

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie

**AFP-L3 als komplementärer Serum-Marker in der Diagnose und Prognose
des primären hepatozellulären Karzinoms (HCC)**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Michael Günter Gorray
aus Gelsenkirchen

2014

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. J. Schlaak
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. F. Weber
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. M. Kirsch

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 2015

Inhalt

0. Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1. Epidemiologie des HCCs	5
1.2. Ätiologie des HCCs	6
1.3. Pathogenese des HCCs	6
1.4. Stadieneinteilung	7
1.5. Diagnostik	8
1.5.1. Serologische Marker	9
1.5.1.1. <i>Alphafetoprotein</i>	9
1.5.1.2. <i>Des-Gamma-Carboxyprothrombin</i>	10
1.5.1.3. <i>Alphafetoprotein-L3</i>	11
1.5.1.4. <i>Andere Serummarker</i>	12
1.6. Therapie des HCCs	12
1.6.1. Kurative Ansätze	13
1.6.2. Palliative Ansätze	14
1.7. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	16
2.1. Patienten	16
2.2. Methoden	17
2.3. Statistische Auswertung	19
3. Ergebnisse	21
3.1. Patientenkollektiv	21
3.1.1. HCC-Patienten	22
3.1.2. Kontrollgruppe	24
3.1.3. Vergleich HCC vs. Kontrolle	26
3.2. Messwerte der drei Tumormarker	28
3.2.1. Messwerte im Gesamtkollektiv	29
3.2.2. Tumormarker in Patienten mit und ohne Zirrhose	32
3.2.3. Tumormarker für Patienten in Früh- und Spätstadien	34
3.2.4. Tumormarker nach MELD-Score	37
3.2.5. Tumormarker in verschiedenen Ätiologien	39
3.3. Nachweis der Tumormarker	44

3.3.1. <i>Nachweis der Tumormarker in verschiedenen Ätiologien</i>	47
3.3.2. <i>Nachweis der Tumormarker in unterschiedlichen Stadien</i>	49
3.3.3. <i>Nachweis der Tumormarker nach Leberstatus</i>	49
3.3.4. <i>Nachweis der Tumormarker bei speziellen Patienten</i>	51
3.4. <i>Sensitivität und Spezifität</i>	52
3.4.1. <i>Gesamtkollektiv</i>	52
3.4.2. <i>Patienten mit oder ohne Zirrhose</i>	54
3.4.3. <i>Patienten in Frühstadien</i>	55
3.4.4. <i>Unterschiedliche Grade der Lebererkrankung</i>	56
3.5. <i>Receiver Operating Characteristics</i>	58
3.5.1. <i>Patienten in frühen Stadien</i>	63
3.5.2. <i>Patienten mit und ohne Zirrhose</i>	65
3.5.3. <i>Unterschiedliche Grade der Lebererkrankung</i>	67
3.6. <i>Korrelation der Tumormarker mit anderen Faktoren</i>	70
3.7. <i>Unabhängigkeit der Tumormarker</i>	72
3.8. <i>Ausprägung und Genauigkeit der Tumormarker</i>	74
3.9. <i>Multivariate Analysen</i>	75
4. <i>Diskussion</i>	78
5. <i>Zusammenfassung</i>	89
6. <i>Literaturverzeichnis</i>	90
7. <i>Anhang</i>	97
7.1. <i>Weitere Tabellen</i>	97
7.2. <i>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</i>	99
7.3. <i>Abkürzungsverzeichnis</i>	100
8. <i>Danksagung</i>	I
9. <i>Lebenslauf</i>	II

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des HCCs

Im Vergleich der soliden Tumoren ist das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) mit 5% Anteil und geschätzten 750.000 Fällen pro Jahr weltweit die fünfthäufigste Krebsart (Jemal et al., 2011). Die Mortalität liegt mit schätzungsweise 700.000 auf Platz drei aller Krebserkrankungen (Jemal et al., 2011; El-Serag, Rudolph, 2007). Gründe für die hohe Sterblichkeit mögen der (partielle) Ausfall des Organs und/oder die nicht zu stoppende, mortale Metastasierung aufgrund fehlender kurativer Interventionen zum Diagnosezeitpunkt sein. Die Inzidenz steigt insgesamt, mit starken regionalen Unterschieden hinsichtlich Risikofaktoren und Auftretens (Bruix et al., 2001; Jemal et al., 2011). In Industrienationen ist der Anstieg konstant (Browning et al., 2004; Chen et al., 2006), in Entwicklungsländern kommt das HCC zwei bis drei Mal häufiger vor (Bosch et al., 1999). Für westliche Länder beträgt die HCC-Inzidenz 2,8/100.000, in Japan 20/100.000, in Südostasien und Afrika 100/100.000. Abb. 1 zeigt die unterschiedliche Inzidenz des HCCs weltweit (McGlynn, London, 2005).

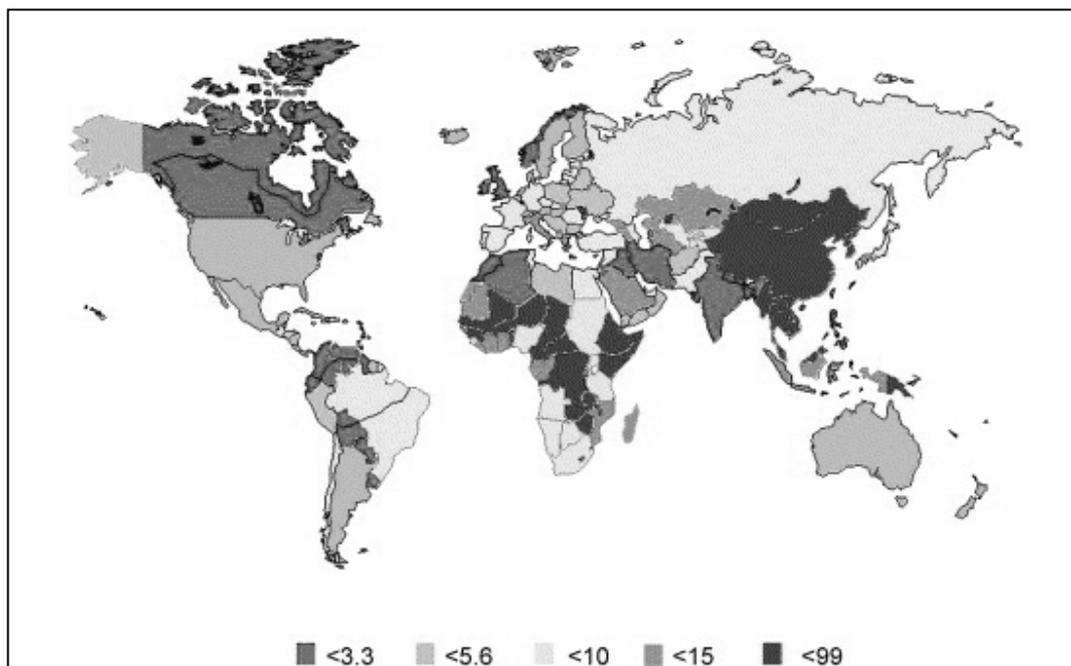


Abb. 1: Inzidenz des HCCs weltweit, nach McGlynn (McGlynn, London, 2005)

Für Männer liegt das Risiko an einem HCC zu erkranken 1,5- bis 3,0-fach über dem von Frauen (Bosch et al., 1999). Das durchschnittliche Erkrankungsalter variiert je nach Region und Exposition mit Risikofaktoren (Bialecki, Di Bisceglie, 2005). Die Inzidenz steigt mit dem Alter weiter an (Moradpour, Blum, 2005; Lodato et al., 2006).

1.2. Ätiologie des HCCs

Leberkrebs tritt in den meisten Fällen vor dem Hintergrund bekannter Ursachen auf. Damit gilt das HCC als Ausnahme unter den Krebserkrankungen (Lodato et al., 2006). Zu den Hauptrisikofaktoren für die Erkrankung zählen vor allem Infektionen mit Hepatitis B oder Hepatitis C (Fung et al., 2009), Alkoholismus oder Fettleber (El-Serag, Rudolph, 2007). Die geographisch unterschiedliche Inzidenz des HCCs (vgl. Abb. 1) resultiert aus einer regional heterogenen Verteilung oder Kombination der zugrunde liegenden Risikofaktoren, etwa einer höheren Virushepatitis-Prävalenz in Asien bzw. Afrika oder auch einer erhöhten Aflatoxin-Exposition in Afrika (Bialecki, Di Bisceglie, 2005).

Ein HCC entwickelt sich in 70-90% der Fälle (Moradpour, Blum, 2005) auf der Grundlage einer bereits vorhandenen Leberzirrhose, also einer chronischen Entzündung der Leber. Da dann die Entwicklung des HCCs eine Komplikation der Zirrhose selbst darstellt (Moradpour, Blum, 2005), wird letztere häufig als Präkanzerose bezeichnet. In Konsequenz und angesichts der Mortalität ist das HCC die häufigste Todesursache für Zirrhose-Patienten in Europa (Danta et al., 2005). Insbesondere bei Vorliegen von Hepatitisinfektionen entsteht Leberkrebs jedoch auch in der nicht-zirrhatischen Leber, etwa durch direkten Einfluss auf die Karzinogenese (Fung et al., 2009).

1.3. Pathogenese des HCCs

Grundlage für die Entstehung eines HCCs ist in den meisten Fällen also eine persistierende Entzündung des Organs. Die durch die entzündliche Schädigung der Leber resultierende chronische Regeneration der Hepatozyten führt zu einem fibrotisch veränderten Gewebe in einer noch immer inflammatorischen Umgebung (Moradpour, Blum, 2005). Dieser kontinuierliche Prozess und der damit verbundene oxidative Stress der DNA fördert die Akkumulation genetischer Veränderungen in den Zellen, bis hin zur malignen Transformation (Fung et al., 2009). So sind bereits in 50% der zirrhatischen Knoten chromosomale Veränderungen oder der Verlust von Allelen nachzuweisen (Levrero, 2006). Die Entstehung eines HCCs bleibt dabei ein komplexer, heterogener Prozess. Mindestens vier molekulare Signaltransduktionswege in der Proliferation oder der Regulation der Apoptose können hierbei betroffen sein (z.B. der pRb-, p53-, TGF-, PI3K/AKT/mTOR-, Ras/Raf/MEK/ERK- oder Wnt/ β -Catenin-Pfad) (Avila et al., 2006; Levrero, 2006; Moradpour, Blum, 2005). Ursachen mit ausreichend onkogenem Charakter, wie Hepatitis-Viren oder Aflatoxin, überspringen potentiell den mehrstufigen, entzündungsgetriebenen Prozess, in dem sie direkt mit den Zellfaktoren interagieren (Fung et al., 2009; Levrero, 2006). Hinzu kommen noch Mechanismen der Angiogenese (z.B. ebenfalls Ras/Raf/MEK/ERK, jedoch auch VEGF, PDGF oder Angiopoietin), die die Vaskularisierung des Tumors beeinflussen (Levrero, 2006; Semela, Dufour, 2004). Insgesamt spielt auch die Hochregulation von Wachstumsfaktoren und die Upstream-Aktivierung der jeweiligen Signalkaskaden eine wichtige

Rolle in der Hepatokarzinogenese, darunter: IGF II, Insulin Receptor Substrate 1, HGF und TGF (Moradpour, Blum, 2005). Eine schematische Darstellung der Pathogenese zeigt Abb. 2.

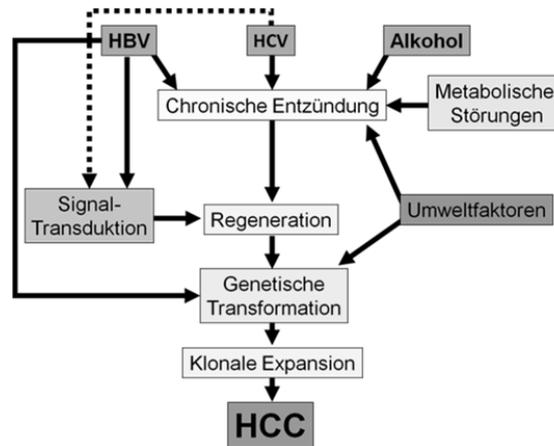


Abb. 2: Pathogenese des HCCs, adaptiert nach Fung und Moradpour (Fung et al., 2009; Moradpour, Blum, 2005)

1.4. Stadieneinteilung

Bei der Einteilung des HCCs in Stadien kommen eine ganze Reihe Schemata zum Einsatz. Diese basieren zumeist auf der Tumorgroße und dem Leberfunktionsstatus, jedoch auch auf weiteren unterschiedlichen Faktoren, wie der Anzahl der Herde, dem Vorhandensein von Metastasen, Gefäßinvasion, der Histologie oder dem Grad der Differenzierung („Grading“). Eine Auswahl gängiger Systeme zur Stadieneinteilung ist in Tab. 1 zusammengefasst.

System	Zahl der Herde	Tumor-Größe	Gefäß-Invasion	Histologie-Grading	Leber-Funktion	Metastasen	Krankheits-Symptome
TNM	✓	✓	✓	✓		✓	
Okuda		✓			✓		
JISS	✓	✓			✓		
CLIP	✓	✓	✓		✓		
BCLC		✓	✓		✓	✓	✓
CUPI	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Tab. 1: Vergleich verschiedener Stadieneinteilungen beim HCC (CLIP Investigators, 1998; Edge et al., 2010; Forner et al., 2012; Leung et al., 2002; Makuuchi, Kokudo, 2006; Okuda et al., 1985)

Für diese Arbeit kommen im Wesentlichen zwei Einteilungen in Stadien („Staging“-Systeme) zum Einsatz: Die klassische Einteilung nach TNM (vgl. Anhang, Tab. 29), wie sie von der AJCC vorgeschlagen wird, sowie die Einteilung nach BCLC, einem weiteren, weltweit verbreiteten und speziell für das HCC entwickelten System, das den ECOG Performance Status mit einbezieht (siehe Tab. 2).

BCLC Staging	Performance Status	Tumor-Ausdehnung	Leberfunktion
Stage 0	0	Einzelner Herd < 2 cm	Keine portale Hypertonie, Bilirubin normal
Stage A	0	Einzelner Herd <5 cm oder 3 Herde < 3 cm	Child Pugh A-B
Stage B	0	>5cm oder multinodulär	Child Pugh A-B
Stage C	1-2	Vaskuläre Infiltration, extrahepatische Metastasierung	Child Pugh A-B
Stage D	3-4	jede	Child Pugh C

Tab. 2: Stadieneinteilung des BCLC-Systems, adaptiert nach Forner (Forner et al., 2012)

Ein besonderes Merkmal der BCLC-Einteilung („Score“) ist die Tatsache, dass über die einzelnen Stadien Therapieempfehlungen abgeleitet werden. Den so entstehenden Algorithmus veranschaulicht im weiteren Verlauf Abb. 4 in Kapitel 1.6.

1.5. Diagnostik

In frühen Stadien zeigen Patienten mit HCC nur selten Symptome. Während Heilungschancen durch Resektion oder Transplantation nur in Frühstadien bestehen, wird das HCC aber häufig zu spät erkannt (Bruix, Sherman, 2005). Demzufolge sind sowohl Screening-Programme als auch verschiedene diagnostische Ansätze zur möglichst frühen Diagnosestellung von hohem Stellenwert. Den ersten Schritt bildet in der Regel die Sonographie. Bestimmte Risikogruppen, beispielsweise Patienten mit Leberzirrhose und eingeschränkter Leberfunktion, jedoch auch Patienten mit einer chronischen HBV- oder HCV-Infektion, sollten so regelmäßig überwacht werden (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012).

Aufgrund des fibrotischen Umbaus in zirrhotischen Lebern ist die Diagnose mittels Ultraschall im Vergleich zur ansonsten gesunden Leber erschwert. Tumoren lassen sich nicht immer klar vom umgebenden Gewebe abgrenzen oder von bindegewebigen Knoten unterscheiden. Insbesondere in Frühstadien ist die Sonographie damit eine Herausforderung. Während die Untersuchung mit Ultraschall trotzdem als die Methode der Wahl gilt, ist deren Sensitivität und Genauigkeit neben den verwendeten Geräten auch stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig und daher anfällig für Fehler (Bruix, Sherman, 2011). Insgesamt besteht ein Bedarf nach zusätzlichen Screening-Methoden für den klinischen Alltag. Daneben bilden bereits verschiedene zusätzliche, nicht-invasive Verfahren und deren Kombination einen diagnostischen Kanon, darunter die Bildgebung mittels CT, MRT sowie die in dieser Arbeit (und weitere) untersuchten serologischen Marker (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012; Bruix, Sherman, 2011). Als Standard gilt der Nachweis der Tumorerkrankung jeweils durch zwei verschiedene Verfahren, allerdings gelten CT

und MRT in der Primärdiagnostik als wenig kosteneffektiv. Für zirrhotische Patienten kann oft nur die Biopsie bzw. Histologie eine abschließende Diagnose liefern (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012). Aufgrund der Gefahr der Entstehung von Stichkanalmetastasen und angesichts einer trotzdem relativ großen Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Befundes (Horigome, 1999), sollte diese nur bei unklaren Fällen zum Einsatz kommen. Nicht zuletzt bildet auch das Staging bei vorliegendem HCC einen essenziellen Teil der Diagnose (Bruix, Sherman, 2011).

1.5.1. Serologische Marker

Für die Differentialdiagnose von Lebertumoren kommen mehrere Biomarker standardmäßig zum Einsatz. Der prominenteste und weltweit am häufigsten genutzte ist das AFP (Alphafetoprotein). Neben AFP etablieren sich auch DCP (Des-Gamma-Carboxyprothrombin) und der kombinierte Nachweis (Arii et al., 2009). Die Kombination beider Marker und deren diagnostische Überlegenheit gegenüber den einzelnen Markern wurden von Ertle et al. 2013 zum ersten Mal in einem europäischen Patientenkollektiv untersucht und gezeigt (Ertle et al., 2013). Eine Unterform von AFP, das AFP-L3, kommt ebenfalls in der Diagnose des HCCs zum Einsatz. AFP-L3 ist als Tumormarker beim HCC in asiatischen Ländern durchaus verbreitet. Die Kombination von AFP-L3 mit AFP und DCP wurde bislang kaum für europäische HCC-Patienten untersucht (Hadziyannis et al., 2013) und ist Gegenstand dieser Arbeit. Generell besteht ein gradueller Unterschied in der Datenlage zwischen dem Einsatz der Marker in der Diagnose im Vergleich zur Überwachung. Für den Einsatz aller drei Marker zur Überwachung der Patienten im klinischen Alltag sind zunächst weitere Untersuchungen notwendig (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012).

Trotz breiterer Datenlage wird keiner der drei Marker in den aktuellen EASL-EORTC-Leitlinien bei der Diagnose des HCCs empfohlen. Dies steht im Gegensatz zu früheren Empfehlungen, die AFP mit einem Cut-off von 400 ng/ml mit in den diagnostischen Algorithmus einbezogen. Die Begründung ist ein genereller Mangel an Genauigkeit und Effektivität der Methode (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012).

1.5.1.1. *Alphafetoprotein*

AFP ist ein humanes Glykoprotein mit einer atomaren Masse von etwa 70 kDa, das dem Albumin ähnelt. Es ist ein vorwiegend fetales Transportprotein, das in der Leber des Embryos produziert wird und dessen Konzentration nach der Geburt auf weniger als 1-16 ng/ml (oder <0,025% des ursprünglichen Wertes) abfällt (Abelev et al., 1963; Ruaslahti et al., 1974; Semela, Dufour, 2004). AFP wird jedoch nach maligner Veränderung der Hepatozyten erneut vermehrt produziert. Daher ist der Test auf AFP im Blut ein weit verbreiteter Standard bei der Diagnose der Überwachung des HCCs (Abelev et al., 1963; Di Bisceglie, Sterling, 1989; O'Connor et al., 1970). Dort ist es in 80%

bis 85% der Fälle vorhanden. Je nach Wahl des Cut-offs und vor allem in Frühstadien werden 40% der Tumoren mittels AFP nicht detektiert (Sherman et al., 1995). Allgemein weisen Werte über 400 ng/ml mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein vorhandenes HCC und auf einen großen Tumor hin. Da AFP-Werte beispielsweise aber auch durch Hepatitis und Leberzirrhose oder in Anwesenheit von Lebermetastasen von einem anderen Primärtumor, etwa einem Lungen-, Gastrointestinal- und Keimzell-Tumor, erhöht sein können, ist der AFP-Test weder besonders sensitiv noch spezifisch (Bayati et al., 1998; Di Bisceglie, Hoofnagle, 2005; Chu et al., 2001). Die Sensitivität von AFP als Tumormarker liegt in der Literatur zwischen 39% und 65%, bei einer Spezifität von 76% bis 94% (Daniele et al., 2004). Die berichteten unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten haben ihre Ursache bei den verschiedenen Patientenkollektiven bzw. Ätiologien. Auch aus den unterschiedlichen Methoden, einschließlich der Messverfahren, jeweiligen Grenzwerten und nicht zuletzt Studiendesigns resultieren zwangsläufig Abweichungen. Je höher der Cut-off liegt, um so größer wird die Spezifität. In den EASL-Richtlinien galten 400 ng/ml lange Zeit als Cut-off, oberhalb dessen man von einem HCC ausging (Bruix et al., 2001). Im Vergleich zu den in anderen Veröffentlichungen eingesetzten Cut-offs von 20 ng/ml (Toyoda et al., 2006) oder 10 bzw. 3 ng/ml (Daniele et al., 2004; Hanaoka et al., 2011) liegt diese Grenze relativ hoch und ist gerade für die Früherkennung ungeeignet (Bruix, Sherman, 2011), da die Sensitivität mit steigender Spezifität sinkt. Der AFP-Wert allein ist damit wenig aussagekräftig, und weitere Testverfahren bzw. Tumormarker sind notwendig, um ein HCC mit größerer Wahrscheinlichkeit und möglichst früh zu diagnostizieren bzw. auszuschließen.

1.5.1.2. *Des-Gamma-Carboxyprothrombin*

DCP ist eine Vorstufe von Prothrombin (auch Faktor II genannt). Prothrombin ist ein Koagulationsprotein, das an der Steuerung der sekundären Hämostase (Blutgerinnung) beteiligt ist. Eine mögliche Relevanz von DCP als Tumormarker für das HCC wurde zum ersten Mal von Liebman et al. 1984 gezeigt (Liebmann et al., 1984). Die Bildung von Prothrombin über DCP erfolgt in der Leber durch die Carboxylierung von 10 N-terminalen Glutaminsäureresten und ist Vitamin K-abhängig. Diese Reaktion wird durch ein vorhandenes HCC beeinträchtigt, was dazu führt, dass sich DCP anreichert. Daher kann der Nachweis von DCP zur Diagnose eines HCCs dienen (Liebmann et al., 1984; Owen et al. 2008). DCP wird in dem Zusammenhang auch als „Protein Induced by Vitamin K absence or Antagonist II (PIVKA-II)“ bezeichnet.

DCP-positive Tumoren können bis zu 91% ausmachen (Liebmann et al., 1984). Die Detektion hängt wiederum von der Wahl des Cut-offs und dem Patientenkollektiv ab. Es konnte teilweise gezeigt werden, dass DCP ein spezifischerer Indikator für das HCC ist als AFP (Volk et al., 2007). Gleichzeitig scheint DCP von beiden der weniger sensitive Marker zu sein (Marrero et al., 2003). Für DCP wurden insgesamt Sensitivitäten zwischen 48% und 62% sowie Spezifitäten zwischen

81% und 98% beschrieben (Marrero et al., 2003; Yuen, Lai, 2005). Bei Tumoren <3 cm sank der Anteil positiv getesteter Patienten auf 15% bis 30% (Marrero et al., 2003).

1.5.1.3. *Alphafetoprotein-L3*

AFP existiert in einer ganzen Reihe von Varianten. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Isoformen besteht in Veränderungen an den N-terminalen Kohlenhydratketten. Dort befindet sich eine einfache, Asparagin-gebundene Kohlenhydratkette, an die weitere Saccharide gebunden werden können. Diese führen dann zu einer Heterogenität. Wichtige Unterformen sind AFP-L1, AFP-L2 und AFP-L3 (Li et al., 2001). Letztere wird auch als *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)-reaktive Form von AFP bezeichnet. In Lebertumoren befindet sich häufig ein Enzym, das einen α -1,6-Fukose-Rest an das reduzierende Ende von N-Acetylglukosamin knüpft (Moriwaki, Miyoshi, 2010). LCA bindet an den so modifizierten N-Terminus (siehe Abb. 3). AFP-L3-Fraktionen scheinen ausschließlich von Leberkrebszellen produziert zu werden, während die nicht glykolysierte Hauptfraktion, das AFP-L1, jene ist, die beispielsweise auch im Rahmen einer Hepatitis oder Leberzirrhose vermehrt produziert wird (Kumada et al., 1999; Yamashita et al., 1996). Daher kann AFP-L3 möglicherweise für eine spezifischere Diagnose herangezogen werden.

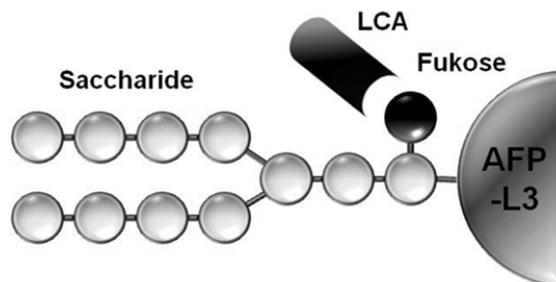


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung des Nachweis von AFP-L3, modifiziert nach Moriwaki (Moriwaki, Miyoshi, 2010)

Die Isoform AFP-L2 ist ebenfalls ein fetales Transportprotein. Es verschwindet bei einer regulär verlaufenden Schwangerschaft ab dem 2. Trimester (Yamamoto et al., 2003). Über AFP-L2 wurde berichtet, dass es als spezifischer Marker für Yolk-Sac-Tumoren (Dottersack- oder auch Endotermaler Sinustumor) gelten kann (Aoki et al., 2005; Yamamoto et al., 2003). Es sind derzeit keine Berichte über eine Relevanz von AFP-L2 beim HCC bekannt.

AFP-L3 ist in der Literatur bereits als potenziell spezifischerer Tumormarker im Vergleich zu AFP gesamt beschrieben (Sterling et al., 2009). In Japan wird AFP-L3 inzwischen routinemäßig zur Diagnose und im übrigen Therapieverlauf sowie in der Nachbeobachtung eingesetzt (Oka et al., 2001; Taketa et al., 1993). Patienten, die durch eine Hepatitis-Infektion ein besonderes Risiko für die Entwicklung eines HCCs haben, werden in regelmäßigen Abständen auf AFP-L3 hin untersucht. Die serologischen Untersuchungen im japanischen Screening führen zusammen mit

bildgebenden Verfahren zu einer insgesamt deutlichen Erhöhung der Sensitivität und Spezifität in der Erkennung von HCCs. Der besondere Wert von AFP-L3 zeigt sich vor allem in der Früherkennung maligner Neuerkrankungen (Oka et al., 2001; Taketa et al., 1993; Sato et al., 1993) sowie im Zusammenhang mit schlecht differenzierten oder metastasierten Tumoren oder unter Beteiligung der Portalvene (Oka et al., 2001). Auch im späteren Verlauf, also bei wiederkehrenden Tumorgeschehen hat AFP-L3 einen Stellenwert (Hayashi et al., 1999; Yamashita et al., 1995; Yamashita et al., 1996). Moderne, hoch-sensitive Messverfahren, wie diejenigen, die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen sind, ermöglichen es, Tumormarker auch bei niedrigen Serumspiegeln zu bestimmen. Dadurch wird eine noch höhere Sensitivität erzielt (Toyoda et al., 2011). Die bereits genannten europäischen Leitlinien (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012) sehen ein umfangreiches diagnostisches Programm im Sinne eines flächendeckenden Screenings, wie in Japan, zurzeit nicht vor.

1.5.1.4. Andere Serummarker

Mehrere weitere Marker werden in ihre Relevanz, z.T. komplementär zu den bislang beschriebenen oder in Kombination, beim HCC untersucht. Zu den viel versprechenden Kandidaten gehören das Osteopontin (Shang et al., 2012), GP 73 (Marrero et al., 2005; Witjes et al., 2013) und Glypican-3 (Wang et al., 2006).

