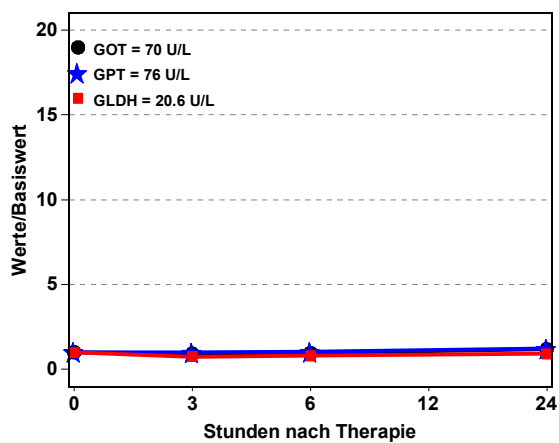
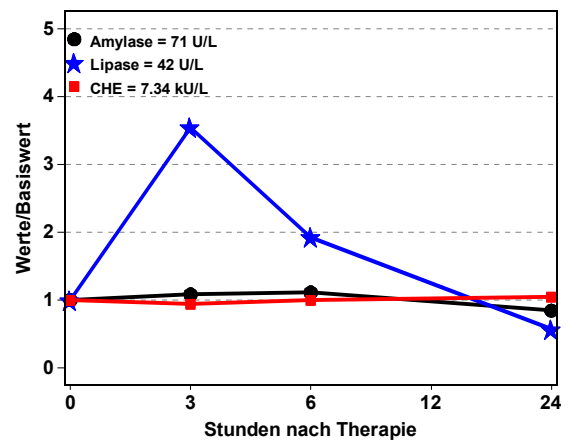
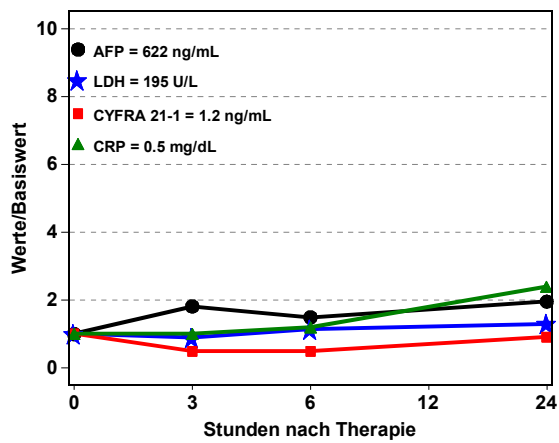
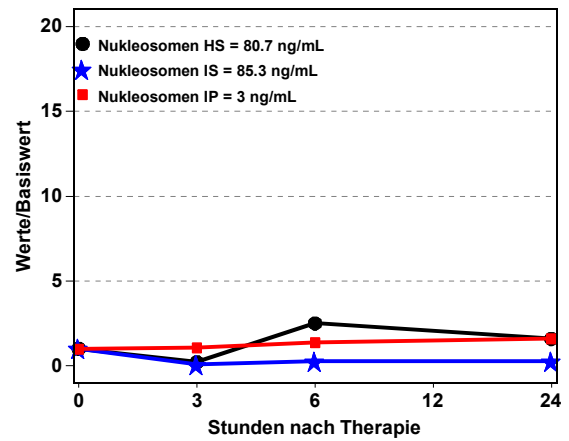
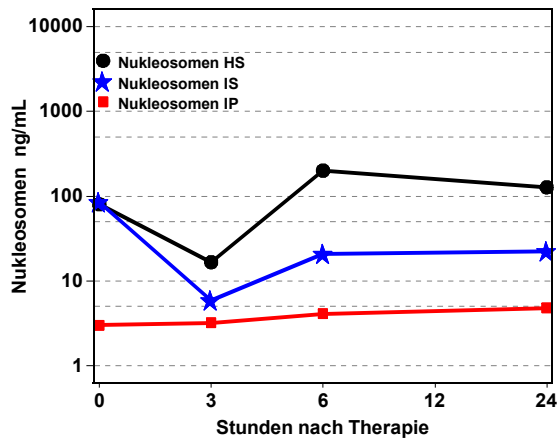


Abbildung 121 Patient 36, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

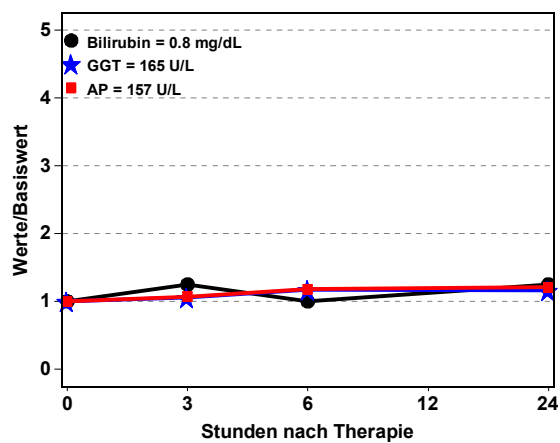
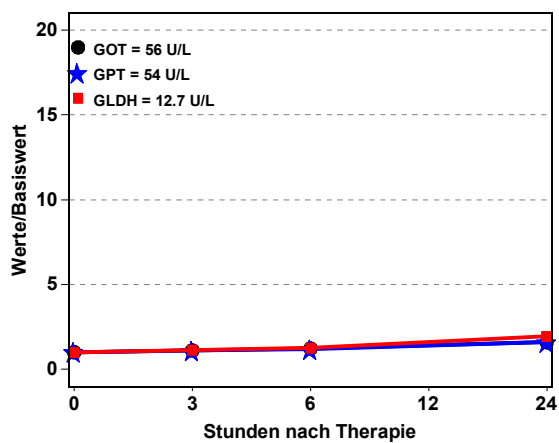
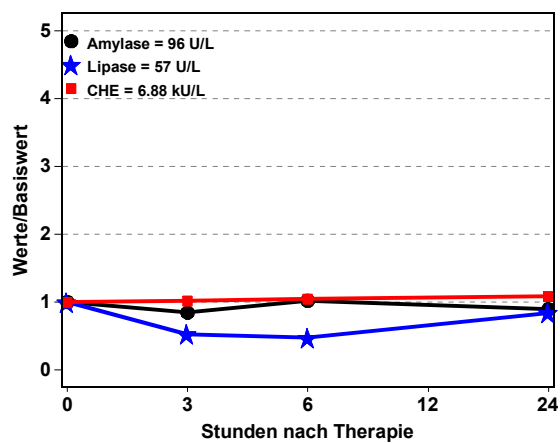
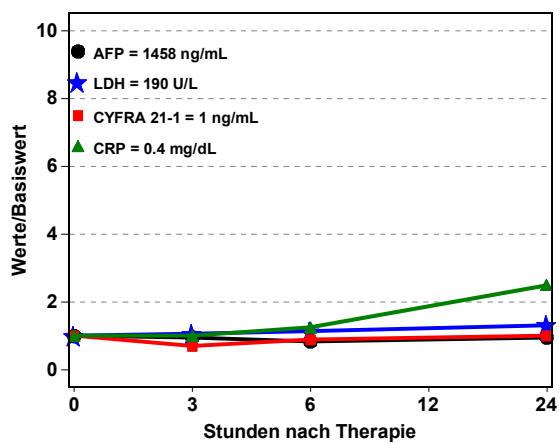
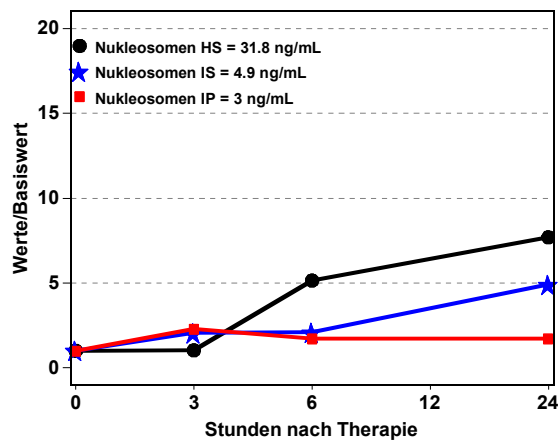
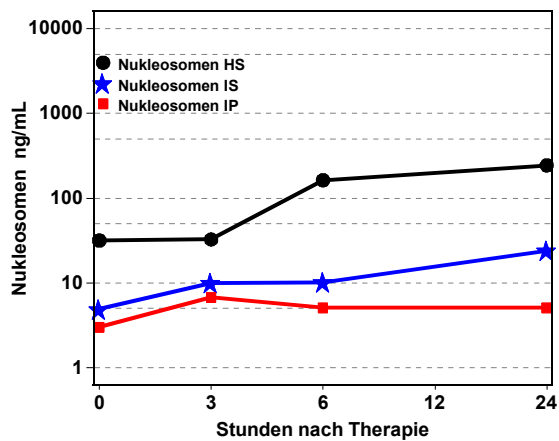


Abbildung 122 Patient 36, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

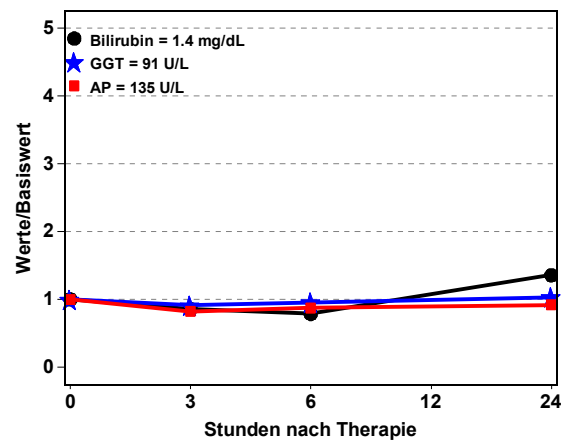
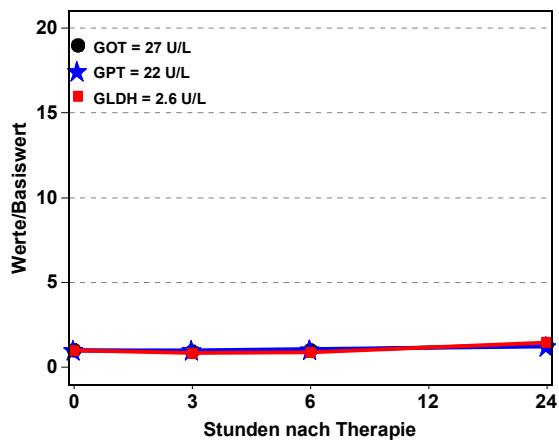
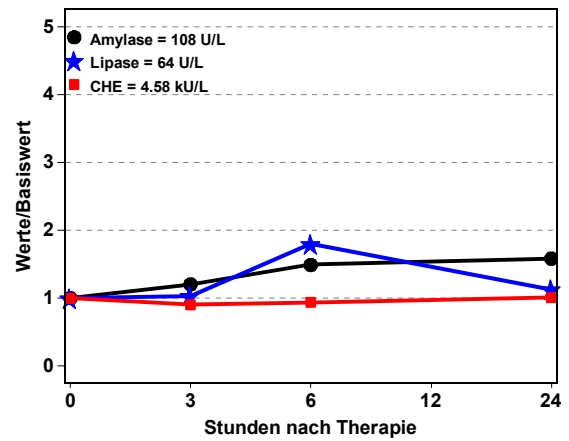
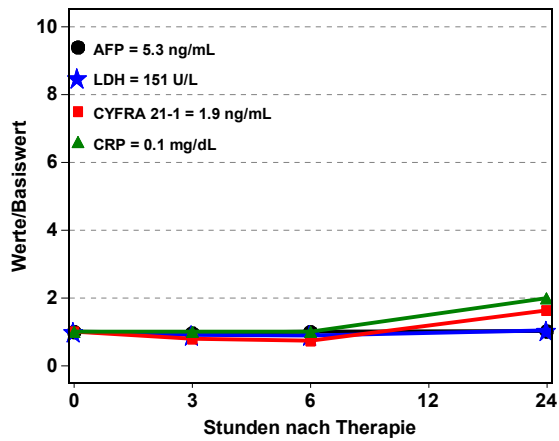
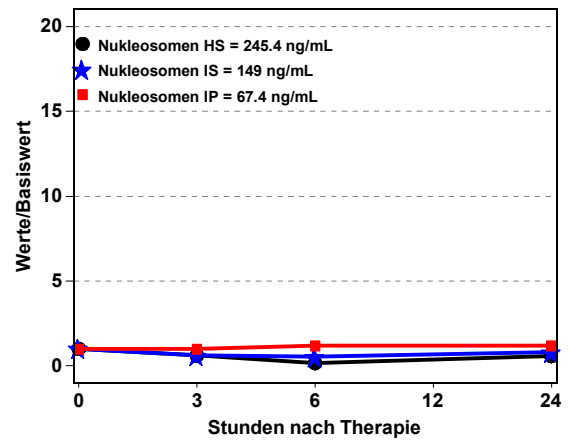
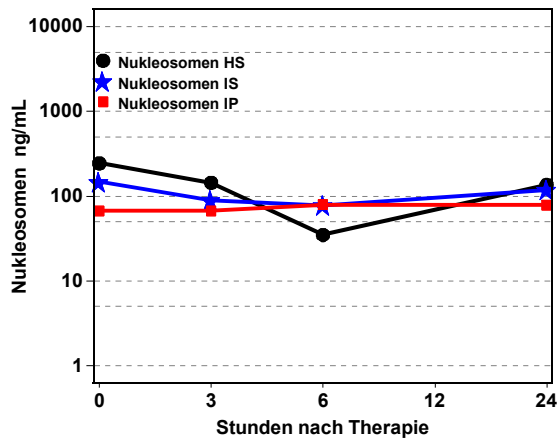


Abbildung 123 Patient 37, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

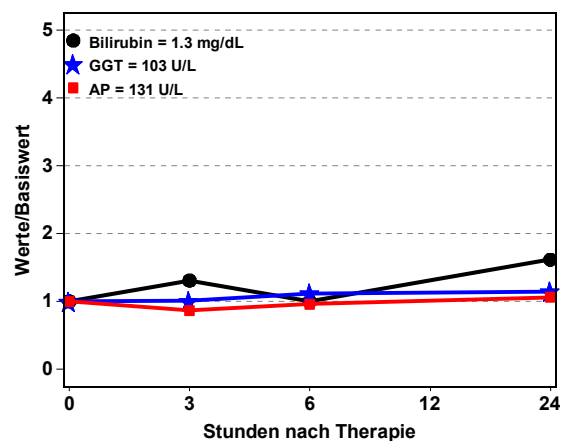
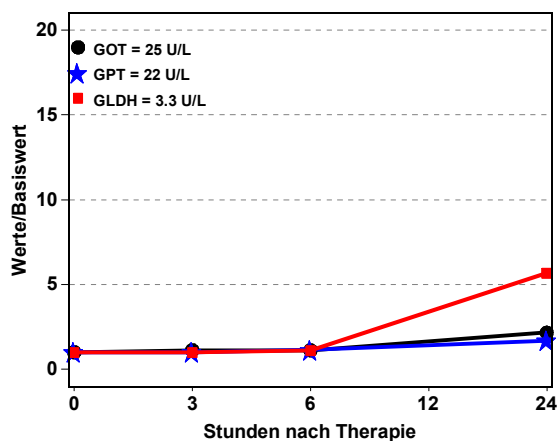
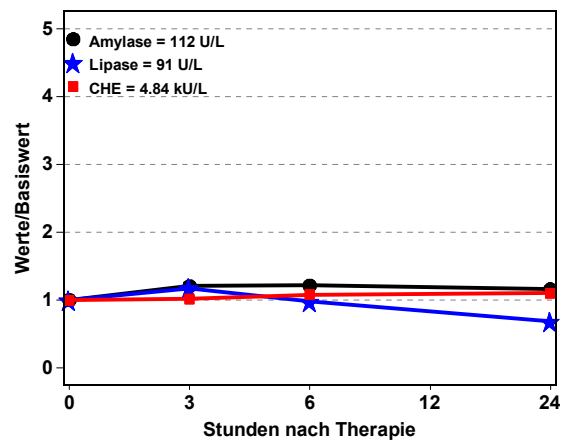
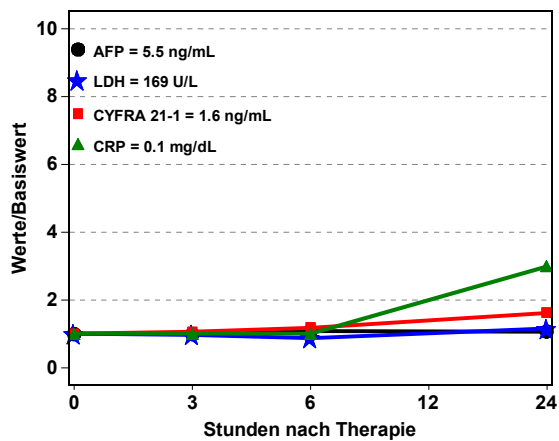
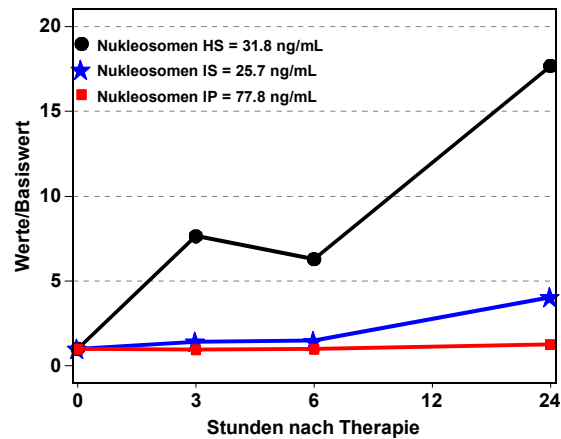
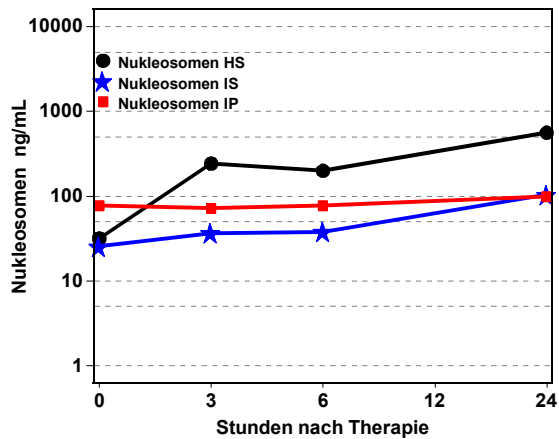


Abbildung 124 Patient 37, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

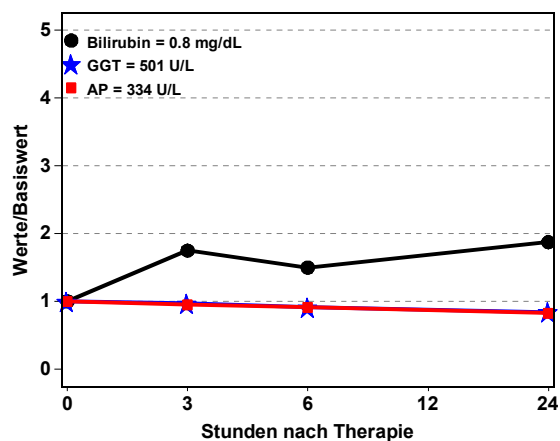
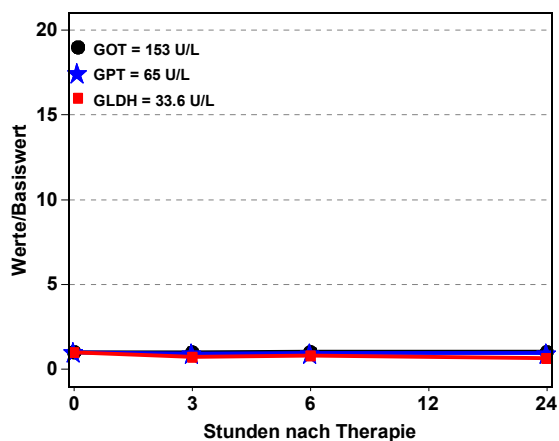
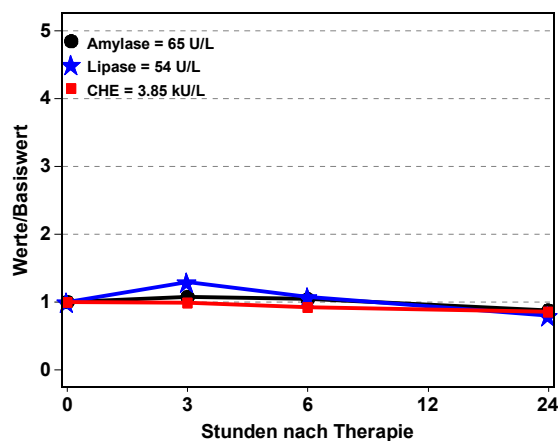
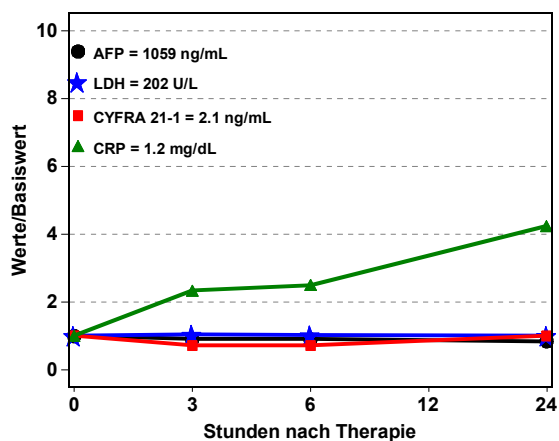
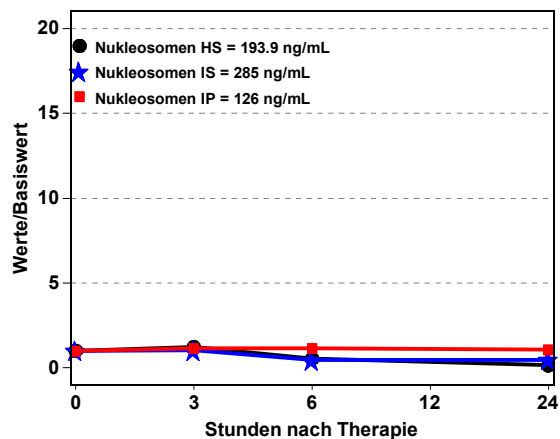
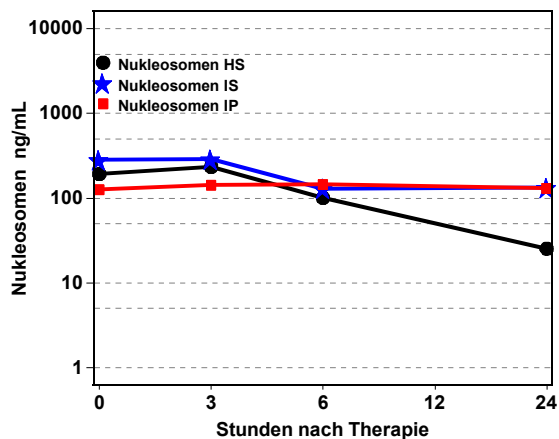


Abbildung 125 Patient 38, weiblich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