1.6. Therapie des HCCs

Das HCC ist eine ätiologisch, pathogenetisch und histologisch heterogene Entität, die, einmal manifestiert, sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe nehmen kann. Die verschiedenen Ansätze zur Therapie des HCCs lassen sich nach dem BCLC-Schema darstellen (Fornier et al., 2012) (siehe Abb. 4).

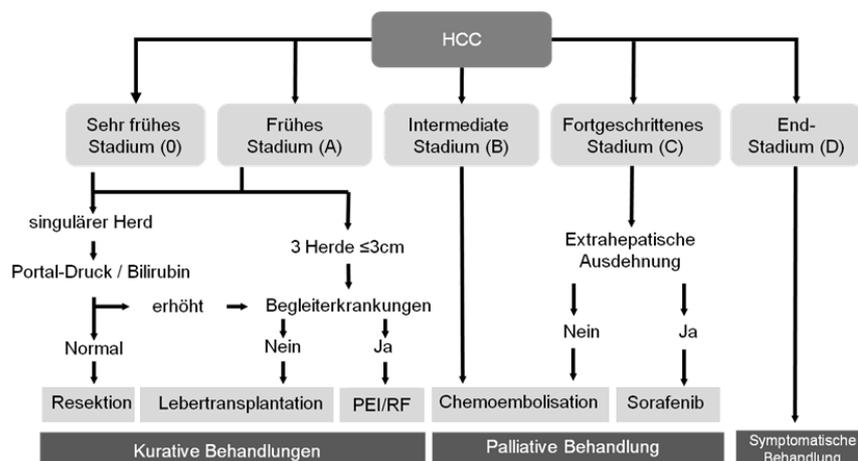


Abb. 4: BCLC Staging und Behandlungsstrategie, vereinfacht nach Fornier und Llovet (Fornier et al., 2012; Llovet et al., 1999)

Im Regelfall wird der Patient unter Berücksichtigung verschiedener Parameter (vgl. Kapitel 1.5) entsprechend einem prognostischen Stadium zugeordnet, das die Behandlungsstrategie bestimmt. Durch die Vielzahl der Methoden, die im Verlauf der Krankheitsgeschichte eines Patienten zum Einsatz kommen können, spricht man auch von multimodalen Konzepten. Kurative Ansätze sind bislang nur in Frühstadien erfolgreich (Bruix, Sherman, 2005). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt hier bei 50–70% (Forner et al., 2012). Ab dem BCLC Stadium B sind lebensverlängernde Maßnahmen möglich, jedoch keine Heilung. Von dieser Palliation wird noch das Endstadium abgegrenzt, in dem lediglich die Linderung der Symptome im Vordergrund steht. Für so gut wie alle therapeutischen Ansätze ist das Stadium der Leberzirrhose ein potenziell limitierender Faktor.

1.6.1. Kurative Ansätze

Je nach Stadium können im kurativen Bereich individuell verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Neben der Leberteilresektion und diversen anderen ablativen Verfahren, wie der Radiofrequenzablation, zählt auch die Lebertransplantation (für ausgewählte Patienten) dazu (Singal, Marerro, 2010). Für die sehr frühen Stadien mit adäquater Leberfunktion (Child 0 bis A) ist der chirurgische Ansatz mit vollständiger Entfernung des Tumors die Methode der Wahl. Für den Fall, dass eine Leberzirrhose vorliegt, bleibt das Problem der Grunderkrankung anschließend bestehen. Für eine Lebertransplantation, bei der auch die Leberzirrhose per se therapiert würde, muss ein Patient hierzulande üblicher Weise die Mailand-Kriterien erfüllen (unifokales HCC <5 cm oder maximal 3 Herde <3cm, keine Fernmetastasen oder Gefäßinvasion, Child B oder C) (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012). So selektierte Patienten haben ein Restrisiko von 8% für eine Rezidivrate (Mazaferro et al., 1996).

Im Fall eines primär inoperablen Tumorgeschehens stehen im Wesentlichen zwei perkutane ablativ Verfahren zur Verfügung. Bei der RFA werden Elektroden in den Tumor eingeführt und das maligne Gewebe anschließend durch Hitze so weit wie möglich zerstört. Der Erfolg ist von der Größe und Anzahl der Herde abhängig. Tumoren mit einem Durchmesser <2 cm werden bis zu 90% zerstört, Tumoren >3 cm und <5 cm noch zu 50% (Lencioni, 2010). Das zweite prominente Verfahren bei nicht operablen Tumoren ist die PEI. Hierbei wird reines Ethanol direkt in den Tumor injiziert mit dem Ziel, eine auf den Herd begrenzte Nekrose auszulösen. Bis zu 70% des Tumors können so zerstört werden, die Rezidivrate ist jedoch mit 33% bis 43% sehr hoch (Lencioni, 2010). RFA und PEI werden jeweils in mehreren Sitzungen durchgeführt. In der Literatur gilt die RFA der PEI als überlegen (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012; Bruix, Sherman 2011). Andere Verfahren, wie die laserinduzierte Thermotherapie oder die Kryotherapie, sind derzeit von untergeordneter Bedeutung.

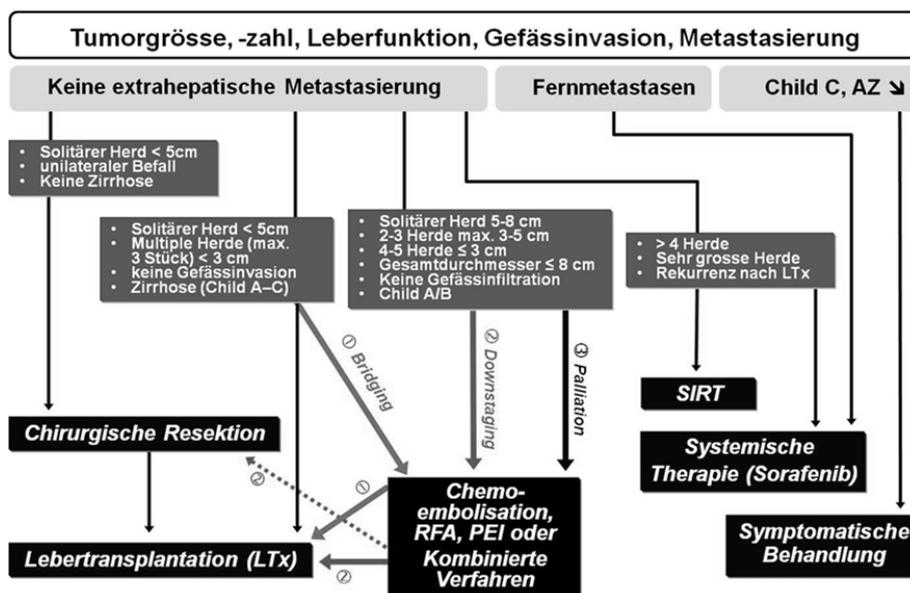


Abb. 5: HCC Behandlungsalgorithmus der Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie der Universität Duisburg-Essen (Fomer et al. 2012; Mazzaferro et al., 1996; Yao et al., 2005)

Aus denen zur Verfügung stehenden etablierten Verfahren ergibt sich anhand der von Mazzaferro et al. 1996 (Mazzaferro et al., 1996) und Yao et al. 2005 (Yao et al., 2005) publizierten Arbeiten zusammen mit den BCLC-Empfehlungen (Fomer et al., 2012) für die Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie der Universität Duisburg-Essen der in Abb. 5 gezeigte therapeutische Algorithmus. Hierbei wird auch deutlich, dass der Einsatz perkutan-ablativer Verfahren spätere chirurgische Eingriffe oder die Kombination nicht ausschließt, sondern auch dazu dienen kann, den Patienten in ein operables Stadium zu überführen.

1.6.2. Palliative Ansätze

Einen besonderen Stellenwert in der Behandlung der weiter fortgeschrittenen Stadien (vgl. Abb. 4 und 5) hat die Embolisation (TAE, TACE). Die Versorgung von Tumoren ist, anders als das übrige Gewebe der Leber, primär von Arterien abhängig. Daher lassen sich die Gefäße eines Tumors mittels über die zuführende Arterie eingebrachter Kunststoffkugeln recht gut blockieren. Die Folge dieser TAE ist eine Nekrose bis hin zum Absterben des behandelten Herdes. Bei einer Behandlung mit TACE transportieren die genannten Kunststoffkugeln zusätzlich ein Zytostatikum (z.B. Doxorubicin) in den Tumor, das dort freigesetzt wird und die Nekrose lokal verstärkt. Bruix et al. analysierten 2004 die Ergebnisse von insgesamt 27 randomisierten, kontrollierten und mehreren kleineren, nicht-kontrollierten Studien und kamen zu dem Schluss, dass bislang kein Überlebensvorteil für die TAE bzw. TACE gezeigt werden konnte (Bruix et al., 2004). Dennoch gilt TACE heute als die Standardbehandlung für Patienten mit BCLC Stadium B. Bei entsprechender Patientenselektion (maximal Child Pugh A, multinodulärer aber asymptomatischer Tumor ohne

Gefäßbeteiligung) lässt sich ein objektives Ansprechen von 30-50% erreichen (Bruix et al., 2004). Dies gilt für etwa 15% der HCC-Patienten. Die behandlungsbedingte Mortalität liegt bei 4% (Bruix et al. 2004).

Zumindest einen ähnlichen Weg beschreitet man bei der SIRT. Das Wirkprinzip ist jedoch eine selektive Strahlentherapie. Hier werden Harz- oder Glaskügelchen in den Tumor injiziert, die Yttrium-90 (^{90}Y) tragen. Yttrium-90 ist ein reiner β -Strahler und hat daher eine kurze Reichweite. Die so in den Tumor eingebrachte Strahlung wirkt praktisch nur auf den Herd begrenzt. Patienten in fortgeschrittenen Stadien haben mit SIRT ein Gesamtüberleben von 6-10, in ausgewählten Fällen bis zu 17 Monaten (Sangro et al., 2012). Negative Auswirkungen auf das Gesamtüberleben unter SIRT haben u.a. eine Pfortaderthrombose, eine stärker eingeschränkte Leberfunktion oder eine extrahepatische Manifestation (Sangro et al., 2012).

Die viel versprechenden Ergebnisse der SIRT beruhen u.a. auf der Tatsache, dass Leberkrebs im Prinzip radiosensitiv ist (Wigg et al., 2010). Bei der externen Bestrahlung wird jedoch ein großer Teil der Strahlung vom Lebergewebe absorbiert, was zu schweren Schäden oberhalb von 35 Gy Dosis führen kann (Lawrence et al., 1995). Daher hat die konventionelle Strahlentherapie beim HCC praktisch keinen Stellenwert.

Verschiedene medikamentöse systemische Therapien, darunter klassische Zytostatika, Hormontherapie und Immuntherapie, zeigten in der Vergangenheit uneinheitliche bzw. negative Ergebnisse. Keine dieser Strategien wird daher für die Therapie des HCCs empfohlen (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012). Llovet et al. gingen bereits 2003 so weit, die überwiegend inaktive bzw. schädliche Chemotherapie aus wissenschaftlichen und ethischen Gründen als Vergleichsarm zugunsten von Placebo auszuschließen (Llovet et al., 2003).

Für fortgeschrittene Patienten nach BCLC steht seit einigen Jahren der Kinaseinhibitor Sorafenib für die Erstlinienbehandlung zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um eine zielgerichtete Therapie, die in gleich mehrere Signaltransduktionswege eingreift, die für das HCC charakteristisch sind und diese blockiert (u.a. Ras/Raf/MEK/ERK, VEGFR, PDGFR, vgl. Kapitel 1.3). In einer Phase III-Studie bei 602 Patienten mit fortgeschrittenem HCC betrug das Gesamtüberleben gegenüber dem Placeboarm 10,7 vs. 7,9 Monate ($p < 0,001$) (Llovet et al., 2008). Die Wirksamkeit von Sorafenib war unabhängig von den stratifizierten Subgruppen, etwa makroskopische Gefäßinvasion und/oder extrahepatische Metastasierung. Sorafenib ist die erste systemische, zielgerichtete Therapie, die eine Überlebensverlängerung bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC zeigen konnte. Sie gilt als der Referenzstandard in der systemischen Therapie des fortgeschrittenen HCC.

Einige weitere neue Substanzen befinden sich aktuell in verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung. Vor allem negative Ergebnisse der jüngeren Vergangenheit (darunter Studien mit Brivanib oder Sunitinib) deuten darauf hin, dass das HCC eine Sonderstellung unter den soliden

Tumoren einnimmt (Villanueva, Llovet, 2012). Insbesondere das Verträglichkeitsprofil scheint eine Herausforderung in einer Entität zu sein, in der das Organ, das wegen der Krebserkrankung therapiert wird, für den Patienten lebenswichtig ist. Gleichzeitig ist es in der Regel anderweitig krank und eingeschränkt funktionsfähig und muss zudem das jeweilige Therapeutikum verstoffwechseln und abbauen. Der Bedarf an Alternativen zu Sorafenib bzw. Optionen für die 2nd-line für Patienten, die resistent gegenüber Sorafenib sind, ist daher groß (Trevisani et al., 2010).

1.7. Zielsetzung

Mit dieser prospektiven Studie sollte der Stellenwert der Tumormarker AFP, DCP und AFP-L3 sowie deren Kombinationen beim HCC in einem europäischen Patientenkollektiv untersucht werden. Die wesentlichen Fragen dazu waren:

1. Ist durch eine Kombination der Tumormarker AFP und DCP mit AFP-L3 eine Verbesserung der diagnostischen Methoden zu erreichen?
2. Welche qualitativen Unterschiede gibt es zwischen den Ergebnissen der beiden Testsysteme?
3. Wie sind die Sensitivität und die Spezifität der drei Tumormarker bei HCC-Patienten?
4. Wie verhalten sich Sensitivität und Spezifität in Subgruppen, insbesondere in Frühstadien (BCLC \leq A, TNM \leq 2) oder bei vorhandener Zirrhose?

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

In die dieser Auswertung zu Grunde liegende, prospektive, monozentrische Studie des Universitätsklinikums Duisburg-Essen wurden 596 Patienten, davon 165 mit HCC und 431 ohne HCC (Kontrollgruppe), eingeschlossen. Die Genehmigung durch die Ethikkommission dazu lag vor. Eingeschlossen wurden sämtliche Patienten, die aufgrund ihrer Lebererkrankung im Studienzentrum vorstellig waren. Die Kontrollgruppe bestand im Wesentlichen aus Patienten mit Virus-Hepatitis, Zirrhose oder anderen chronischen Lebererkrankungen. Den Patienten wurde im Rahmen ihres klinischen Aufenthaltes Blut für die Untersuchungen abgenommen. Alle Teilnehmer willigten schriftlich in die Untersuchung ein. Sofern nicht anders angegeben, wurden für die Analysen und Auswertungen diejenigen Patientendaten verwendet, für die beide in Kapitel 2.2

beschriebenen Messungen vorlagen (n=570, n=153 Patienten mit HCC und n=417 Patienten in der Kontrollgruppe).

2.2. Methoden

Die Feststellung eines HCCs erfolgte entsprechend der EASL/EORTC-Richtlinien (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012). Sie wurde anhand von histologischen Proben oder nicht-invasiv jeweils durch zwei unterschiedliche Verfahren gestellt bzw. bestätigt. Die Stadieneinteilung erfolgte den genannten Richtlinien folgend mit dem BCLC- und dem TNM-System. Eine Diagnose der zugrunde liegenden Lebererkrankung erfolgte anhand histologischer Befunde, Laborparameter und anderer für das Krankheitsbild typischer Merkmale. Die Leberzirrhose wurde durch Biopsien in Verbindung mit weiteren klinischen Merkmalen, wie portale Hypertonie und Aszites, diagnostiziert. Die Einteilung der Zirrhose erfolgte nach Child-Pugh und MELD Score.

Folgende erhobenen Patienten-Daten wurden für die Auswertung dieser Arbeit herangezogen: Alter, Geschlecht, Herkunft, Ätiologie (HBV, HCV, Alkohol, NASH, kryptogen, andere) sowie die Laborparameter GPT, GGT, GOT, Bilirubin, Albumin und INR. Weitere Einteilungen in Subgruppen erfolgten nach Leberzirrhose, Child-Pugh-Status, MELD- und CLIP-Score. Die für die Studie notwendigen Laborparameter wurden vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen bestimmt (Leitung: Dr. med. Lothar Volbracht).

Bei sämtlichen Patienten erfolgte eine Blutentnahme in Standardtechnik, nach Einwilligung in die Studie, zum Zeitpunkt der Anamnese oder während der Visiten. Danach wurde das Blut für 10 Minuten bei 2.300 U/min zentrifugiert und abpipettiert. Die Lagerung erfolgte in der Klinik bei -80°C.

Sämtliche Analysen zu Biomarkern im Blutserum erfolgten verblindet in den Labors der Firma Wako in Neuss. Dabei handelte es sich um die quantitativen Bestimmungen der Marker AFP und DCP sowie des Anteils der fukolysierten Variante am AFP (AFP-L3%). Zwei verschiedene immunologische Verfahren kamen zum Einsatz. Im ersten Ansatz wurden die drei genannten Marker von allen Patienten erhoben. Diese Messungen wurden mit einem LiBASys (Abb. 6, links), einem früher kommerziell verfügbaren LBA der Firma Wako (Wako Chemicals GmbH, Neuss) im Zeitraum von 02/2007 bis 11/2008 bestimmt.

AFP wird in diesem System mithilfe von drei Antikörpern bestimmt. Durch deren Bindung entstehen zwei verschiedene Immunkomplexe mit unterschiedlicher Ladung. Diese können chromatographisch voneinander getrennt werden. In einer anschließenden Fluoreszenzmessung werden die LCA-aktiven und -inaktiven AFP-Komplexe dargestellt. Deren Summe ergibt die gesamte AFP-Konzentration. Die Ergebnisse werden in ng/ml angegeben. Der Anteil der LCA-

aktiven Fraktion am Gesamt-AFP entspricht AFP-L3 und wird in % angegeben ($\text{AFP-L3}/\text{AFP}_{\text{gesamt}} \times 100$) (Yamagata et al., 2003).

Die Bestimmung von DCP beruht ebenfalls auf der Bildung eines Immunkomplexes. Dieser entsteht mittels LBA aus einem an Anionen gebundenen Prothrombin und einem gegen DCP gerichteten Antikörper. Letzterer ist mit einer Peroxidase verbunden. Nach einer chromatographischen Auftrennung wird die DCP-Konzentration über die Verstärkung der Fluoreszenz ermittelt. Diese wird ebenfalls in ng/ml angegeben (Yamaguchi et al., 2008).

Für einen zweiten Ansatz standen von den zuvor verwendeten Proben diejenigen von 153 HCC-Patienten und 417 Patienten der Kontrollgruppe zur Verfügung. Diese Messungen wurden mit einem $\mu\text{TASWako-i30}$ -Gerät (Abb. 6, rechts), einem weiter entwickelten, kommerziell erhältlichen Testsystem der Firma Wako, im Zeitraum vom 01/2011 bis 02/2011 durchgeführt. Dieses neuere System erlaubt mehrere biochemische Analyseschritte mittels eines mikrofluidischen Chips (Kawabata et al., 2008). Die Angaben erfolgen ebenfalls in ng/ml für AFP und DCP bzw. % AFP-L3. Auch diese Methode basiert auf Flüssigphasen-Bindungsreaktionen zwischen Antigenen und markierten Antikörpern mit anschließender elektrophoretischer Trennung von gebundenen und freien Reaktionspartnern. Durch die so genannte on-Chip-Technologie ist die modernere Methode schneller als das LiBASys und verfügt über eine bessere Auftrennung (Kagebayashi et al., 2009). Damit sind Marker-Konzentrationen ab 0,3 ng/ml messbar, was zu einer erhöhten Sensitivität führt. In Mikrokanälen des mikrofluidischen Chips bilden sich Immunkomplexe aus AFP, *Lens culinaris* Agglutinin, DNA-markierten Antikörpern und Farbstoff-markierten Antikörpern in der Flüssigphase aus. AFP-L3 und AFP-L1-Komplexe werden in den gleichen Kanälen mittels Kapillargelelektrophorese aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten aufgetrennt und quantitativ gemessen. Aufgrund der definierten Testvolumina sowie der gleichmäßigen Reaktionstemperatur, ist die Präzision der Messung sehr hoch (Kagebayashi et al., 2009).



Abb. 6: Links LiBASys (<http://www.wako-chemicals.de>) und rechts $\mu\text{TASWako-i30}$ (<http://www.wakodiagnostics.com>)

Aufgrund der fluoreszenzoptischen Auslesung ist die Messung zudem äußerst empfindlich. Sowohl AFP-L1 als auch AFP-L3 können ab 0,3 ng/ml quantifiziert werden. AFP-L3 kann in % ermittelt werden, sobald beide Fraktionen mit $\geq 0,3$ ng/ml gemessen werden. Beim LiBASys betrug die analytische Sensitivität $\geq 0,8$ ng/ml pro Fraktion. Zudem konnte das Gerät das AFP-L3 in Prozent erst ab 10 ng/ml (Gesamt-) AFP bestimmen. Das kleinere μ TASWako-i30-Gerät gilt als der neue Referenzstandard.

2.3. Statistische Auswertung

Die Datenerhebung erfolgte mit Microsoft® Office Excel® 2007 SP3. Statistische Analysen wurden mit Mypstat Version 12 (Systat Software GmbH, Erkrath), IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (IBM Corporation, Armonk, New York) und VassarStats (© Richard Lowry 2001-2012) oder ebenfalls Excel® 2007 durchgeführt. Signifikanzniveaus wurden mit dem Student's t -Test, für kategoriale Daten mit dem Fisher's exact Test berechnet. Für den t -Test wurde aufgrund der Verteilung der Marker die Variante für ungleiche Varianzen gewählt.

Die Receiver Operating Characteristics (ROC) -Analysen erfolgten mittels John Eng, ROC Analysis: Web-based Calculator for ROC Curves (Eng, 2013) und VassarStats.

Deskriptive und induktive Auswertungen wurden von einem erfahrenen Statistiker überprüft.

Die Arbeit wurde mit Microsoft® Office Word® 2007 SP3 geschrieben.

Bei den ROCAUC-Analysen wurde ein Format mit sechs möglichen Kategorien gewählt. Für sämtliche Berechnungen wurde Kategorie 1 = „sicher negativ“ und Kategorie 6 = „sicher positiv“ gesetzt. Für AFP mit einem Cut-off von 20 ng/ml gelten die in den Tab. 3 getroffenen Annahmen.

Zustand	Ergebnis	Definition	Annahme
1	Zahl	AFP ≤ 19 ng	Sicher negativ
2	Zahl	nicht vergeben	Wahrscheinlich negativ
3	Zahl	AFP > 19 ng < 20 ng	Möglicherweise negativ
4	Zahl	AFP = 20 ng	Möglicherweise positiv
5	Zahl	AFP > 20 ng < 21 ng	Wahrscheinlich positiv
6	Zahl	AFP > 21 ng	Sicher positiv

Tab. 3: Kategorien bei den ROCAUC-Berechnungen für AFP bei einem Cut-off von 20 ng/ml

Die Kategorien für die Cut-offs von 10 ng/ml oder 200 ng/ml wurden analog dazu gebildet. Die anderen Einteilungen gruppieren sich um den jeweiligen Grenzwert. Die daraus resultierenden Kurven basieren auf den von Metz et al. 2010 an der Universität von Baltimore entwickelten Programmen ROCFIT und LABROC4 (Eng, 2013). Bei den Kategorien für DCP und AFP-L3% gilt im Prinzip die gleiche Vorgehensweise wie beim AFP (siehe Tabellen 4 und 5). Der Vereinfachung halber wurden nicht alle Zustände vergeben. Insgesamt gilt für alle Berechnungen ein Wert von 4 oder größer immer als positiv.

Zustand	Ergebnis	Definition	Annahme
1	Zahl	DCP <7 ng	Sicher negativ
2	Zahl	nicht vergeben	Wahrscheinlich negativ
3	Zahl	DCP >7 ng <7,5 ng	Möglicherweise negativ
4	Zahl	DCP = 7,5 ng	Möglicherweise positiv
5	Zahl	nicht vergeben	Wahrscheinlich positiv
6	Zahl	DCP >7,5 ng	Sicher positiv

Tab. 4: Kategorien bei den ROCAUC-Berechnungen für AFP bei einem Cut-off von 7,5 ng/ml

Zustand	Ergebnis	Definition	Annahme
1	NC/ND	AFP ≥3 ng	Sicher negativ
2	NC/ND	AFP <3 ng	Wahrscheinlich negativ
3	Zahl	AFP-L3 >9% <10%	Möglicherweise negativ
4	Zahl	AFP-L3 = 10%	Möglicherweise positiv
5	Zahl	AFP-L3 10% bis 11%	Wahrscheinlich positiv
6	Zahl	AFP-L3 ≥11%	Sicher positiv

Tab. 5: Kategorien bei den ROCAUC-Berechnungen für AFP-L3% bei einem Cut-off von 10%

Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit für die verschiedenen Cut-offs wurden (mit Spezifität = Spec, Sensitivität = Sens, Genauigkeit = Acc, „richtig positiv“ = rp, „richtig negativ“ = rn, „falsch positiv“ = fp sowie „falsch negativ“ = fn, Positive Prävalenz = PP und Negative Prävalenz = NP und Youden-Index = J) wie folgt bestimmt:

$$Spec = \frac{rn}{rn+fp} \quad Sens = \frac{rp}{rp+fn} \quad Acc = \frac{rp+rf}{rp+fn+rn+fp}$$

$$PP = \frac{rp+fn}{n(\text{Patienten})} \quad NP = \frac{fp+rn}{n(\text{Patienten})} \quad J = Sen + Spe - 1$$

Wahrscheinlichkeiten (Positive Predictive Value = PpV, Negative Predictive Value = NpV, konventionell positive Wahrscheinlichkeitsrate C = LR⁺, konventionell negative Wahrscheinlichkeitsrate = LR⁻, positive Wahrscheinlichkeitsrate gewichtet nach Prävalenz = W⁺, negative Wahrscheinlichkeitsrate gewichtet nach Prävalenz = W⁻) wurden errechnet mit:

$$PpV = \frac{rp}{rp+fp} \quad NpV = \frac{rf}{rf+fn} \quad LR^+ = \frac{Sens}{1-Spec} \quad LR^- = \frac{1-Sens}{Spec}$$

$$W^+ = \frac{PP \times Sens}{(1-PP) \times (1-Spec)} \quad W^- = \frac{NP \times (1-Sens)}{(1-NP) \times (Spec)}$$

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit statistischen Analysen einer großen Fülle von Patentendaten. Die so gewonnenen Ergebnisse werden in diesem Abschnitt ausführlich dargestellt. Im Hinblick auf die in Kapitel 1.7 formulierten wesentlichen Fragestellungen und die sich daraus ergebenden Einzelheiten lässt sich zur besseren Lesbarkeit Folgendes voranstellen:

1. Die Hinzunahme von AFP-L3 zu AFP und DCP führte zu einer deutlichen Verbesserung der diagnostischen Methode (siehe Kapitel 3.5).
2. Das modernere Testsystem μ TAS ist dem älteren LiBASys überlegen (vgl. Kapitel 3.3 und 3.5).
3. Die Sensitivität einer Kombination aus allen drei Markern liegt im Allgemeinen über der von nur zwei Markern, bei kaum geringerer Spezifität (vgl. Kapitel 3.4).
4. Für frühe HCC-Stadien können so erheblich mehr Patienten erkannt werden (siehe Kapitel 3.4.3 und 3.5.1), ebenso bei vorhandener Zirrhose (siehe Kapitel 3.4.2. und 3.5.2).

3.1. *Patientenkollektiv*

In diese retrospektive Auswertung wurden Daten von insgesamt 596 Patienten eingeschlossen. Von den 596 Patienten gehörten 431 (72,3%) zur Kontrollgruppe und 165 (27,7%) zur HCC-Gruppe. In der Kontrollgruppe befanden sich vier Patienten, die ursprünglich als HCC-positiv eingestuft waren, sich jedoch unabhängig von dieser Arbeit als negativ herausgestellt haben. Weitere Details zu diesen Patienten befinden sich in Kapitel 3.3.4. Die in den Kapiteln 3.1 sowie 3.1.1 und 3.1.2 im Text beschriebenen prozentualen Angaben zu Ätiologien beziehen sich auf singuläre Faktoren. Am Ende der jeweiligen Abschnitte befindet sich eine kumulative Darstellung dazu. Eine Darstellung zur ethnischen Herkunft der Patienten befindet sich in Tabelle 30 im Anhang.

Das Gesamtkollektiv bestand aus 331 (55,5%) Männern und 265 (44,5%) Frauen. Zum Zeitpunkt der Diagnose betrug das durchschnittliche Alter $53,3 \pm 13,5$ Jahre. Von diesen 596 Patienten litten 208 (34,9%) an einer Leberzirrhose. Die Verteilung der verschiedenen Ätiologien aller Patienten veranschaulicht Abb. 7. Am häufigsten lag eine HCV-Erkrankung vor (21,4%), gefolgt von Hepatitis B (18,9%), NASH (5,8%), Alkohol/ASH (5,6%) und kryptogenen Lebererkrankungen (4,4%). In 26,7% der Fälle litten die Patienten an anderen Erkrankungen (einschließlich AIH, PBC oder PSC, siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Erkrankungen unbekannter Ursache traten in 5,3% der Fälle auf. Bei 10,7% der Patienten lagen zwei Faktoren vor. Weitere 1,2% der Patienten wiesen drei Faktoren auf. Abb. 8 zeigt die kumulative Verteilung der Faktoren für die Gesamtgruppe.

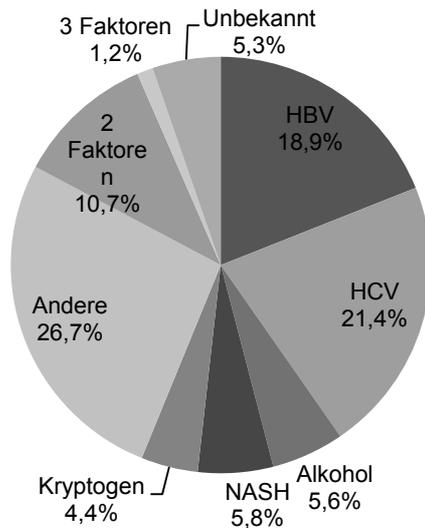


Abb. 7: Ätiologie, Faktorenverteilung im Gesamtkollektiv

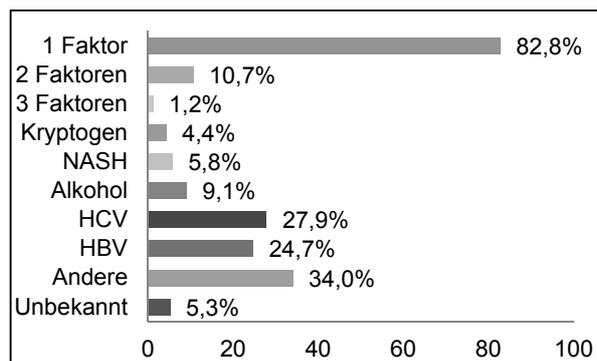


Abb. 8: Ätiologie, kumulative Faktorenverteilung im Gesamtkollektiv

3.1.1. HCC-Patienten

Die HCC-Gruppe bestand aus 136 (82,4%) Männern und 29 (17,6%) Frauen. Das durchschnittliche Alter dieser Patienten betrug zum Zeitpunkt der Diagnose $63,8 \pm 9,8$ Jahre. Die Patienten befanden sich durchschnittlich im TNM-Stadium 3A bzw. BCLC-Stadium B. Eine Leberzirrhose lag bei 125 Patienten (76,2%) vor. Tab. 6 zeigt Charakteristika der HCC-Gruppe im Detail, aufgeschlüsselt nach Ätiologien.

HCC		Gesamt	HBV	HCV	Alkohol	NASH	Kryptogen	Andere	Multifaktoriell	
n/% ¹		165/100	30/18,2	29/17,6	23/13,9	35/21,2	26/15,8	8/4,8	14/8,5	
♂ ¹	n/%	136/82,4	26/86,7	22/75,9	18/78,3	29/82,9	21/80,8	7/87,5	13/92,9	
Zirrhose ²	n/%	125/76,2	25/83,3	28/96,6	20/87,0	21/60,0	10/40,0	8/100	13/92,9	
Alter bei Diagnose ¹	Jahre	Mittel	63,8 ± 9,8	59,8 ± 11,1	63,7 ± 9,6	64,6 ± 8,1	66,9 ± 8,9	68,6 ± 7,9	57,4 ± 10,7	58,5 ± 8,2
		Median	65,2	61,0	65,2	67,6	67,4	68,1	57,5	57,9
GGT ²	U/l	Mittel	290 ± 327	227 ± 327	278 ± 430	332 ± 308	357 ± 309	249 ± 258	267 ± 275	310 ± 328
		Median	176	118	136	239	251	141	139	230
GPT ¹	U/l	Mittel	66 ± 63	56 ± 36	97 ± 63	59 ± 60	51 ± 28	53 ± 39	114 ± 195	65 ± 49
		Median	49	43	78	48	47	45	50	54
GOT ¹	U/l	Mittel	96 ± 142	79 ± 67	132 ± 113	86 ± 70	79 ± 73	62 ± 57	257 ± 547	93 ± 62
		Median	61	51	108	57	60	45	62	78
De Ritis ¹	GOT/GPT	Mittel	1,6 ± 1,2	1,6 ± 1,4	1,5 ± 1,0	1,6 ± 0,7	1,7 ± 1,5	1,3 ± 0,8	1,9 ± 1,6	1,9 ± 1,3
		Median	1,2	1,2	1,1	1,5	1,3	1,2	1,5	1,5
Bilirubin ¹	mg/dl	Mittel	1,6 ± 4,0	2,5 ± 6,3	1,4 ± 1,0	1,2 ± 1,1	2,0 ± 6,2	0,8 ± 0,6	1,8 ± 1,7	1,2 ± 0,7
		Median	0,9	1,1	1,2	0,8	0,8	0,8	1,2	1,1
Albumin ¹	g/dl	Mittel	3,8 ± 0,6	3,7 ± 0,6	3,7 ± 0,6	3,7 ± 0,8	3,8 ± 0,6	3,9 ± 0,4	3,6 ± 0,6	3,7 ± 0,5
		Median	3,8	3,7	3,6	4,0	3,9	3,9	3,8	3,7
Kreatinin ¹	mg/dl	Mittel	1,3 ± 1,0	1,2 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,4 ± 1,0	1,4 ± 1,3	1,4 ± 1,2	1,1 ± 0,2	1,4 ± 1,5
		Median	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,2	1,1	1,0
INR ¹		Mittel	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1
		Median	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,2	1,1
MELD ¹		Mittel	10,4 ± 4,9	11 ± 5,8	10 ± 3,5	9,7 ± 4,8	10 ± 5,8	10 ± 4,6	11 ± 3,6	10 ± 5,1
		Median	9,0	10	9,0	8,0	9,0	9,0	11	8,5
Child ^{3, a}		Mittel	1,2 ± 0,9	1,3 ± 0,9	1,7 ± 0,8	1,3 ± 0,8	1,0 ± 1,0	0,7 ± 1,0	1,8 ± 0,7	1,4 ± 0,8
		Median	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	0,0	2,0	1,0
AFP LiBASys ¹	ng/ml	Mittel	12.364 ± 9.144	25.901 ± 95.847	831 ± 1.358	7.295 ± 26.471	17.512 ± 64.051	923 ± 2.560	47.249 ± 132.214	4.018 ± 13.593
		Median	24	8,6	58	108	8,9	42	390	18
AFP µTas ¹	ng/ml	Mittel	6.397 ± 4.068	8.299 ± 27.848	628 ± 1.109	5.567 ± 21.408	16.071 ± 43.446	1.332 ± 3.895	701 ± 854	4.333 ± 14.713
		Median	24	14	31	39	60	37	337	24
DCP LiBASys ¹	ng/ml	Mittel	484 ± 275	235 ± 718	268 ± 1.010	1.705 ± 3.990	259 ± 505	264 ± 397	84 ± 114	57 ± 96
		Median	16	4,6	4,6	16	38	37	36	2,2
DCP µTas ¹	ng/ml	Mittel	2.744 ± 2.116	3.450 ± 12.859	3.134 ± 16.319	4.671 ± 21.028	1.574 ± 4.987	3.633 ± 14.476	77 ± 151	75 ± 141
		Median	11	2,7	6,2	9,6	29	116	6,2	1,4
L3 LiBASys ¹	ng/ml	Mittel	7.004 ± 5.906	25.901 ± 95.847	495 ± 968	3.029 ± 10.207	13.748 ± 58.956	499 ± 1.593	17.733 ± 49.424	236 ± 283
		Median	0,0	8,6	6,0	0,0	0,0	0,0	132	0,0
L3 µTas ¹	ng/ml	Mittel	2.559 ± 1.617	4.251 ± 14.030	353 ± 723	2.043 ± 7.637	6.059 ± 16.112	760 ± 2.376	391 ± 611	490 ± 1.179
		Median	4,6	1,7	8,4	4,7	18	4,6	176	2,4
CLIP ⁴		Mittel	2,0 ± 1,3	1,6 ± 1,1	2,2 ± 1,3	2,0 ± 1,3	2,3 ± 1,3	1,9 ± 1,6	2,5 ± 1,9	1,9 ± 1,2
		Median	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,5	2,0	2,0
TNM ^{5, b}		Mittel	3,1 ± 1,6	2,8 ± 1,4	3,1 ± 1,9	3,3 ± 1,6	3,5 ± 1,4	3,4 ± 2,0	2,6 ± 1,8	2,4 ± 1,3
		Median	3,0	2,0	2,5	3,0	3,0	3,0	2,0	2,0
BCLC ^{6, c}		Mittel	3,1 ± 1,2	3,0 ± 1,1	3,0 ± 1,3	3,1 ± 1,1	3,6 ± 0,9	3,2 ± 1,6	2,6 ± 1,5	2,6 ± 1,0
		Median	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,5	2,0

¹ n (LiBASys) = 165, n (µTas) = 153

^a Kein = 0, Child A = 1, B = 2, C = 3

² n (LiBASys) = 162, n (µTas) = 152

^b Kein = 0, Stadium 1 = 1, 2 = 2, 3A = 3, 3B = 4, 3C = 5, 4 = 6

³ n (LiBASys) = 162, n (µTas) = 150

^c Kein = 0, Very early (0) = 1, Early (A) = 2, Intermediate (B) = 3, Advanced (C) = 4, End-stage (D) = 5

⁴ n (LiBASys) = 153, n (µTas) = 141

⁵ n (LiBASys) = 154, n (µTas) = 144

⁶ n (LiBASys) = 152, n (µTas) = 144

Tab. 6: Patientencharakteristika der HCC-Gruppe aufgeschlüsselt nach Ätiologien

Eine NASH war in diesem Kollektiv mit 21,6% am häufigsten. Ähnlich häufig lag eine HCV-Infektion (18,3%), HBV-Infektion (17,0%) oder kryptogene Erkrankung (16,3%) vor. Alkohol war in 13,7% der Fälle ein Faktor. Für weitere 9,2% trafen zwei Ätiologien zu. Jeweils ein anderer Faktor lag bei sechs Patienten (3,9%) vor. Insgesamt befanden sich acht (4,9%) unter den 165 Patienten der HCC-Gruppe (LiBASys) mit jeweils einer anderen Ätiologie: AIH (n=2), PBC (n=1), Hämochromatose (n=2), Budd-Chiari-Syndrom (n=2) sowie Alpha-1-Antitrypsinmangel (n=1). Die Verteilung der verschiedenen Ätiologien der HCC-Gruppe verdeutlicht Abb.9. Die kumulative Verteilung der Faktoren für Patienten mit HCC zeigt Abb. 10.

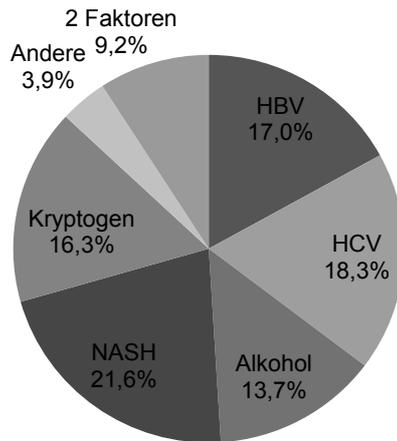


Abb. 9: Ätiologie, Faktorenverteilung in der HCC-Gruppe

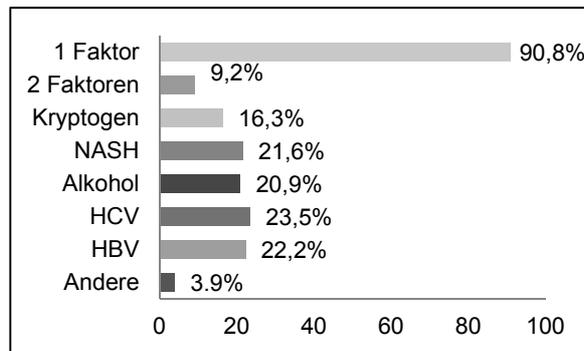


Abb. 10: Ätiologie, kumulative Faktorenverteilung der HCC-Patienten

3.1.2. Kontrollgruppe

Zur Kontrollgruppe gehörten 195 (45,2%) Männer und 236 (54,8%) Frauen. Das durchschnittliche Alter in dieser Gruppe zum Zeitpunkt der Diagnose betrug $49,2 \pm 14,9$ Jahre. Mit 83 Patienten (19,3%) litt nur etwa jeder fünfte Patient an einer Zirrhose. Tab. 7 verdeutlicht Patientencharakteristika für die Kontrolle, aufgeteilt nach Ätiologien.

Kontrolle			Gesamt	HBV	HCV	Alkohol	Andere	Multifaktoriell
n/% ⁷			431/100	83/19,3	96/22,3	10/2,3	153/35,5	58/13,5
♂ ⁷	n/%		195/45,2	41/49,4	42/43,8	3/30,0	64/41,8	28/48,3
Zirrhose ⁸	n/%		83/19,3	7/8,4	18/18,9	10/100	23/15,1	18/31,0
Alter bei Diagnose ⁷	Jahre	Mittel	49,2 ± 14,9	40,7 ± 13,0	50,7 ± 12,9	55,1 ± 10,6	52,0 ± 16,1	48,6 ± 13,0
		Median	48,7	39,2	50,5	50,9	54,4	47,9
GGT ⁹	U/l	Mittel	118 ± 202	54 ± 129	98 ± 113	172 ± 150	162 ± 273	123 ± 147
		Median	46	22	56	127	64	71
GPT ⁷	U/l	Mittel	67 ± 104	50 ± 55	84 ± 76	28 ± 16	56 ± 77	115 ± 217
		Median	40	35	59	25	37	52
GOT ⁷	U/l	Mittel	58 ± 92	39 ± 36	78 ± 96	39 ± 20	49 ± 71	94 ± 170
		Median	35	27	47	35	33	44
De Ritis ⁷	GOT/GPT	Mittel	1,0 ± 0,6	0,9 ± 0,6	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,4
		Median	0,9	0,8	0,9	1,5	1,0	0,9
Bilirubin ⁷	mg/dl	Mittel	1,1 ± 0,6	0,7 ± 0,4	1,0 ± 1,4	1,8 ± 0,9	1,5 ± 3,9	1,1 ± 1,6
		Median	2,5	0,6	0,6	1,6	0,6	0,7
Albumin ⁷	g/dl	Mittel	4,2 ± 0,5	4,2 ± 0,4	4,2 ± 0,5	4,0 ± 0,7	4,1 ± 0,6	4,2 ± 0,5
		Median	4,2	4,2	4,2	4,3	4,1	4,2
Kreatinin ⁷	mg/dl	Mittel	1,1 ± 0,6	1,1 ± 1,0	1,1 ± 0,7	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
		Median	1,0	1,0	1,0	1,6	1,0	1,0
INR ⁷		Mittel	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,3
		Median	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
MELD ⁷		Mittel	8,2 ± 3,9	7,5 ± 3,0	8,4 ± 4,2	14 ± 5,8	8,3 ± 3,5	8,3 ± 4,4
		Median	7,0	7,0	7,0	14	7,0	7,0
Child ^{9,a}		Mittel	0,3 ± 0,6	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,8	1,6 ± 0,7	0,2 ± 0,6	0,4 ± 0,6
		Median	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0
AFP LiBASys ⁷	ng/ml	Mittel	5,5 ± 4,4	3,6 ± 1,7	14 ± 9,3	2,4 ± 2,1	1,2 ± 2,9	9,0 ± 2,8
		Median	1,0	0,0	1,5	2,0	0,9	1,3
AFP µTas ⁷	ng/ml	Mittel	114 ± 211	6,0 ± 1,8	487 ± 4.570	6,9 ± 4,7	3,2 ± 4,3	11 ± 2,2
		Median	2,7	2,3	4,5	5,6	2,4	4,0
DCP LiBASys ⁷	ng/ml	Mittel	9,1 ± 6,3	1,4 ± 1,1	2,2 ± 1,4	1,7 ± 2,6	14 ± 7,4	23 ± 13,1
		Median	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0
DCP µTas ⁷	ng/ml	Mittel	73 ± 97	1,5 ± 1,0	1,9 ± 1,1	1,7 ± 2,3	95 ± 1,041	302 ± 2,177
		Median	0,3	0,3	0,3	0,6	0,4	0,3
L3 LiBASys ⁷	ng/ml	Mittel	0,9 ± 1,5	0,3 ± 1,9	3,3 ± 3,2	6,9 ± 4,7	0,0 ± 0,0	0,5 ± 2,7
		Median	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	0,0
L3 µTas ⁷	ng/ml	Mittel	53 ± 103	0,6 ± 3,5	232 ± 2.217	0,7 ± 1,2	0,2 ± 1,5	1,5 ± 5,0
		Median	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0

⁷ n (LiBASys) = 431, n (µTas) = 417 ^a Kein = 0, Child A = 1, B = 2, C = 3

⁸ n (LiBASys) = 429, n (µTas) = 415

⁹ n (LiBASys) = 428, n (µTas) = 414

Tab. 7: Patientencharakteristika der Kontrollgruppe aufgeschlüsselt nach Ätiologien

Abb. 11 zeigt die Verteilung der verschiedenen Ätiologien der HCC-Gruppe:

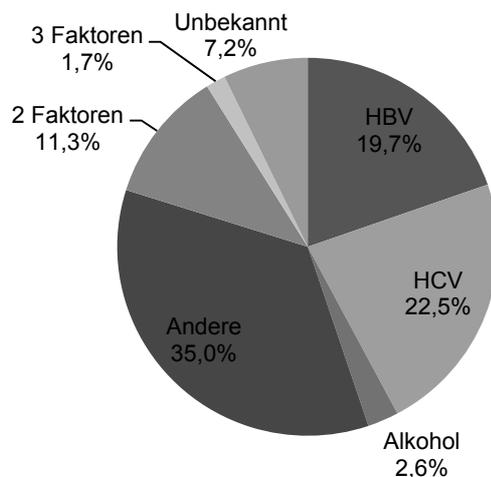


Abb. 11: Ätiologie, Faktorenverteilung im der Kontrollgruppe

Von den Patienten in der Kontrollgruppe litten 22,5% an einer HCV-Infektion, gefolgt von 19,7% mit einer HBV-Infektion. Alkohol als einzelner Faktor spielte in 2,6% eine Rolle. Andere Ätiologien, einschließlich NASH und kryptogene Erkrankungen (zum Zeitpunkt dieser Auswertung nicht gesondert dokumentiert) lagen in 35,0% der Fälle vor. Für 7,2% der Patienten war keine Ätiologie bekannt. Eine Kombination von zwei Faktoren lag in 11,3%, von drei Faktoren in 1,7% der Fälle vor. Für 82 Patienten (19,0%*) waren folgende anderen Ätiologien bekannt: AIH (n=16), hepatische Metastasen (n=14), PBC (n=11), Leberzysten (n=9), unklare Hepatopathie (n=7), FNH (n=7), intrahepatische Cholestase (n=6), toxische Hepatopathie (n=4), portale Hypertonie (n=2), Leberzelladenom (n=2), Hämochromatose (n=2), Hämangiom (n=2), Echinococcus granulosus (n=2), Leberhämatom (n=1). Daraus ergeben sich 16,0% Patienten mit mutmaßlicher NASH oder kryptogener Erkrankung. Eine kumulative Verteilung der Faktoren für Patienten der Kontrolle zeigt Abb. 12.

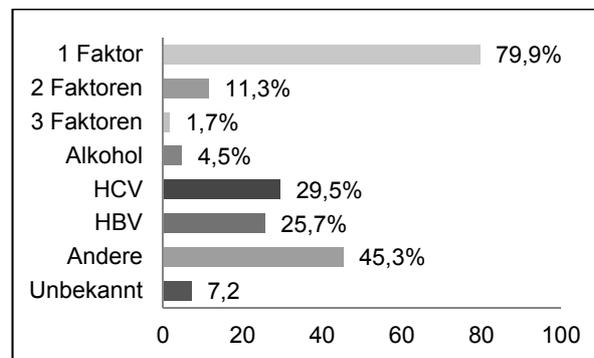


Abb. 12: Ätiologie, kumulative Faktorenverteilung der Kontrollgruppe

3.1.3. Vergleich HCC vs. Kontrolle

In der Kontrollgruppe befanden sich mit 431 Patienten wesentlich mehr Individuen als in der HCC-Gruppe mit 165 Patienten (Verhältnis 2,6:1).

Hinsichtlich der Faktoren, die zur Bildung der Subgruppen herangezogen wurden (Ältere Patienten, Geschlecht, Ätiologie, Leberstatus, Laborparameter erhöht ja/nein bzw. erniedrigt ja/nein im Fall von Albumin), waren beide Kohorten in den meisten Fällen hoch signifikant unterschiedlich (vgl. Tab. 8). Im Fall von HCV zeigte sich ein Trend zu mehr Infektionen in der Kontrollgruppe. HBV-Infektionen oder Kreatinin-Erhöhung waren nicht signifikant unterschiedlich.

Der Vergleich der für diese Arbeit verwendeten numerischen Parameter (Alter, Leberstatus, Laborwerte) lieferte ein ähnliches Bild. Zwischen beiden Gruppen bestanden in der überwiegenden Anzahl der Werte signifikante bis hoch signifikante Unterschiede (siehe Tab. 9).

* LiBASys, n=431

Es zeigte sich darüber hinaus ein Trend zu höheren Bilirubin-Werten in der HCC-Gruppe. Lediglich GPT war in den Kohorten nicht unterschiedlich. Insgesamt entsprechen die gefundenen Unterschiede den Erwartungen an Patienten mit HCC bzw. ohne.

Charakteristika		Fisher's exact Test		
		HCC (n/%)	Kontrolle (n/%)	p-Wert
Alter ¹	> 65 Jahre	85/54,5	81/18,8	<0,0001
Geschlecht ¹	♂	136/82,4	195/45,2	<0,0001
Ätiologie ²				
HBV	nur HBV	30/18,2	83/19,3	n.s.
HCV	nur HCV	29/17,6	96/22,3	0,066
Alkohol	nur Alkohol	23/13,9	10/2,3	<0,0001
Multiple	vorhanden	14/8,5	58/13,5	0,003
Andere	vorhanden	8/4,8	153/35,5	<0,0001
Leberstatus				
Zirrhose ³	vorhanden	125/76,2	83/19,3	<0,0001
MELD ¹	> 10	59/35,8	58/13,4	<0,0001
Child ^{4, a}	B/C	60/36,4	25/5,8	<0,0001
Laborparameter				
Bilirubin ¹	≥ 1,1 mg/dl	71/43,0	92/21,3	<0,0001
Albumin ¹	< 3,5 g/dl	38/23,0	26/6,0	<0,0001
GGT ⁴	♂ ≥ 65 ♀ ≥ 39 U/l	141/85,5	204/47,3	<0,0001
GPT ¹	♂ > 55 ♀ > 35 U/l	77/46,7	196/45,5	<0,0001
GOT ¹	♂ > 55 ♀ > 35 U/l	103/62,4	155/36,0	<0,0001
DeRitis ¹	> 1	112/67,9	149/34,6	<0,0001
Kreatinin ¹	♂ ≥ 1,5 ♀ ≥ 1,2 mg/dl	19/11,5	34/7,9	n.s.
INR ¹	>1	105/63,6	127/29,5	<0,0001

¹ n (LiBASys) = 165 vs. 431

^a Kein = 0, Child A = 1, B = 2, C = 3

² n (µTas) = 153 vs. 417

³ n (LiBASys) = 162 vs. 429

⁴ n (LiBASys) = 162 vs. 428

Tab. 8: Vergleich der HCC- mit der Kontrollgruppe (Fisher's exact Test)

Charakteristika		Student's t-Test		
		HCC	Kontrolle	p-Wert
Alter ¹	Jahre	63,8 ± 9,8	49,2 ± 14,9	<0,0001
Leberstatus				
MELD ¹		10,4 ± 4,9	8,2 ± 3,9	<0,0001
Child ^{4, a}		1,2 ± 0,9	0,3 ± 0,6	<0,0001
Laborparameter				
Bilirubin ¹	mg/dl	1,6 ± 4,0	1,1 ± 0,6	0,061
Albumin ¹	g/dl	3,8 ± 0,6	4,2 ± 0,5	<0,0001
GGT ⁴	U/l	290 ± 327	118 ± 202	<0,0001
GPT ¹	U/l	66 ± 63	67 ± 104	n.s.
GOT ¹	U/l	96 ± 142	58 ± 92	0,002
DeRitis ¹		1,6 ± 1,2	1,0 ± 0,6	<0,0001
Kreatinin ¹	mg/dl	1,3 ± 1,0	1,1 ± 0,6	0,004
INR ¹		1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,5	0,024

¹ n (LiBASys) = 165 vs. 431

^a Kein = 0, Child A = 1, B = 2, C = 3

² n (µTas) = 153 vs. 417

³ n (LiBASys) = 162 vs. 429

⁴ n (LiBASys) = 162 vs. 428

Tab. 9: Numerischer Vergleich der HCC- mit der Kontrollgruppe (Student's t-Test)

3.2. Messwerte der drei Tumormarker

Um die Daten zu beschreiben, wurden die Messwerte von LiBASys und μ TAS mit den jeweiligen Markern, ausgehend vom Gesamtkollektiv, untersucht. Daneben wurden auch jeweils Patienten mit HCC, Kontrollgruppe und das Gesamtkollektiv miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die Gesamtkollektive (unterschiedliche Patientenzahlen) sowie gleiche Patienten („matched-Pair“) für LiBASys und μ TAS untersucht. Zuletzt wurden sämtliche Konfidenzintervalle berechnet, um die erhaltenen p-Werte auf Plausibilität zu prüfen. Diese basieren auf einem zweiseitigen Test und (sofern nicht anders angegeben) auf einem Konfidenzintervall von 95%. Der ebenfalls durchgeführte *F*-Test wie auch die grafische Verteilung der Werte ergab stets eine unterschiedliche Varianz, weshalb der dazugehörige *t*-Test zum Einsatz kam.

Die untere analytische Sensitivitätsgrenze für Messverfahren mit dem μ TAS für DCP liegt bei 0,1 ng/ml. In 6 Fällen von HCC und 18 anderen Fällen ergaben die Messungen einen Wert <0,1 ng/ml. Da solche Werte aufgrund der technischen Voraussetzungen nicht weiter exakt bestimmt werden können, wurden für die meisten Berechnungen 0,1 ng/ml als Messwert angenommen. Im Rahmen der Untersuchungen zu den Signifikanzniveaus der Biomarker wurde auch die Variante gebildet, in der solche Proben als klinisch negativ gewertet werden würden. In den 58,0% der Fälle lieferte die ältere Messung mit dem LiBASys einen Wert von <0,1 ng/ml für DCP. Abweichend davon lieferten sechs Proben mit dem älteren Verfahren bei 1,3 bis 7,0 ng/ml relativ niedrige, vier Proben mit bis zu 14.280 ng/ml zum Teil sehr hohe Werte.