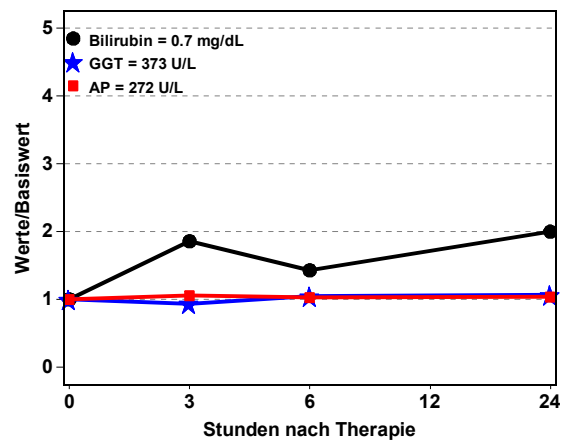
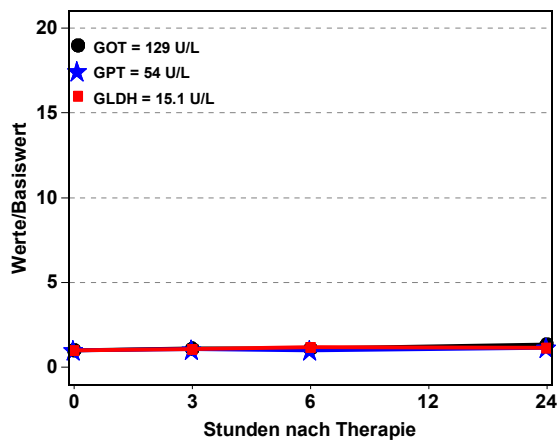
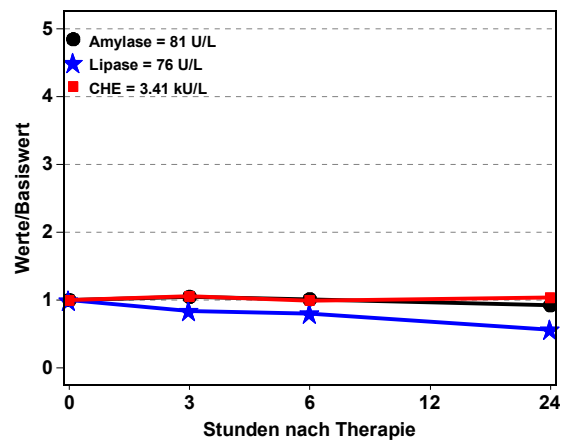
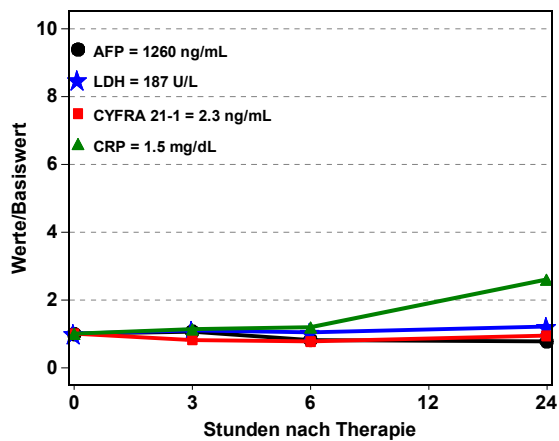
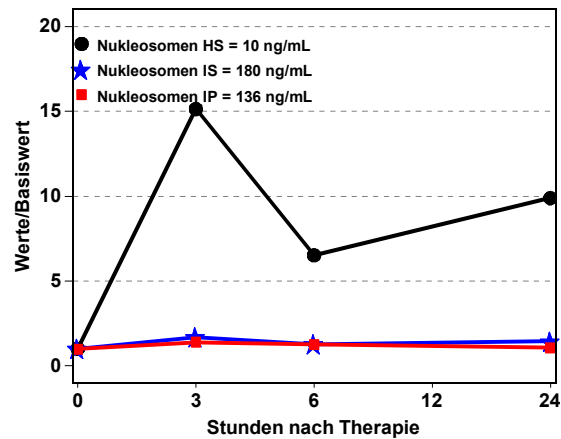
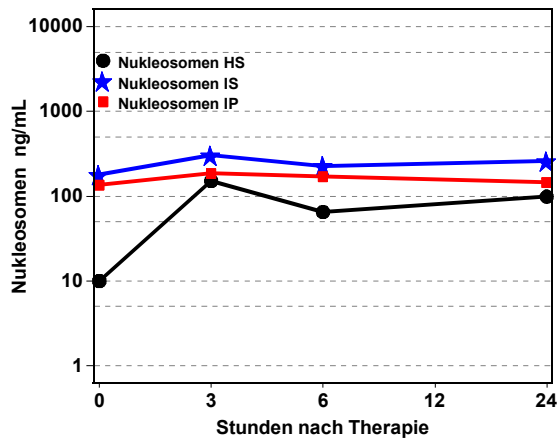


Abbildung 126 Patient 38, weiblich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

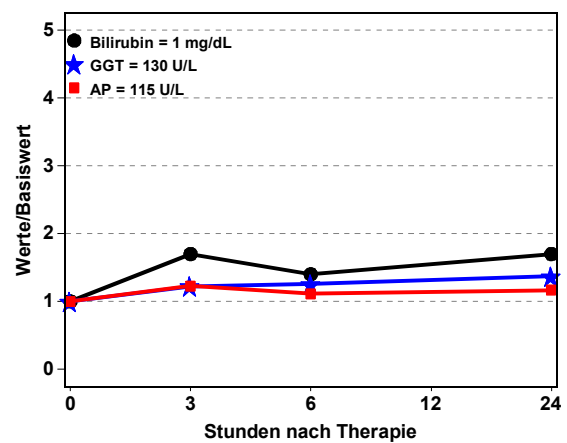
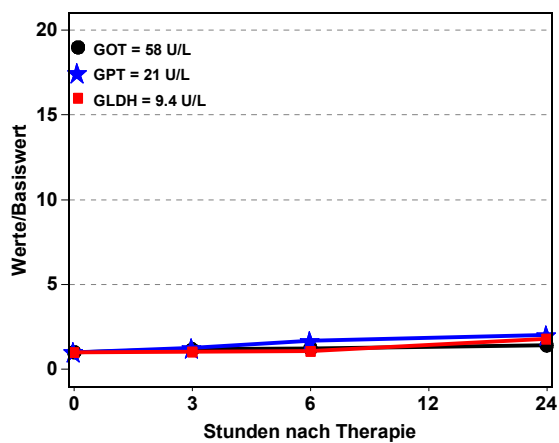
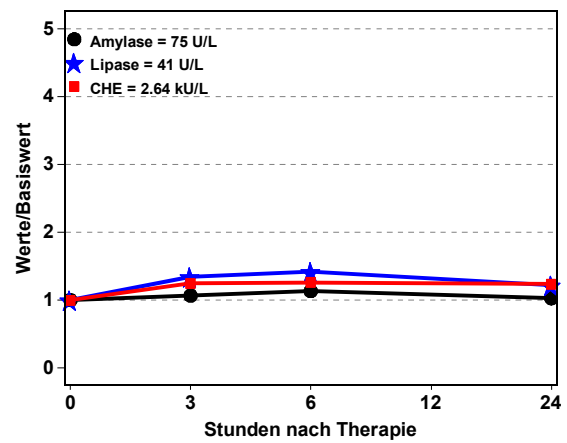
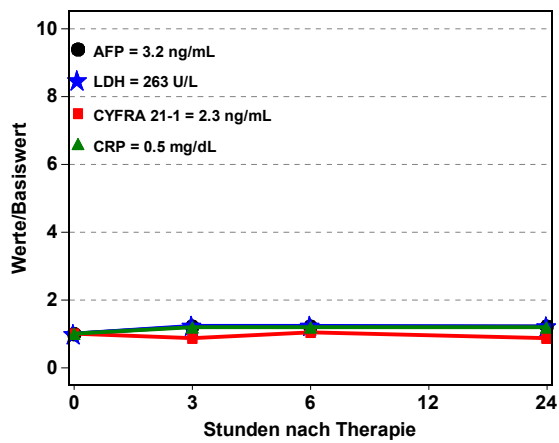
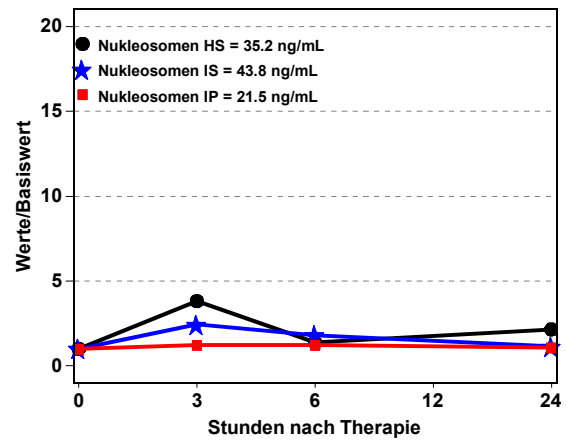
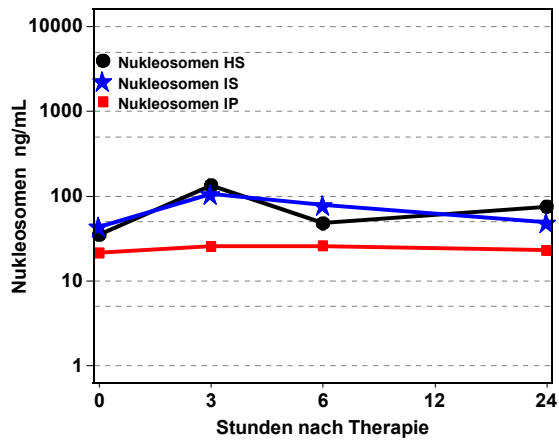


Abbildung 127 Patient 39, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

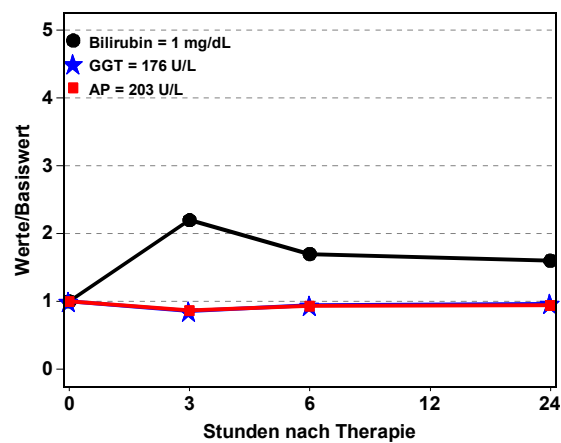
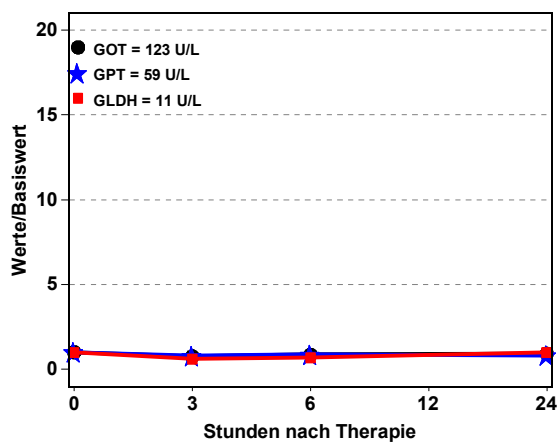
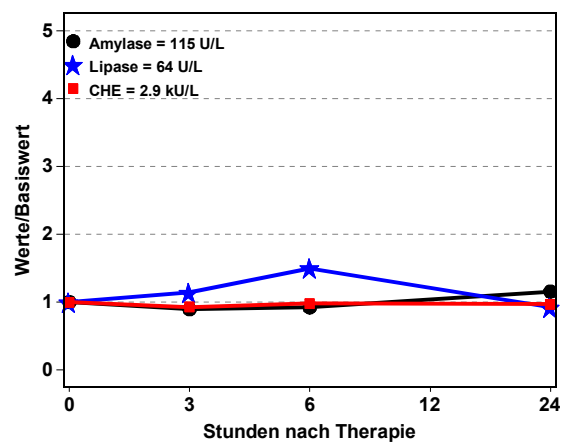
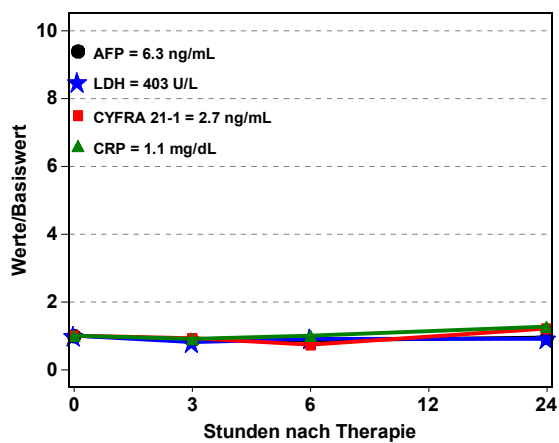
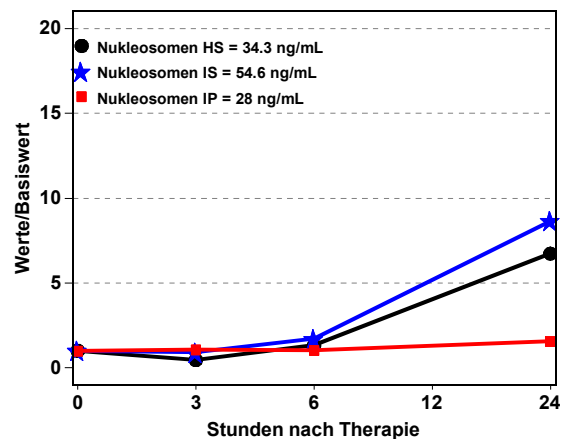
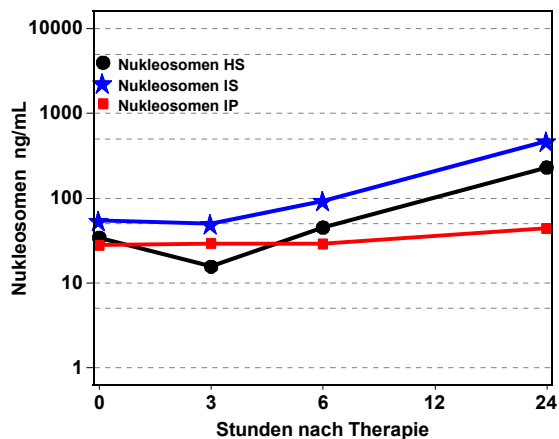


Abbildung 128 Patient 39, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

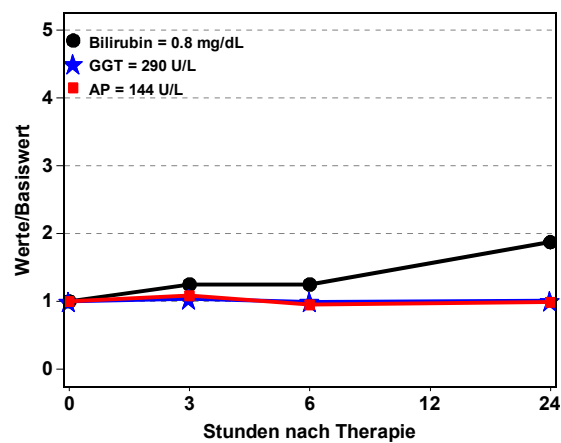
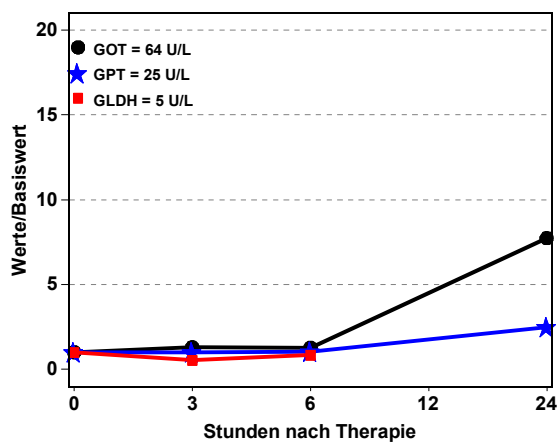
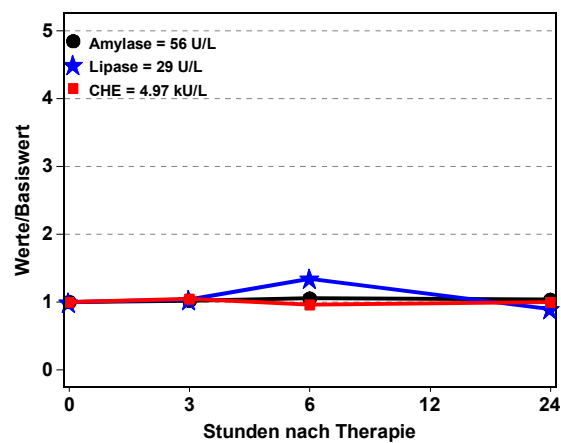
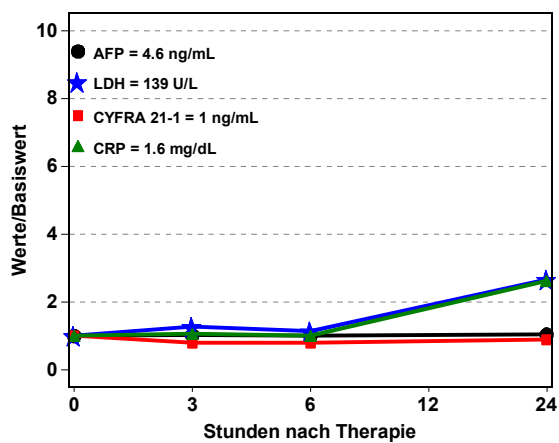
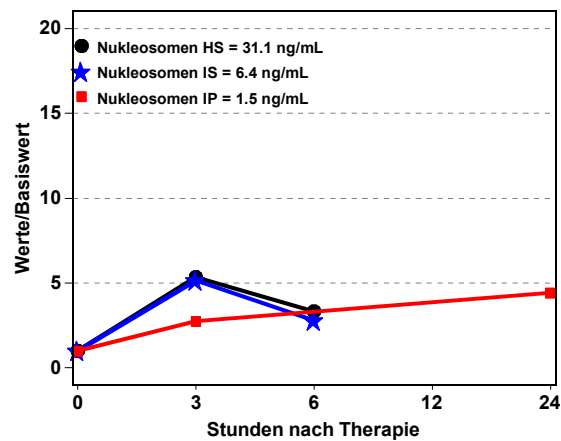
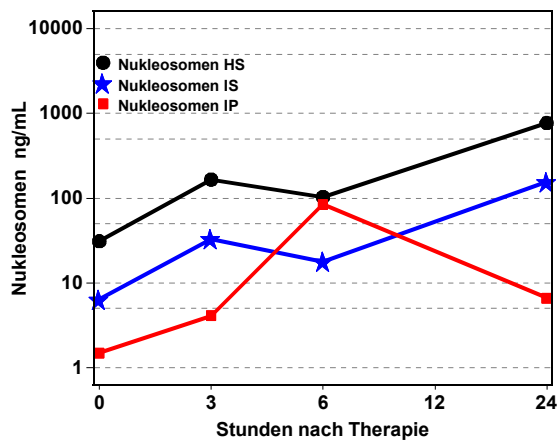


Abbildung 129 Patient 40, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

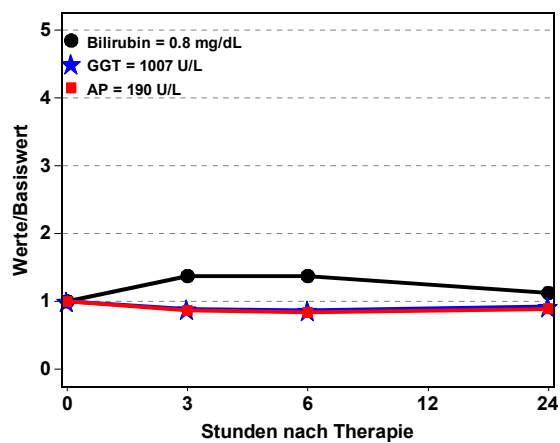
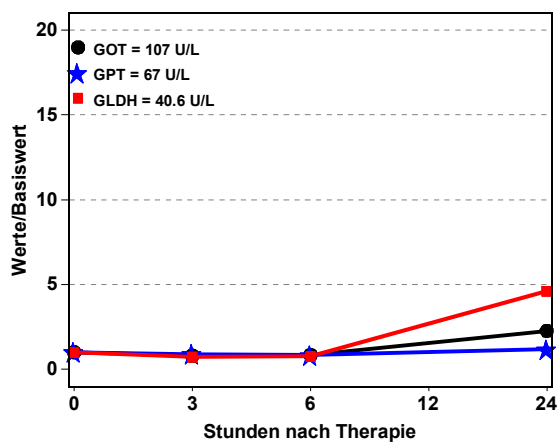
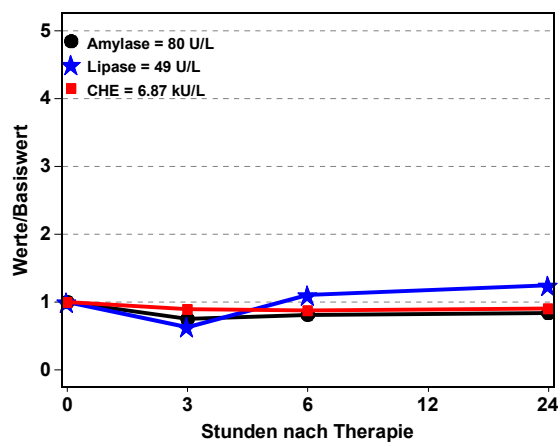
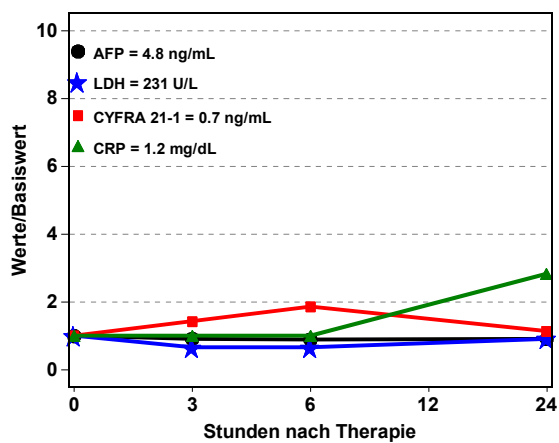
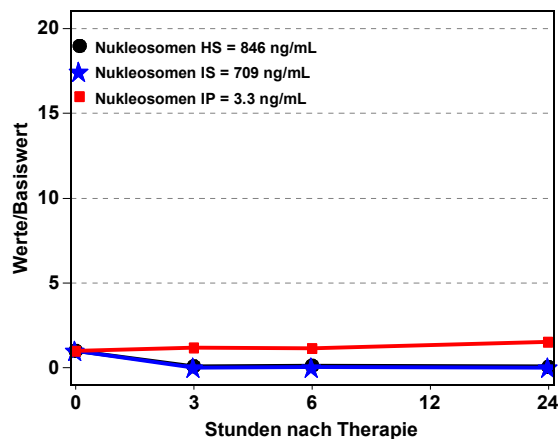
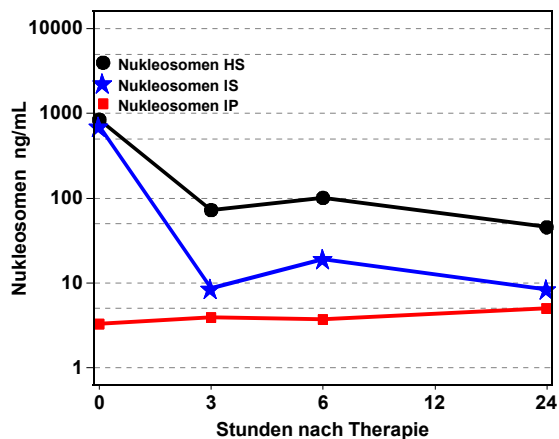


Abbildung 130 Patient 40, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

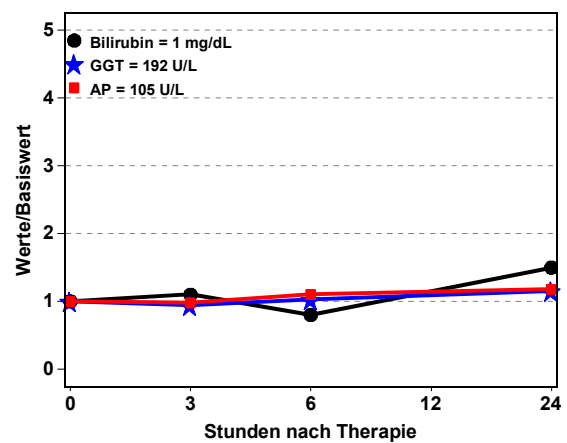
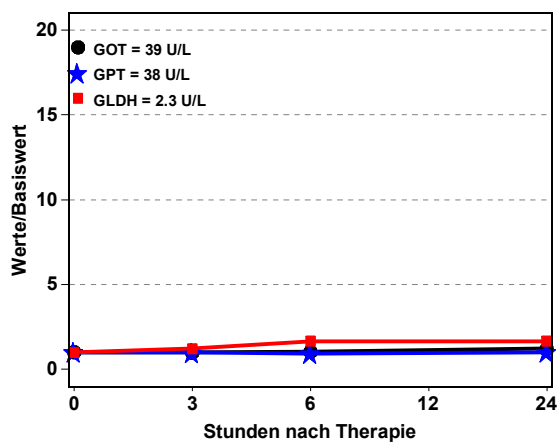
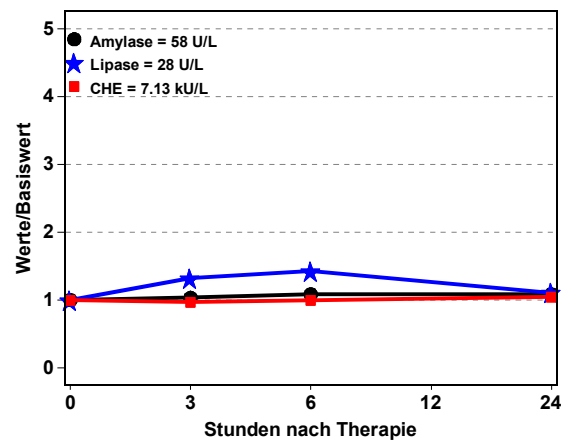
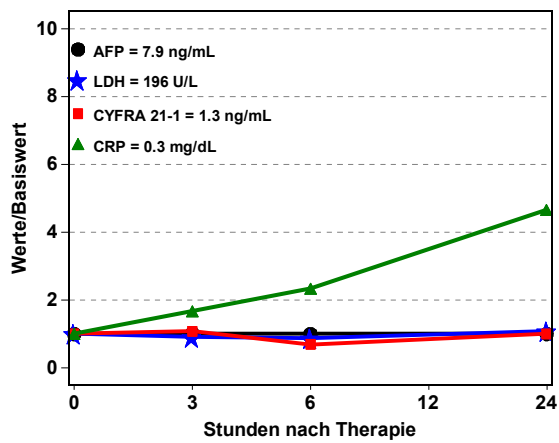
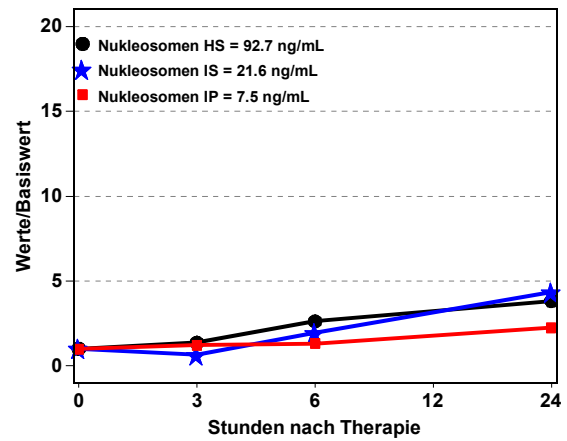
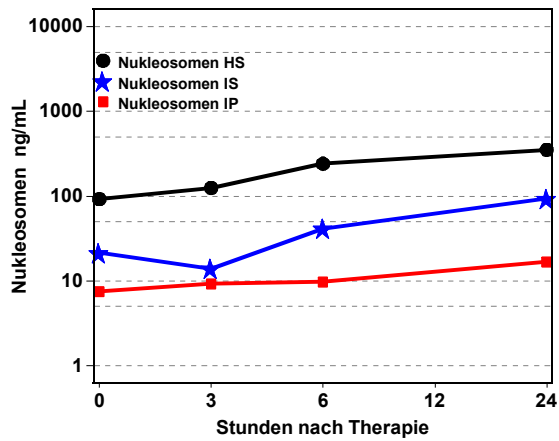


Abbildung 131 Patient 41, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

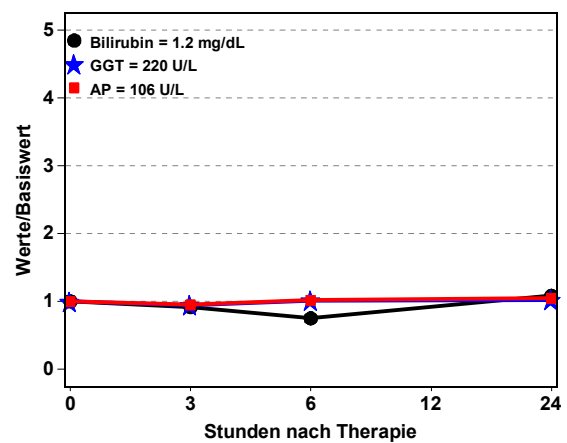
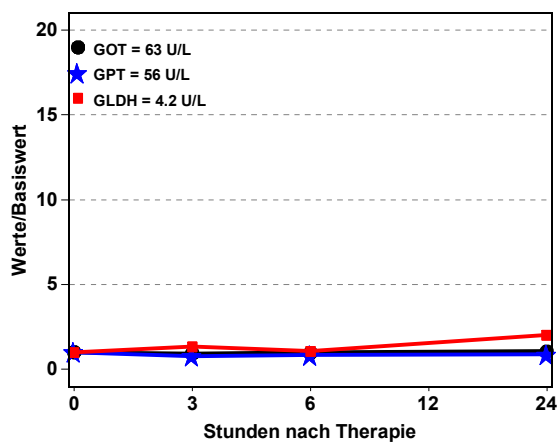
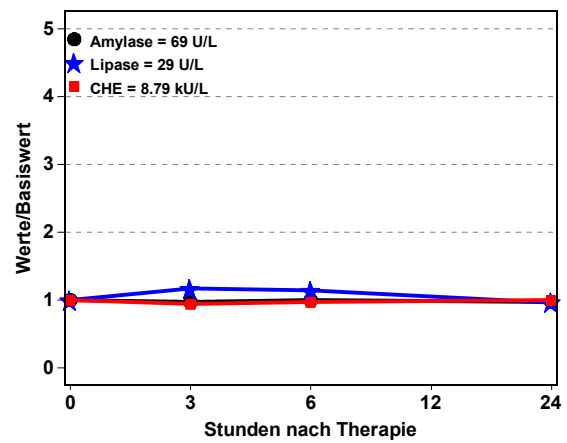
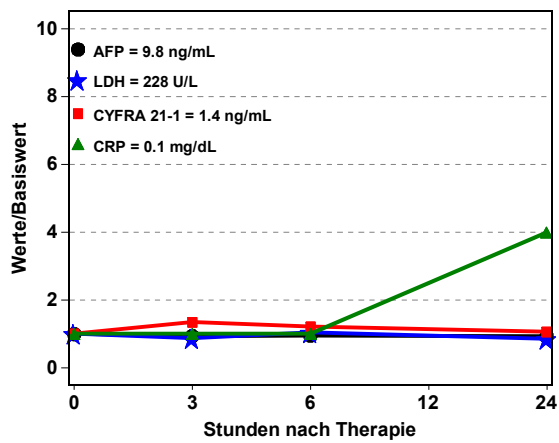
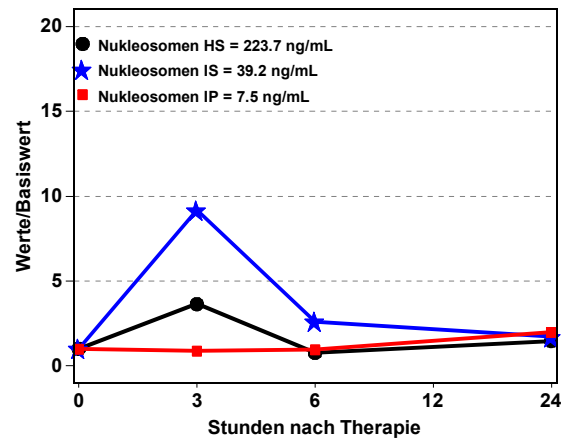
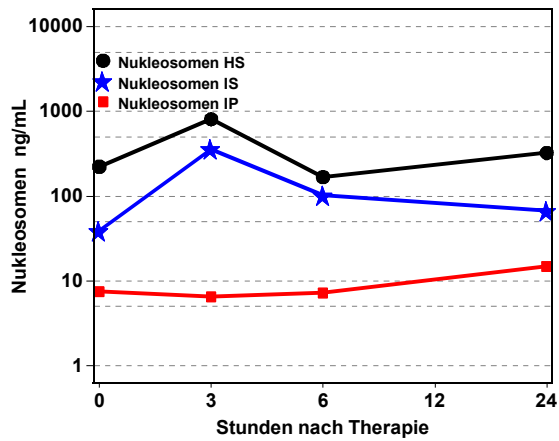


Abbildung 132 Patient 41, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

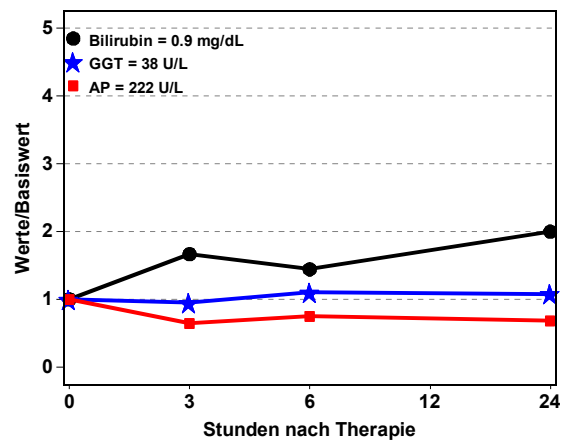
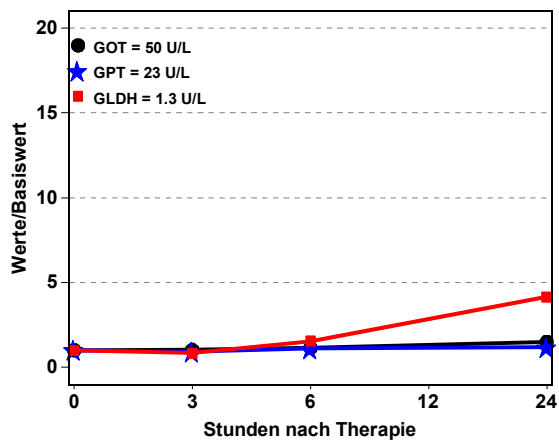
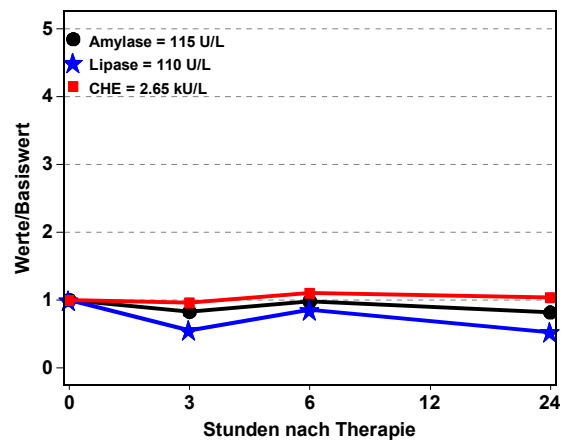
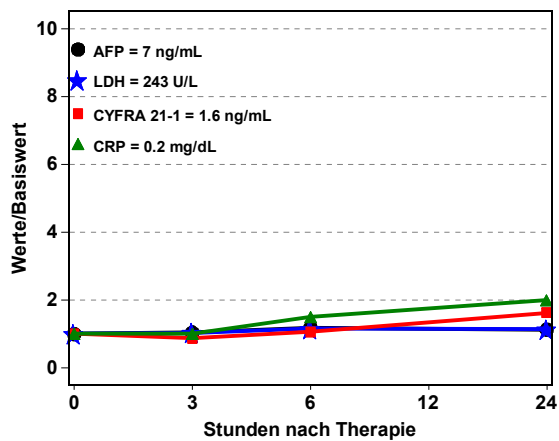
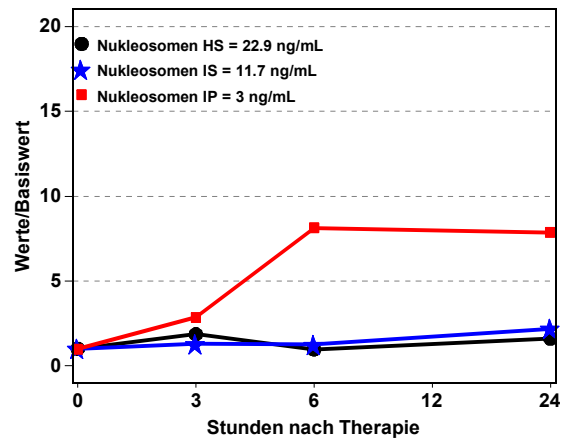
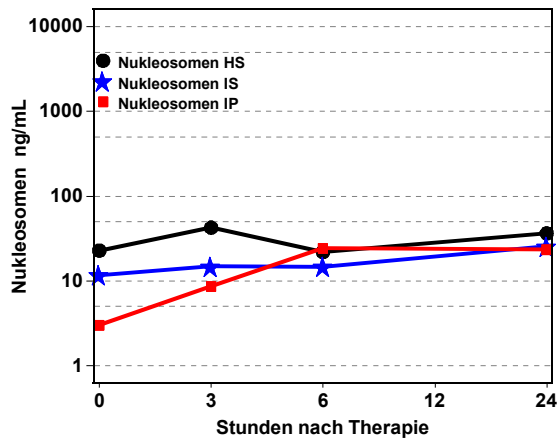


Abbildung 133 Patient 42, weiblich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

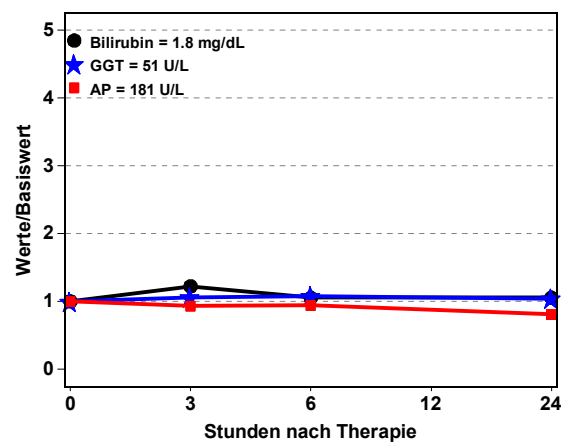
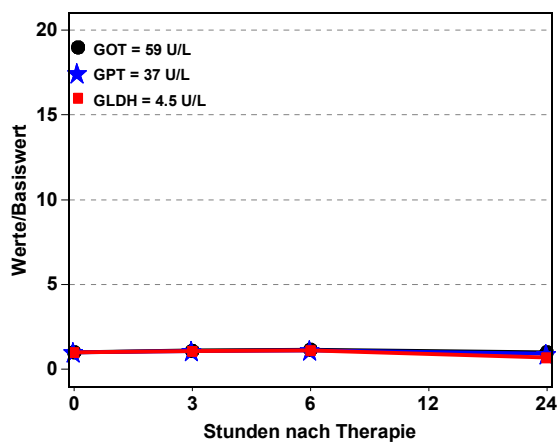
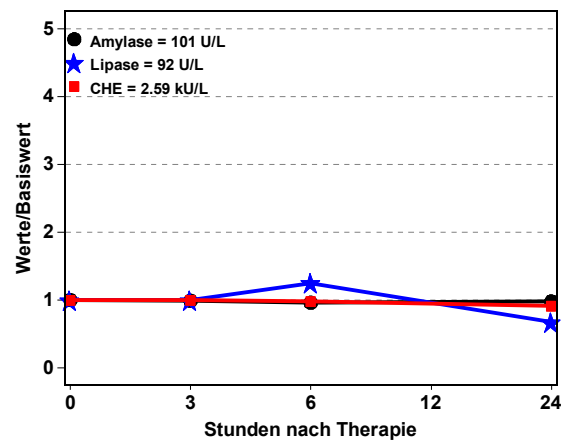
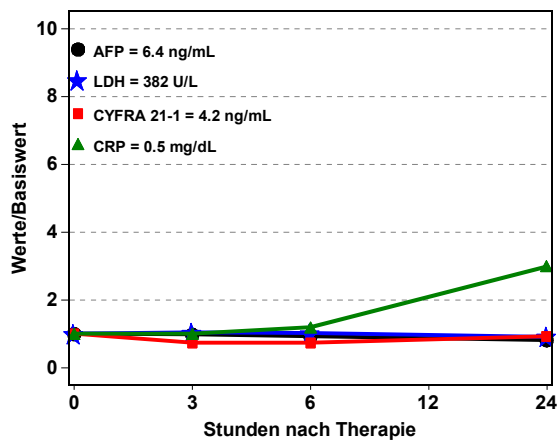
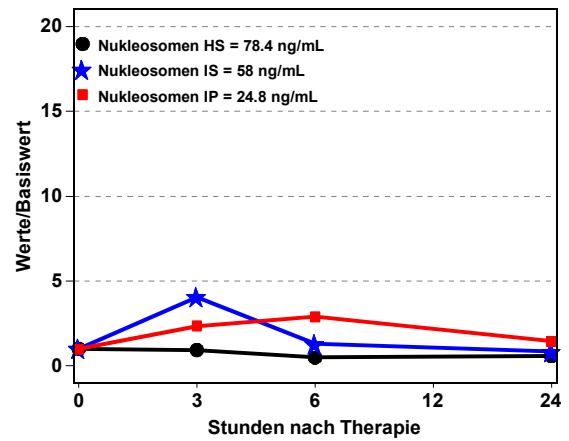
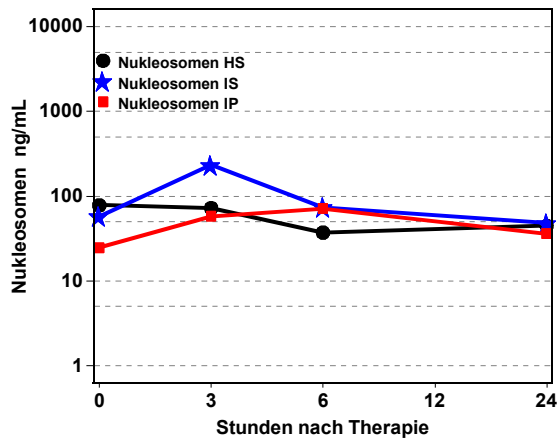


Abbildung 134 Patient 42, weiblich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

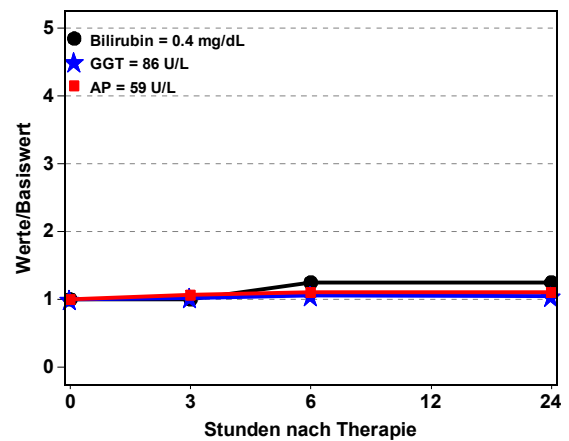
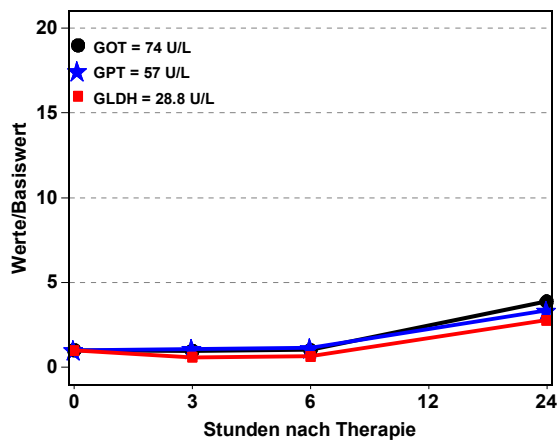
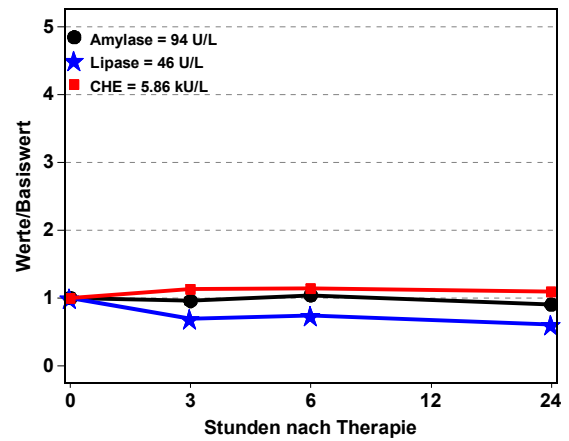
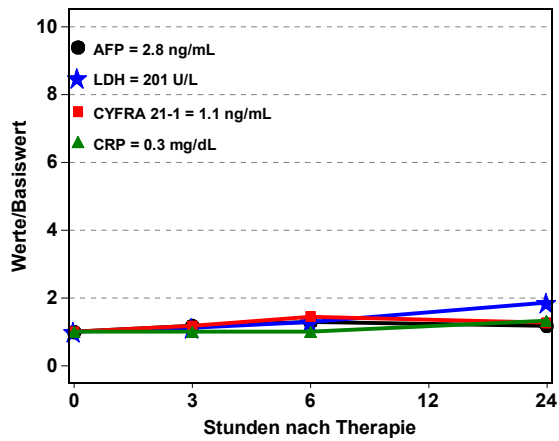
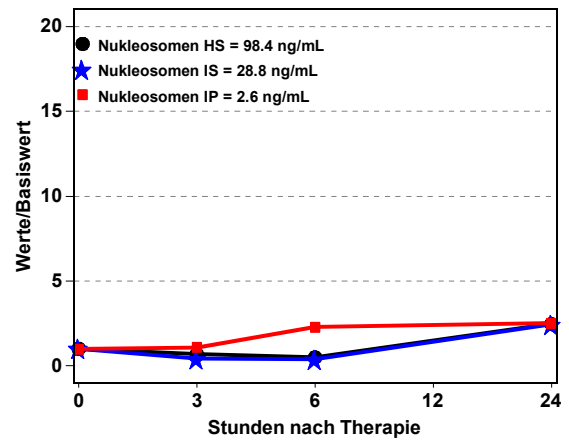
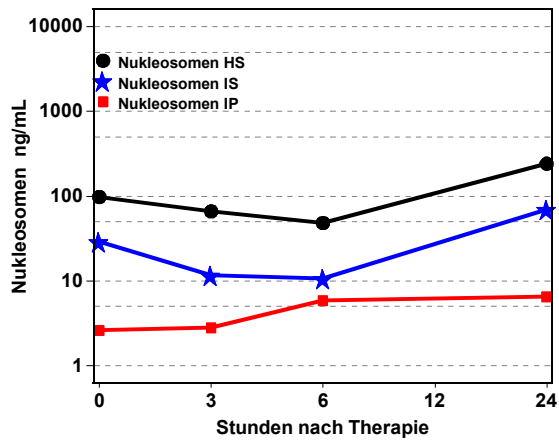


Abbildung 135 Patient 43, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

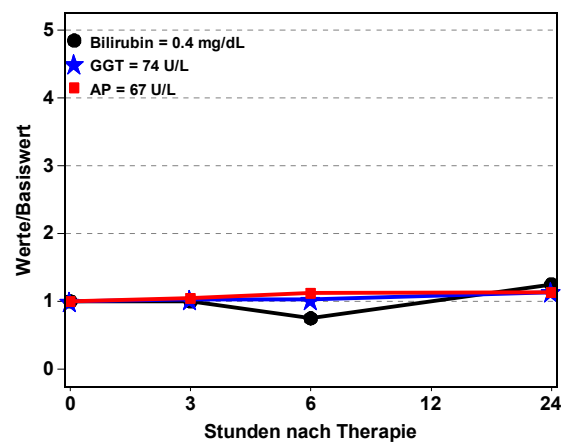
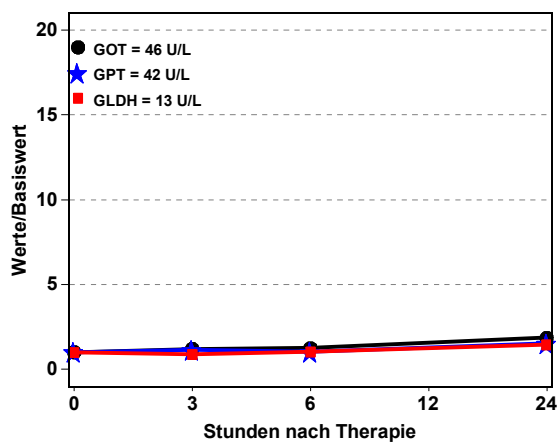
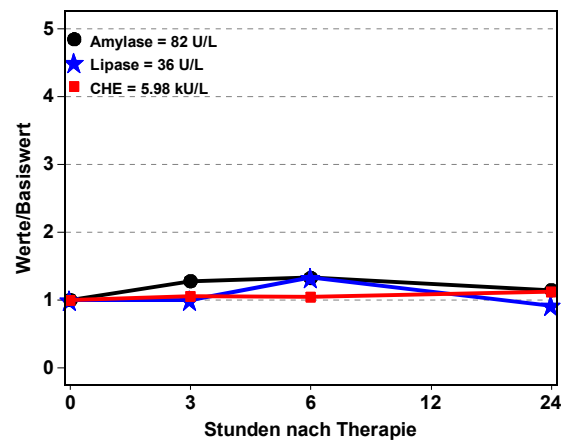
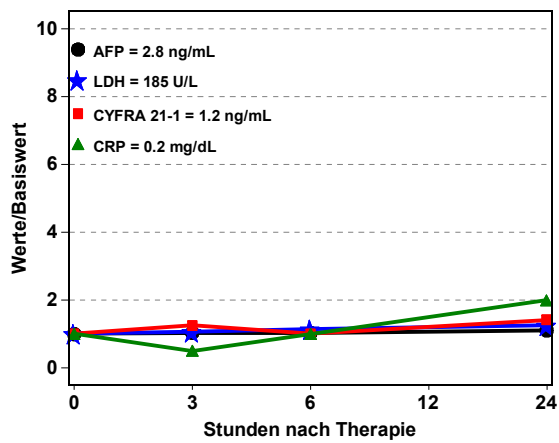
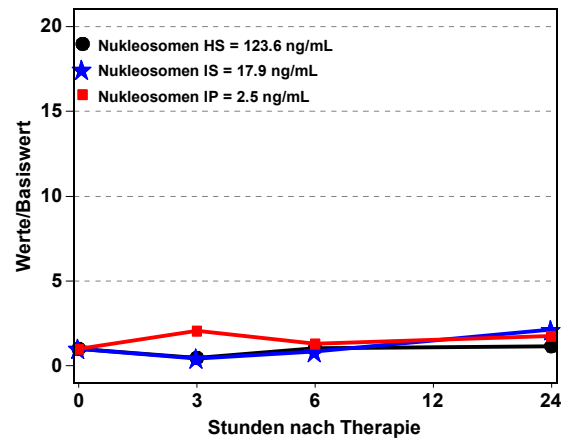
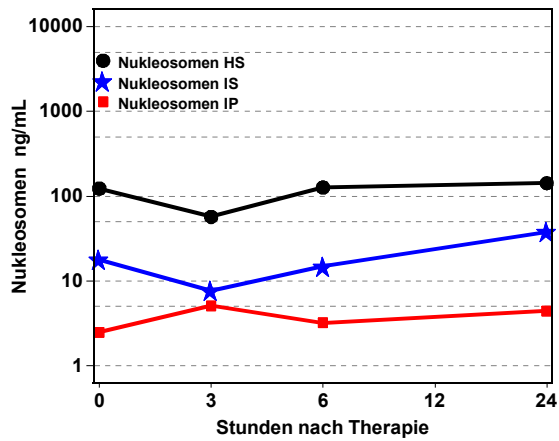