Das Gesamt-AFP in beiden Testverfahren wird aus der Summe der Isoformen AFP-L1 und AFP-L3 gebildet. Die untere Nachweisgrenze für beide Konzentrationen liegt bei 0,3 ng/ml. In der Studie gab es unter den 153 für beide Systeme auswertbaren Patienten keinen Fall, in denen die Konzentration für beide Isoformen unterhalb der Nachweisgrenze lag. Allerdings gab es insgesamt 22 Fälle (14,4%), in denen AFP-L3 für sich genommen kleiner als 0,3 ng/ml und der prozentuale Anteil nicht zu berechnen war. Das Messgerät lieferte hier die Meldung „NC“ (not calculated). Die genaue Höhe von AFP-L3 ist dann unbekannt. Zudem ist für die statistische Auswertung ein numerischer Wert erforderlich.

Für die Berechnungen des AFP-L3 Anteils wurde zu Beginn der Studie ein Cut-off von 10% für ein positives Ergebnis festgelegt. Daraus folgt, dass sämtliche Werte für ein Gesamt-AFP <3 ng/ml mit einem gleichzeitigen AFP-L3 von höchstens 0,2999 ng/ml positiv sein könnten. Dies gilt für 10 Patienten (6,5%). In allen Fällen von Gesamt AFP >3 ng/ml, in denen AFP-L3 kleiner als 0,3 ng/ml ist und damit die Meldung „NC“ liefert, wurde AFP-L3 als 0,3 ng/ml gesetzt. Der prozentuale Anteil ist damit stets kleiner als 10% und klinisch negativ. Für die Vergleichsgruppe wurden diese Varianten ebenfalls gebildet. Angesichts von 73,1% wurde der weit überwiegende Teil der Patienten mit „NC“ angegeben. Von diesen haben 71,8% einen AFP-Wert von <3 ng/ml. Weitere neun Patienten aus der Kontrolle haben einen AFP-Wert von 3ng/ml und AFP-L3 „NC“. Fünf

Patienten (1,2%) in der Kontrollgruppe hatten einen AFP-Wert unterhalb von 3 ng/ml bei einem errechneten AFP-L3-Anteil oberhalb von 10%. In der HCC-Gruppe war dies bei einem Patienten der Fall. Für das μ TAS-Gerät konnte AFP-L3% immer angegeben werden, wenn die Summe der Konzentration der Subfraktionen $\geq 0,3$ ng/ml lag.

Für Berechnungen der p-Werte wurde der Definition des Cut-offs für AFP-L3 im μ TAS nachgegangen. Von besonderem Interesse war die Frage, ob es möglich ist, Werte von $\leq 0,2999$ ng/ml, also solche, die bei einem vorliegenden AFP-Wert von ≥ 3 ng/ml im Ergebnis als „NC“ angegeben werden, grundsätzlich als negativ zu behandeln. Hierfür wurden zwei Varianten gebildet. In der einen gilt das Ergebnis „NC“ als 0,2999 ng/ml, in der anderen als 0 ng/ml. Die erhaltenen p-Werte ($p=1,0$) in den nicht korrelierten Analysen zeigen, dass sich beide Varianten praktisch nicht voneinander unterscheiden. Daher wurden für sämtliche weiteren Berechnungen AFP-L3 mit „NC“ als 0,0 ng/ml gesetzt. Analog dazu wurde die Frage überprüft, ob DCP-Werte $< 0,1$ ng/ml automatisch als klinisch negativ gelten sollen. Die nicht korrelierte Analyse verdeutlichte, dass sich auch diese Varianten nicht voneinander unterscheiden ($p=1,0$). Da für einen größeren Teil dieser Proben in der HCC Gruppe ein positiver Vergleichswert mit LiBASys vorlag, wurden für die weiteren Berechnungen dennoch Ergebnisse mit DCP $< 0,1$ als gleich 0,1 definiert, um die klinische Realität besser abzubilden.

Sowohl das μ TAS als auch das LiBASys liefern Fehlermeldungen bei sehr hohen Werten. Die Obergrenze dafür liegt bei 2.000 ng/ml für AFP und bei 950 ng/ml für DCP. In solchen Fällen werden die Messungen erneut und mit einem Verdünnungsfaktor vorgenommen, den die Auswertung mit einrechnet. Die angegebenen Ergebnisse für die erneuten Messungen entsprechen dann den tatsächlichen Werten. In der HCC-Gruppe hatten mit dem μ TAS 18,3% einen derartig hohen AFP-Wert. In sieben weiteren Fällen (4,6%) lieferte die erneute Messung ein Ergebnis von < 2.000 ng/ml. Sieben der HCC-Fälle wurden analog dazu hinsichtlich DCP neu gemessen. Sämtliche Ergebnisse lagen hier über der Obergrenze. Lediglich ein AFP-Wert und zwei Werte für DCP mussten in der Kontrollgruppe neu gemessen werden und lagen im Ergebnis über der jeweiligen Obergrenze.

Im μ TAS handelte es sich jeweils um die gleichen Patienten, die in Bezug auf AFP auch im LiBASys neu gemessen werden mussten. Die Neumessungen beim DCP waren ebenfalls bei den gleichen Proben in beiden Systemen notwendig. Dazu mussten im LiBASys fünf Proben aus der HCC-Gruppe wegen zu hoher Werte neu gemessen werden, die mit μ TAS regelrecht waren.

3.2.1. Messwerte im Gesamtkollektiv

Wie erwartet unterschieden sich HCC-Patienten von solchen ohne HCC signifikant in allen drei Markern und in beiden Systemen. Für das LiBASys war der Unterschied bei AFP und DCP jeweils

auch noch bei einem Konfidenzniveau von 99% signifikant, Gleiches gilt für μ TAS bei AFP und AFP-L3.

Darüber hinaus gab keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Systemen in den einzelnen Kohorten. Lediglich bei DCP schien der p-Wert zunächst auf einen Unterschied zwischen LiBASys und μ TAS hinzudeuten ($p=0,024$). Der Unterschied entfiel jeweils für Patienten mit HCC und die Kontrollgruppe einzeln ab einem Konfidenzniveau von 99%. Er bestand dann nur noch für das Gesamtkollektiv und auch nur für diejenigen Patienten, für die Werte beider Messungen auch vorliegen ($p=0,013$). Die in diesem Kapitel besprochenen Messwerte für die Tumormarker (Mittelwerte, Abweichungen) sind zusammen mit den Medianen zuvor aufgeführt in Tab. 6 und 7 in Kapitel 3.1.

Die Ergebnisse der t -Tests für die Gesamtgruppe und die Kapitel 3.2.2-3.2.4 sind in Tab. 10 zusammengefasst (im Anschluss). Speziell zu Ätiologien befindet sich eine analoge Betrachtung in Kapitel 3.2.5 (Tab. 11 und 12). Den Angaben in Kapitel 3.2 sowie den Unterkapiteln liegen die Mittelwerte der jeweiligen Messreihen zugrunde.

Gruppe	System	Faktor (ng/ml)	HCC		Kontrolle		p-Wert
			ja	nein	ja	nein	
Gesamt	LiBASys	AFP	12.364		5,5		0,008
		DCP	485		9,1		<0,001
		AFP-L3	7.004		0,85		0,019
	μ Tas	AFP	6.397		114		<0,001
		DCP	2.744		73		0,013
		AFP-L3	2.559		53		0,002
Zirrhose	LiBASys	AFP	11.982		6,2		0,024
		DCP	383	20	559	6,6	0,015
		AFP-L3	5.658		0,33		0,043
	μ Tas	AFP	6.473		10		0,008
		DCP	2.339		210		0,065
		AFP-L3	2.318		1,5		0,008
TNM oder BCLC ≤ 2	LiBASys	DCP	373		9,2		0,046
	μ Tas	AFP	2.963		115		0,035
	AFP-L3	1.536		53		0,067	
BCLC ≤ 2	LiBASys	DCP	90	434	9,2		0,010
	μ Tas	AFP	808		7.591		0,024
		DCP	388	3.162			0,077
		AFP-L3	432	2.650			0,041
MELD >10	LiBASys	AFP	15.471		22		0,043
				10.635		2,9	0,071
		DCP	238		17		0,003
		AFP-L3		542		7,9	0,008
	μ Tas	AFP	6.973		5,5		0,028
			9.484		23		0,017
		AFP		4.665		128	0,058
		DCP	3.411		13		0,057
				2.369		83	0,092
		AFP-L3	5.194		5,3		0,008
		1.080			60	0,016	

Tab. 10: Ergebnisse der t -Tests für die Gesamtgruppe, verschiedene TNM- und BCLC-Stadien und MELD

Die Mittelwerte für AFP im Hinblick auf die Gesamtgruppe waren in beiden Testsystemen bei Patienten mit einem HCC signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,008$ mit LiBASys,

$p < 0,001$ mit μ TAS; vgl. Abbildungen 13 und 14). Der Mittelwert der HCC-Patienten im μ TAS lag mit 6.397 ng/ml unter dem im LiBASys (12.634 ng/ml). Die AFP-Werte der Kontrollgruppe waren im Mittel deutlich höher im μ TAS im Vergleich zum LiBASys (114 und 5,5 ng/ml).

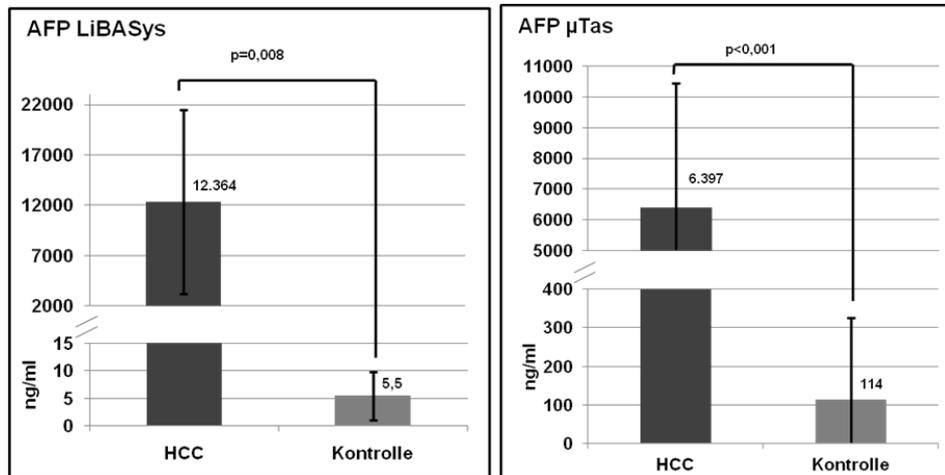


Abb. 13 (links) und 14 (rechts): Messwerte für AFP LiBASys und μ TAS

Auch die DCP-Werte waren für HCC-Patienten im Vergleich zur Kontrolle in beiden Systemen hochsignifikant bzw. signifikant erhöht ($p < 0,001$ mit LiBASys, $p = 0,013$; siehe Abbildungen 15 und 16). Der Mittelwert für HCC-Patienten war höher im μ TAS als mit LiBASys (2.744 vs. 484 ng/ml), ebenso in der Kontrollgruppe (73 vs. 9,1 ng/ml).

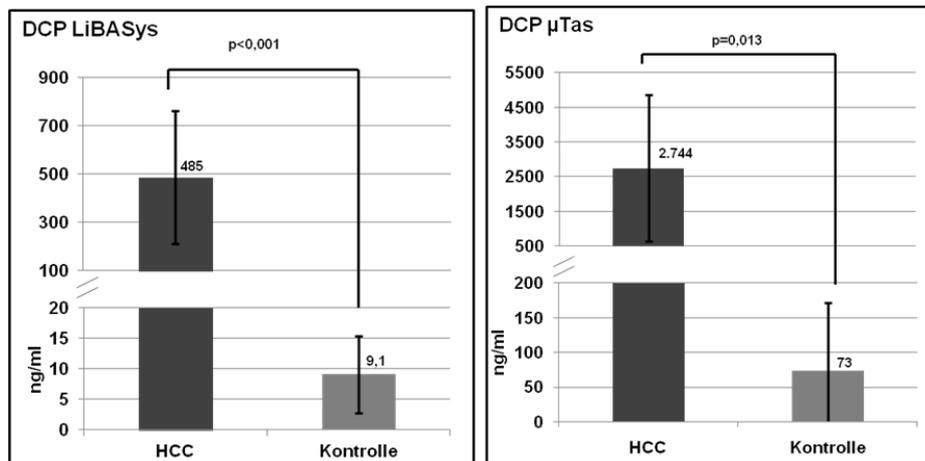


Abb. 15 (links) und 16 (rechts): Messwerte für DCP LiBASys und μ TAS

Die Konzentration an AFP-L3 war ebenfalls signifikant höher bei HCC-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Dies galt ebenso für beide Systeme ($p = 0,019$ mit LiBASys, $p = 0,002$ mit μ TAS; vgl. Abbildungen 17 und 18). Das LiBASys lieferte für HCC-Patienten einen höheren Mittelwert als

das μ TAS-Gerät (7.004 vs. 2.559 ng/ml). Für die Patienten aus der Kontrolle war der mit μ TAS gemessene Wert im Mittel höher (53 vs. 0,85 ng/ml).

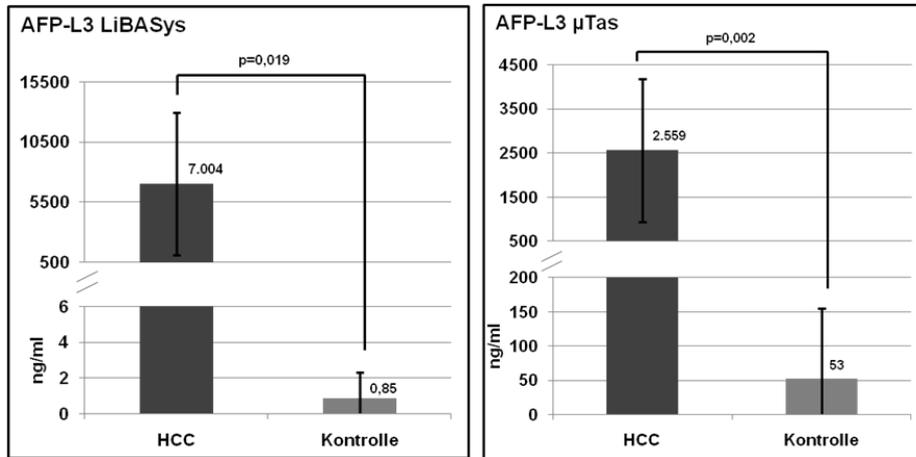


Abb. 17 (links) und 18 (rechts): Messwerte für AFP-L3 LiBASys und μ TAS

3.2.2. Tumormarker in Patienten mit oder ohne Zirrhose

Beim Vergleich der AFP-Mittelwerte von Patienten mit oder ohne Zirrhose ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen HCC und Kontrolle und zwar jeweils für Patienten mit Zirrhose. Dieses Ergebnis zeigte sich für beide Systeme ($p=0,024$ für LiBASys, $p=0,008$ für μ TAS). Darüber hinaus bestanden keine weiteren signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 19 und 20).

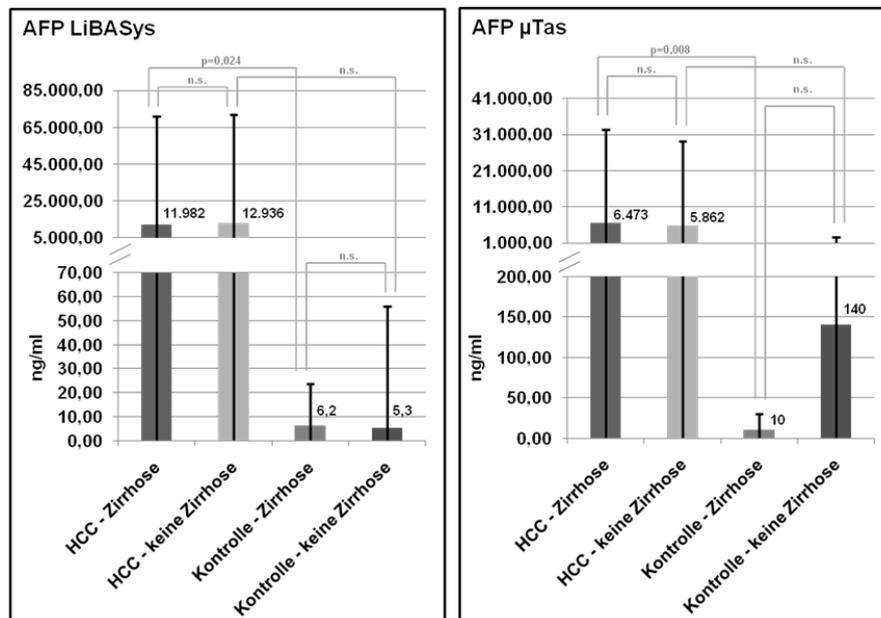


Abb. 19 (links) und 20 (rechts): AFP bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose mit LiBASys und μ TAS

Die Werte für HCC-Patienten waren im LiBASys im Mittel etwa zwei Mal so hoch wie mit μ TAS. Für Patienten der Kontrollgruppe ohne Zirrhose war AFP wesentlich höher mit μ TAS im Vergleich zu LiBASys (140 vs. 5,3 ng/ml).

Hinsichtlich DCP zeigten sich mit LiBASys signifikante Unterschiede zwischen HCC- und Patienten der Kontrollgruppe, sowohl für Patienten mit ($p=0,015$) als auch ohne ($p=0,043$) Zirrhose (siehe Abbildungen 21 und 22). Der DCP-Wert in der Kontrollgruppe mit Zirrhose lag hierbei mit 559 ng/ml für LiBASys mehr als doppelt so hoch wie im μ TAS (210 ng/ml) und noch oberhalb von Patienten mit HCC und Zirrhose (383 ng/ml, LiBASys). Dieser Umstand war, wie auch die zuvor beschriebene Beobachtung hinsichtlich AFP, auf Ausreißer zurückzuführen.

Die Messungen mit dem μ TAS-Gerät lieferten einen Trend zu höheren Werten für Patienten mit Zirrhose bei HCC-Patienten ($p=0,065$). Während der Mittelwert für Patienten mit HCC und ohne Zirrhose im LiBASys bei 20 ng/ml lag, war dieser im μ TAS mit 3.767 ng/ml wesentlich höher.

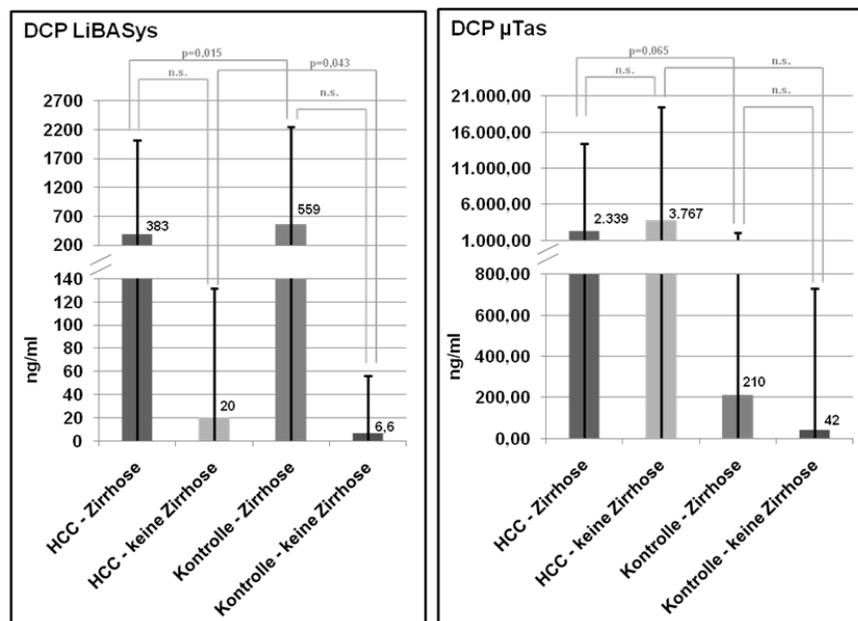


Abb. 21 (links) und 22 (rechts): DCP bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose mit LiBASys und μ TAS

Die Werte für AFP-L3 (siehe Abbildungen 23 und 24) waren im LiBASys für HCC-Patienten ohne Zirrhose nahezu doppelt so hoch wie für solche mit Zirrhose (10.796 vs. 5.658 ng/ml) jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Mit μ TAS lagen die Ergebnisse für diese beiden Patientengruppen näher beieinander und insgesamt etwas niedriger als im LiBASys (3.124 vs. 2.318 ng/ml).

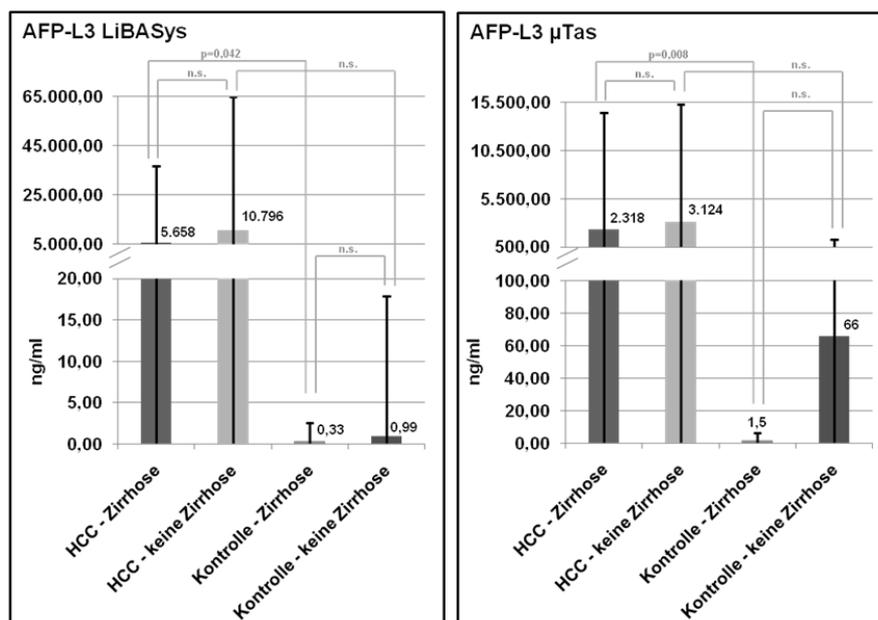


Abb. 23 (links) und 24 (rechts): AFP-L3 bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose mit LiBASys und μ TAS

Signifikante Unterschiede zeigten sich in beiden Testsystemen innerhalb der Zirrhotiker (LiBASys: $p=0,042$; μ TAS: $p=0,008$) mit deutlich höheren Werten für HCC-Patienten. Die Werte der Patienten mit Zirrhose in der Kontrollgruppe lagen mit LiBASys lediglich bei 0,33 ng/ml und für μ TAS bei 1,5 ng/ml. Mit μ TAS als Testgerät wiesen Patienten der Kontrollgruppe, wie schon bei AFP gesamt, einen höheren Wert auf als mit LiBASys. Dieser lag jedoch mit 66 ng/ml weit unterhalb derjenigen der HCC-Patienten.

3.2.3. Tumormarker für Patienten in Früh- und Spätstadien

Sowohl für AFP als auch für AFP-L3 zeigten sich im LiBASys höhere Serumwerte bei Patienten mit TNM- oder BCLC-Stadium >2 , jedoch ohne statistische Signifikanz. Der Mittelwert für DCP war bei diesem Gerät höher bei Patienten in frühen Stadien, jedoch in der gleichen Größenordnung und ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Frühe Stadien unterschieden sich hinsichtlich DCP signifikant von der Kontrollgruppe ($p=0,046$). Die Abbildungen 25-27 zeigen die Tumormarker in frühen Stadien mit LiBASys.

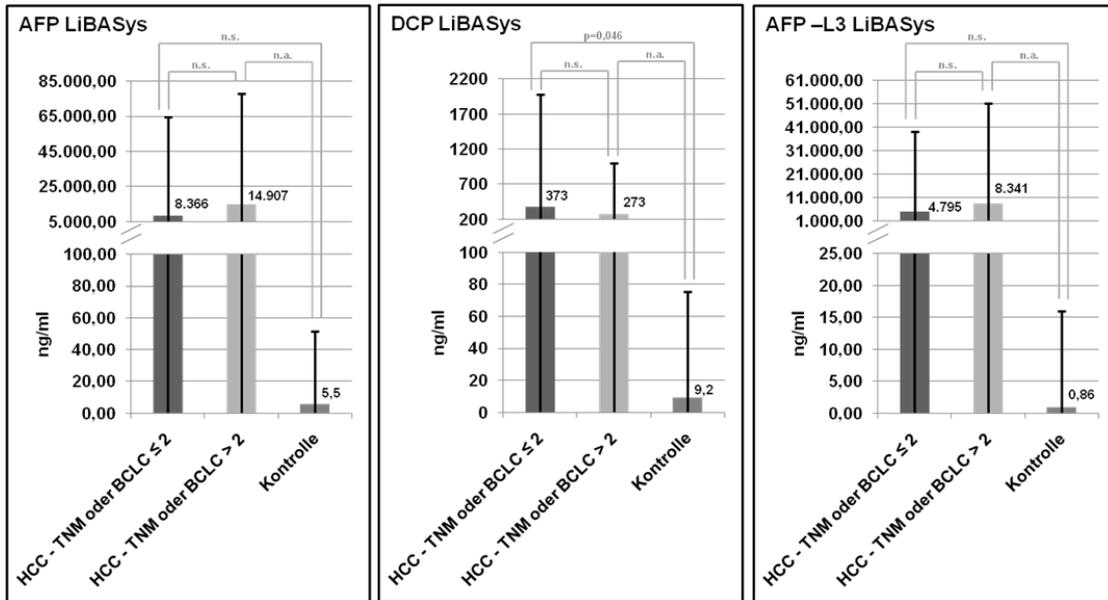


Abb. 25 (links), 26 (Mitte) und 27 (rechts): Tumormarker in frühen oder späteren Stadien mit LiBASys

Bei den Messreihen mit μ TAS (siehe Abbildungen 28-30) zeigte sich ein etwas anderer Eindruck. Die AFP-Werte für Patienten mit HCC waren geringer. Patienten in Frühstadien hatten einen etwa um Faktor 10 höheren AFP-Wert als solche in späteren, allerdings ohne statistische Signifikanz. Dagegen war der Unterschied der Patienten in frühen Stadien zur Kontrollgruppe signifikant ($p=0,035$).

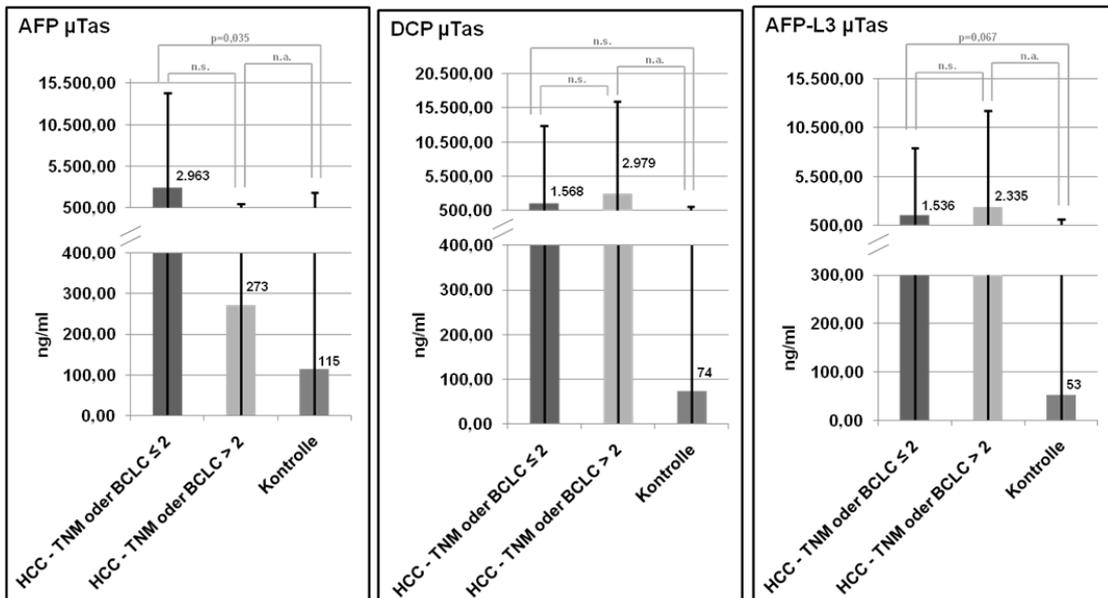


Abb. 28 (links), 29 (Mitte) und 30 (rechts): Tumormarker in frühen oder späten Stadien mit μ TAS

Die DCP-Werte waren für frühe und spätere Stadien höher als im LiBASys und insgesamt höher bei weiter fortgeschrittenen Patienten, jedoch nicht signifikant. AFP-L3 war im Mittel niedriger im Vergleich zu den Werten im LiBASys. Es gab einen Trend zu höheren Werten bei Patienten in Frühstadien vs. Kontrolle.