Abbildung 136 Patient 43, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

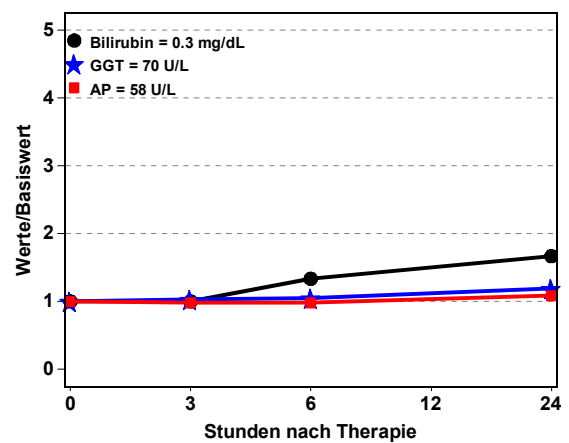
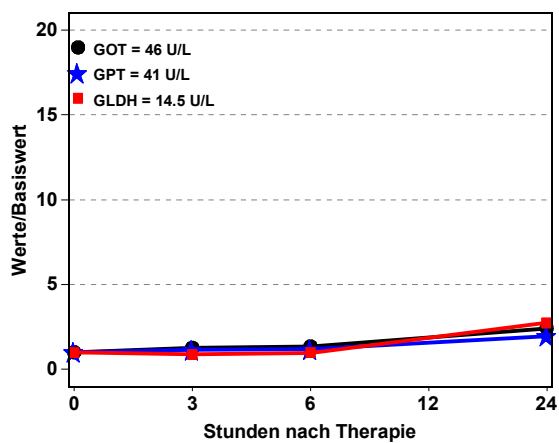
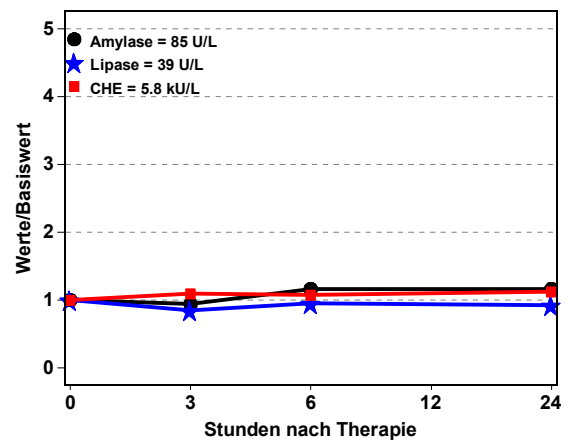
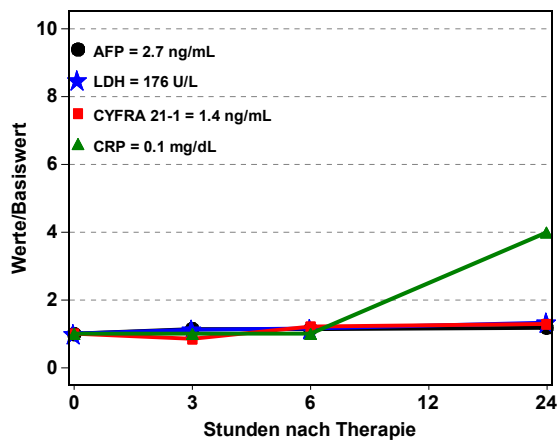
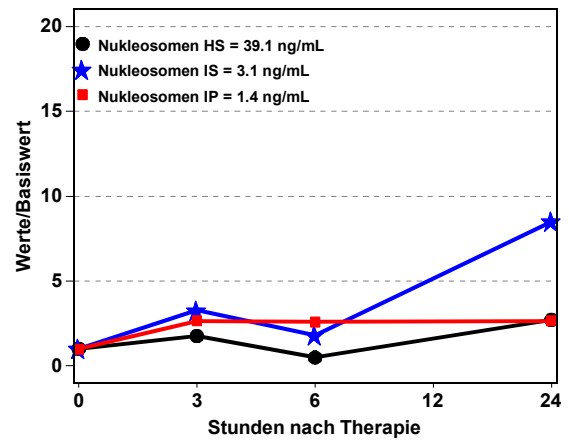
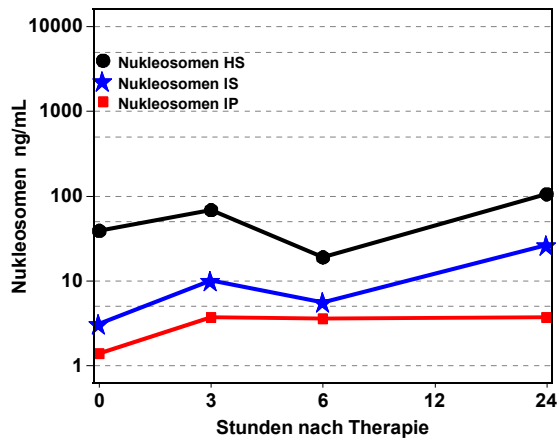


Abbildung 137 Patient 43, männlich, 3. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

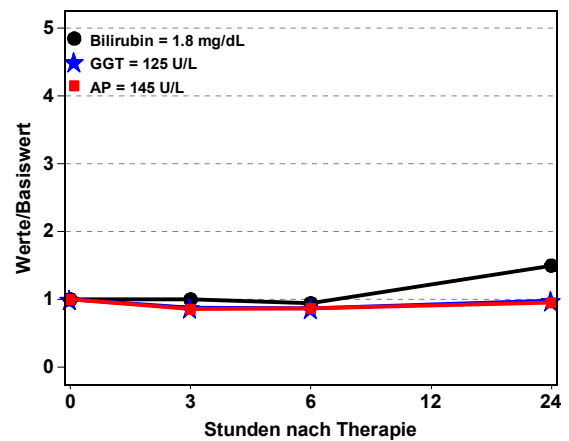
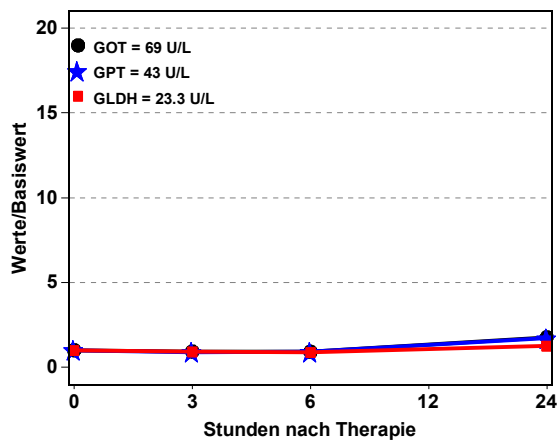
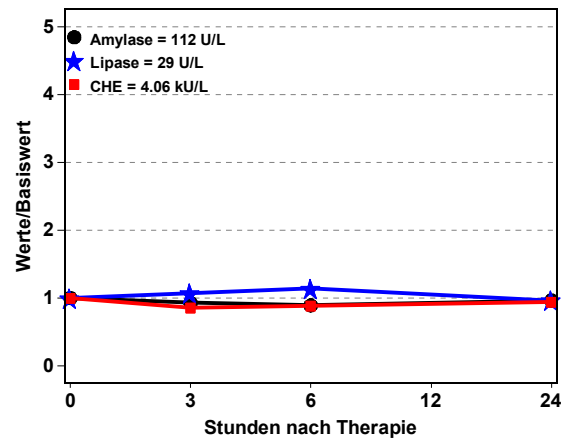
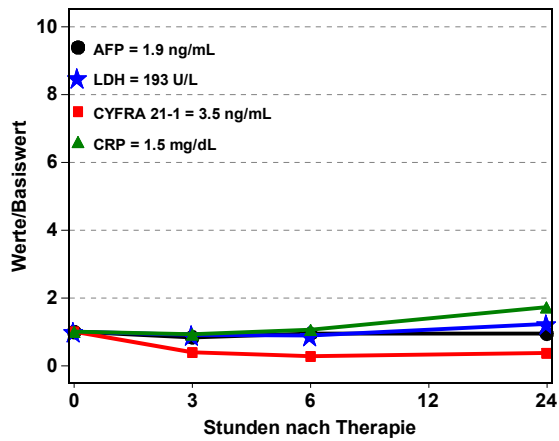
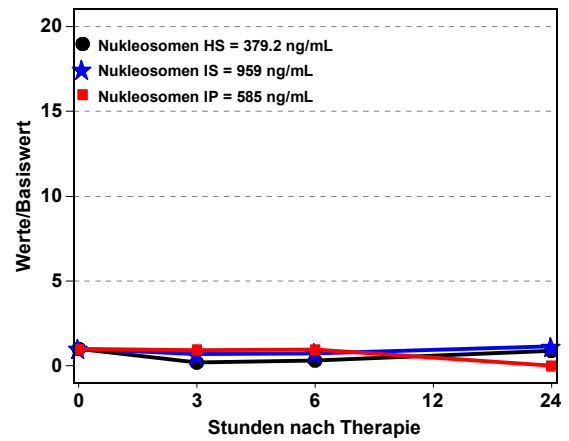
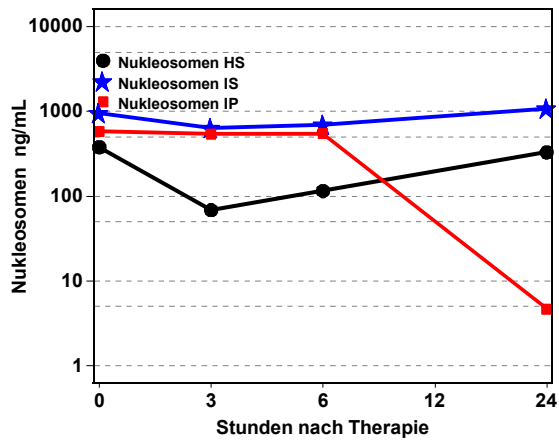


Abbildung 138 Patient 44, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

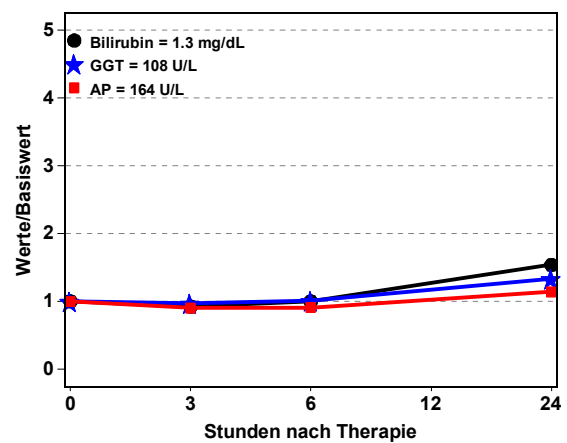
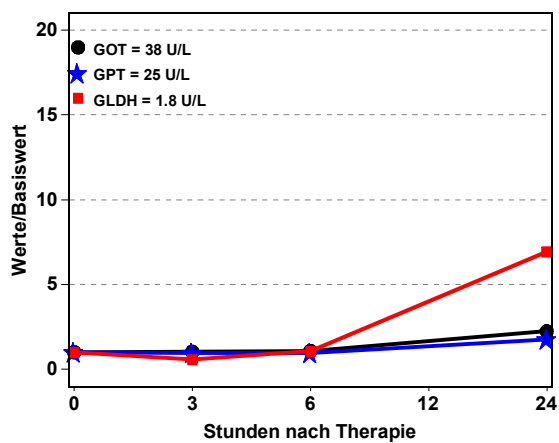
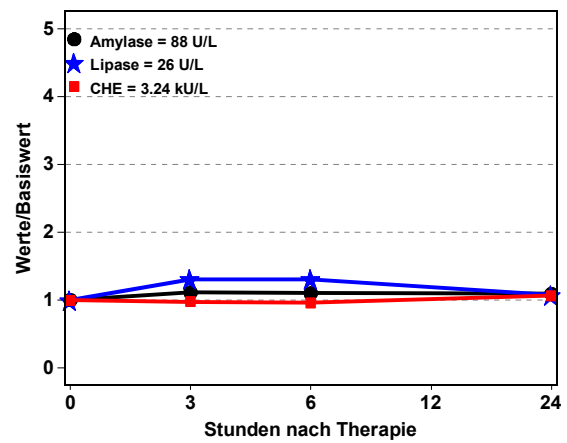
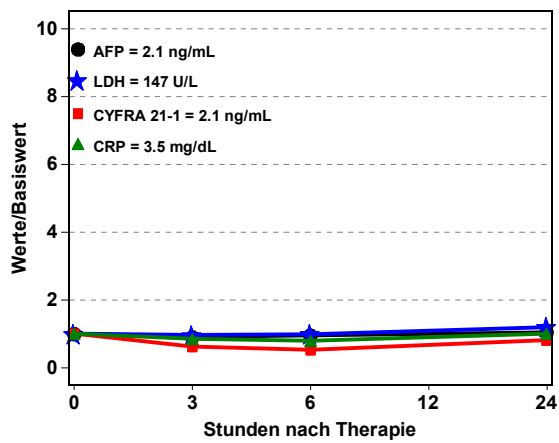
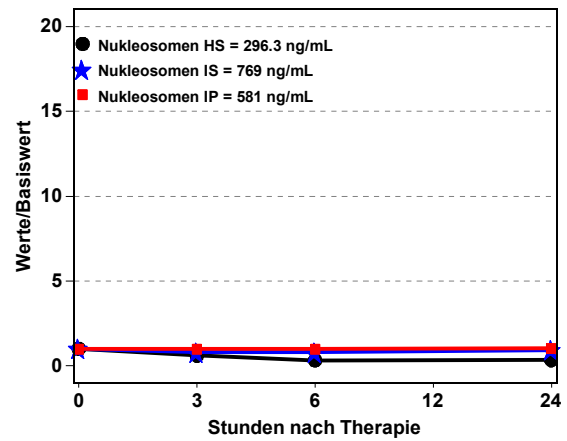
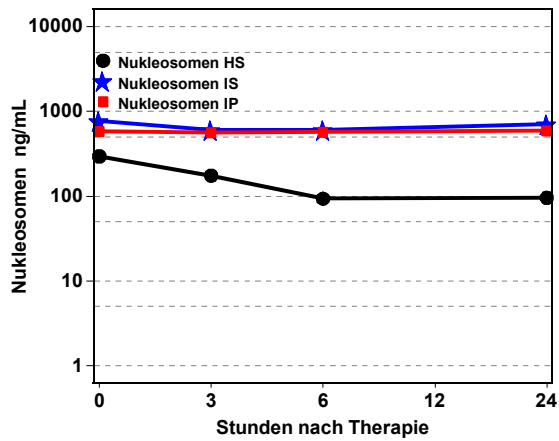


Abbildung 139 Patient 44, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

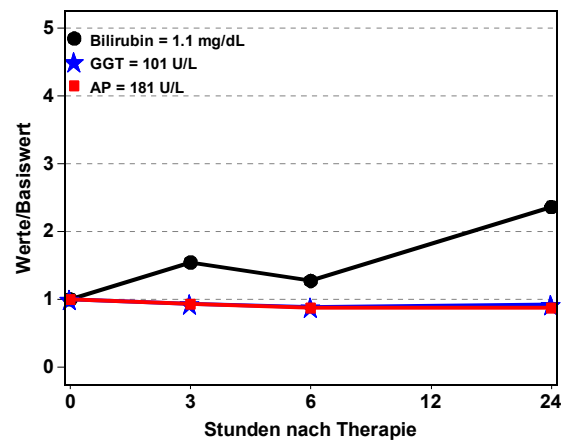
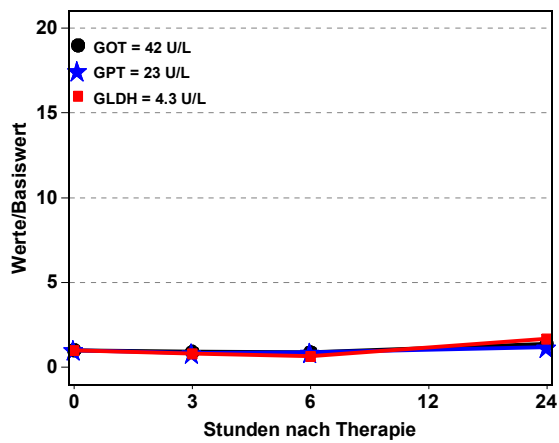
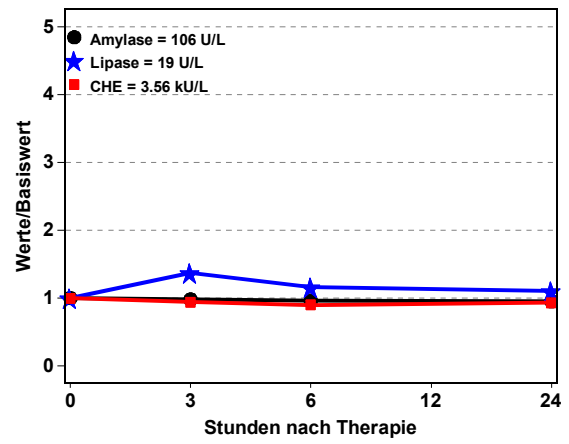
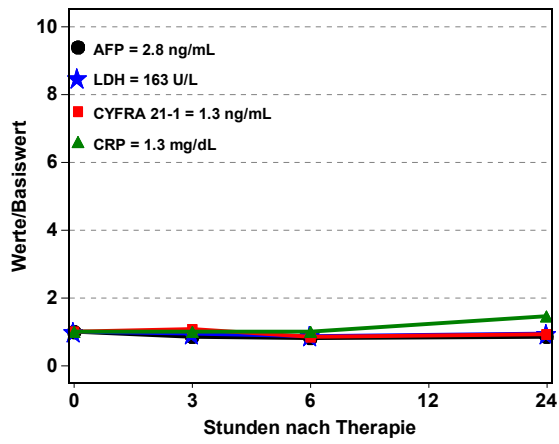
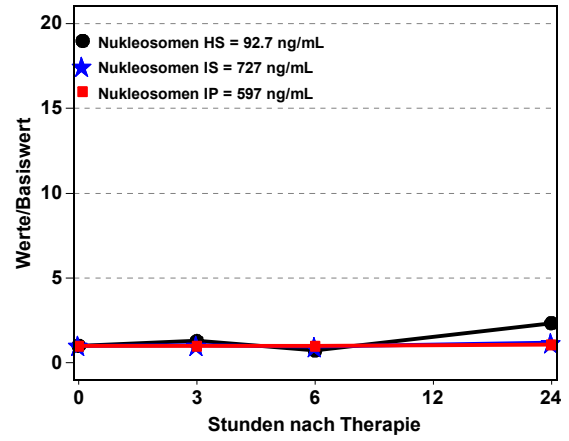
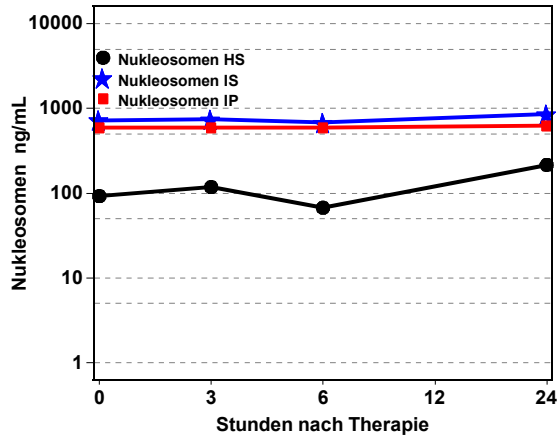


Abbildung 140 Patient 44, männlich, 3. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

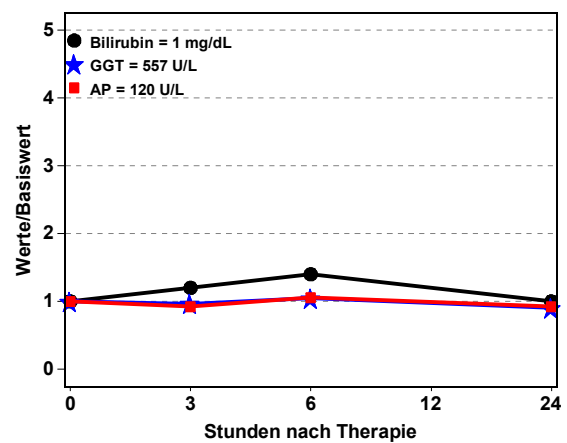
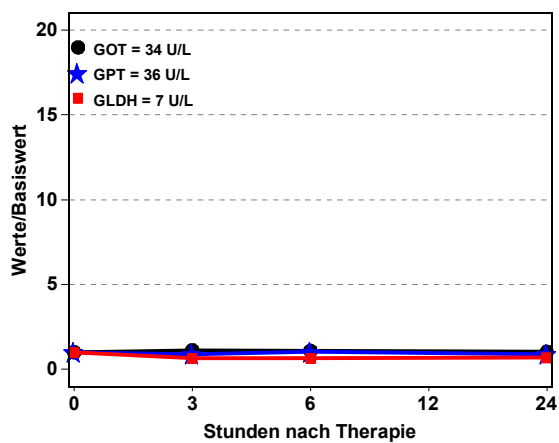
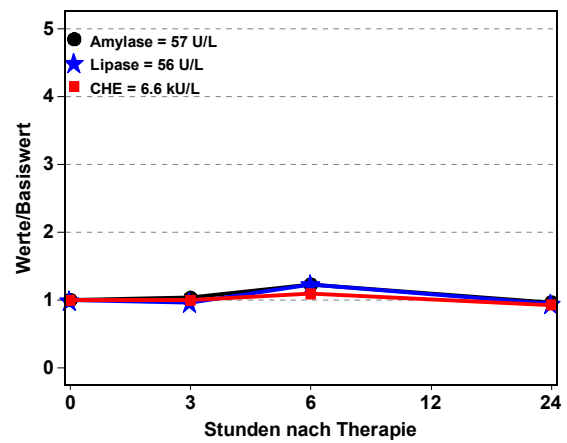
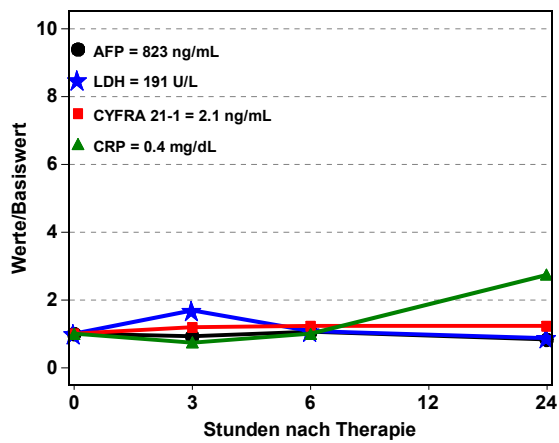
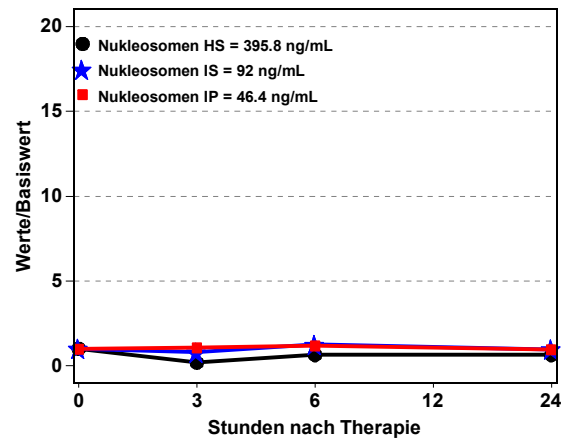
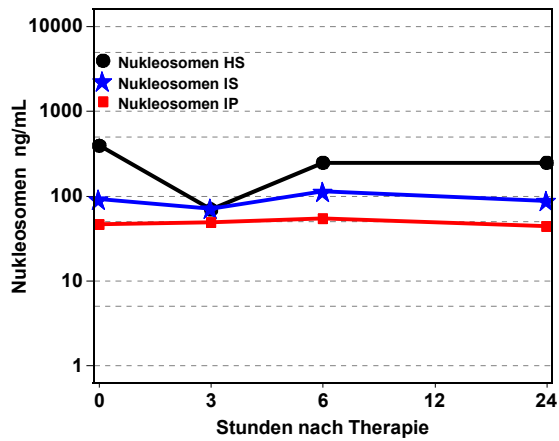