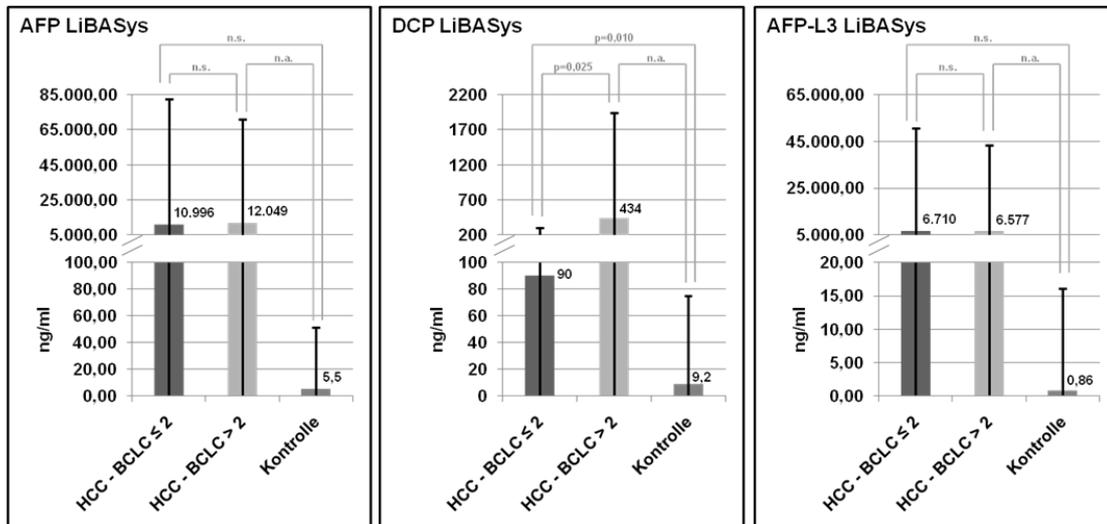


Abb. 31 (links), 32 (Mitte) und 33 (rechts): Tumormarker für Patienten mit BCLC≤2 vs. BCLC>2 (LiBASys)

Insgesamt 77* Patienten befanden sich entweder in den Stadien TNM ≤2 oder BCLC ≤2. Bei der ausschließlichen Betrachtung von Patienten mit BCLC ≤2, also solchen, die sich noch früher in ihrem Krankheitsverlauf befanden, reduzierte sich die Anzahl auf n=45*. Die mit LiBASys erhaltenen Werte (siehe Abbildungen 31-33) für diese kleinere Gruppe waren mit denen der Stadien TNM ≤2 vergleichbar. Für DCP zeigte sich in diesem Gerät darüber hinaus ein signifikant höherer Wert für Patienten mit BCLC >2 (434 vs. 90 ng/ml, p=0,025).

Bei der gleichen Betrachtung mit μTAS (siehe Abbildungen 34-36) ergab sich für DCP ein Trend zu höheren Werten in späteren Stadien (3.162 vs. 388 ng/ml, p=0,077). Die Messreihen mit dem neueren Gerät lieferten auch für AFP einen signifikant höheren Mittelwert für die Patienten mit BCLC >2 (7.591 vs. 808 ng/ml, p=0,024). AFP-L3 war ebenfalls signifikant höher im weiter fortgeschrittenen Stadium (2.650 vs. 432 ng/ml, p=0,041).

* LiBASys, n=165

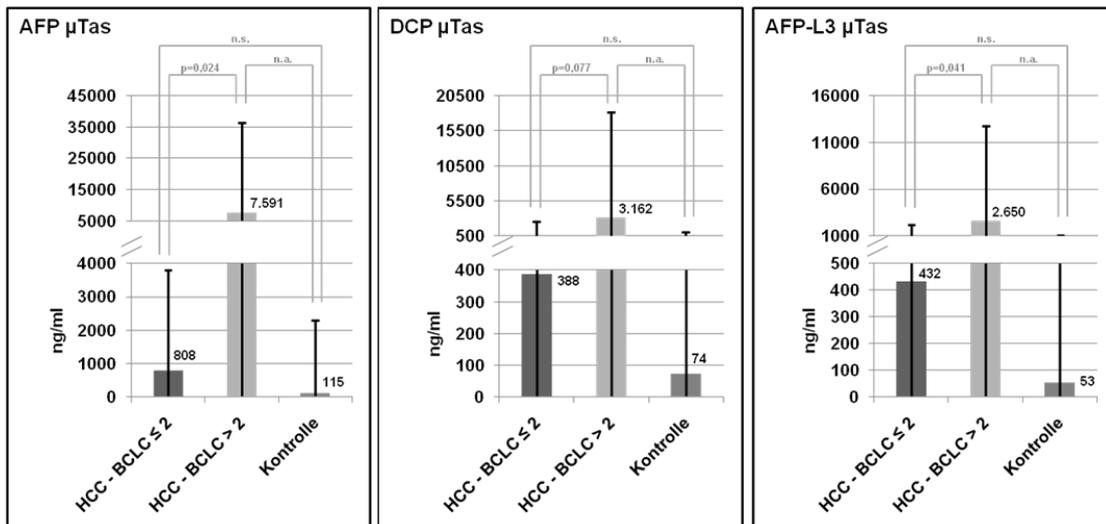


Abb. 34 (links), 35 (Mitte) und 36 (rechts): Tumormarker für Patienten mit BCLC ≤ 2 vs. BCLC > 2 (μTAS)

3.2.4. Tumormarker nach MELD-Score

In den Proben der HCC-Patienten war AFP unabhängig vom MELD-Score höher als in der Kontrollgruppe. Im LiBASys (siehe Abb. 37) lag AFP für Patienten mit HCC und MELD >10 bei 15.471 ng/ml vs. 22 ng/ml in der Kontrollgruppe (p=0,043).

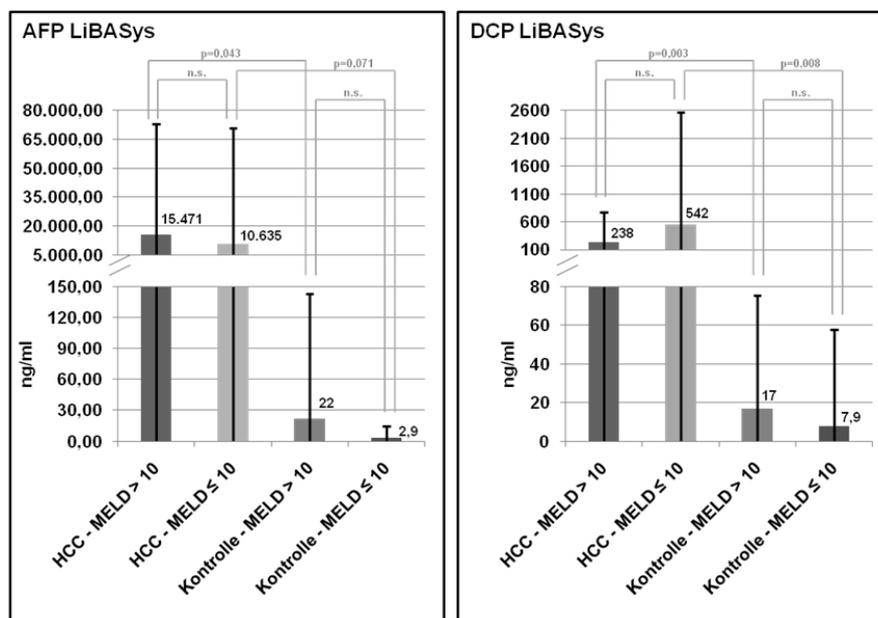


Abb. 37 und 38: AFP (links) und DCP (rechts) für Patienten mit MELD >10 vs. MELD ≤ 10 (LiBASys)

Für Patienten mit MELD ≤ 10 ergab sich ein Trend zugunsten von höheren Werten im Fall eines HCCs (10.635 vs. 3,9 ng/ml, p=0,071). Auch DCP (Abb. 38) war in diesem System höher in

Patienten mit HCC vs. ohne. Sowohl für Patienten mit hohem als auch mit niedrigem MELD-Score war der Zusammenhang signifikant (238 vs. 17 ng/ml, $p=0,003$; 542 vs. 7,9 ng/ml, $p=0,008$). Die Werte für AFP-L3 (Abb. 39) waren ebenso höher für Patienten mit HCC, jedoch nur signifikant für Patienten mit MELD >10 (6.973 vs. 5,5 ng/ml, $p=0,028$).

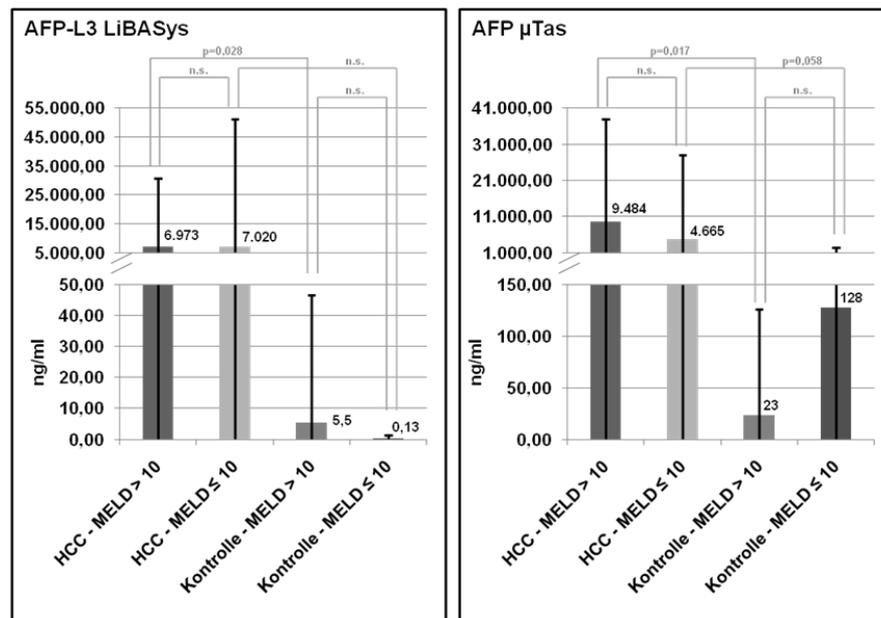


Abb. 39 und 40: AFP-L3 (links, LiBASys) und AFP (rechts, µTAS) für Patienten mit MELD >10 vs. MELD ≤10

Die Betrachtung der gleichen Subgruppen mit µTAS (siehe Abbildungen 40-42) lieferte ein ähnliches Ergebnis. AFP war für HCC-Patienten unabhängig vom MELD-Score insgesamt höher als in der Kontrollgruppe. Für Patienten mit HCC und MELD >10 lag AFP bei 9.484 ng/ml vs. 23 ng/ml in der Kontrollgruppe ($p=0,017$). Für Patienten mit MELD ≤10 zeigte sich ebenfalls ein Trend zugunsten von höheren Werten in der Gruppe mit HCC (4.665 vs. 128 ng/ml, $p=0,058$). Auch DCP war mit µTAS höher bei Patienten mit HCC vs. ohne. Sowohl für Patienten mit hohem als auch mit niedrigem MELD-Score ergab sich ein entsprechender Trend (3.411 vs. 13 ng/ml, $p=0,057$; 2.369 vs. 83 ng/ml, $p=0,092$). Die Werte für AFP-L3 waren höher für Patienten mit HCC im Vergleich zur Kontrolle. Für Patienten mit MELD >10 ergaben sich 5.194 vs. 5,3 ng/ml ($p=0,008$). Analog dazu lag AFP-L3 bei niedrigem MELD-Score bei 1.080 vs. 60 ng/ml ($p=0,016$). Zusätzlich zeigte sich ein Trend innerhalb der HCC-Gruppe zwischen hohem und niedrigem MELD-Score ($p=0,058$).

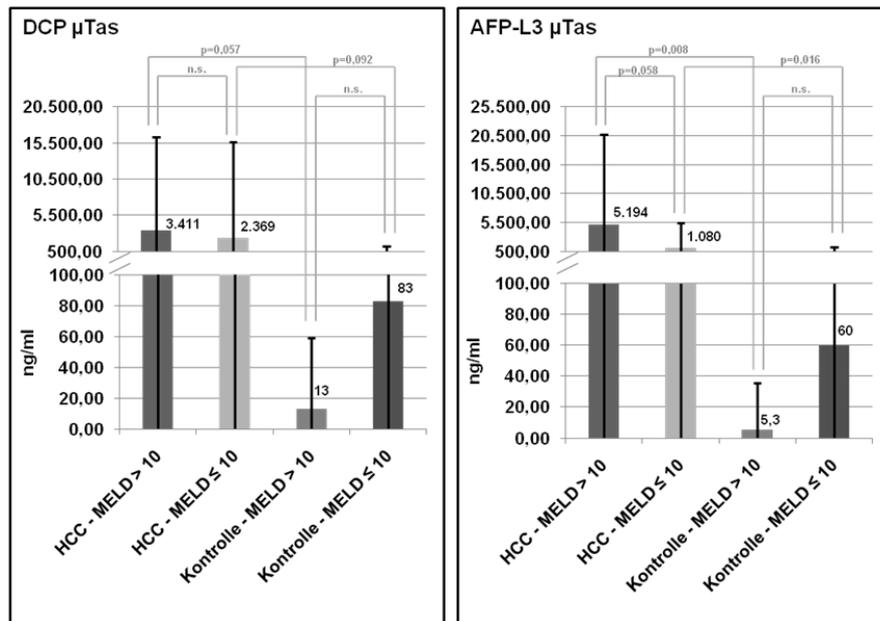


Abb. 41 und 42: DCP (links) und AFP-L3 (rechts) für Patienten mit MELD >10 vs. MELD ≤10

3.2.5. Tumormarker in verschiedenen Ätiologien

Je nach Ätiologie zeigten sich deutliche Unterschiede bei den Mittelwerten für die einzelnen Marker. Untersucht wurden Patienten, die jeweils nur eine bekannte Ursache aufwiesen. Patienten mit mehreren Ätiologien sind als „multiple“ zusammengefasst (siehe Tab. 11 und 12). AFP war mit 16.071 ng/ml am höchsten für HCC-Patienten mit NASH, gefolgt von HBV (8.299 ng/ml) und Alkohol (5.567 ng/ml). Der Mittelwert für AFP betrug 4.333 ng/ml bei HCC-Patienten mit multipler Ätiologie (vgl. Abb. 43). Niedrigere Werte ergaben sich für kryptogene Erkrankungen (1.332 ng/ml) und HCV (628 ng/ml). Patienten mit HCC anderer Herkunft wiesen im Mittel einen AFP-Wert von 701 ng/ml auf.

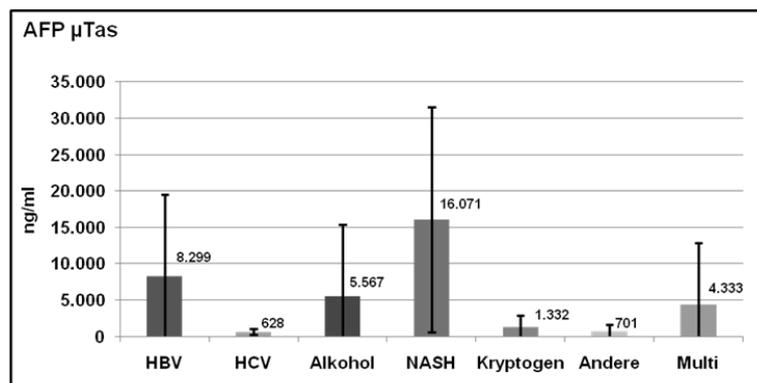


Abb. 43: AFP bei HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Ätiologie

Die Auswertung für DCP zeigte im Unterschied dazu andere Schwerpunkte bei den HCC-Patienten (siehe Abb. 44). Der höchste Mittelwert ergab sich für Alkohol als Faktor (4.671 ng/ml), gefolgt von kryptogener Ursache (3.633 ng/ml), HBV (3.450 ng/ml) sowie HCV (3.134 ng/ml). Die Serumwerte unter NASH-Erkrankungen lagen im Schnitt bei 1.573 ng/ml. Vergleichsweise niedrige Level ergaben sich für Patienten mit anderer oder multipler Ätiologie (77 und 75 ng/ml).

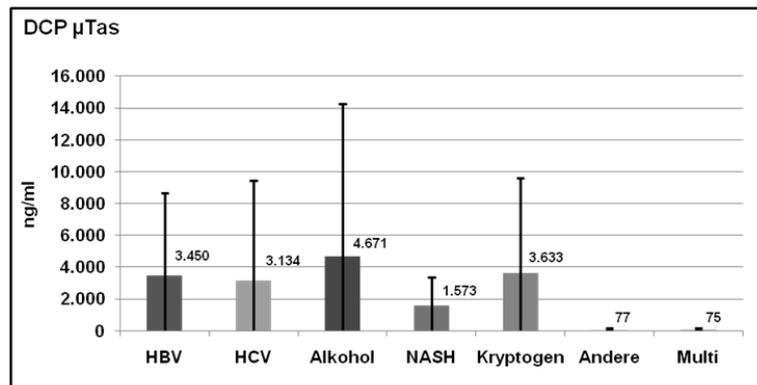


Abb. 44: DCP bei HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Ätiologie

Die Verteilung von AFP-L3 in HCC-Patienten ähnelte derjenigen von AFP (Abb. 45) an. Patienten mit NASH hatten hierbei erneut den höchsten Mittelwert (6.059 ng/ml), auch hier gefolgt von HBV (4.251 ng/ml) und Alkohol (2.043 ng/ml). Für kryptogene Ätiologie ergab sich eine AFP-L3 Konzentration von 760 ng/ml, HCV lieferte im Mittel einen Wert von 353 ng/ml. Andere Ätiologien lagen bei 391 ng/ml. Patienten mit multiplen Ursachen kamen auf 490 ng/ml.

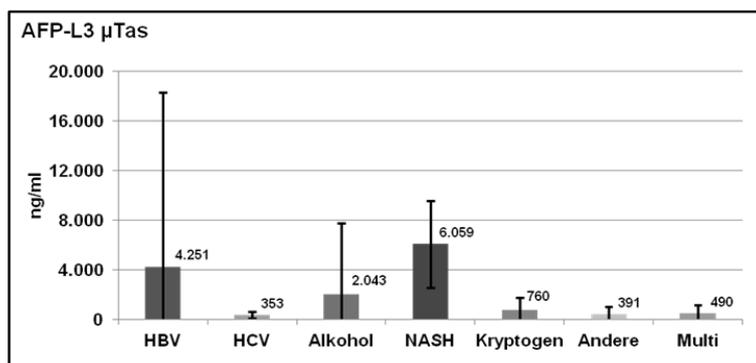


Abb. 45: AFP-L3 bei HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Ätiologie

Für Patienten mit oder ohne HBV-Infektion zeigten sich sowohl mit LiBASys als auch mit μ TAS signifikante Unterschiede. Trends der Tumormarker ergaben sich überwiegend bei Patienten ohne HBV-Ätiologie. Dort zeigte sich besagter Abstand jeweils zwischen HCC- und Kontrollgruppe. Die einzige Ausnahme bildet DCP beim LiBASys. Für Patienten mit HCC und HBV ergab sich ein Trend im Vergleich zur Kontrolle (235 vs. 1,4 ng/ml, $p=0,085$). Patienten mit

HCC ohne HBV hatten in diesem System einen signifikant höheren DCP-Wert (477 vs. 11 ng/ml, $p=0,003$). Auch innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich ein Unterschied zwischen HBV- und nicht-HBV-Patienten mit statistischer Signifikanz (1,4 vs 11 ng/ml, $p=0,020$). Die Mittelwerte für AFP oder AFP-L3 waren für HCC-Patienten mit HBV ausdrücklich nicht signifikant verschieden von der Kontrolle.

Im Fall einer HCV-Erkrankung zeigten sich bei den mit LiBASys gemessenen Werten mehrere signifikante Ergebnisse. AFP unterschied sich mit einem p-Wert von 0,003 zwischen HCC-Patienten und Kontrolle (831 vs. 14 ng/ml), jeweils bei vorliegender HCV-Infektion. Auch für Patienten ohne HCV-Ätiologie zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HCC- und Kontrollgruppe (14.823 vs. 3,2 ng/ml, $p=0,009$). Das Signifikanzniveau hinsichtlich AFP für Patienten mit oder ohne HCV innerhalb der HCC-Gruppe betrug $p=0,013$.

Die Mittelwerte für DCP unterschieden sich im LiBASys für Patienten ohne HCV-Erkrankung mit HCC vs. Kontrolle ohne HCV (468 vs. 11 ng/ml, $p=0,003$). Innerhalb der Kontrollgruppe ergab sich eine signifikante Differenz zwischen Patienten mit oder ohne HCV-Vorgeschichte (2,2 vs. 11 ng/ml, $p=0,039$).

AFP-L3 folgte im LiBASys den Ergebnissen für AFP gesamt. HCC-Patienten und Kontrolle unterschieden sich jeweils bei vorliegender HCV-Infektion (495 vs. 3,3 ng/ml, $p=0,011$). Auch für Patienten ohne HCV-Ätiologie zeigte sich ein signifikanter Abstand zwischen HCC- und Kontrollgruppe (8.391 vs. 0,14 ng/ml, $p=0,021$). AFP-L3 war auch innerhalb der HCC-Gruppe für Patienten mit oder ohne HCV signifikant unterschiedlich ($p=0,030$). Die mit μ TAS erhaltenen Messwerte lieferten ein etwas anderes Bild. AFP unterschied sich mit 628 vs. 7.690 ng/ml zwischen Patienten mit HCC und mit bzw. ohne HCV ($p=0,005$). In Abwesenheit einer HCV-Ätiologie zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HCC- und Kontrollgruppe (7.690 vs. 5,3 ng/ml, $p=0,002$). Die DCP-Werte waren signifikant verschieden für Patienten in der Kontrollgruppe mit oder ohne HCV-Ätiologie (1,9 vs. 94 ng/ml). AFP-L3 unterschied sich ebenfalls nur statistisch signifikant in Patienten der Kontrollgruppe mit oder ohne HCV (232 vs. 0,54 ng/ml, $p=0,009$).

Bei der Untersuchung von Alkohol als Einzelfaktor mit dem LiBASys ergab sich für AFP ein signifikanter Unterschied mit 13.185 ng/ml in der HCC-Gruppe vs. 5,6 ng/ml für die Kontrolle bei Patienten ohne Alkohol-Ätiologie ($p=0,013$). Im LiBASys traten signifikante Ungleichheiten sowohl innerhalb der HCC- und der Kontrollgruppe als auch mit oder ohne Alkohol als Faktor auf. Die Mittelwerte für DCP betrugen 1.705 vs. 227 ng/ml für HCC-Patienten mit oder ohne Alkohol-Ätiologie ($p=0,090$) sowie 1,7 vs. 9,3 ng/ml für Patienten in der Kontrolle bei An- bzw. Abwesenheit von Alkohol als Ursache ($p=0,024$). Der Vergleich über HCC und Kontrolle hinweg ergab innerhalb der Patienten mit Alkohol-Ätiologie für HCC-Patienten einen p-Wert von 0,053. Die gleiche Konstellation ohne Alkohol als Faktor ergab einen Wert von $p<0,001$. Eine signifikante

Differenz hinsichtlich AFP-L3 zeigte sich mit einem p-Wert von 0,025 zwischen HCC-Patienten (7.647 ng/ml) und Patienten der Kontrolle (0,88 ng/ml), jeweils ohne ASH. Die entsprechende Betrachtung mit μ TAS als Testsystem lieferte ebenso einen Unterschied der AFP-Mittelwerte zwischen Patienten mit HCC oder ohne, in Abwesenheit einer Alkohol-Ätiologie (6.529 vs. 117 ng/ml, $p=0,005$). Auch DCP (2.437 vs. 75 ng/ml, $p=0,020$) und AFP-L3 (2.641 vs. 54 ng/ml, $p=0,003$) unterschieden sich bei dieser Konstellation signifikant. Eine weitere statistisch signifikante Differenz zeigte sich innerhalb der HCC-Gruppe bei einem AFP-L3-Wert von 2.043 ng/ml für Patienten mit HCC und Alkohol-Historie ($p=0,011$).

Zum Zeitpunkt der Analyse lag die Evaluation kryptogener Erkrankungen und NASH als Ursachen für die Kontrollgruppe nicht vor. Da für die Auswertung einem Merkmal entweder ein Wert von 0 oder 1 zugeordnet wurde, liegt für NASH und kryptogene Ätiologie jeweils der Vergleich innerhalb der HCC-Gruppe und zwischen HCC-Patienten, in Abwesenheit des jeweiligen Faktors aber im Vergleich zur gesamten Kontrollgruppe vor. Ein Vergleich von HCC-Patienten mit der Kontrollgruppe jeweils ohne kryptogene Erkrankung bzw. NASH oder ein Vergleich zu einem dieser Merkmale innerhalb der Kontrollgruppe war nicht möglich.

Gruppe	System	Faktor (ng/ml)	HCC		Kontrolle		p-Wert
			ja	nein	ja	nein	
nur HBV	LiBASys	AFP		9356		5,9	0,023
			235		1,4		0,085
		DCP		477		11	0,003
	μ Tas	AFP-L3		5.358		1,0	0,059
		AFP		6.008		140	0,009
		DCP		2.599		91	0,035
		AFP-L3		2.212		65	0,009
nur HCV	LiBASys	AFP	831		14		0,003
				14.823			0,013
						3,2	0,009
		DCP		468		11	0,003
						2,2	0,039
	μ Tas	AFP-L3	495			3,3	0,011
				8.391			0,030
						0,14	0,021
		AFP	628	7.690			0,005
nur Alkohol	LiBASys	DCP				5,3	0,002
						1,9	0,023
		AFP-L3				232	0,009
	μ Tas	AFP		13.185		5,6	0,013
			1.705		1,7		0,053
		DCP		227			0,090
	AFP-L3				1,7	<0,001	
	AFP		7.647		0,88	0,025	
	DCP		6.529		117	0,005	
	AFP-L3		2.437		75	0,020	
			2.641		54	0,003	
		2.043				0,011	

Tab. 11: Ergebnisse der t -Tests in unterschiedlichen Ätiologien (HBV, HCV, Alkohol)

Die Betrachtung mit kryptogener Ätiologie als Unterscheidungsmerkmal ergab im LiBASys für AFP einen signifikanten Unterschied innerhalb der HCC-Gruppe für Patienten mit oder ohne kryptogenen Faktor (923 vs. 14.504 ng/ml, $p=0,014$). Für letztere war der AFP-Mittelwert mit auch

signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe (5,5 ng/ml, p=0,009). Beim DCP zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten anderer Ätiologie mit einem höheren Wert für Patienten mit HCC (465 vs. 9,1 ng/ml, p=0,003). Für AFP-L3 zeigten die über LiBASys erhaltenen Mittelwerte eine ähnliche Konstellation wie AFP. Es ergab sich ein signifikanter Abstand zwischen Patienten mit oder ohne kryptogenen Faktor in der HCC-Gruppe (499 vs. 8.220 ng/ml, p=0,03). Für Patienten ohne kryptogene Ätiologie gab es darüber hinaus einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (0,9 ng/ml, p=0,021). Im μ TAS ergab sich ein paralleles Bild. Die Mittelwerte waren innerhalb der HCC-Gruppe verschieden bei Patienten mit oder ohne kryptogenem Faktor (1.332 vs. 7.387 ng/ml, p=0,019). Der AFP-Wert für HCC-Patienten anderer Ätiologie war signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe (114 ng/ml, p=0,003). Für DCP zeigte sich ebenso ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten nicht-kryptogener Ätiologie mit dem höheren Wert auf Seiten der Patienten mit HCC (2.570 vs. 73 ng/ml, p=0,031). AFP-L3 war mit μ TAS signifikant unterschiedlich für Patienten mit oder ohne kryptogenem Faktor und HCC (760 vs. 2.910 ng/ml, p=0,047). Für Patienten ohne kryptogene Ätiologie ergab sich für AFP-L3 zusätzlich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (53 ng/ml, p=0,004).

Gruppe	System	Faktor (ng/)	HCC		Kontrolle		p-Wert
			ja	nein	ja	nein	
nur kryptogen ¹	LiBASys	AFP	923	14.504			0,014
		DCP		465	5,5	9,1	0,009
		AFP-L3	499	8.220			0,003
	μ Tas	AFP				0,9	0,030
		DCP	1.332	7.387			0,021
		AFP-L3					0,019
		AFP			114		0,003
		DCP		2.570	73		0,031
		AFP-L3	760	2.910			0,047
nur NASH ²	LiBASys	AFP		11.061	5,5		0,032
		DCP		484	9,1		0,004
		AFP-L3		5.226	0,85		0,053
	μ Tas	AFP				114	0,019
		DCP		3.766	73		0,027
		AFP-L3		1.608	53		0,025
		AFP	13.140		4,9		0,010
		DCP	468	57	6,9		0,001
		AFP-L3	7.632	236	0,92		0,005
nur 1 Faktor (vs. multiple Ätiologie)	LiBASys	AFP					0,020
		DCP					0,024
		AFP-L3					0,004
	μ Tas	AFP	6.605		130		0,012
		DCP	3.013	75	39		0,013
		AFP-L3	2.767		60		0,003
		AFP		490			0,017

¹ HCC mit kryptogener Erkrankung vs. Kontrolle mit kryptogener Erkrankung nicht verfügbar

² HCC mit NASH vs. Kontrolle NASH nicht verfügbar

Tab. 12: Ergebnisse der t-Tests in unterschiedlichen Ätiologien (kryptogen, NASH, multiple)

Für Patienten mit NASH als ursächliche Erkrankung ergaben sich in beiden Testsystemen durchweg Unterschiede zwischen HCC-Patienten ohne NASH im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die Messreihen mit LiBASys betragen die Mittelwerte 11.061 vs. 5,5 ng/ml (p=0,032) für AFP,

484 vs. 9,1 ng/ml ($p=0,004$) für DCP und 5.226 vs. 0,85 ng/ml ($p=0,053$) für AFP-L3. Parallel dazu ergaben sich mit μ TAS 3.766 vs. 114 ng/ml ($p=0,019$) für AFP, 3.091 vs. 73 ng/ml ($p=0,027$) für DCP sowie 1.608 vs. 53 ng/ml ($p=0,025$) für AFP-L3. Es fanden sich in Bezug auf NASH keine signifikanten Differenzen der Tumormarker innerhalb der HCC-Gruppe.

Der Vergleich von solchen Patienten, die einen einzigen ursächlichen Faktor auswiesen, mit denjenigen, die mehrere Ätiologien gleichzeitig hatten, zeigte ebenfalls eine Reihe von statistisch signifikanten Zusammenhängen. Die resultierenden Konstellationen waren vergleichbar zwischen LiBASys und μ TAS.

Innerhalb der Kontrollgruppe fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen einem im Vergleich zu mehreren Faktoren.

3.3. Nachweis der Tumormarker

Alle drei Marker waren für Patienten mit HCC heterogen erhöht (siehe Abb. 46 und 47). Mit LiBASys war AFP bei einem Cut-off von 200 ng/ml in 30,9%, bei 20 ng/ml in 50,9% und bei 10 ng/ml in 54,5% der Fälle positiv. DCP war in diesem System mit einem Cut-off von 7,5 ng/ml in 56,4%, bei 5 ng/ml in 63,0% der Patienten auffällig. AFP-L3 war bei einem Cut-off von 10% in 35,2% der Fälle erhöht. Im μ TAS war analog dazu AFP bei einem Cut-off von 200 ng/ml in 30,7%, bei 20 ng/ml in 51,6% und bei 10 ng/ml in 63,4% der Patienten erhöht. DCP war in diesem System mit einem Cut-off von 7,5 ng/ml in 54,9% und bei 5 ng/ml in 58,8% der Patienten auffällig. AFP-L3 war zu 58,8% positiv.

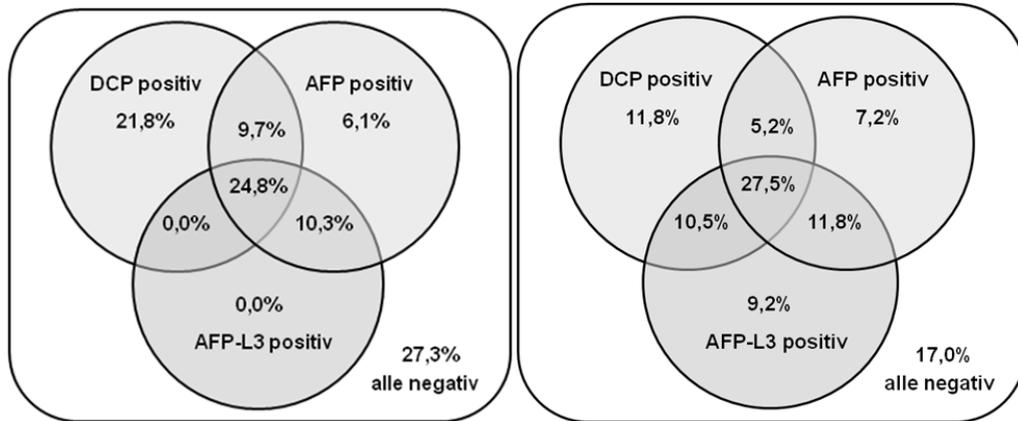
Insgesamt hatten in der Gruppe der HCC-Patienten in der Testreihe mit LiBASys 72,7% mindestens einen der drei untersuchten Werte oberhalb der Grenzwerte. Ausschließlich einen einzigen Parameter hatten 27,9% der Patienten: AFP in 6,1%, DCP in 21,8% und AFP-L3 in keinem einzigen der Fälle. Daher entspricht die Anzahl der Patienten mit erhöhtem AFP-L3 im LiBASys der Anzahl der Patienten mit AFP/AFP-L3 in Kombination.

Die gleiche Betrachtung mit μ TAS lieferte immerhin 83,0% Patienten mit mindestens einem positiven Wert. Ausschließlich einen einzigen auffälligen Messwert hatten insgesamt 28,1% der Patienten, bzw. AFP 7,2%, DCP 11,8% sowie AFP-L3 9,2%.

Gleichzeitig auffällige Werte für AFP und DCP im LiBASys fanden sich bei 34,5% der Patienten, einschließlich derer, die auch AFP-L3 erhöht hatten. AFP und AFP-L3 war dem entsprechend bei 35,2% der Patienten oberhalb des jeweiligen Grenzwertes. Ohne jeweils einen dritten Wert war AFP/DCP in 9,7% der Patienten, AFP/AFP-L3 in 10,3% und DCP und AFP-L3 bei keinem Patienten erhöht. Alle drei Werte waren für 24,8% aller Fälle positiv.

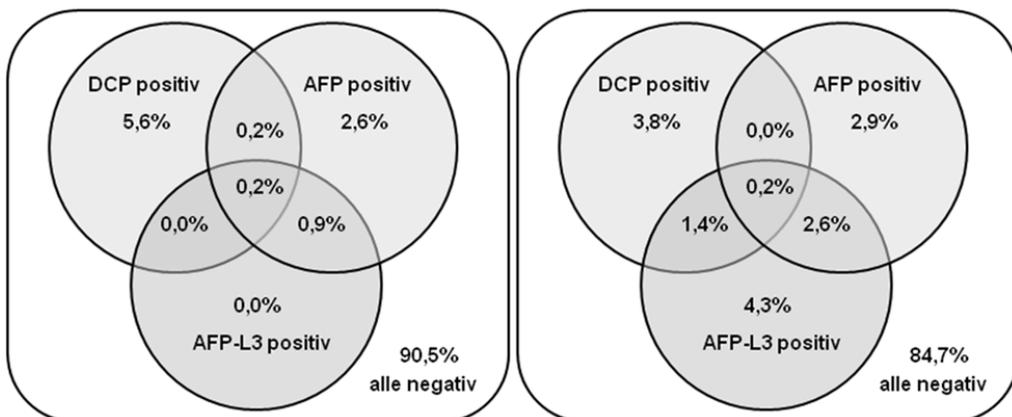
Bei der Betrachtung mehrfach auffälliger Werte mit μ TAS hatten 32,7% der Patienten AFP oder DCP erhöht, einschließlich derer, die auch AFP-L3 erhöht hatten. AFP und AFP-L3 war auf die gleiche Weise in 39,2% der Patienten erhöht und ebenso DCP und AFP-L3 bei 37,9% der

Patienten. Ohne jeweils einen dritten Wert war AFP und DCP in 5,2% der Patienten, AFP und AFP-L3 in je 11,8% und DCP und AFP-L3 für 10,5% der Patienten zu hoch. Alle drei Werte waren in 27,5% aller Fälle positiv.



Verteilung der Tumormarker in der HCC-Gruppe, adaptiert von Toyoda et al. (Toyoda et al., 2006)
(Links: LiBASys, Abb. 46; rechts: μTAS, Abb. 47)

In der Kontrollgruppe (siehe Abb. 48 und 49) waren mit LiBASys bei einem Cut-off von 20 ng/ml 3,9% der Fälle positiv im Hinblick auf AFP. DCP war hier in 6,0% der Patienten auffällig. Für 1,2% der Patienten war AFP-L3 erhöht. Alle drei Angaben schließen auch mögliche Kombinationen mit ein. Demgegenüber waren im LiBASys 90,5% der Kontrollgruppe für alle Tumormarker negativ. Bei den Messreihen mit μTAS war analog dazu AFP bei einem Cut-off von 20 ng/ml in 5,8% der Patienten erhöht. DCP war in diesem System bei 5,5% der Patienten auffällig. AFP-L3 war zu 8,6% positiv. Hierbei hatten 84,7% der Patienten keinen einzigen der drei Marker erhöht.



Verteilung der Tumormarker in der Kontrollgruppe, adaptiert von Toyoda et al. (Toyoda et al., 2006)
(Links: LiBASys, Abb. 48; (Rechts: μTAS, Abb. 49)

Mit dem Fisher's exact Test zu der Verteilung der einzelnen Marker konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich AFP zwischen den Systemen festgestellt werden. Dies galt für 200, 20

und 10 ng/ml als Cut-off. Auch für DCP bei einer Grenze von 7,5 ng/ml bestand kein signifikanter Unterschied. Lediglich für AFP-L3 (Cut-off 10%) zeigte sich ein, allerdings hochsignifikanter, Unterschied mit mehr nachgewiesenen Patienten mit μ TAS (58,8% vs. 35,8%, $p < 0,0001$).

Bei der entsprechenden Untersuchung der Kombinationen zeigte sich erneut ein hoch signifikanter Unterschied in der Verteilung für AFP zusammen mit AFP-L3 zugunsten von μ TAS (71,2% vs. 49,7%, $p < 0,0001$). Für die Kombination aller drei Marker ergab sich ein Trend zugunsten von μ TAS, wenn für AFP ein Cut-off von 20 ng/ml verwendet wurde (81,7% vs. 72,7%, $p = 0,063$). Dieser Unterschied wurde signifikant, wenn der Cut-off für AFP auf 10 ng/ml gesenkt wurde (85,6% vs. 75,2%, $p = 0,024$).

Abb. 50 veranschaulicht die unterschiedliche Verteilung der Marker und deren Kombinationen im für Patienten mit HCC.

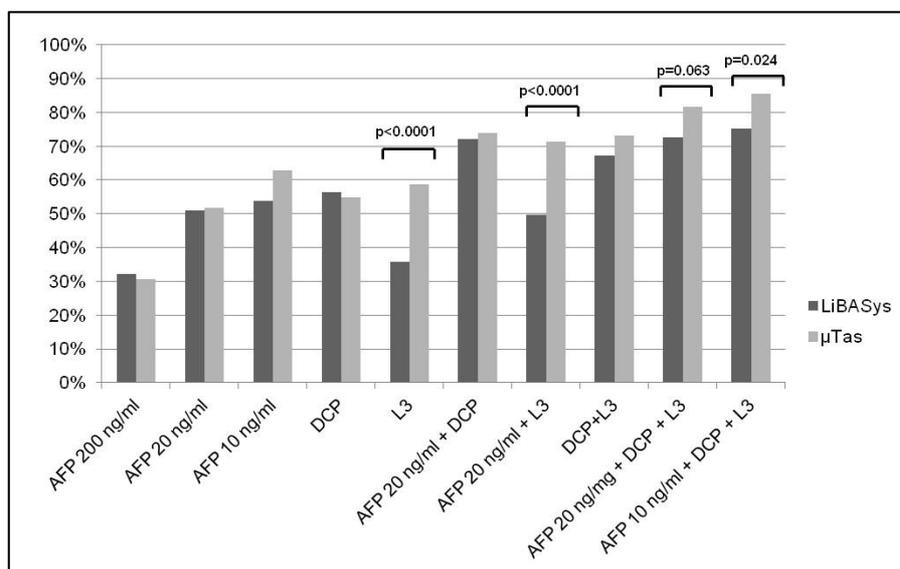


Abb. 50: Unterschiedliche Verteilung der Marker und deren Kombinationen für Patienten mit HCC

Die gleiche Untersuchung zwischen den Systemen in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 51) ergab für AFP für Cut-offs von 200 und 20 ng/ml keine signifikante Differenz. Bei einer weiteren Absenkung der Grenze auf 10 ng/ml war ein deutlicher Unterschied erkennbar (LiBASys: 6,0%; μ TAS: 12,0%, $p = 0,002$). DCP als einzelner Marker war nicht verschieden. Einen hochsignifikanten Unterschied zugunsten von μ TAS ergab der Einzelvergleich von AFP-L3 (8,6% vs. 1,2%, $p < 0,0001$). Sämtliche Kombinationen, die AFP-L3 als Komponente enthalten, wiesen statistische Unterschiede zwischen LiBASys und μ TAS auf. Für die Kombination AFP/AFP-L3 ergaben sich 3,9% vs. 10,3% ($p = 0,0004$). Für DCP/AFP-L3 war der Unterschied 6,7% vs. 12,5% ($p = 0,005$). Bei einem Cut-off von 20 ng/ml für AFP zeigte sich ein Trend mit $p = 0,052$ zu mehr positiven Patienten bei der Kombination aller drei Marker mit μ TAS (9,3% vs. 13,7%). Dieser Trend wurde statistisch signifikant bei einem Cut-off von 10 ng/ml (LiBASys: 11,4%, μ TAS: 19,4%; $p = 0,001$). Die

Kombination der beiden Marker AFP und DCP ergab keinen Unterschied von einem Testsystem zum anderen.

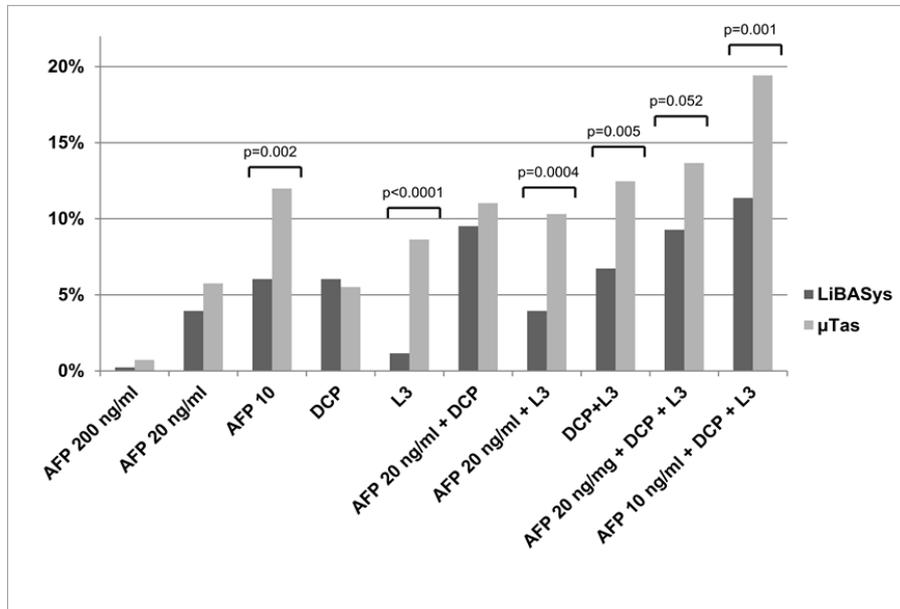


Abb. 51: Unterschiedliche Verteilung der Marker und deren Kombinationen in der Kontrollgruppe

Sämtliche im μTAS positiven Patienten aus der Kontrollgruppe wurden auch mit LiBASys positiv getestet, jedoch in etwa 1/3 der Fälle nicht umgekehrt. Alle Patienten der Kontrollgruppe, die erhöhte Werte für DCP zeigten, taten dies in beiden Systemen.

3.3.1. Nachweis der Tumormarker in verschiedenen Ätiologien

Für die Tumormarker ergab sich je nach Ätiologie ein anderes Verteilungsmuster für die drei Marker (siehe Abb. 52). Bei der Betrachtung von Patienten mit HCC und jeweils nur einem erhöhten Tumormarker im LiBASys war DCP in allen untersuchten Subgruppen (HBV, HCV, Alkohol, NASH, kryptogen, andere und multiple) häufiger erhöht als AFP. DCP war am häufigsten erhöht für Patienten mit kryptogener Erkrankung (30,8%), gefolgt von Patienten mit NASH als Grunderkrankung (28,6%). Erhöhte einzelne Werte für AFP zeigten sich am häufigsten für Patienten mit multipler Ätiologie (14,3%) und HBV-Infektion (10,0%). Wie bereits in Kapitel 3.3 ausgeführt, trat AFP-L3 (LiBASys) nicht einzeln auf. Für die Kombination aus AFP und DCP waren Patienten mit Alkohol als Ursache besonders prominent (17,4%), gefolgt von kryptogener Ätiologie (15,4%). AFP in Verbindung mit AFP-L3 trat am häufigsten bei HBV-Infektion (20,7%) und multipler Ätiologie (14,3%) auf. Alle drei Tumormarker waren insbesondere bei Patienten mit anderer Ätiologie auffällig (37,5%), jedoch auch bei kryptogener Ursache (34,6%), NASH (28,6%), Alkohol (26,1%) oder HCV (24,1%). Bei etwa jedem dritten bis sechsten Patienten jedweder

Ätiologie war kein einziger Marker erhöht. Für die Hälfte der HBV-Patienten waren alle drei Marker negativ (vgl. auch Tab. 31 im Anhang).

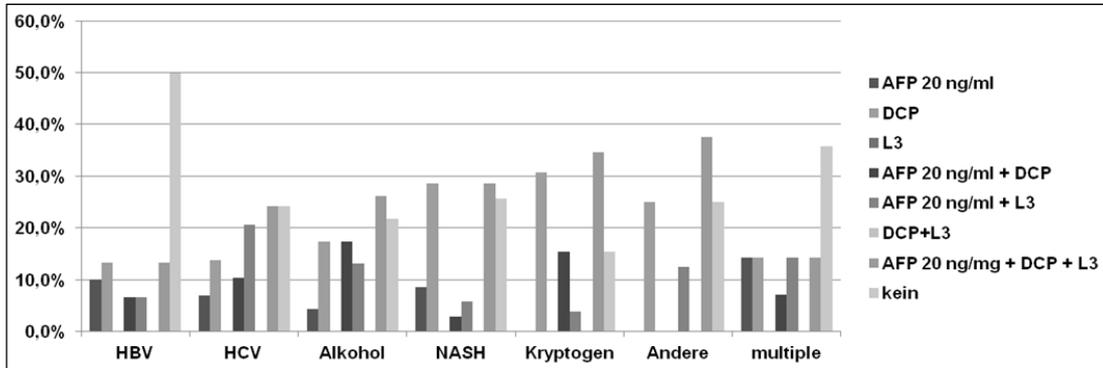


Abb. 52: Verteilung der Marker und deren Kombinationen bei unterschiedlichen Ätiologien (LiBASys)

Auch aus den Messreihen mit μ TAS ergaben sich je nach Ätiologie unterschiedliche Markerverteilungen. Insbesondere durch das prominentere Auftreten von AFP-L3 waren die Anteile im Vergleich zu LiBASys deutlich verschoben (siehe Abb. 53).

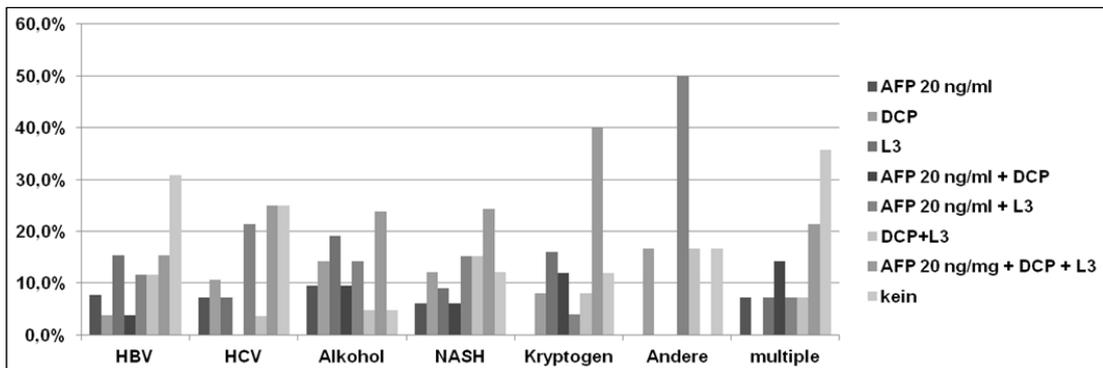


Abb. 53: Verteilung der Marker und deren Kombinationen bei unterschiedlichen Ätiologien (μ TAS)

Für Patienten mit HCC und jeweils nur einem erhöhten Tumormarker war DCP in mehreren untersuchten Subgruppen (HCV, Alkohol, NASH, kryptogen, andere) häufiger erhöht als AFP, jedoch nicht für Patienten mit HBV-Infektion. DCP war am häufigsten erhöht für Patienten mit anderer (16,7%) oder alkoholischer Ätiologie (14,3%). AFP einzeln zeigte sich am häufigsten für Patienten mit alkoholischer Ätiologie erhöht, jedoch bei weniger als jedem 10. Patienten (9,3%). AFP-L3 als Marker alleine trat am häufigsten in Verbindung mit Alkohol (19,0%), kryptogener Erkrankung (16,0%) oder Patienten mit HBV (15,4%) auf. Für die Kombination aus AFP und DCP waren Patienten mit multiplen Ursachen ebenfalls besonders prominent (14,3%), gefolgt von kryptogener Ätiologie (12,0%). AFP in Verbindung mit AFP-L3 trat am häufigsten bei anderer Ätiologie (50,0%), gefolgt von HCV (21,6%) auf. Die Kombination aller drei Tumormarker über

dem jeweiligen Schwellenwert trat, mit Ausnahme anderer Ätiologien, bei mindestens jedem 6. Patienten der Subgruppen auf. Für Patienten mit kryptogener Erkrankung traf dies in 40,0% der Fälle zu. Abgesehen von Patienten mit HCV (μ TAS: 25,0%; LiBASys: 24,1%) waren in allen Subgruppen wesentlich weniger Patienten ohne mindestens einen positiven Tumormarker. Weitere Details zu dieser Auswertung befinden sich in Tab. 32 im Anhang.

3.3.2. Nachweis der Tumormarker in unterschiedlichen Stadien

Im LiBASys hatten Patienten in den Stadien BCLC ≤ 2 oder TNM ≤ 2 ähnliche Werte für AFP und DCP im Vergleich zu späteren Stadien (siehe Abb. 54). Die Kombinationen AFP/DCP und AFP/AFP-L3 kamen in den früheren Stadien jeweils bei weniger als jedem 10. Patienten vor und öfter in späteren Stadien. Alle drei Marker gleichzeitig waren bei immerhin 16,9% für Patienten mit BCLC ≤ 2 oder TNM ≤ 2 positiv, jedoch bei 32,5% der Spätstadien. In 41,6% der Fälle war in früheren Stadien keiner der Marker erhöht, was nur für 16,9% der fortgeschrittenen Fälle zutraf.

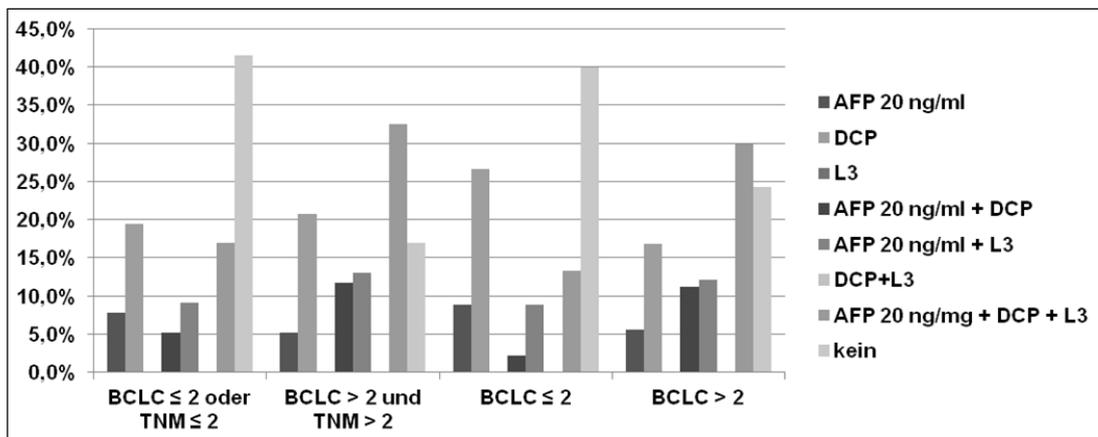


Abb. 54: Verteilung der Marker und deren Kombinationen in verschiedenen Tumorstadien (LiBASys)

Bei einer Unterscheidung zwischen Patienten mit BCLC ≤ 2 vs. > 2 wurde vor allem der Unterschied für DCP als Einzelparameter größer. Während 26,7% der Patienten der Frühstadien einen positiven DCP-Wert aufwiesen, waren es 16,8% in BCLC-Stadien oberhalb von 2 (vgl. Tab. 33 und 34 im Anhang).

3.3.3. Nachweis der Tumormarker nach Leberstatus

Hinsichtlich des Leberstatus wurde zwischen vorhandener oder nicht vorhandener Zirrhose sowie einem MELD-Score bis einschließlich 10 vs. darüber unterschieden. Im LiBASys hatten Patienten mit Zirrhose häufiger AFP als einzelnen Parameter (8,0%) sowie in Zweierkombination mit AFP-L3 (12,8%) erhöht als Patienten ohne Zirrhose (2,6% und 5,1%), DCP war häufiger erhöht in Patienten ohne Zirrhose, sowohl als Einzelparameter als auch in allen Kombinationen. Insgesamt

71,8% der Patienten ohne Zirrhose hatten DCP als Marker auffällig. Mit 30,4% hatte etwa die Hälfte mehr Patienten mit Zirrhose keinen positiven Marker als ohne Zirrhose.

Die Werte im LiBASys für Patienten mit einem niedrigen MELD-Score lagen relativ nahe bei denen mit MELD-Score >10. Etwas mehr Patienten mit niedrigem MELD-Score waren positiv hinsichtlich DCP im Vergleich zu den Patienten mit höherem MELD-Score (22,6% vs. 16,9%). Das Verhältnis war deutlich umgekehrt für die Kombination aus den drei Tumormarkern (22,6% vs. 30,5%) (siehe Abb. 55).