Abbildung 141 Patient 45, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

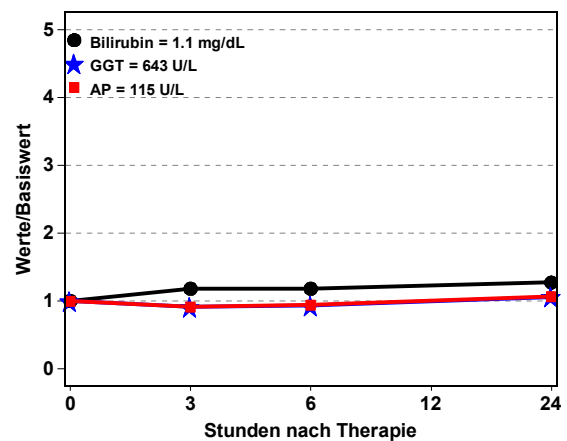
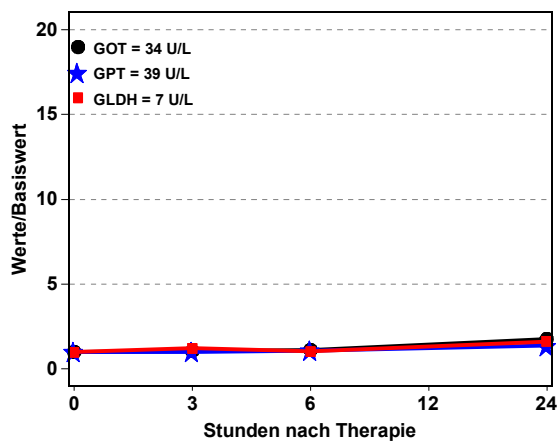
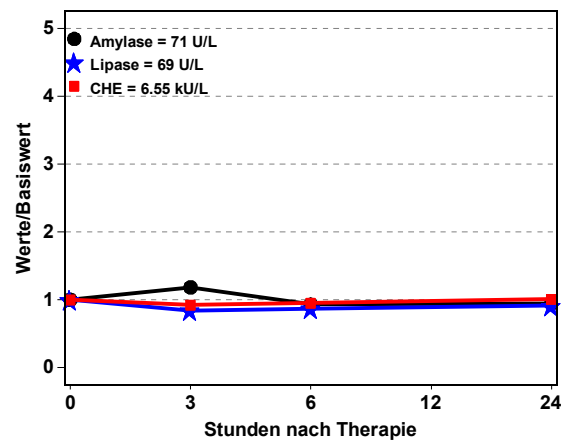
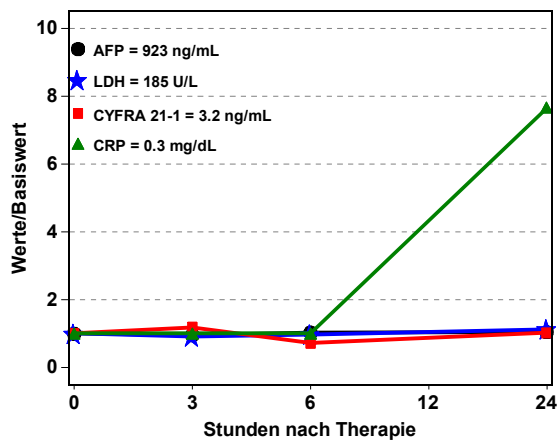
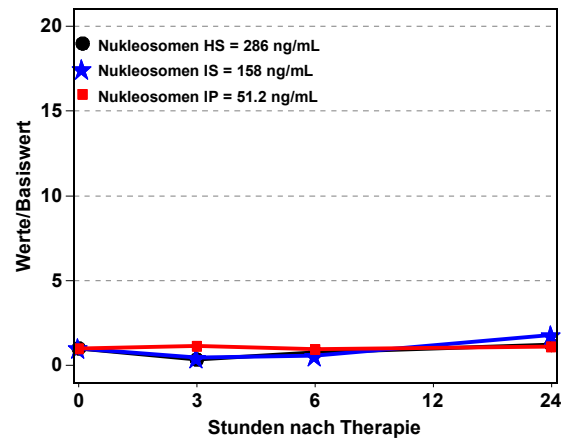
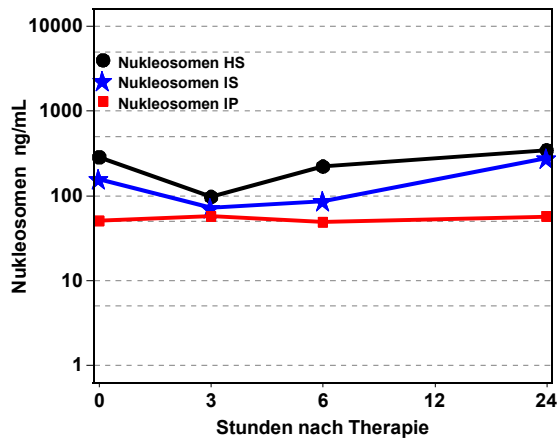


Abbildung 142 Patient 45, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

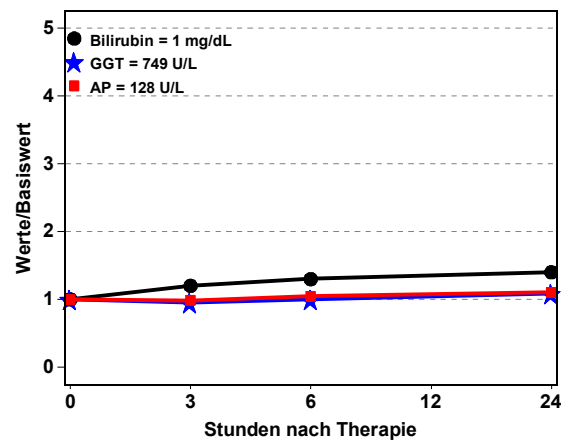
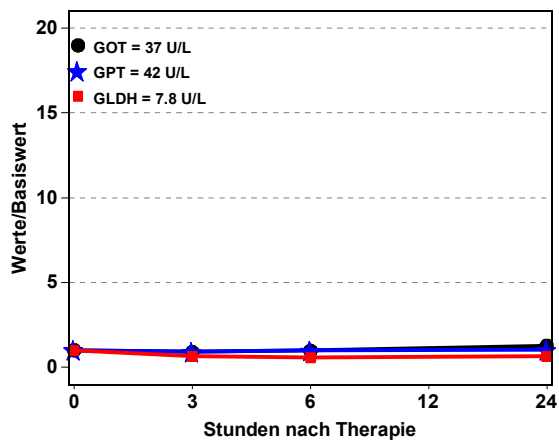
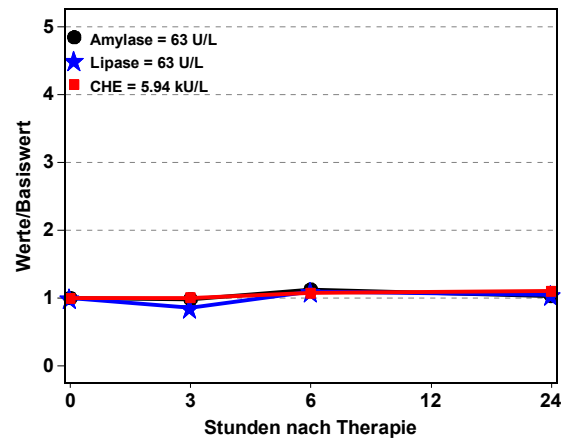
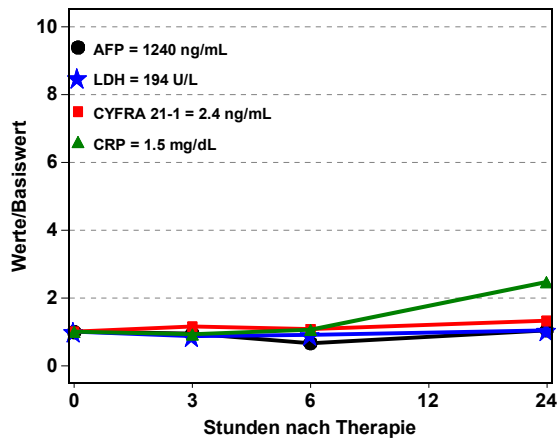
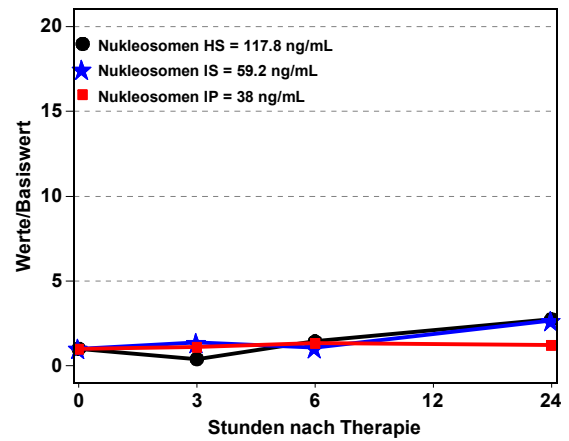
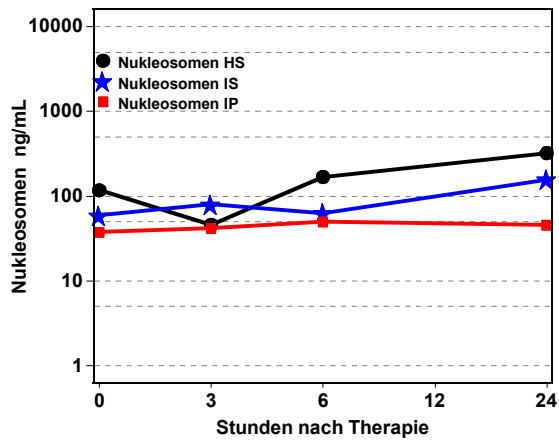


Abbildung 143 Patient 45, männlich, 3. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

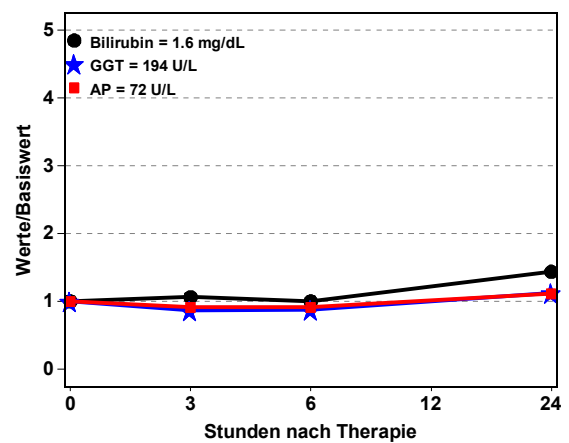
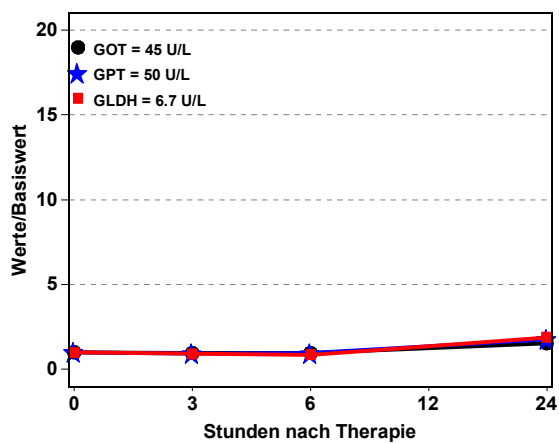
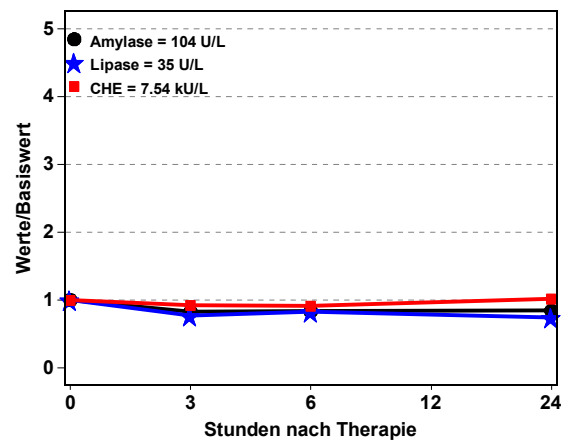
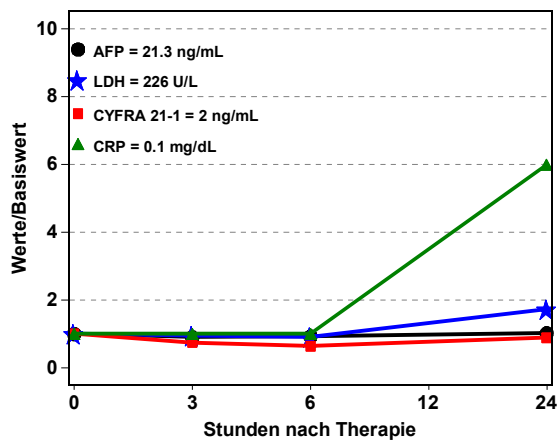
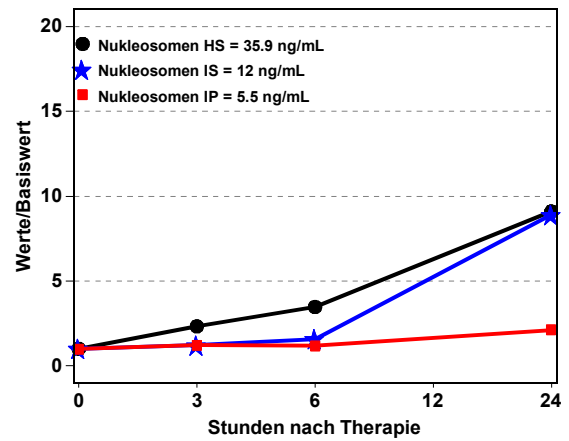
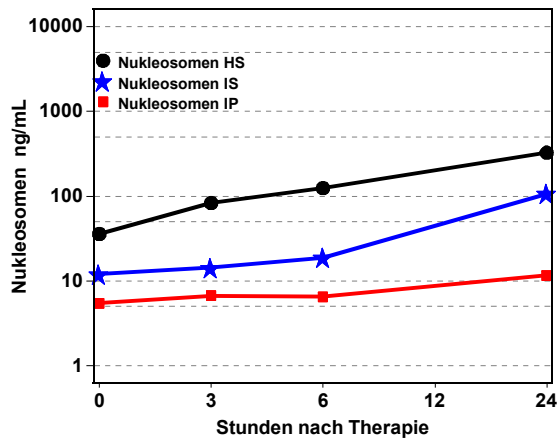


Abbildung 144 Patient 46, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

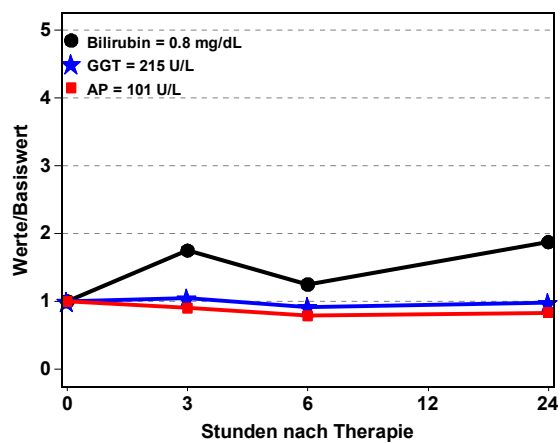
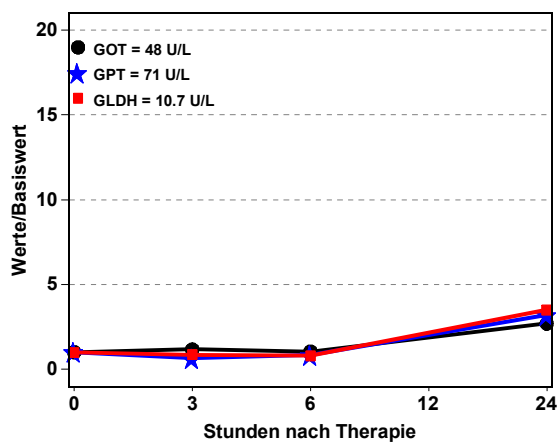
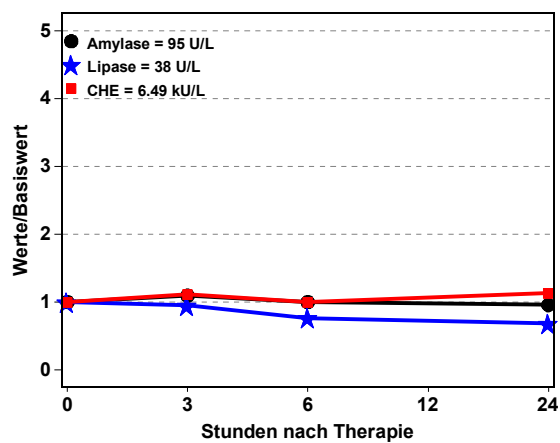
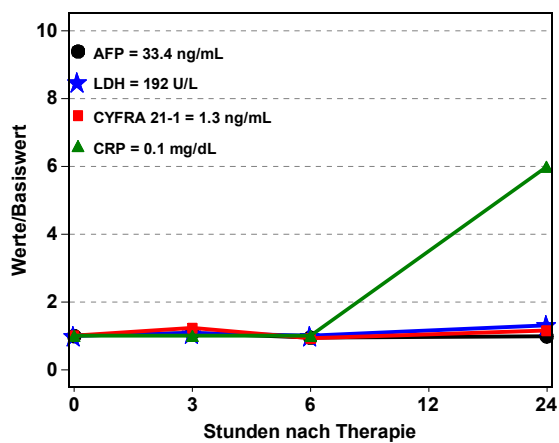
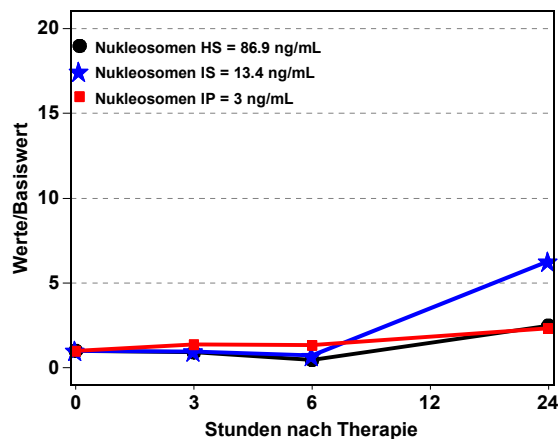
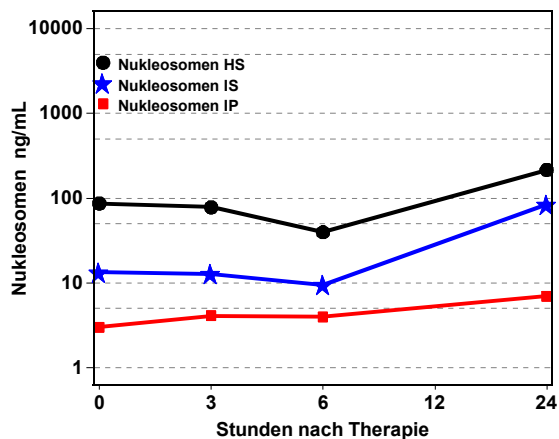


Abbildung 145 Patient 46, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

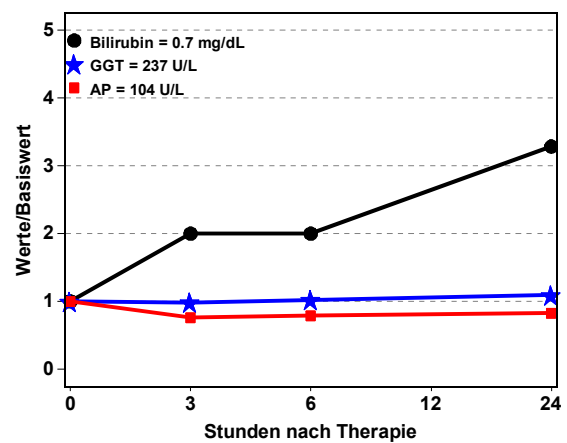
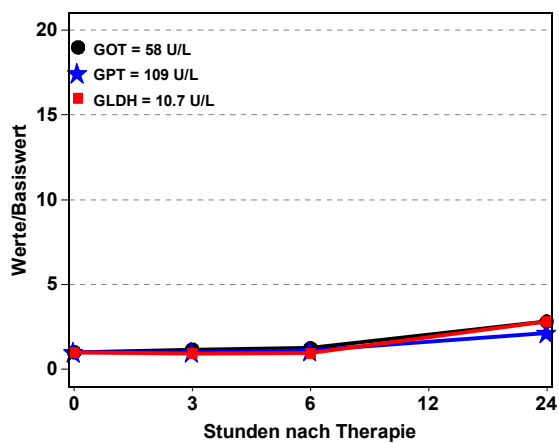
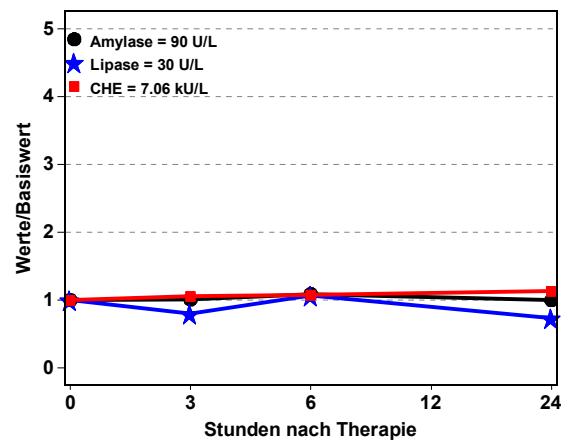
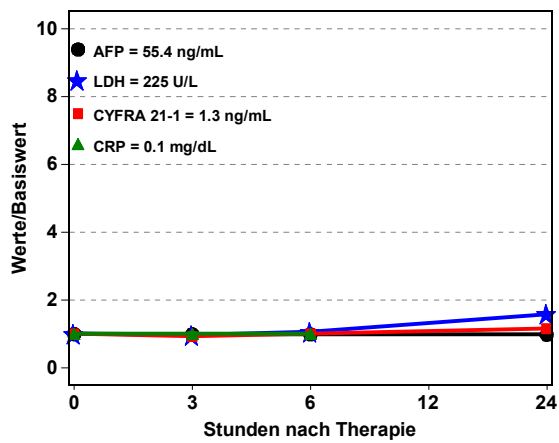
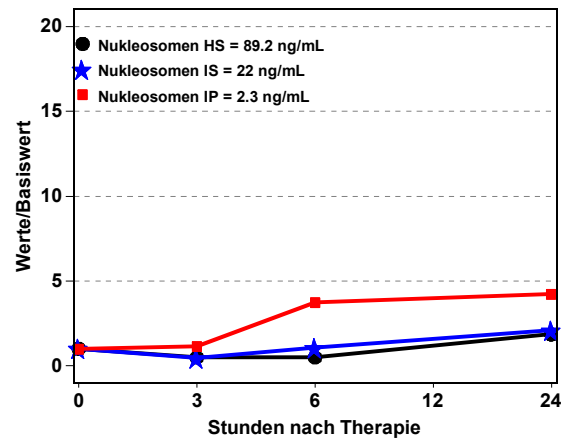
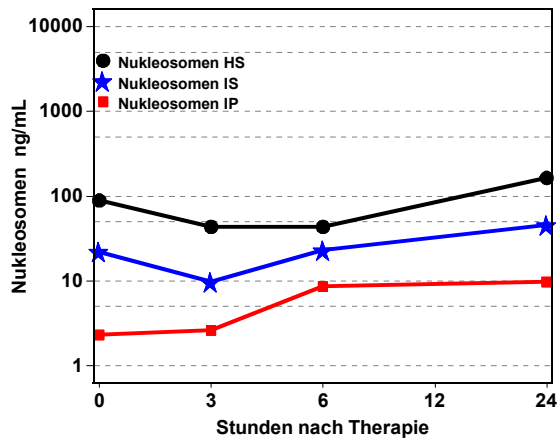