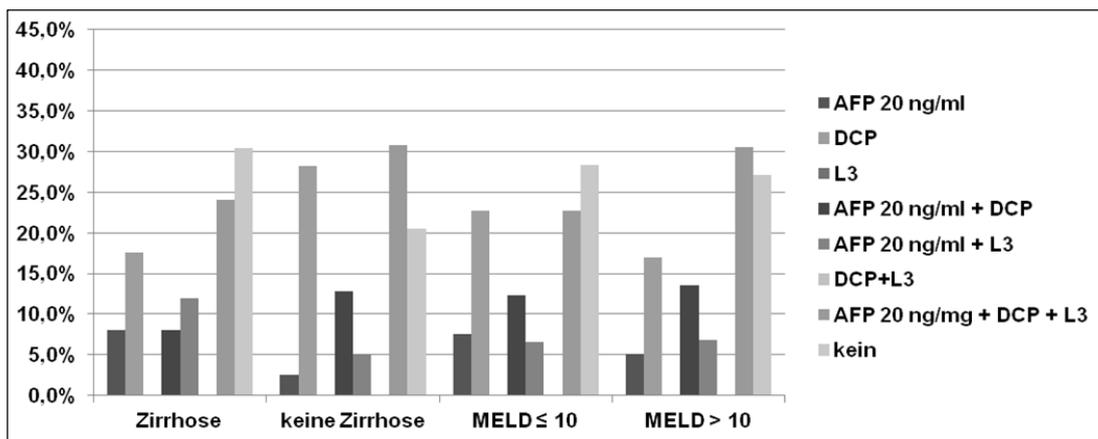


Abb. 55: Verteilung der Marker und deren Kombinationen nach Leberstatus (LiBASys)

Auch mit μ TAS (vgl. Abb. 56) haben Patienten mit Zirrhose öfter AFP als einzelnen Wert positiv (7,0% vs. 2,6%) als ohne Zirrhose. Hierbei hatten Patienten ohne Zirrhose DCP einzeln häufiger erhöht (15,8% vs. 8,8%). AFP-L3 für sich genommen lag mit oder ohne Zirrhose in der gleichen Größenordnung. Sowohl die Kombination von AFP-L3 mit AFP als auch die von AFP-L3 mit DCP lag deutlich häufiger über den jeweiligen Grenzwerten in zirrhotischen Patienten. Mit 39,5% war die Kombination der drei Marker nahezu doppelt so oft anzutreffen, wenn Patienten keine Zirrhose hatten. Etwa jeder sechste Patient wurde vollständig negativ getestet, unabhängig vom Zirrhose-Status.

Für Patienten mit niedrigem MELD-Score war häufiger DCP alleine erhöht (14,3% vs. 5,5%, für solche mit höherem MELD-Score hingegen AFP-L3 (14,5% vs. 7,1%). Die Kombination AFP/AFP-L3 war charakteristischer für Patienten mit MELD \leq 10 (16,3% vs. 9,1%). Auch hier war mit 32,7% in etwa doppelt so vielen Patienten ohne Zirrhose die Dreierkombination zu finden. Wie bei der Unterscheidung nach Zirrhose war etwa jeder sechste Patient in beiden Gruppen in Bezug auf MELD ohne auffälligen Marker (siehe auch Tab. 35 und 36 im Anhang).

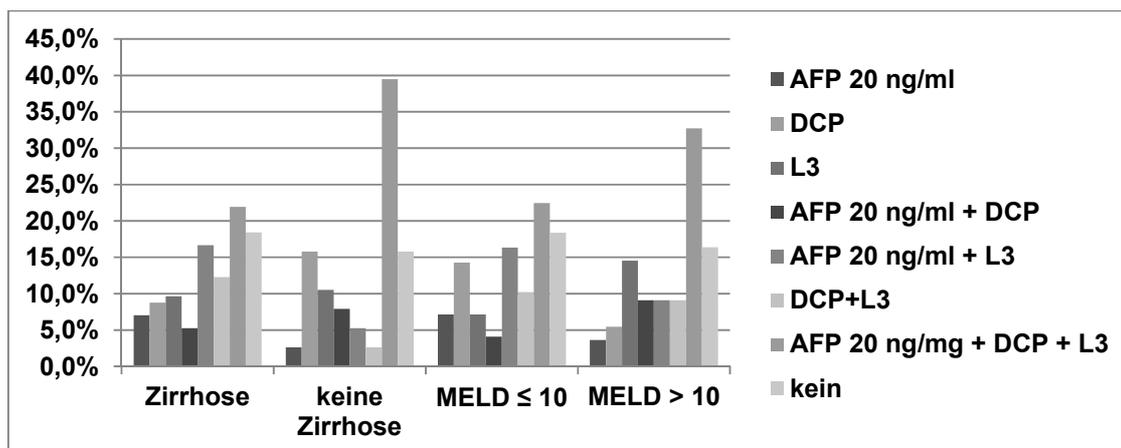


Abb. 56: Verteilung der Marker und deren Kombinationen nach Leberstatus (µTAS)

3.3.4. Nachweis der Tumormarker bei speziellen Patienten

In der Kontrollgruppe befanden sich vier Patientinnen, die ursprünglich als HCC-positiv eingestuft waren, sich jedoch unabhängig von dieser Arbeit als negativ herausgestellt haben (siehe Tab. 13). Im Hinblick auf die hier untersuchten Testverfahren und Marker sind diese Patienten von besonderem Interesse, weil sie Ergebnisse zeigen könnten, die auf ein HCC hinweisen. Damit können diese Fallbeispiele weiteren Aufschluss über die Qualität der Messverfahren liefern.

Die erste Patientin hatte statt eines HCCs einen neuroendokrinen Tumor. Hinsichtlich AFP und DCP waren die Werte unauffällig. Der AFP-L3-Wert lag lediglich für µTAS vor und gilt mit einem Anteil von 8,2% bei einem Cut-off von 10% als negativ. Die Patientin wurde korrekt als HCC negativ erkannt.

Im Fall der zweiten Patientin lag eine HCV-Erkrankung zugrunde. Der ursprüngliche Verdacht auf HCC hatte sich nicht bestätigt. Die Patientin wurde durch einen AFP-Wert von 28,5 ng/ml im µTAS als falsch positiv angezeigt. Im LiBASys war der gleiche Wert mit 19,7 ng/ml bei einem Cut-off von 20 ng/ml grenzwertig negativ.

Der Tumor der dritten Patientin stellte sich als Gallengangs-Karzinom heraus. Diese Patientin wurde sowohl mit dem LiBASys als auch mit µTAS als richtig negativ erkannt. AFP-L3 und DCP waren in beiden Testverfahren unauffällig. Erst bei einem Cut-off von 10 ng/ml für AFP würde die Patientin mit einem Ergebnis von 11,5 ng/ml im µTAS als falsch positiv angezeigt. Der AFP-Wert im LiBASys lag bei 5,9 ng/ml und würde auch bei einer Grenze von 10 ng/ml für AFP negativ gelten.

Die vierte Patientin hatte ebenfalls eine Tumorerkrankung anderen (nicht näher bekannten) Ursprungs. AFP, AFP-L3 und DCP war im LiBASys unauffällig. Die Patientin wurde als richtig negativ angezeigt. Ein Vergleich mit µTAS lag mangels Probe nicht vor.

Keine dieser vier Proben war hinsichtlich DCP erhöht. Für sich allein genommen zeigten in allen vier Fällen beide Testverfahren die Werte für AFP-L3 und DCP die Patienten als richtig negativ an. Lediglich im Fall einer Patientin führte der AFP-Wert zu einem falsch positiven Ergebnis. Die Beobachtung deckt sich mit der Erfahrung, dass der AFP-Wert allein relativ wenig aussagekräftig für die Diagnose eines HCCs ist. Gleichzeitig unterstreichen diese vier Einzelfälle die Spezifität von DCP und AFP-L3.

Patienten- Nummer #	Diagnose	LiBASys			µTAS		
		AFP (n/ml)	% AFP-L3	DCP (ng/ml)	AFP (n/ml)	% AFP-L3	DCP (ng/ml)
65	Neuroendokriner Tumor	1,7	0,0	2,3	4,0	8,2	0,13
67	HCV-Infektion	19,7	0,0	0,0	28,4	6,8	0,12
166	Gallengangs-Karzinom	5,9	0,0	0,0	11,4	7,3	0,39
208	Tumor anderen Ursprungs	2,0	0,0	1,1	n.a.	n.a.	n.a.

Tab. 13: Werte für die Tumormarker von Patienten mit ursprünglichem Verdacht auf HCC

3.4. Sensitivität und Spezifität

Für alle drei untersuchten Tumormarker ergaben sich unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten. Diese hingen im Fall von AFP im Wesentlichen von der Wahl des Cut-offs ab. Auch die Hinzunahme eines Kombinationspartners oder mehrerer spielte eine entscheidende Rolle. Schließlich zeigten sich auch zwischen Subgruppen, insbesondere dort, wo ein Merkmal mit einer stärker eingeschränkten Leberfunktion vergesellschaftet ist, zum Teil erhebliche Unterschiede. Unterschiede bestanden auch zwischen den beiden Geräten LiBASys und µTAS. Die nachfolgend besprochenen Werte befinden sich auch in Tabellenform in Kapitel 3.5.

3.4.1. Gesamtkollektiv

Die Sensitivität für AFP gesamt war bei einem Cut-off von 200 ng/ml relativ niedrig (LiBASys: 32,1%, µTAS 30,7%). Gleichzeitig lag die Spezifität bei nahezu 100% (LiBASys: 99,8%, µTAS 99,3%). Die Reduktion des Cut-offs auf die im klinischen Alltag verbreitete Grenze von 20 ng/ml führte zu einer Steigerung der Sensitivität auf 50,9% (LiBASys) bzw. 51,6% (µTAS) bei sinkender Spezifität. Eine weitere Absenkung des Schwellenwerts auf 10 ng/ml führte zu einer minimal höheren Sensitivität mit LiBASys (53,9%) und noch einmal zu einer deutlichen Steigerung mit µTAS auf 62,7%.

Im Vergleich dazu lag die Sensitivität von DCP bei 56,4% im LiBASys über derjenigen von AFP und mit µTAS darunter (54,9%). Die Spezifität für DCP betrug 94,0% (LiBASys) bzw. 94,5% (µTAS). Deutliche Unterschiede zwischen den Messverfahren zeigten sich bei AFP-L3. Mit 58,8% Sensitivität war AFP-L3 im µTAS vergleichbar mit den anderen Markern. Im LiBASys betrug die Sensitivität für AFP-L3 lediglich 35,8%. Die Spezifität lag bei 98,8% (LiBASys) bzw. 91,4% (µTAS). Den Vergleich der beiden Systeme in der Gesamtgruppe veranschaulicht Abb. 57.

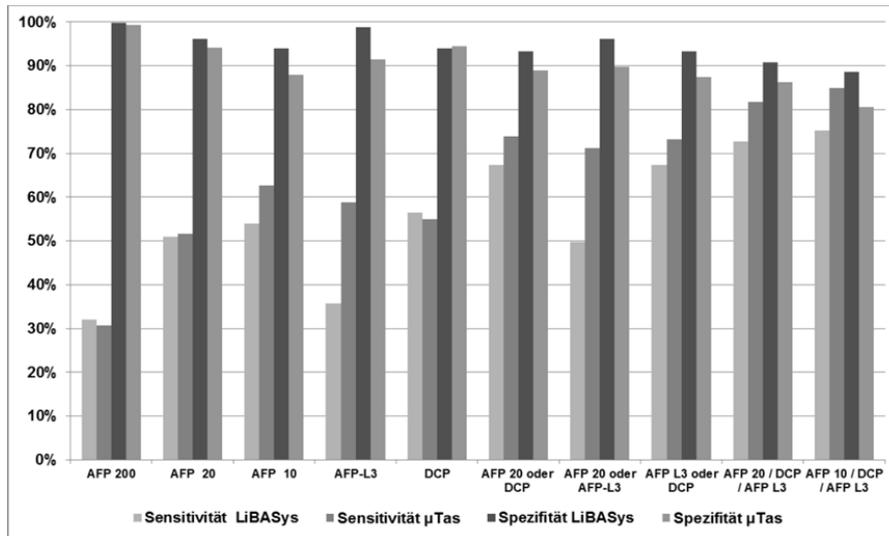


Abb. 57: Sensitivität und Spezifität für AFP, DCP und AFP-L3 und deren Kombinationen, Patienten gesamt

Die Kombination von AFP mit DCP führte in beiden Systemen erwartungsgemäß zu einer Steigerung der Sensitivität (Abb. 57). Mit LiBASys betrug der Wert 67,3% und lag mit 73,9% für μTAS leicht darüber. Die Spezifität sank demgegenüber marginal auf 93,3% (LiBASys) bzw. 89,0% (μTAS).

Bei der Kombination aus AFP und AFP-L3 konnte mit μTAS ebenfalls eine höhere Sensitivität als für die einzelnen Tumormarker erreicht werden. Die Sensitivität lag dort bei 71,2% und ähnlich hoch wie mit der Kombination aus AFP und DCP (siehe oben) oder auch AFP-L3 zusammen mit DCP (73,2%). Die Kombination aus AFP und AFP-L3 führte mit LiBASys zu keiner Steigerung im Vergleich zu AFP allein. Mit AFP-L3 und DCP konnte hier eine Verbesserung der Sensitivität auf 67,3% erreicht werden. Die Spezifitäten beider Systeme für die Kombination aus AFP und AFP-L3 zeigten sich vergleichbar mit denen von AFP in Verbindung mit DCP (LiBASys: 96,1%; μTAS: 89,7%).

Eine generell weitere Anhebung der Sensitivität bewirkte jeweils die Hinzunahme des dritten Markers. Die erreichten Sensitivitäten lagen dann bei 72,7% für LiBASys und noch höher im μTAS (81,7%). Gleichzeitig waren die Spezifitäten noch immer hoch (LiBASys: 90,7%; μTAS: 86,3%). Wurde der Grenzwert von AFP auf 10 ng/ml gesenkt, so ergab sich eine nochmalige Steigerung der Sensitivität auf 75,2% (LiBASys) und 85,0% (μTAS). Der Effekt wurde begleitet durch eine Absenkung der Spezifität auf 88,6% (LiBASys) bzw. 80,6% (μTAS).

3.4.2. Patienten mit oder ohne Zirrhose

Patienten mit Zirrhose hatten, ähnlich wie das Gesamtkollektiv, niedrige Sensitivitäten für die einzelnen Marker. AFP-L3 lag mit 59,6% am höchsten (siehe Abb. 58). Die Sensitivität von AFP und DCP lag bei 51,8% und 49,1% bei einer Spezifität von 87,7% und 86,4%. Die Spezifität für AFP-L3 betrug ebenfalls 86,4%. Die Kombination von jeweils zwei Markern führte zu einer Steigerung der Sensitivität auf etwa 70% für alle sich ergebenden Konstellationen. In allen drei Fällen lag die Spezifität vergleichbar um 80%. Die Kombination der drei Marker führte zu einer Verbesserung der Sensitivität auf 79,8% bei einer Spezifität von immerhin 75,3%. Die Genauigkeit lag in dem Fall bei 77,9%. Letztere betrug noch immer 74,9% wenn der Grenzwert für AFP in der Dreierkombination auf 10 ng/ml gesenkt wurde. Die Sensitivität ließ sich dann weiter auf 83,3% erhöhen, bei einer Spezifität von nunmehr 63,0%.

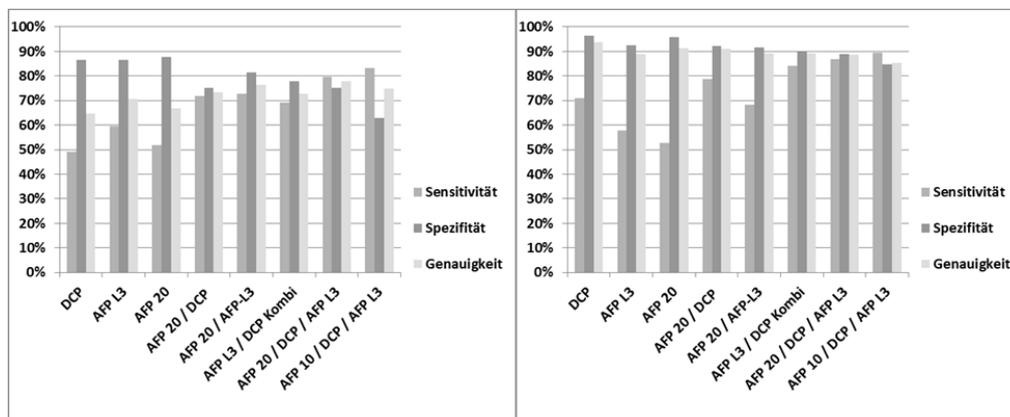


Abb. 58 und Abb. 59: Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten mit Leberzirrhose (links) und ohne (rechts)

Im Vergleich dazu hatten Patienten ohne Zirrhose höhere Sensitivitäten für die einzelnen Marker und sämtliche Kombinationen. Hier lag DCP mit 71,1% am höchsten (siehe Abb. 59). Die Sensitivität von AFP-L3 lag über der von AFP (57,9% vs. 52,6%). Die Spezifitäten für DCP, AFP-L3 und AFP betragen 96,4%, 92,5% und 95,8%. Die Kombination von jeweils zwei Markern führte auch in Abwesenheit einer Zirrhose zu einer Steigerung der Sensitivität. Für AFP und DCP ergaben sich 78,9%, für AFP-L3 und DCP 84,2%. Die Kombination von AFP mit AFP-L3 blieb mit 68,4% als einzige deutlich in der Nähe des Wertes von zirrhotischen Patienten. Die Spezifität für die drei Möglichkeiten lag jeweils um 90%. Die Kombination der drei Marker führte erneut zu einer Verbesserung der Sensitivität. Diese lag mit einem Cut-off für AFP von 20 ng/ml bei 86,8% bei einer Spezifität von 88,9% und einer Genauigkeit von 88,7%. Bei einem Cut-off von 10 ng/ml in der Dreierkombination stieg die Sensitivität auf 89,5% mit leichten Einbußen hinsichtlich Spezifität (84,7%) und Genauigkeit (85,2%).

Beim anschließenden Vergleich der Kombination AFP und DCP sowie der Kombination aller drei Tumormarker mit Cut-offs für AFP von 20 oder 10 ng/ml zeigte sich μ TAS in allen Fällen als das sensitivere Messsystem mit einer etwas geringeren Spezifität. Der Unterschied war deutlicher für drei Tumormarker vs. zwei und noch stärker ausgeprägt bei einer Schwelle für AFP von 10 ng/ml (vgl. Abb. 60).

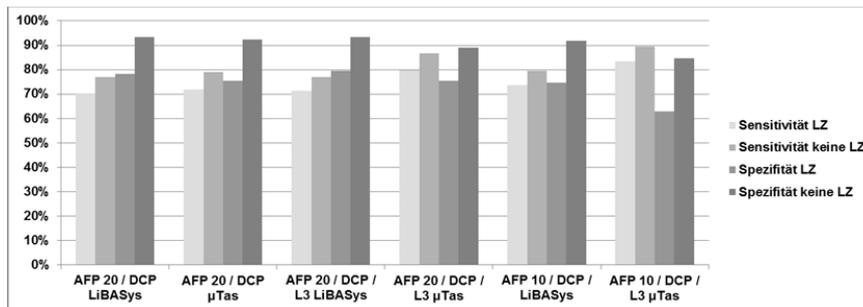


Abb. 60: Vergleich der Sensitivität und Spezifität für Kombinationen von Markern für Patienten mit oder ohne Leberzirrhose, LiBASys vs. μ TAS

3.4.3. Patienten in frühen Stadien

Patienten in den Stadien BCLC ≤ 2 oder TNM ≤ 2 hatten sehr niedrige Sensitivitäten für die einzelnen Marker. AFP-L3 lag mit 42,0% am höchsten (siehe Abb. 61), gefolgt von DCP (39,1%) und AFP (36,2%) bei Spezifitäten von 91,4%, 94,5% und 94,2%. Bei einer Absenkung des Schwellenwerts für AFP-L3 stieg die Sensitivität auf 47,8%. Die Kombination von jeweils zwei Markern bewirkte eine Steigerung der Sensitivität auf bis zu 56,5%. In allen drei Fällen lag die Spezifität vergleichbar bei knapp 90%. Die Kombination der drei Marker ergab eine Verbesserung der Sensitivität auf 66,7% bei gleichzeitiger Spezifität von 86,3% und einer Genauigkeit von 83,5%. Bei einem Grenzwert für AFP in der Dreierkombination von 10 ng/ml wurde eine Sensitivität 73,9% erreicht, bei einer Spezifität von 80,6% und einer Genauigkeit von 79,6%.

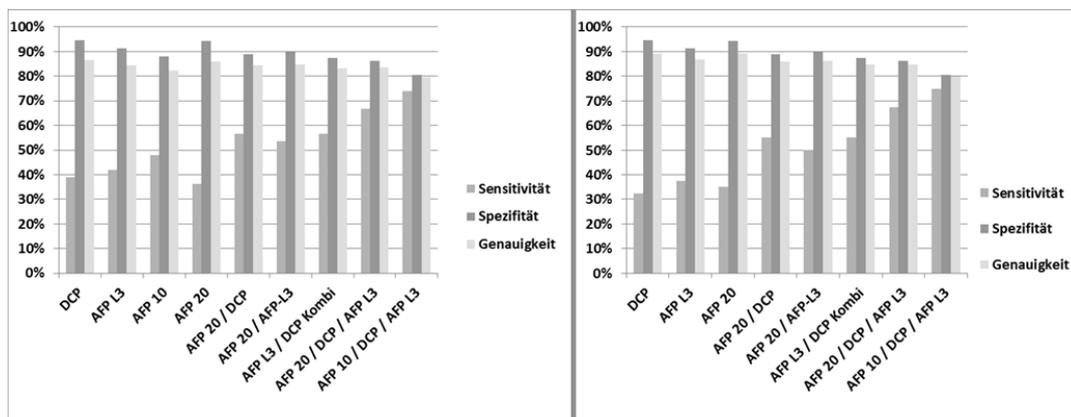


Abb. 61 und Abb. 62: Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen im Stadium TNM ≤ 2 oder BCLC ≤ 2 (links) und BCLC ≤ 2 (rechts)

Bei einer erneuten Betrachtung der Patienten mit ausschließlich BCLC ≤ 2 zeigte sich ein noch kontrastreicheres Bild. Die Sensitivitäten waren im Vergleich zum soeben beschriebenen Kollektiv noch etwas geringer, die Spezifitäten marginal höher. Beides galt auch für die Kombination von zwei Markern. Wie in Abb. 62 zu sehen ist, bewirkt auch hier die Verbindung von zwei Markern eine allgemeine Verbesserung der Effektivität der Methode bei noch immer hoher Spezifität. Auch bei diesen Patienten war die Dreierkombination die Konstellation mit der höchsten Sensitivität. Die Absenkung der Grenze für AFP auf 10 ng/ml ergab hier ebenfalls eine nochmalige Steigerung. Die Sensitivität betrug dann 75,0%, die Spezifität 80,6% und die Genauigkeit 80,1%.

Der Vergleich der Kombination AFP und DCP sowie der Kombination aller drei Marker mit Cut-offs für AFP von 20 oder 10 ng/ml in Frühstadien ergab keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Testsystemen (siehe Abb. 63).

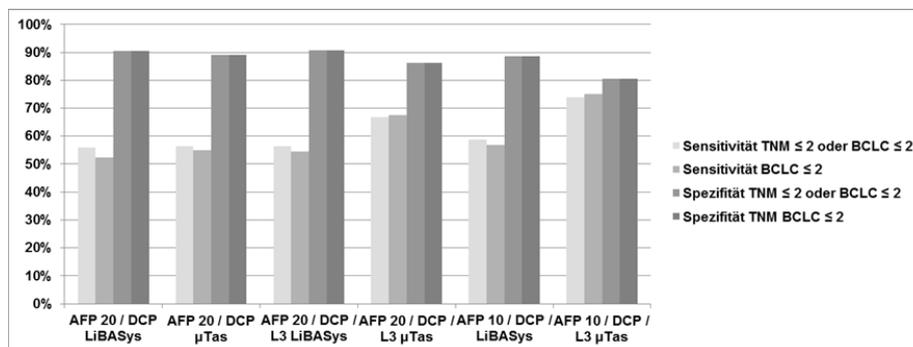


Abb. 63: Vergleich der Sensitivität und Spezifität für Kombinationen von Markern für Patienten in frühen Stadien, LiBASys vs. μ TAS

3.4.4. Unterschiedliche Grade der Lebererkrankung

Die Sensitivität von AFP, DCP und AFP-L3 für Patienten mit MELD ≤ 10 lag bei 48,9%, 54,3% und 53,2% bei einer Spezifität von 95,5%, 96,3% und 93,0%. Die Sensitivitäts-Werte für die einzelnen Marker waren damit höher für Patienten mit MELD > 10 (siehe Abb. 64 und 65). Für AFP und DCP ergaben sich dort jeweils 55,9%. AFP-L3 lag mit 67,8% noch einmal deutlich darüber. Die Spezifität für AFP, DCP und AFP-L3 war bei den Patienten mit höherem MELD-Score absolut um 8,4%, 12,4% und 10,7% geringer. Die beliebige Kombination von zwei Markern ergab, praktisch unabhängig vom MELD-Score, eine bessere Sensitivität, mit Werten zwischen 70% und 80%. Wie bei den in den Kapiteln zuvor beschriebenen Subgruppen sank dadurch die Spezifität, in diesem Fall besonders für Patienten mit MELD > 10 . Die Kombinationen AFP/DCP, AFP/AFP-L3 und DCP/AFP-L3 erreichten hier Spezifitäten von 71,0%, 77,4% und 67,7%, während die Werte für die Zweierkombination bei Patienten mit MELD ≤ 10 durchweg über 90% lagen. Ein ähnlicher Unterschied zeigte sich bei der Genauigkeit. Die Hinzunahme des dritten Markers führte zu einer weiteren Steigerung der Sensitivität für beide Kohorten in vergleichbarer Höhe. Für die

Kombination der drei Marker und bei 10 ng/ml als Grenzwert für AFP ergab sich eine Sensitivität von 86,4% (MELD >10) bzw. 84,0% (MELD ≤10). Jedoch waren in dieser Konstellation, absolut gesehen, die Spezifität mit 58,1% und die Genauigkeit mit 71,9% um 26,4% bzw. 12,5% geringer als in Patienten mit MELD ≤10.

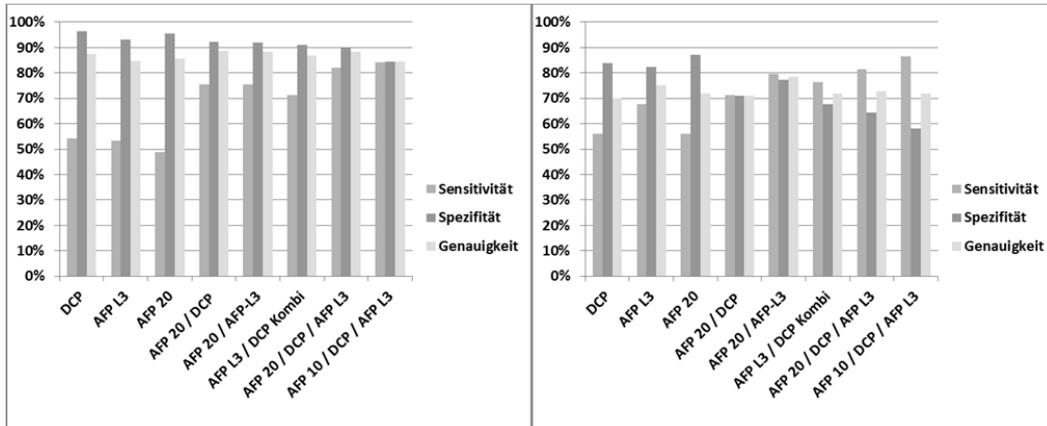


Abb. 64 und Abb. 65: Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten mit MELD ≤10 (links) und MELD >10 (rechts)

Ein ähnliches Szenario zeigte sich in der Betrachtung unterschiedlicher Child Stadien (siehe Abb. 66 und 67). Die Sensitivitäten der Einzelmarker waren in späteren Stadien etwas höher, insgesamt jedoch vergleichbar. Eine Ausnahme bildete allerdings AFP-L3, mit 52,7% in Patienten mit Child A und 66,7% bei Patienten mit Child B oder C. Die höchsten Sensitivitäten wurden erneut mit der Kombination aller drei Tumormarker erreicht. Diese betrug 81,8% bei leichter Einschränkung der Leberfunktion und 84,2% bei stärker geschädigter Leber.