Abbildung 146 Patient 46, männlich, 3. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

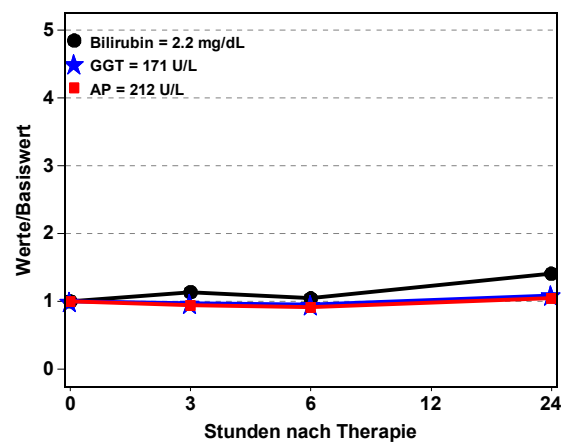
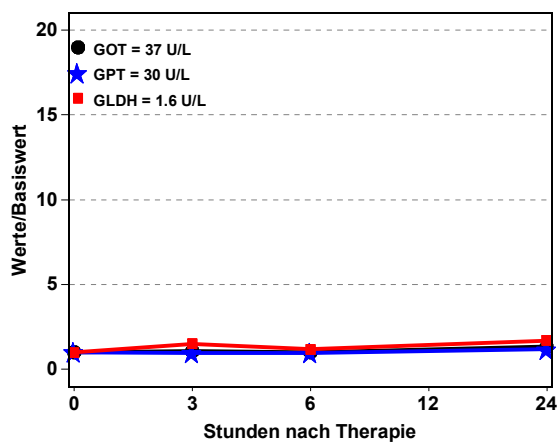
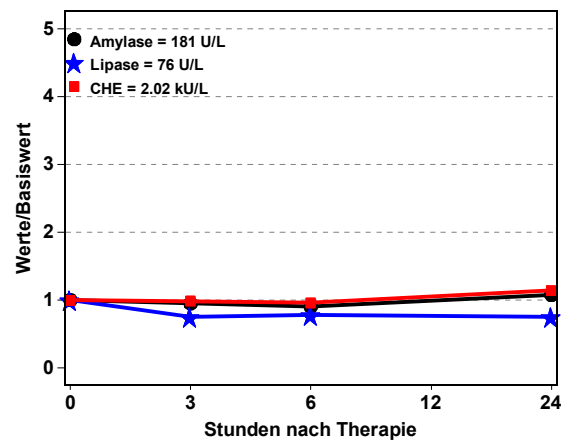
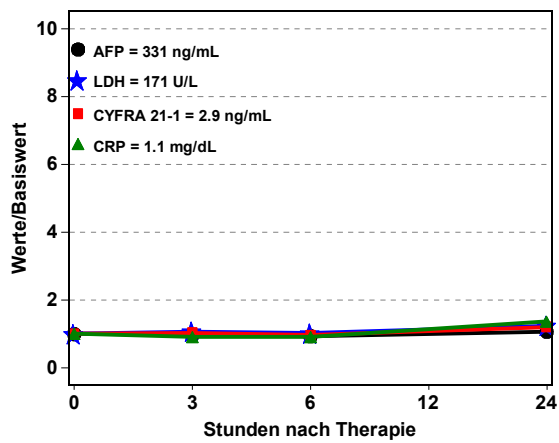
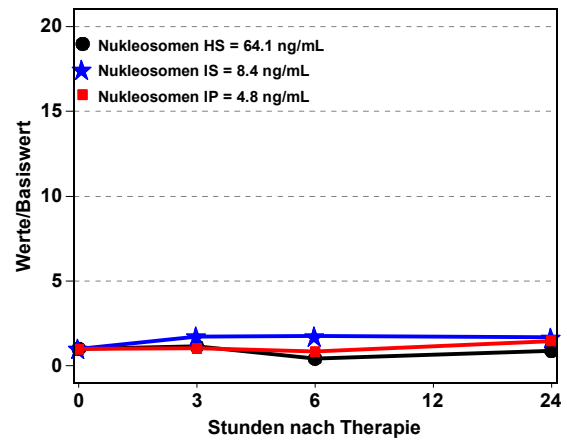
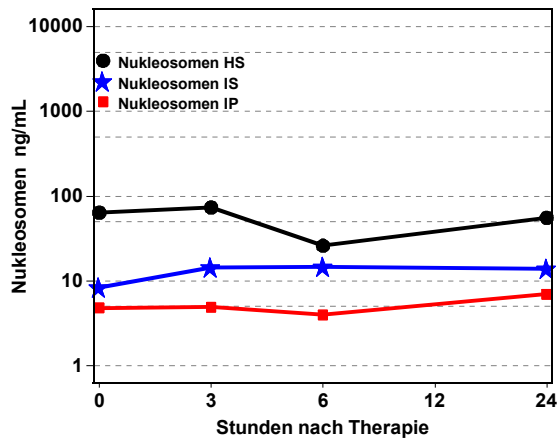


Abbildung 147 Patient 47, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

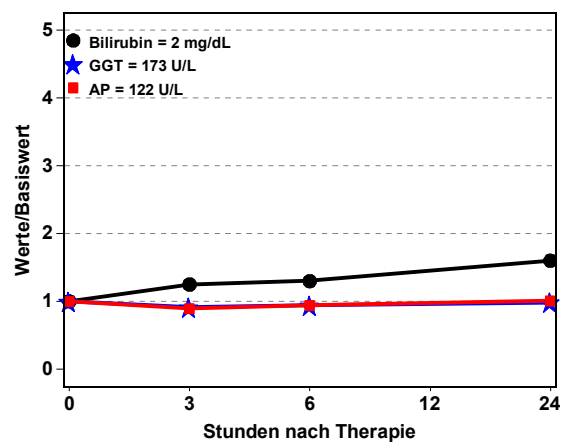
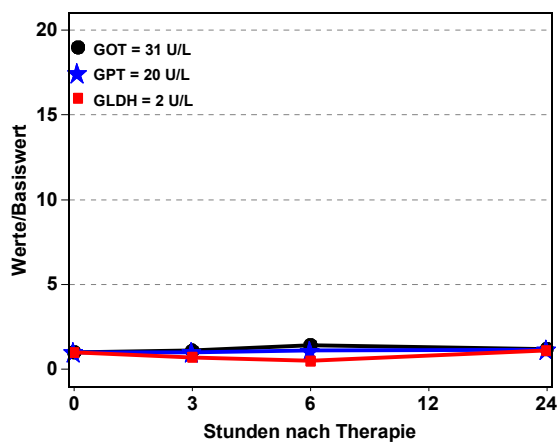
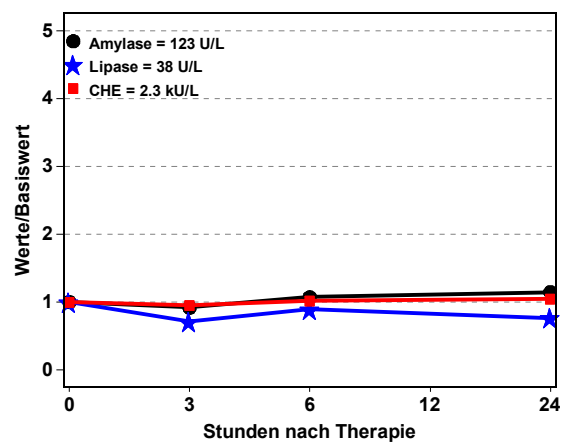
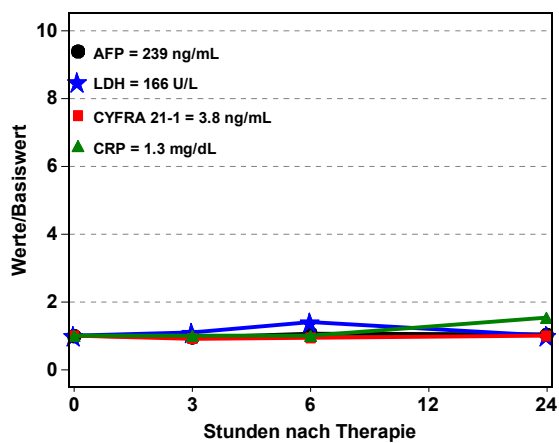
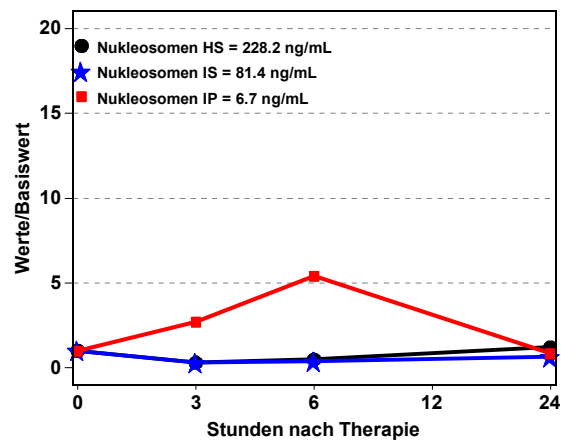
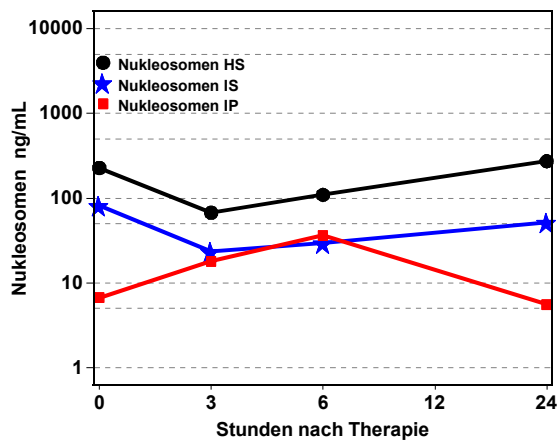


Abbildung 148 Patient 47, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

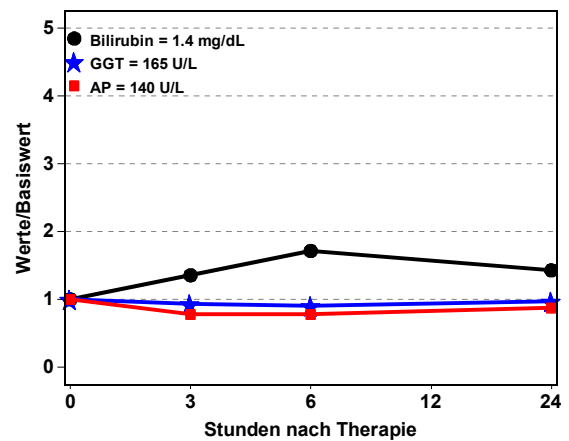
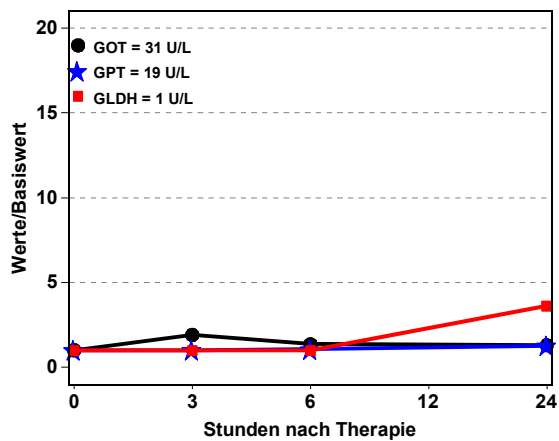
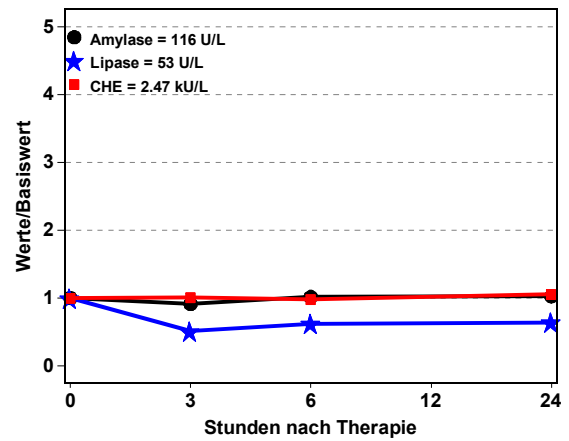
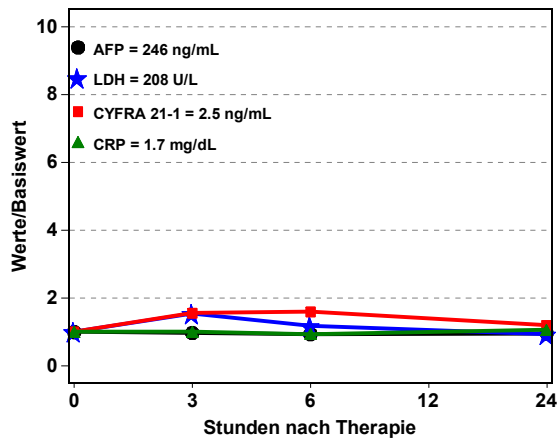
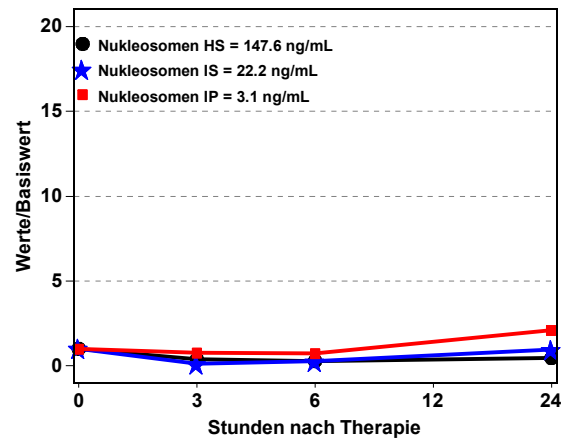
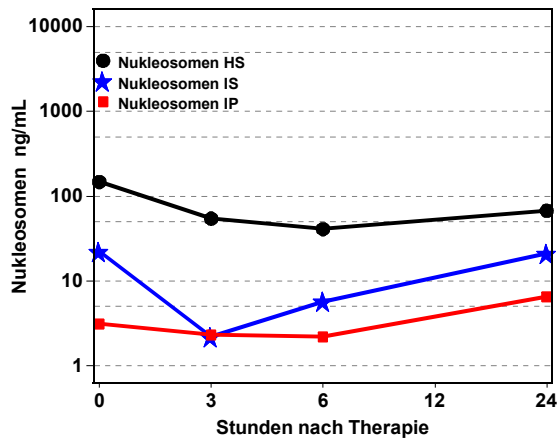


Abbildung 149 Patient 47, männlich, 3. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

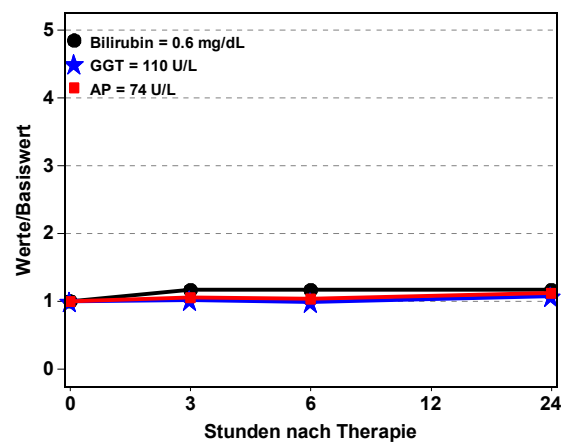
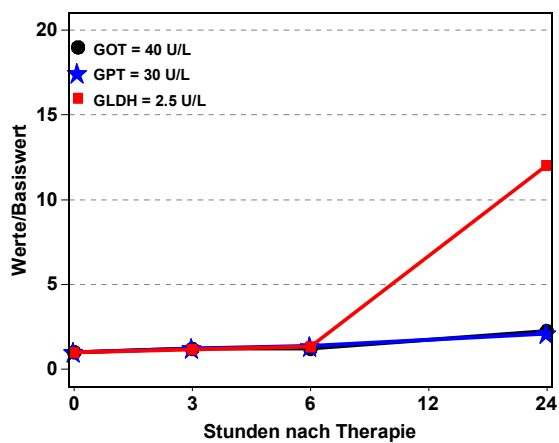
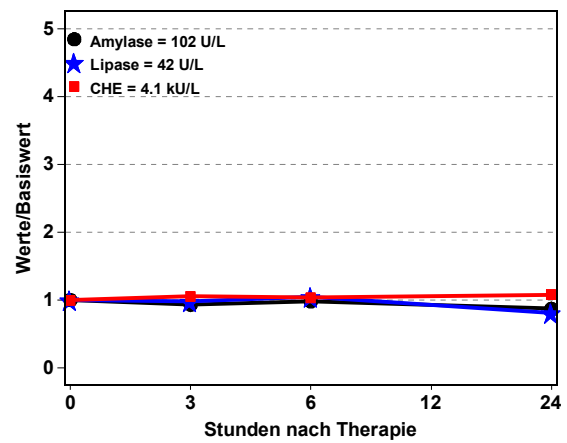
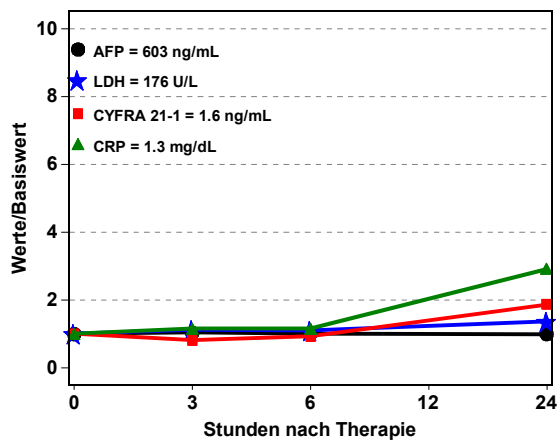
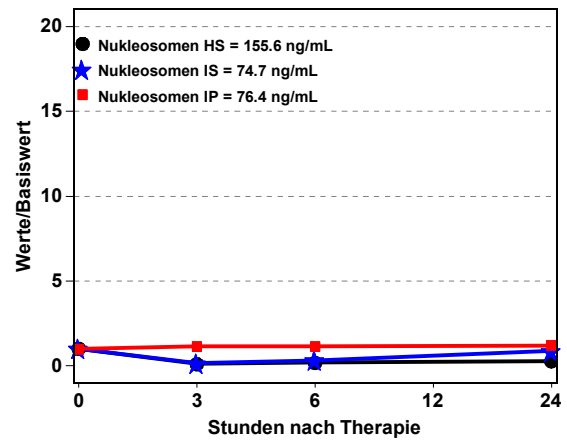
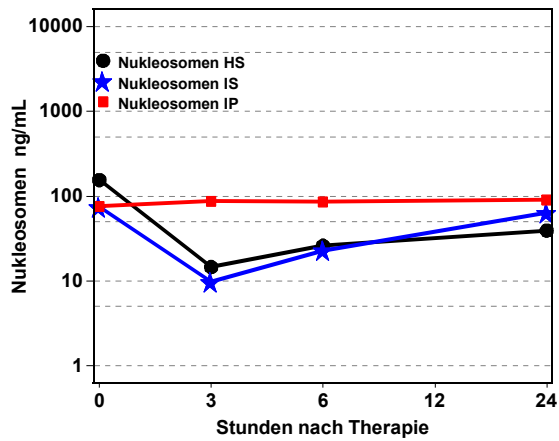


Abbildung 150 Patient 48, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

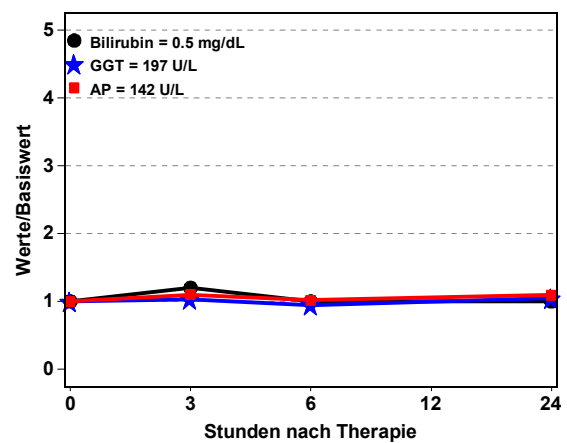
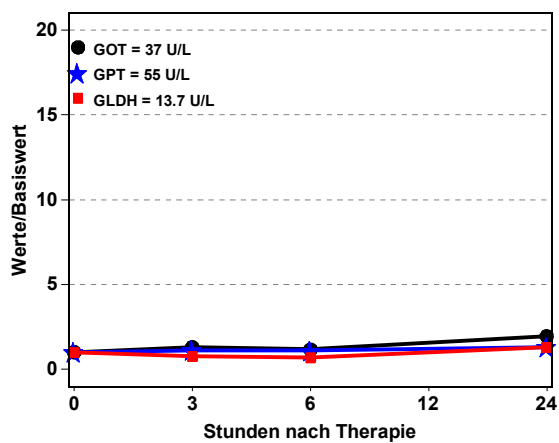
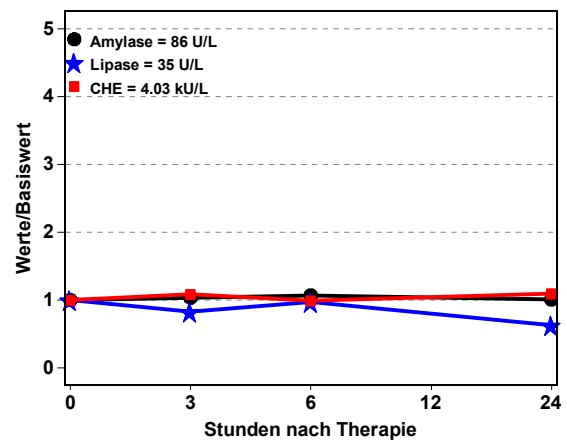
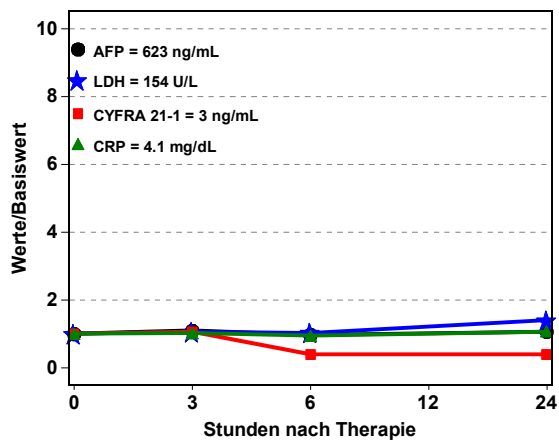
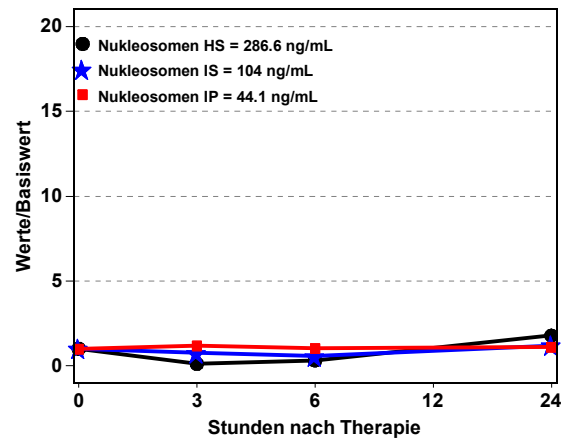
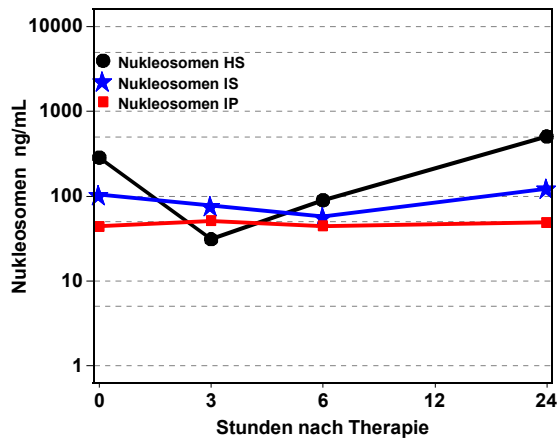


Abbildung 151 Patient 48, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

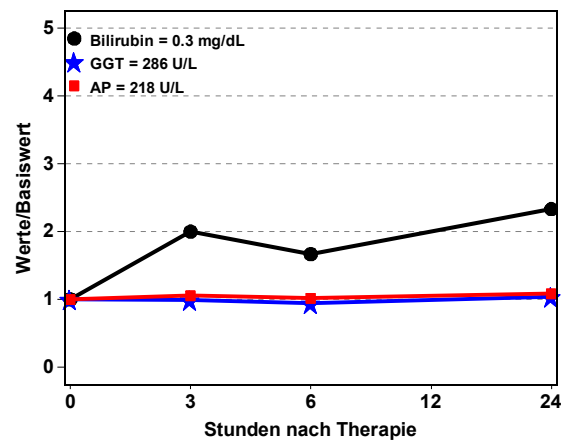
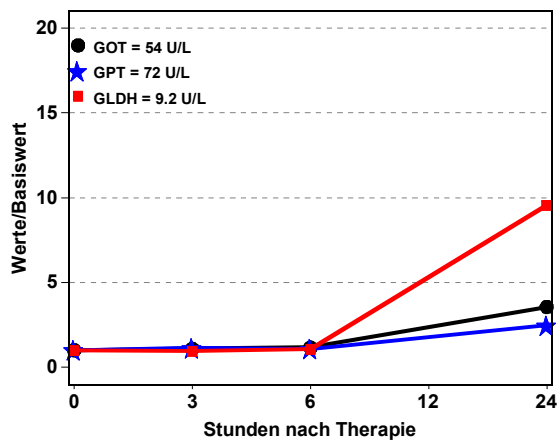
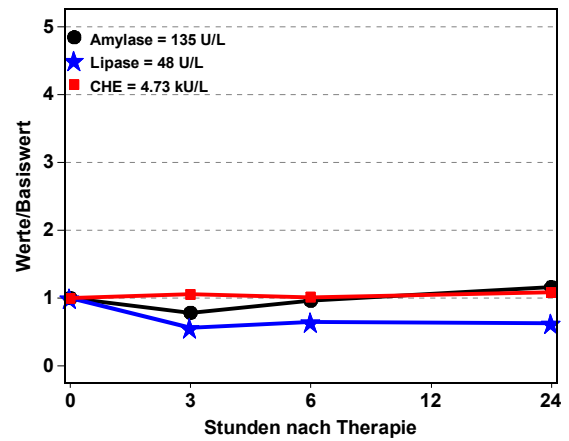
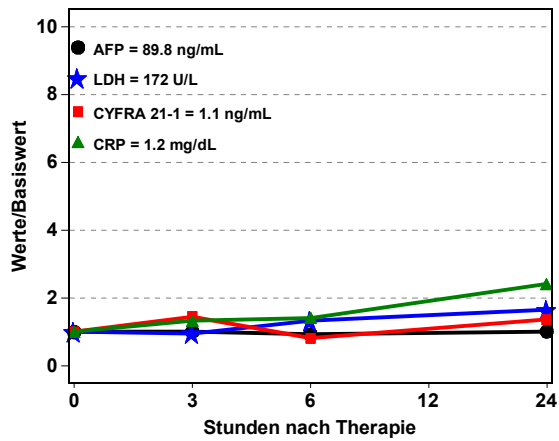
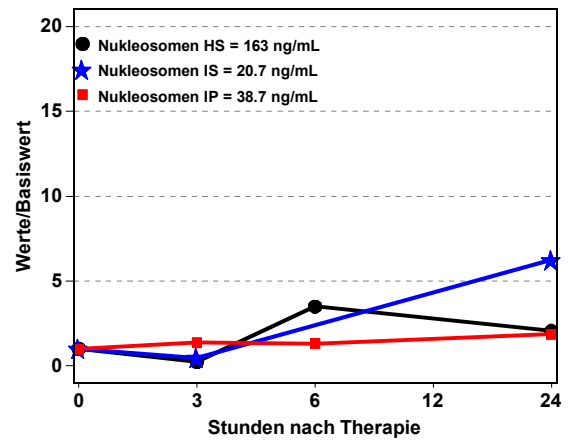
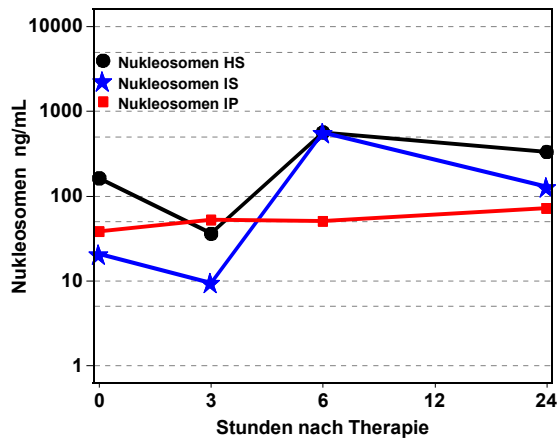


Abbildung 152 Patient 48, männlich, 3. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

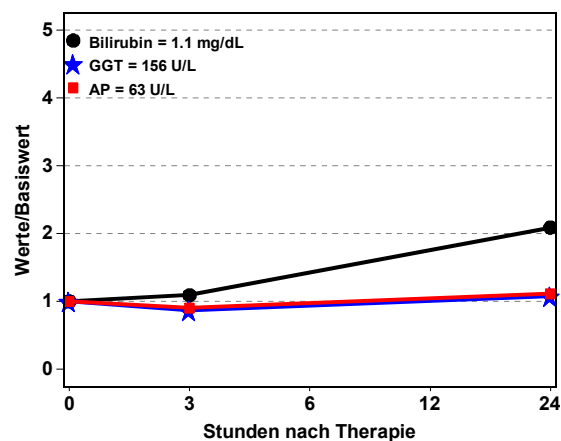
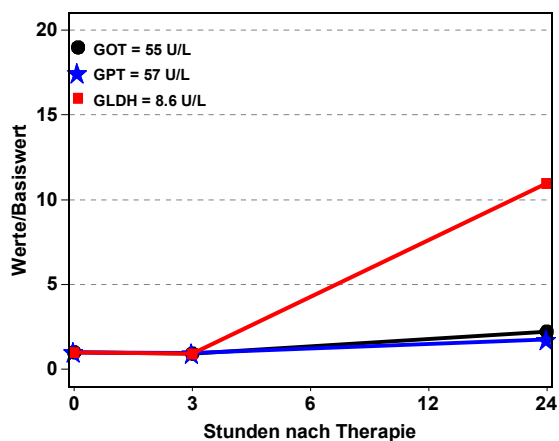
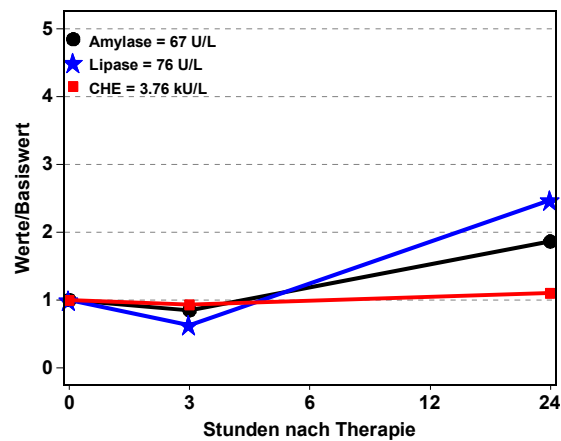
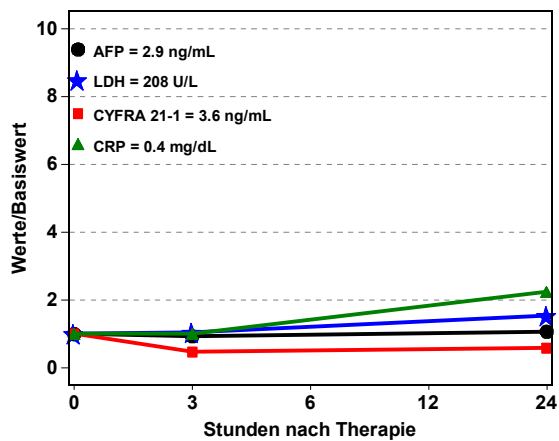
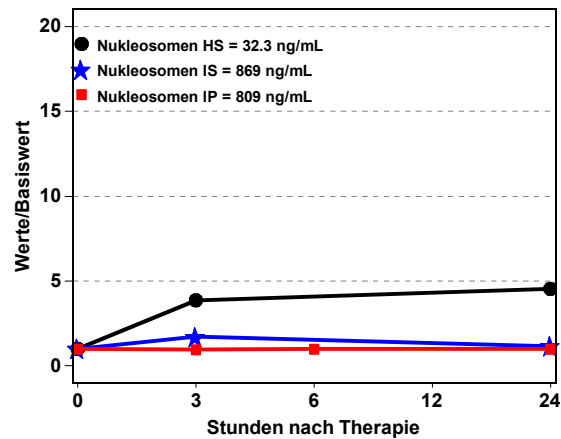
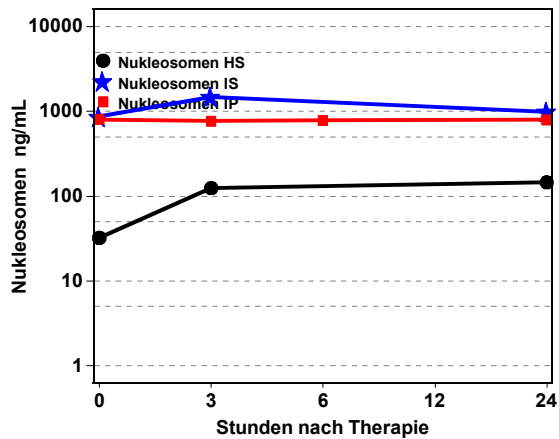


Abbildung 153 Patient 49, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

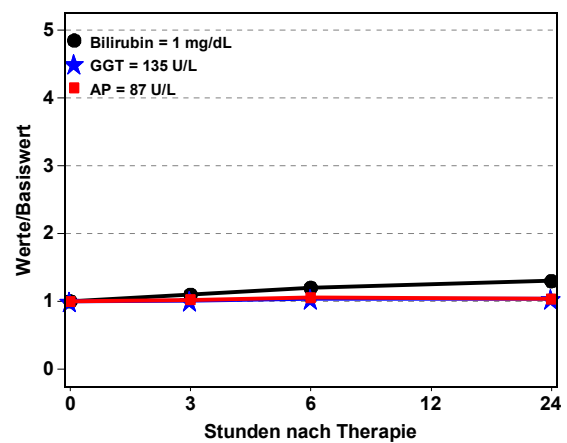
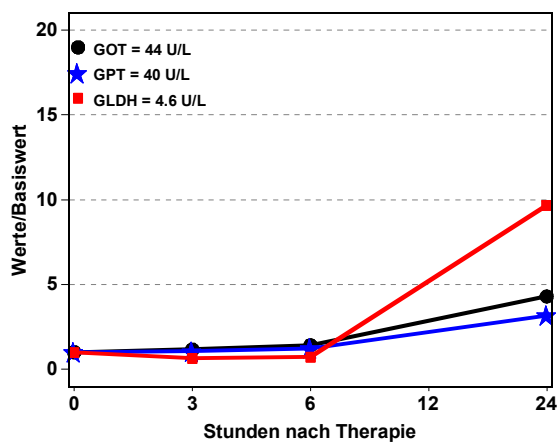
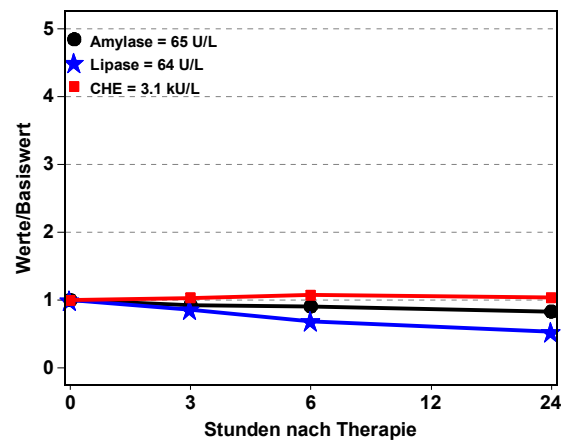
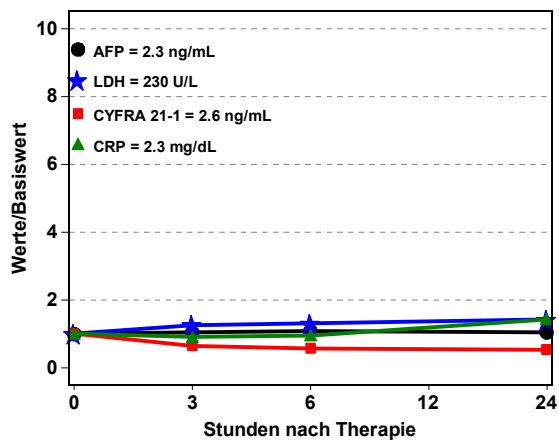
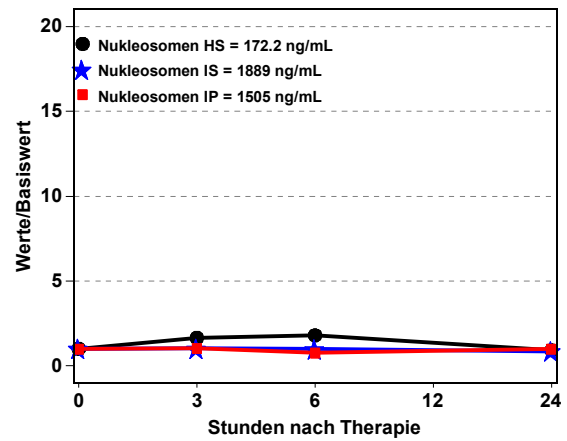
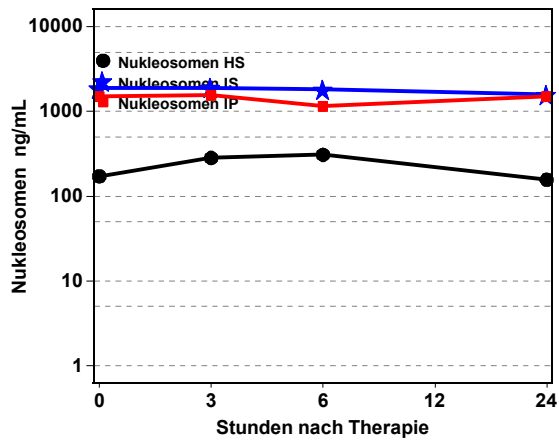


Abbildung 154 Patient 49, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

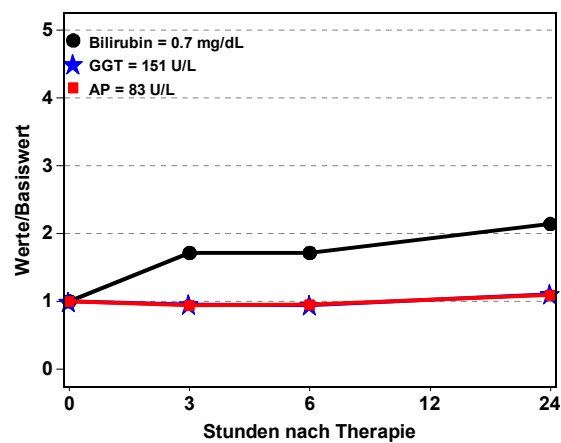
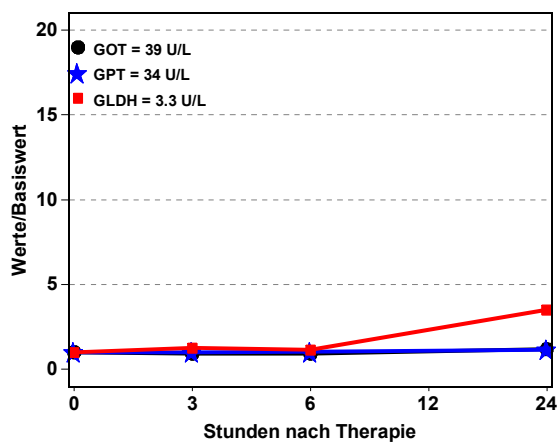
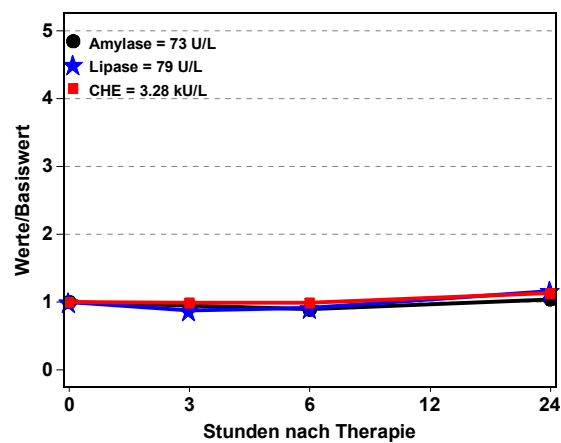
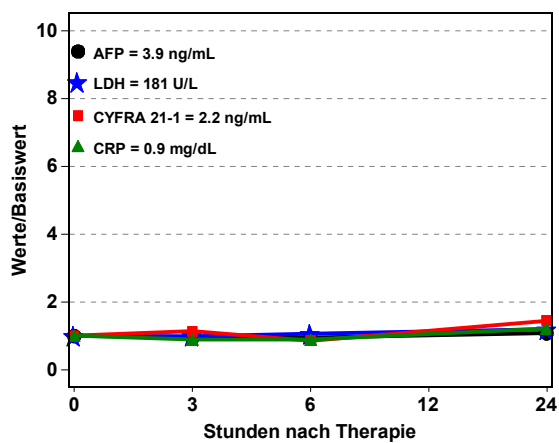
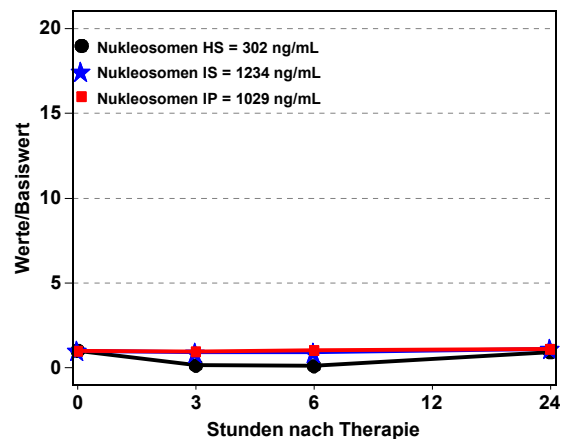
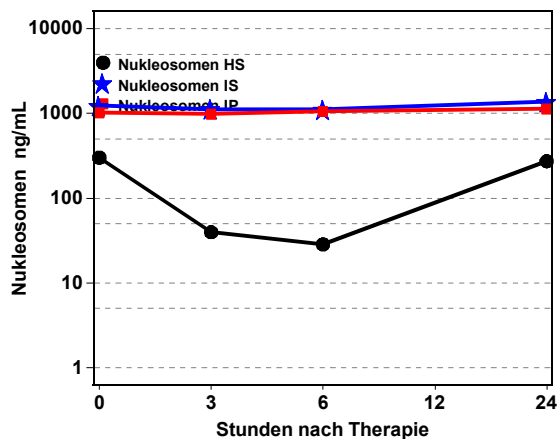


Abbildung 155 Patient 49, männlich, 3. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

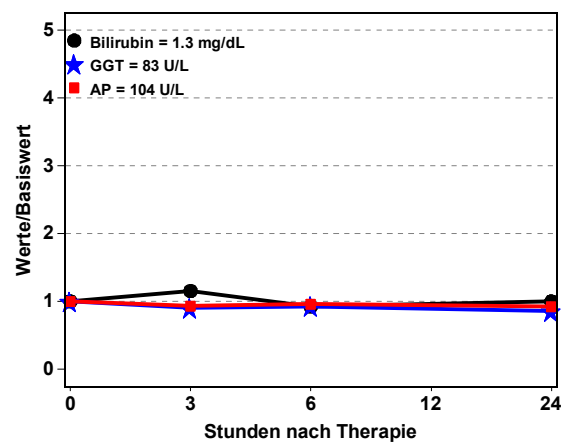
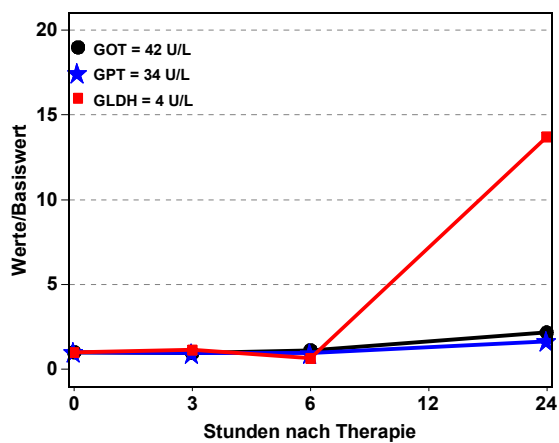
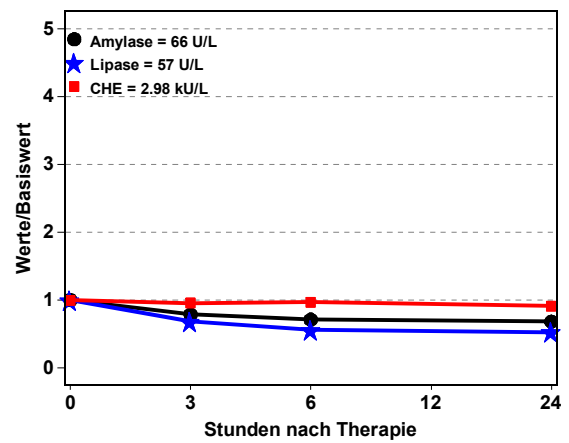
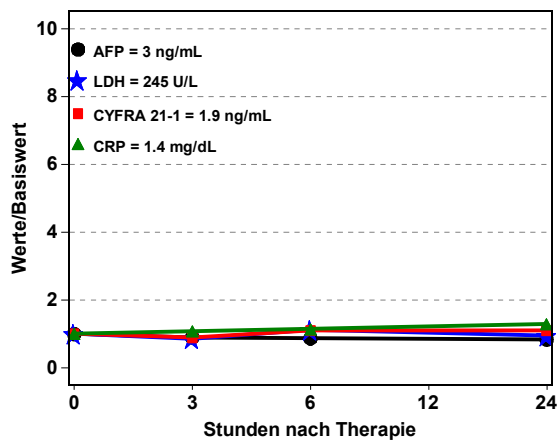
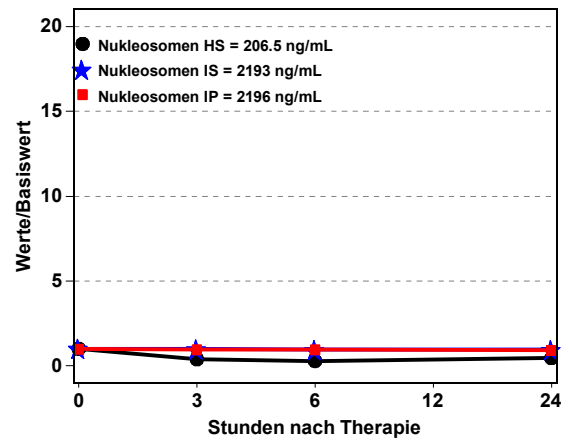
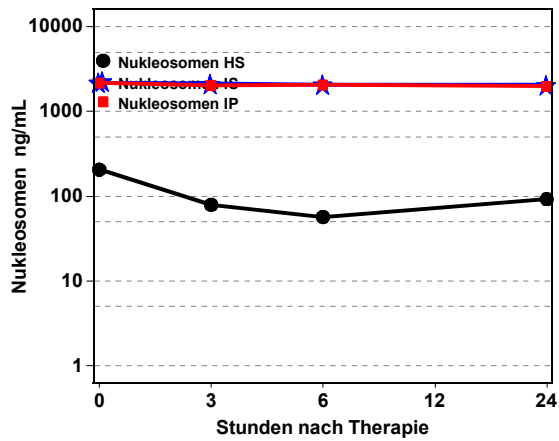


Abbildung 156 Patient 49, männlich, 4. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

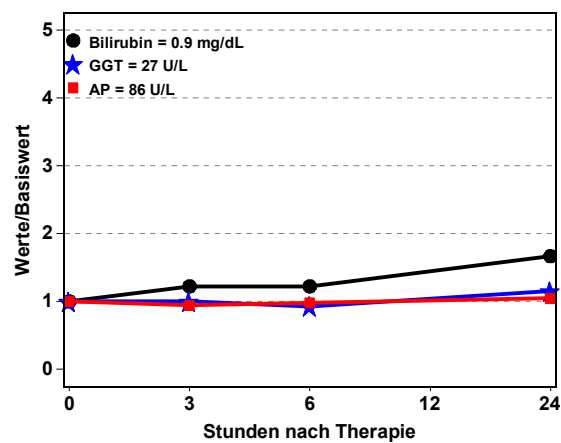
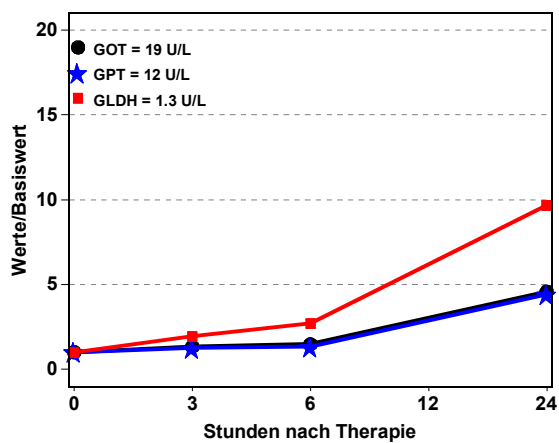
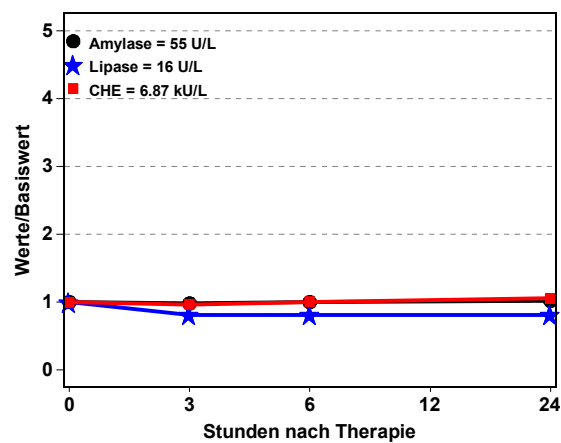
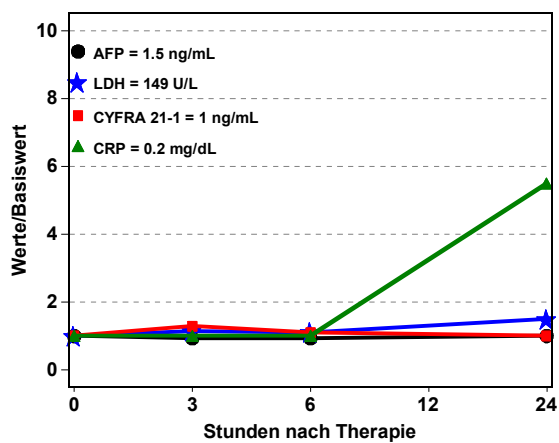
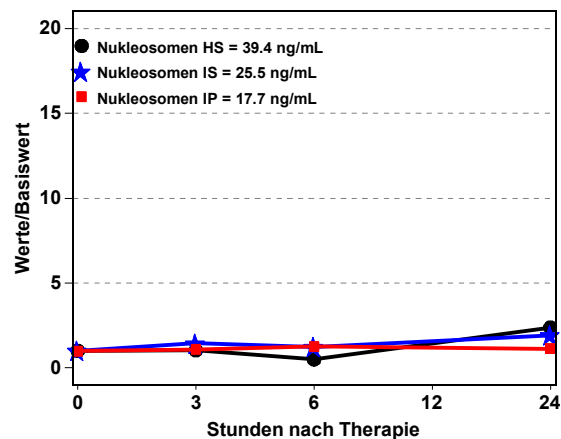
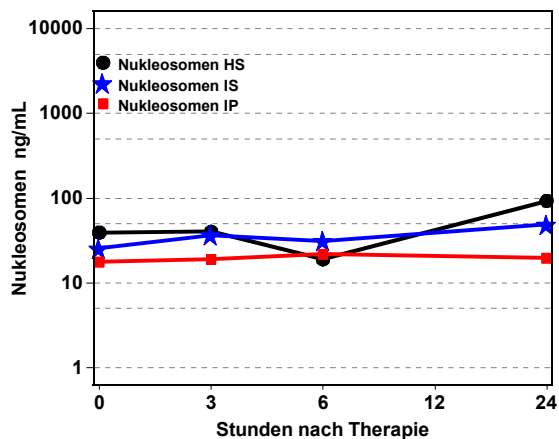


Abbildung 157 Patient 50, männlich, 1. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

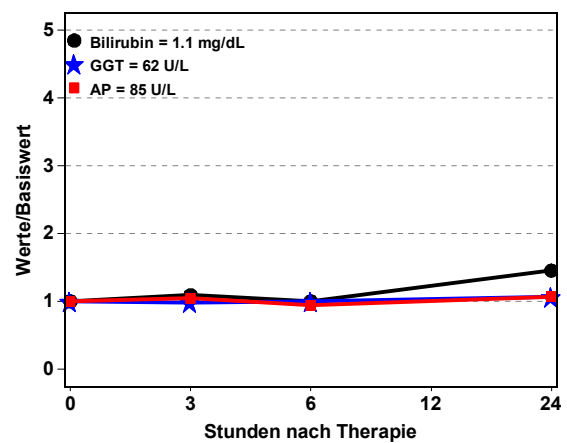
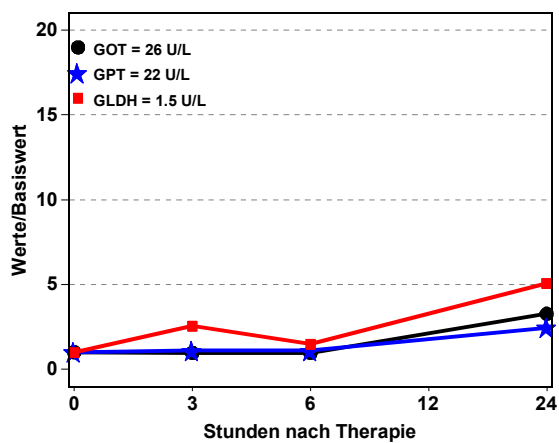
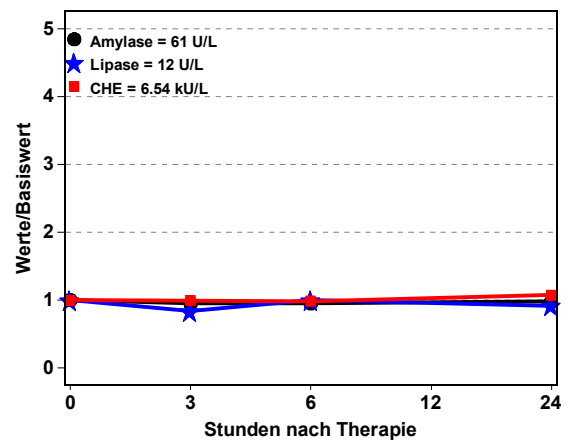
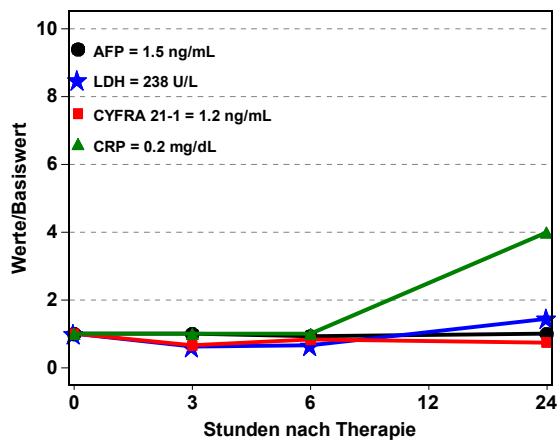
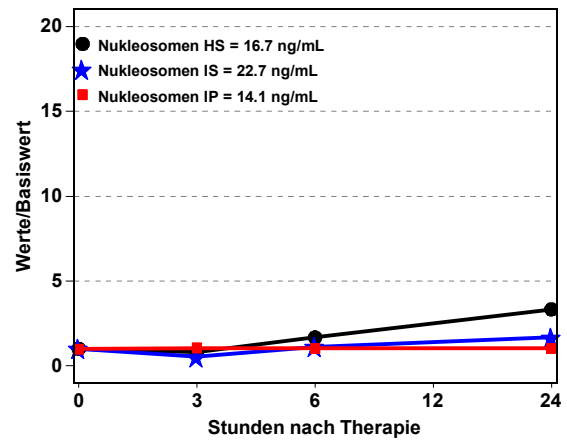
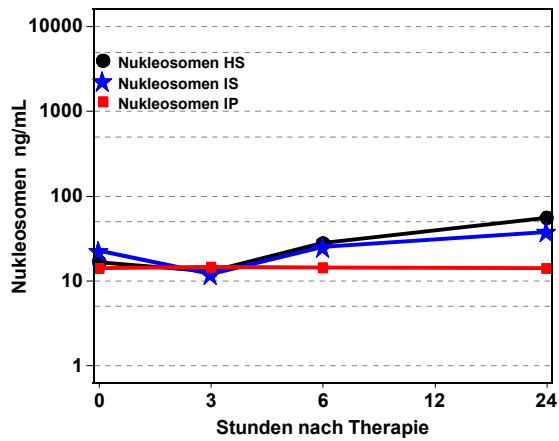


Abbildung 158 Patient 50, männlich, 2. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

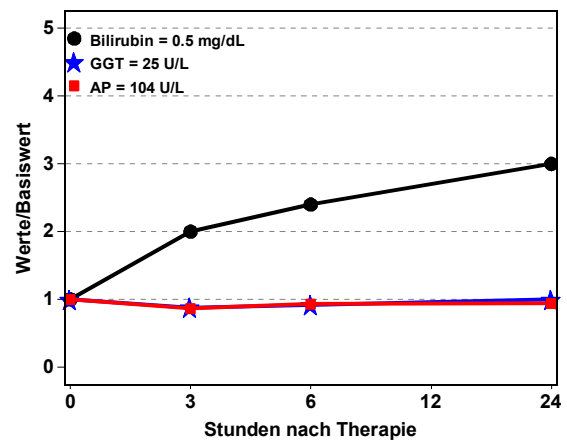
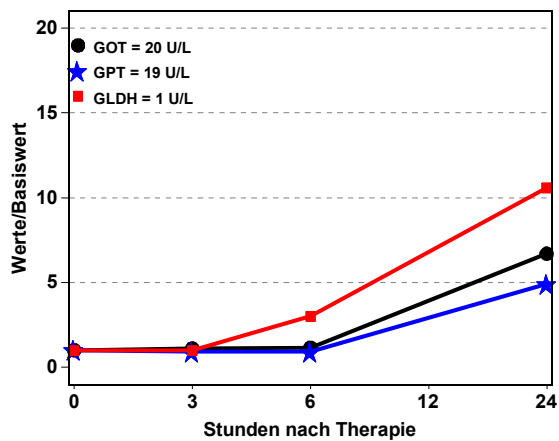
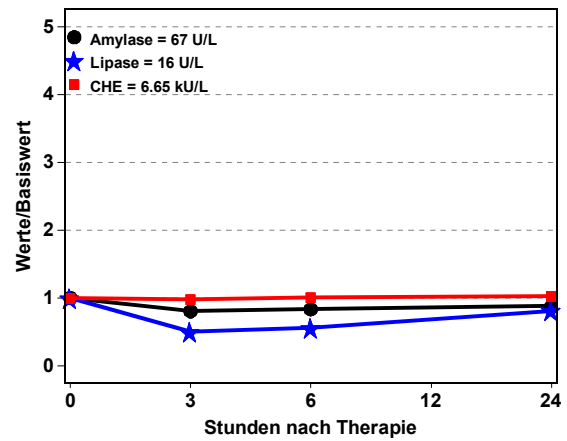
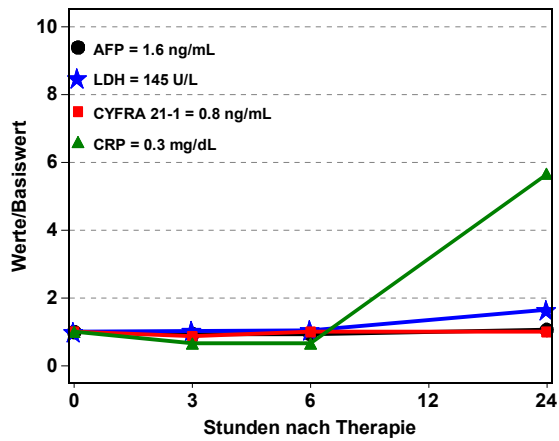
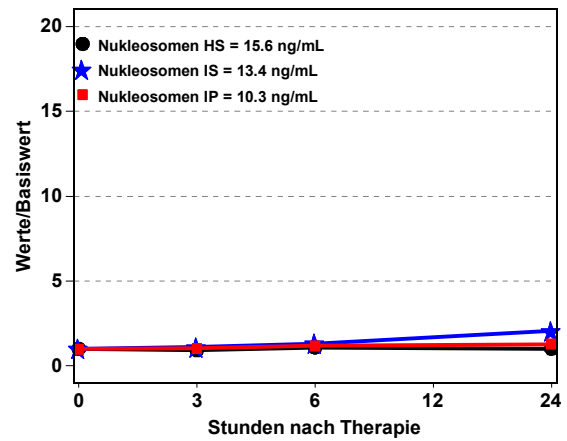
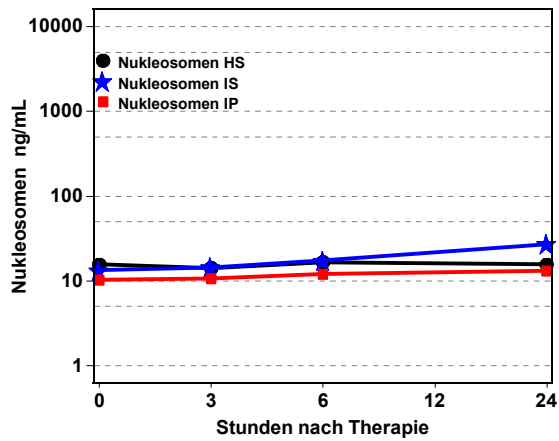


Abbildung 159 Patient 50, männlich, 3. Therapie, Chemoembolisation, Status: SD

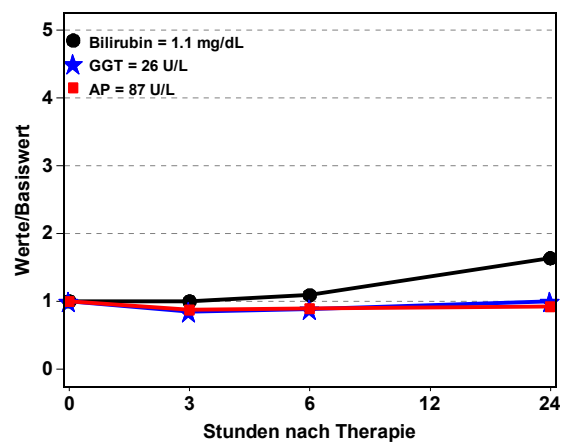
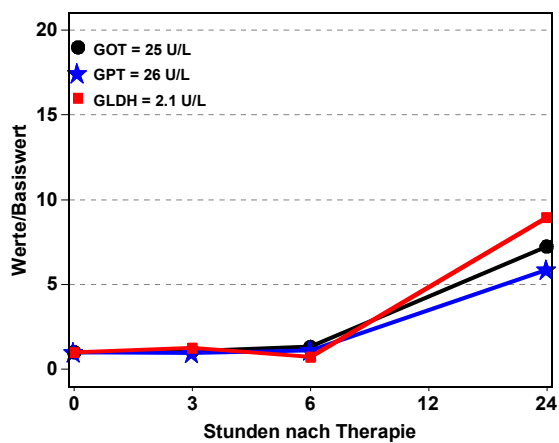
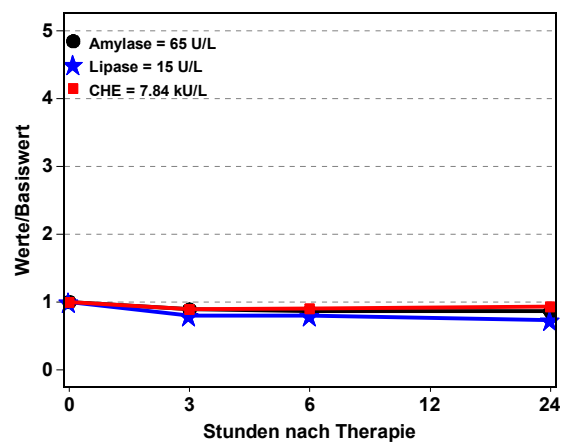
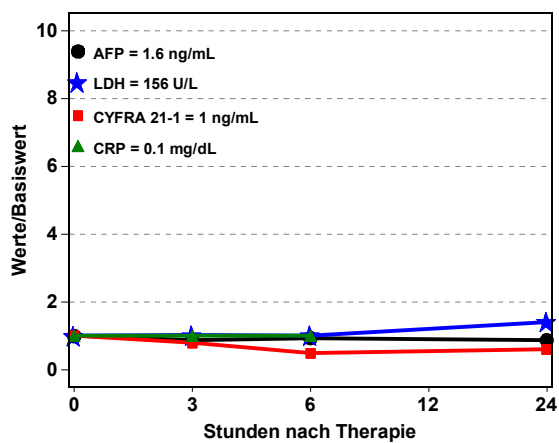
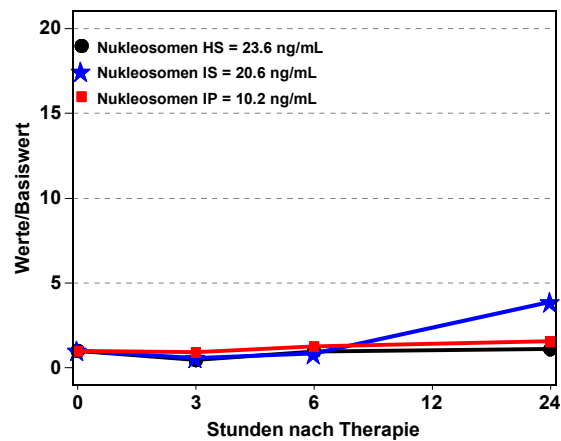
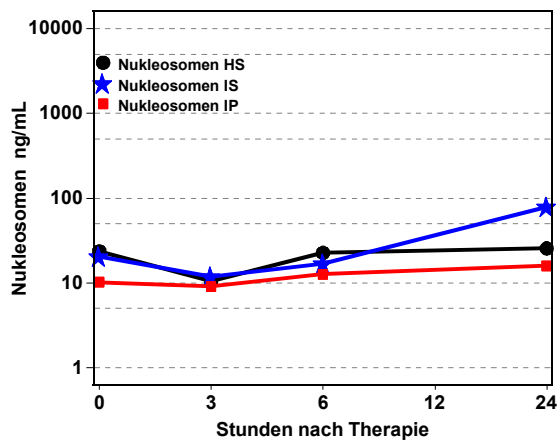


Abbildung 160 Patient 50, männlich, 4. Therapie, Chemoembolisation, Status: PD

8.2 Verzeichnis der Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)
ADP	Adenosindiphosphat
AFP	Alpha Fetoprotein
AFP-L3	Lens-culinaris agglutinin-reaktive Fraktion des AFP
AIF	Apoptose-induzierter Faktor
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ALAT	Alanin-Aminotransferase
Amy	Amylase
AP	Alkalische Phosphatase
APAF1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
Apo	<i>apoptosis receptor</i>
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Units
Bad	proapoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
Bak	proapoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
Bax	proapoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
Bcl	<i>B-cell lymphoma gen</i>
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Carcinoma</i>
Bid	proapoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
Bik	proapoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
Bili	Bilirubin
Bin	proapoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
Blk	proapoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
bp	Basenpaare
C	Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CAD	Caspasen-abhängige DNase
Casp	Caspase
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDDE	<i>Cell Death Detection ELISA</i>

CEA	karzinoembryonales Antigen
CHE	Cholinesterase
CLIP	<i>Clinic of the Liver Italian Program</i>
Cm	Zentimeter
CR	<i>Complete response</i>
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
Cyclin A	Name eines Schlüsselproteins des Zellzyklus
CYF	CYFRA 21-1
CYFRA 21-1	Cytokeratin 19-Fragment
d	Tage
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DCP	Des-gamma-carboxy-prothrombin
d.h.	das heißt
DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pl</i>
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DR	<i>death receptor</i>
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ECOG	<i>Performance Status European Cooperative Oncology Group</i>
ECLIA	<i>Electrochemiluminescence Immunoessay</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assey</i>
EndoG	Endonuklease G
et al.	und andere
FADD	Fas assoziierte Todesdomäne
Fas	Name eines Zelltodrezeptors
FLIP	<i>FADD like ICE inhibitory protein</i>
g	Gramm
GGT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase

GPC3	Glypican-3
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
GRETCH	<i>Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire</i>
H	Histon
h	Stunden
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HepG2	Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms
HSP70	Hitzeschockprotein 70
Htr2/omi	Name für eine Serinprotease
IAP	Apoptose-inhibierendes Protein
ICAD	<i>inhibitor of caspase activated DNase</i>
ISS	Injury Severity Score
J	Jahre
JÜ	Jahresüberleben
JÜR	Jahresüberlebensrate
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
kHz	Kilohertz
kU	Kilo units
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LDLT	<i>Living donor liver transplantation</i>
Lip	Lipase
LTX	Lebertransplantation
LYVE-1	<i>Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
MDCT	Multidetektor Computertomografie
mg	Milligramm
min	Minuten

ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mon	Monate
MPCT	Multiphasische helikale Computertomografie
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Anzahl
NAD ⁺	oxidierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NFκB	<i>nuclear factor-kappaB</i>
ng	Nanogramm
NHS	Nukleosomen Handtest Serum (ELISA)
NIP	Nukleosomen Impact Plasma (Elecsys 2010)
NIS	Nukleosomen Impact Serum (Elecsys 2010)
nm	Nanometer
NM 23-H1	Name eines Tumorsuppressorgens
p21	Name eines Kontrollproteins im Zellzyklus
p53	Name eines Tumorsuppressorgens
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
pH	pondus hydrogenii
PD	<i>progressive disease</i>
PLAG12B	Phospholipase A2
PR	<i>partial response</i>
PRRs	pattern-recognition receptors
PSA	Prostata spezifisches Antigen
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in solid Tumors</i>
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	<i>reactive oxygen species</i>

r-Wert	Korrelationskoeffizient
SCCA	<i>Squamos Cell Carcinoma Antigen</i>
SD	<i>stable disease</i>
SERCA1	Sarko-endoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase 1
SET	Name eines Onkogens
SIRT	Selektive Intraarterielle Radio-Therapie
Smac	<i>second mitochondria derived activator of caspase</i>
STK6	Serin/Threonin kinase 15
Survivin	Name für ein Apoptose-inhibierendes Protein
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TERT	Telomerase-reverse-Transkriptase
TLR	Toll-like receptor
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TUNEL	<i>terminal deoxyribonucleotid transferase mediated dUTP nick end labeling</i>
U	Units
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i> (Klassifikation verschiedener Karzinome)
UNOS	<i>United Network for Organ Sharing</i>
V.	Vena
VISUM	<i>Vienna survival model for HCC</i>

9 Curriculum Vitae

Nikolaus Josef Kohles

Geburtsdatum: 16.11.1982

Geburtsort: Lichtenfels

Schulausbildung:

1989-1993 Grundschule Redwitz an der Rodach

1993-2002 Gymnasium Burgkunstadt

Berufsausbildung:

04/2003-04/2010 Studium der Humanmedizin (LMU München)

08/2008-07/2009 Praktisches Jahr

1.Tertial: Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde,
Klinikum München-Großhadern (LMU)

2.Tertial: Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und
Wiederherstellungschirurgie, Städtisches Klinikum München-
Harlaching

3.Tertial: Klinik für Innere Medizin,
Städtisches Klinikum München-Neuperlach

31.05.2010 Approbation

Seit 01/2011 Assistenzarzt im Helios Klinikum Erfurt, Abteilung für Hals-
Nasen-Ohrenheilkunde, Plastische Operationen

10 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. med. Stefan Holdenrieder herzlichen Dank für die Überlassung des Themas aussprechen. Während der gesamten Arbeit hat er mich jederzeit kompetent betreut und immer wieder motiviert. Darüber hinaus bin ich ihm für die Hilfe und Unterstützung bei den Korrekturen, statistischen Auswertungen sowie für die Durchsicht des Textes außerordentlich verbunden.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Dorothea Nagel vom Institut für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern, die mir bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten und der Erstellung der Abbildungen geholfen hat.

Zudem danke ich dem ehemaligen Oberarzt der Medizinischen Klinik II Herrn PD Dr. med. Dietrich Jüngst und dem Assistenzarzt des Instituts für klinische Radiologie Herrn Dr. med. Tobias Wagershauser – beide vom Klinikum Großhadern – für die konstruktive Kooperation. Sie standen stets für eine Diskussion der entsprechenden Krankenakten zur Verfügung.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Kompetenzzentrums „Onkologische Labordiagnostik“ sowie dem Hauptlabor bedanken, die einige Messungen für diese Arbeit durchgeführt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken: Zunächst meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium und somit diese Arbeit erst ermöglichten. Darüber hinaus danke ich meiner Ehefrau, meinem Bruder sowie meinen Großeltern dafür, dass sie mich zu jeder Zeit bestärkt und motiviert haben.