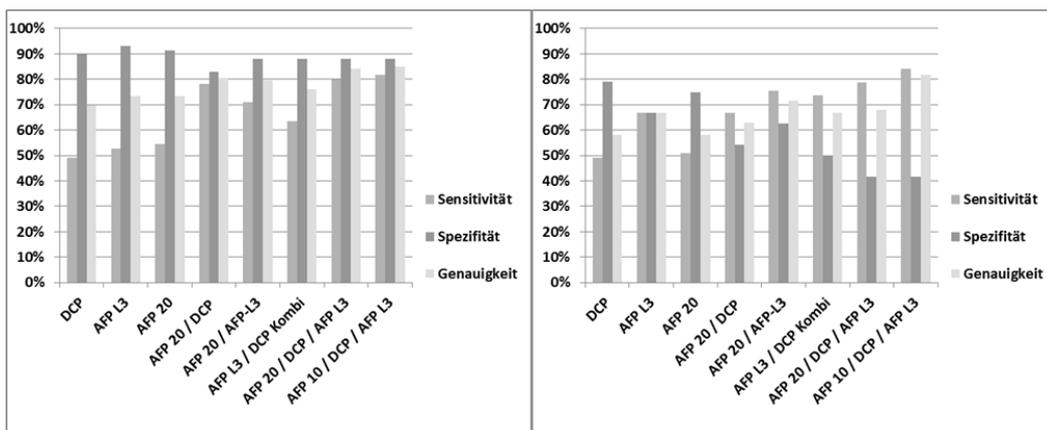


Abb. 66 und Abb. 67: Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten mit Child Status A (links) und Child Status B oder C (rechts)

Ein größerer Unterschied zeigte sich in der Spezifität. Diese war, wie auch in der komplementären Untersuchung unterschiedlicher MELD-Scores, deutlich geringer in den fortgeschrittenen Stadien.

Während Patienten mit Child A mit der Dreierkombination bei beiden Cut-offs für AFP je auf eine Spezifität von 87,9% kamen, betrug diese in beiden Fällen nur noch 41,7% für Child B oder C. Auch die errechneten Genauigkeiten waren durchweg geringer bei stärker geschädigter Leber nach Child Pugh.

Bei der folgenden Gegenüberstellung der Kombination aus AFP und DCP sowie der Kombination aller drei Tumormarker, je nach Leberstatus und mit Cut-offs für AFP von 20 oder 10 ng/ml, zeigte sich μ TAS, wie zuvor, durchweg als sensitiveres Messsystem (vgl. Abb. 68).

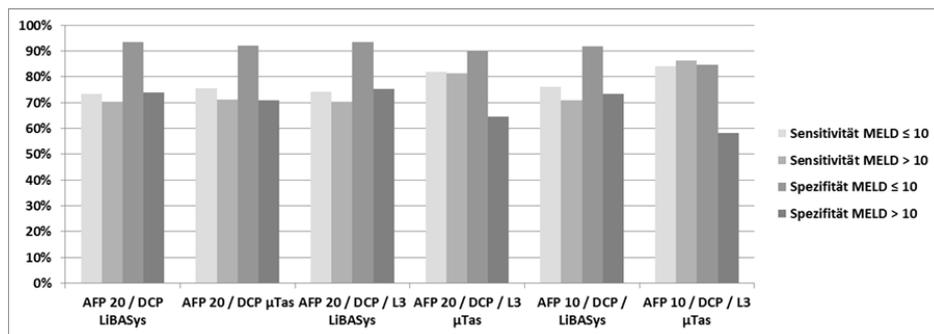


Abb. 68: Vergleich der Sensitivität und Spezifität für Kombinationen von Markern für Patienten mit MELD \leq 10 oder MELD $>$ 10, LiBASys vs. μ TAS

Die Spezifität des μ TAS lag allerdings unter den im LiBASys erreichten Werten. Der Unterschied war ebenso stärker ausgeprägt für die gleichzeitige Betrachtung aller drei Tumormarker und am größten bei einer Schwelle für AFP von 10 ng/ml.

Noch deutlicher trat der beschriebene Unterschied hinsichtlich beider Systeme bei der Untersuchung unterschiedlicher Child-Scores hervor (siehe Abb. 69).

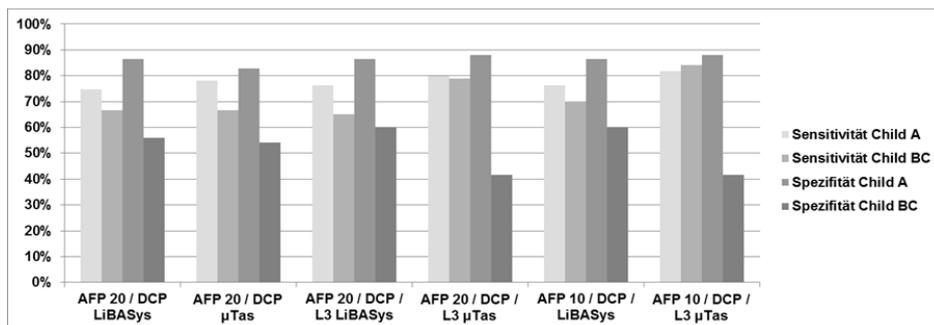


Abb. 69: Vergleich der Sensitivität und Spezifität für Kombinationen von Markern für Patienten mit Child A oder Child B/C, LiBASys vs. μ TAS

3.5. Receiver Operating Calculations

Die AUROC für das Gesamtkollektiv (LiBASys, vgl. Tab. 14) lag bei 0,63 für AFP, bei einem Cut-off von 20 ng/ml und bei 0,81 mit AFP \geq 10 ng/ml. Für DCP und AFP-L3 als einzelne Tumormarker ergaben sich AUCs von 0,83 und 0,64. Mit μ TAS (vgl. Tab. 15) erzielte AFP AUCs von 0,78 (20

ng/ml) und 0,88 (10 ng/ml). Die Werte für DCP und AFP-L3 lagen bei 0,75 (emp) und 0,69. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe der Einzelmarker zeigt Abb. 70. Bei der Kombination von zwei Markern war die AUC größer als für die Einzelmessungen. Für AFP/DCP, AFP/AFP-L3 und DCP/AFP-L3 ergaben sich mit LiBASys 0,89, 0,62 und 0,80 und mit μ TAS 0,87, 0,79 sowie 0,78. Den höchsten Wert erzielte jeweils die Kombination der drei Tumormarker bei 10 ng/ml als Schwellenwert für AFP. Die AUC betrug dann 0,84 (LiBASys) bzw. 0,88 (μ TAS). Die Kurvenverläufe für die Kombinationen von zwei und drei Markern mit den beiden Testsystemen veranschaulicht Abb. 71.

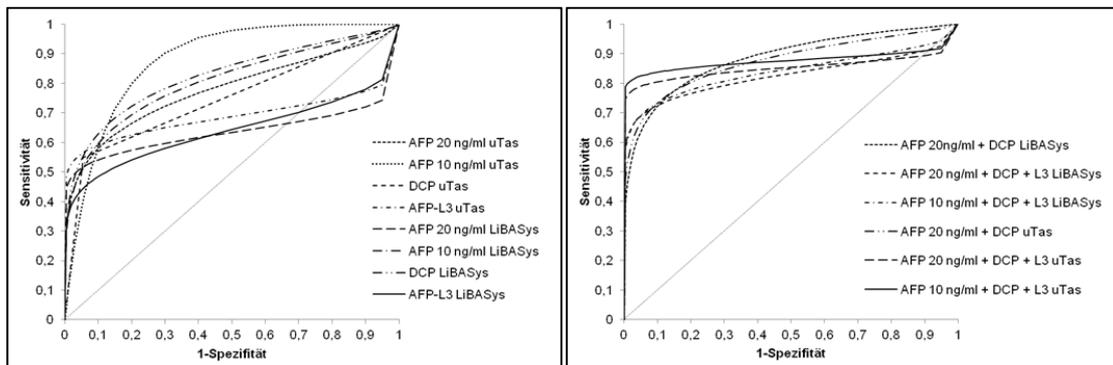


Abb. 70 und Abb. 71: Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker in der Gesamtgruppe (links) sowie verschiedener Kombinationen (rechts)

Im direkten Vergleich der Dreierkombination, einschließlich der Konfidenzintervalle, zeigte sich die Überlegenheit von μ TAS gegenüber LiBASys. Die Sensitivität mit μ TAS war konstant hoch, bei geringerer Falsch-positiv-Rate als mit LiBASys (siehe Abb. 72).

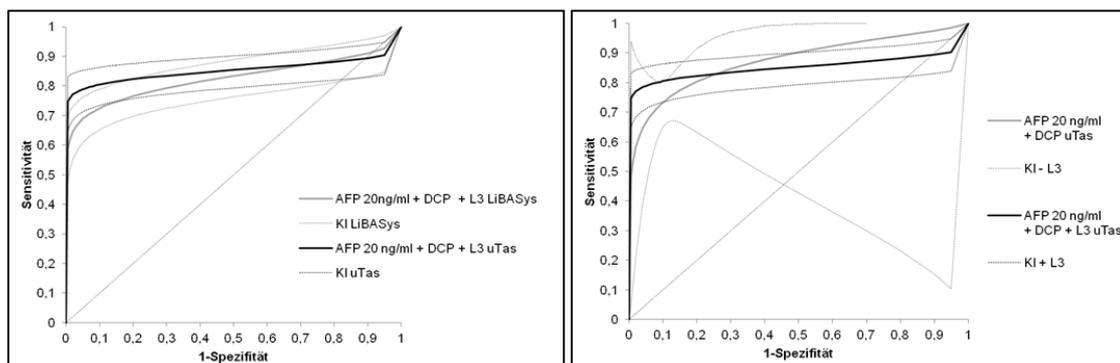


Abb. 72 und Abb. 73: Vergleich der AUROC der Kombination AFP/DCP/AFP-L3 mit LiBASys und μ TAS (links) und Veranschaulichung des Effekts von AFP-L3 auf die AUROC in der Dreierkombination (rechts)

Die Ergebnisse legen nahe, dass der Effekt in Wesentlichen auf der Zunahme von AFP-L3 beruhte. Ohne AFP-L3 hatte die Kombination aus AFP und DCP zwar eine große AUC, bedingt durch eine hohe Sensitivität aber begleitet von einer höheren Falsch-Positiv-Rate. Gleichzeitig

scheren die Konfidenzintervalle in Grenzbereichen weit auseinander. Mit AFP-L3 als drittem Marker entsteht eine konstant hohe Leistung über das gesamte Spektrum (Abb. 73).

Patienten total	LiBASys, n=596									
	AFP (200 ng/ml)	AFP (20 ng/ml)	AFP (10 ng/ml)	DCP	L3	AFP + DCP	AFP + L3	DCP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	32,1	50,9	53,9	56,4	35,8	67,3	49,7	67,3	72,7	75,2
Spezifität (%)	99,8	96,1	94,0	94,0	98,8	93,3	96,1	93,3	90,7	88,6
Genauigkeit (%)	81,0	83,6	82,9	83,6	81,4	86,1	83,2	86,1	85,7	84,9
ROC Area (emp)	0,659	0,734	0,741	0,757	0,611	0,777	0,722	0,777	0,809	0,813
ROC Area (calc)	n.a.	0,632	0,808	0,827	0,637	0,885	0,621	0,800	0,824	0,838
SDAbw	n.a.	0,139	0,118	0,109	0,035	0,051	0,141	0,027	0,030	0,027
unteres 95% KI	n.a.	0,493	0,690	0,718	0,602	0,834	0,480	0,773	0,794	0,811
oberes 95% KI	n.a.	0,771	0,925	0,935	0,671	0,936	0,761	0,828	0,854	0,865
pos. predictive Value	0,981	0,832	0,774	0,782	0,922	0,744	0,828	0,793	0,750	0,717
neg. predictive Value	0,793	0,836	0,842	0,849	0,801	0,894	0,833	0,882	0,897	0,903
positive Prävalenz	0,277	0,277	0,277	0,277	0,277	0,277	0,277	0,277	0,277	0,277
negative Prävalenz	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723
LR+	160,500	13,051	8,983	9,400	29,833	10,045	12,744	10,045	7,817	6,596
LR-	0,680	0,511	0,490	0,464	0,650	0,350	0,523	0,350	0,301	0,280
LR+ gewichtet	61,444	4,996	3,439	3,599	11,421	3,845	4,879	3,845	2,993	2,525
LR- gewichtet	1,777	1,335	1,281	1,212	1,697	0,916	1,367	0,916	0,786	0,731
Youden Index (J)	0,319	0,470	0,479	0,504	0,346	0,606	0,458	0,606	0,634	0,638
p-Value (Fisher's)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tab. 14: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen im Gesamtkollektiv (LiBASys)

Patienten total	µTas, n=570									
	AFP (200 ng/ml)	AFP (20 ng/ml)	AFP (10 ng/ml)	DCP	L3	AFP + DCP	AFP + L3	DCP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	30,7	51,6	62,7	54,9	58,8	73,9	71,2	73,2	81,7	85,0
Spezifität (%)	99,3	94,2	88,0	94,5	91,4	89,0	89,7	87,5	86,3	80,6
Genauigkeit (%)	80,9	82,8	81,2	83,9	82,6	84,9	84,7	83,7	85,1	81,8
ROC Area (emp)	0,650	0,733	0,767	0,747	0,706	0,818	0,782	0,767	0,817	0,811
ROC Area (calc)	n.a.	0,778	0,879	n.a.	0,685	0,874	0,788	0,778	0,851	0,875
SDAbw	n.a.	0,155	0,027	n.a.	0,035	0,080	0,030	0,032	0,027	0,025
unteres 95% KI	n.a.	0,623	0,852	n.a.	0,649	0,794	0,757	0,746	0,824	0,850
oberes 95% KI	n.a.	0,933	0,906	n.a.	0,720	0,955	0,818	0,810	0,878	0,901
pos. predictive Value	0,940	0,767	0,658	0,785	0,714	0,711	0,717	0,683	0,687	0,616
neg. predictive Value	0,798	0,842	0,866	0,859	0,858	0,903	0,895	0,899	0,928	0,936
positive Prävalenz	0,268	0,268	0,268	0,268	0,268	0,268	0,268	0,268	0,268	0,268
negative Prävalenz	0,732	0,732	0,732	0,732	0,732	0,732	0,732	0,732	0,732	0,732
LR+	43,857	8,897	5,225	9,982	6,837	6,718	6,913	5,856	5,964	4,381
LR-	0,698	0,514	0,424	0,477	0,451	0,293	0,321	0,306	0,212	0,186
LR+ gewichtet	16,091	3,264	1,917	3,662	2,509	2,465	2,536	2,149	2,188	1,608
LR- gewichtet	1,902	1,400	1,155	1,301	1,229	0,799	0,875	0,835	0,578	0,507
Youden Index (J)	0,300	0,458	0,507	0,494	0,502	0,629	0,609	0,607	0,680	0,656
p-Value (Fisher's)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tab. 15: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen im Gesamtkollektiv (µTAS)

Die Rangfolge der empirischen AUROCs (siehe Abb. 74) verdeutlicht die besseren Resultate mit AFP-L3 als zusätzlichem Tumormarker einerseits sowie den Vorteil für µTAS andererseits. Eine Standardmessung von AFP bei 20 ng/ml in Kombination mit DCP mit LiBASys käme beispielsweise auf Rang sieben. Die gleiche Messung mit µTAS kommt auf Rang eins und ist damit selbst der Dreierkombination bei 10 ng/ml für AFP mit LiBASys überlegen.

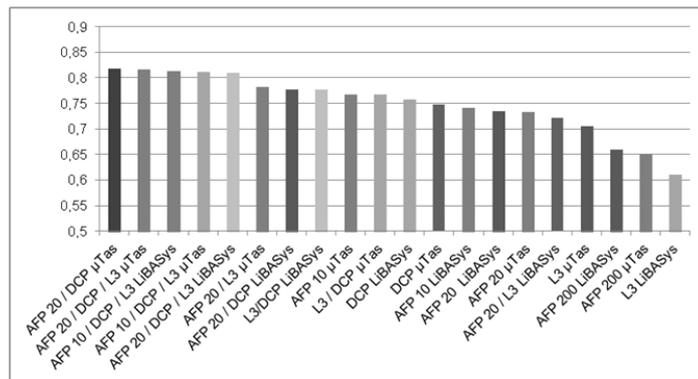


Abb. 74: Rangfolge der empirischen AUROC-Werte

Ein etwas anderes Bild verdeutlicht die Rangfolge der kalkulierten AUROCs (Abb. 75). Die Standardmessung von AFP bei 20 ng/ml in Kombination mit DCP mit LiBASys liegt hier auf dem vordersten Rang. Allerdings ist der numerische Unterschied zu den Rängen zwei bis vier marginal und das Konfidenzintervall erheblich breiter als in der gleichen Messung mit μ TAS (Rang 5) oder mit μ TAS bei einem Grenzwert von 10 ng/ml für AFP (Rang 3). Letztere Messung kam mit LiBASys in dieser Betrachtung auf Rang sieben.

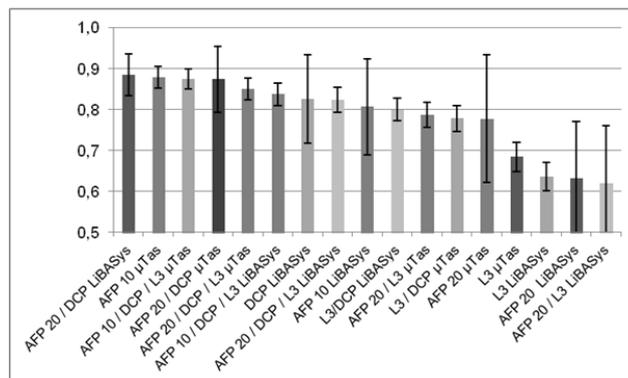


Abb. 75: Rangfolge der kalkulierten AUROC-Werte mit Konfidenzintervallen

Ergänzend zu den bisherigen Beobachtungen lag der positive prädiktive Wert mit LiBASys (siehe Tab. 14) höher für die einzelnen Marker als für die Kombinationen. Der höchste Wert ergab sich für AFP-L3 mit 92,2%. Die Dreierkombination brachte es auf 75,0% (Cut-off für AFP 20 ng/ml) bzw. 71,7% (Cut-off für AFP 10 ng/ml). Die negativ prädiktiven Werte lagen im LiBASys etwas höher für die Kombinationen mit dem besten Ergebnis für die Dreierkombinationen (Cut-off AFP 20 ng/ml: 89,7%; 10 ng/ml: 90,3%). Der positiv prädiktive Wert für μ TAS (Tab. 15) lag jeweils etwas unter den korrespondierenden Werten aus der Messung mit LiBASys. Mit der Kombination aller drei Tumormarker ergaben sich mit μ TAS 68,7% (Cut-off für AFP 20 ng/ml) sowie 61,6% (Cut-off für AFP 10 ng/ml). Die negativ prädiktiven Werte lagen ebenfalls etwas höher für die

Kombinationen, mit dem den höchsten Werten für die Kombinationen mit drei Markern (Cut-off AFP 20 ng/ml: 92,8%; 10 ng/ml: 93,6%).

Abschließend war der Youden Index größer für Kombinationen von Markern, größer für die Verbindung von drei Markern im Vergleich zu zwei und insgesamt größer für die Messreihen mit μ TAS als für diejenigen mit LiBASys (vgl. Abb. 76). In der Rangfolge der Möglichkeiten liegt die Kombination AFP (20 ng/ml) mit DCP und AFP-L3 auf Platz eins, gefolgt von der gleichen Kombination mit 10 ng/ml als Grenzwert für AFP (0,68 bzw. 0,66, beide μ TAS). In umgekehrter Reihenfolge landeten die gleichen Kombinationen mit LiBASys auf den Rängen drei (0,64) und vier (0,63).

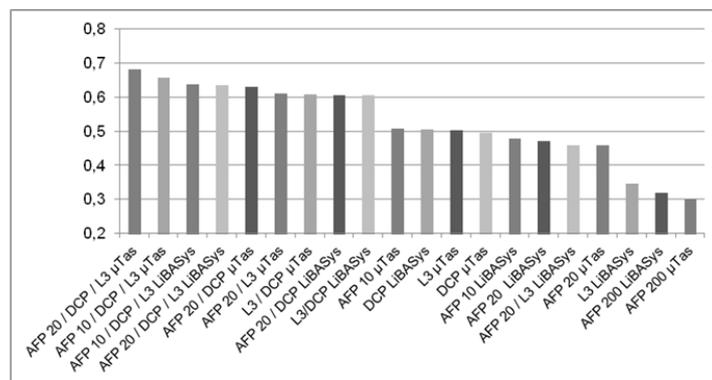


Abb. 76: Rangfolge der Youden-Indizes das Gesamtkollektiv

In einer exploratorischen Analyse wurden über das Youden-Verfahren diejenigen Cut-offs für AFP, DCP und AFP-L3 festgelegt, bei der die Spezifität und die Sensitivität optimal wird. Diese lagen im LiBASys bei AFP=2,65 ng/ml und bei DCP=1,45 ng/ml, sowie im μ TAS für AFP=6,15 ng/ml, DCP=0,69 ng/ml und AFP-L3=0,55 nm/ml. Letzterer Wert war angesichts der Nachweisgrenzen des μ TAS (vgl. Kap. 2.2) plausibel, jedoch stets von AFP abhängig (siehe auch Kapitel 3.7). Für das LiBASys ergab sich ein Wert für AFP-L3 von 0,2843 ng/ml. Angesichts der analytischen Sensitivität von $\geq 0,8$ ng/ml pro Fraktion im LiBASys und der Tatsache dass AFP-L3 in Prozent dort erst ab 10 ng/ml (Gesamt-) AFP bestimmt werden kann, unterliegt dieser Wert einer starken statistischen Verzerrung. Daher wurde weiterhin mit einem Cut-off von 10% für AFP-L3 für beide Messverfahren gearbeitet.

Für die einzelnen Marker konnten so insbesondere mit dem μ TAS vergleichsweise hohe Sensitivitäten und Spezifitäten erreicht werden (siehe Tab. 37 und 38 im Anhang). Die Sensitivität lag für AFP bei 75,2% bei einer Spezifität von 83,5%. Für DCP ergaben sich analog dazu 77,8% und 87,3%. Die Kombination der Marker ergab eine Steigerung der Sensitivität auf bis zu 91,5% beim Einsatz aller drei Marker. Die Spezifität sank dabei auf 64,7%.

3.5.1. Patienten in frühen Stadien

Für Patienten in den Stadien TNM ≤ 2 oder BCLC ≤ 2 wurde die AUC ebenfalls größer, sobald Marker kombiniert wurden (siehe Abb. 77 und 78). Die empirischen Werte für die Einzelmarker AFP, DCP und AFP-L3 lagen in der gleichen Größenordnung (0,66, 0,67 und 0,61). Die Verbindung AFP und DCP erreichte AUCs von 0,84 mit μ TAS und 0,73 (emp) mit LiBASys. Da sich AUC für AFP/DCP im LiBASys nicht errechnen ließ, sind die Werte nicht direkt vergleichbar. Die Kombination der drei Tumormarker erzielte für Patienten in diesen Stadien hohe, jedoch keine höheren Werte als AFP/DCP im μ TAS. Ab einem Schwellenwert für AFP von 20 ng/ml ergab sich mit μ TAS eine AUC von 0,75 und 0,80 ab 10 ng/ml. LiBASys erzielte mit der zuletzt genannten Kombination eine AUC von 0,72 (vgl. Tab. 16).

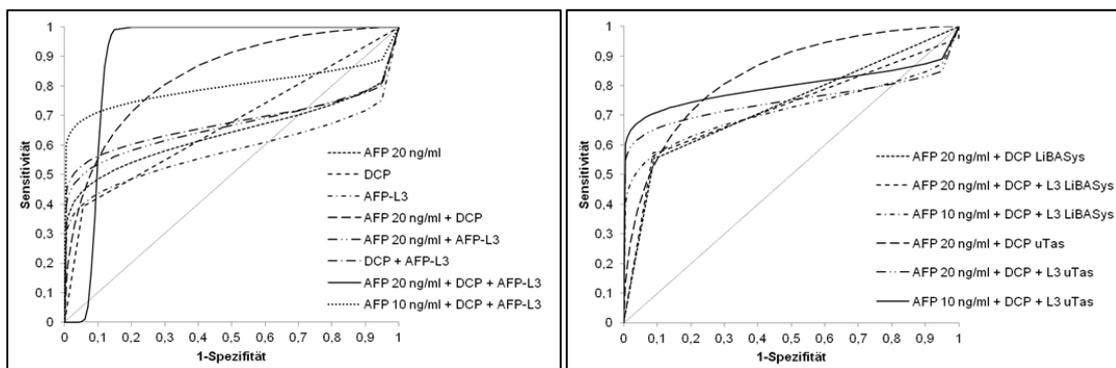


Abb. 77 und Abb. 78: Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker (links, μ TAS) sowie verschiedener Kombinationen (rechts) in den Stadien TNM ≤ 2 oder BCLC ≤ 2

Parameter	μ Tas, n=486								LiBASys, n=506		
	AFP (20 ng/ml)	DCP	L3	DCP + L3	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	AFP + DCP	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	36,2	39,1	42,0	56,5	56,5	53,6	66,7	73,9	56,0	56,3	58,7
Spezifität (%)	94,2	94,5	91,4	87,5	89,0	89,7	86,3	80,6	90,5	90,7	88,6
Genauigkeit (%)	86,0	86,6	84,4	83,1	84,4	84,6	83,5	79,6	85,4	85,8	84,2
ROC Area (emp)	0,659	0,668	0,610	0,679	0,735	0,672	0,730	0,748	0,732	0,722	0,724
ROC Area (calc)	0,707	n.a.	0,578	0,672	0,838	0,662	0,746	0,796	n.a.	n.a.	0,716
SDAbw	0,271	n.a.	0,054	0,052	0,111	0,052	0,048	0,044	n.a.	n.a.	0,051
unteres 95% KI	0,436	n.a.	0,524	0,620	0,727	0,610	0,698	0,794	n.a.	n.a.	0,666
oberes 95% KI	0,977	n.a.	0,632	0,724	0,949	0,713	0,752	0,840	n.a.	n.a.	0,767
pos. predictive Value	0,510	0,540	0,446	0,429	0,459	0,463	0,447	0,386	0,506	0,518	0,473
neg. predictive Value	0,899	0,904	0,905	0,924	0,925	0,921	0,940	0,949	0,922	0,924	0,925
positive Prävalenz	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148	0,852	0,852	0,852
negative Prävalenz	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,858	0,858	0,858
LR+	6,241	7,109	4,884	4,520	5,136	5,204	4,869	3,809	5,895	6,054	5,149
LR-	0,677	0,644	0,635	0,497	0,489	0,517	0,386	0,324	0,486	0,482	0,466
LR+ gewichtet	1,033	1,176	0,808	0,748	0,850	0,861	0,806	0,630	1,026	1,053	0,896
LR- gewichtet	4,093	3,895	3,835	3,004	2,954	3,126	2,332	1,957	2,794	2,769	2,679
Youden Index (J)	0,304	0,336	0,334	0,440	0,455	0,433	0,530	0,545	0,465	0,470	0,473

Tab. 16: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen in den Stadien TNM oder BCLC ≤ 2

Die positiv prädiktiven Werte für diese frühen Stadien waren geringer als für das Gesamtkollektiv und kaum über 50%. Die Kombination von Markern brachte hier keinen Zugewinn und kam mit μ TAS und AFP (≥ 10 ng/ml) zusammen mit DCP und AFP-L3 auf nur 38,6%. Die gleiche

Kombination erreichte mit 94,9% den größten negativ prädiktiven Wert, welcher für diese Patienten durchweg über 90% lag, sowie den höchsten Youden-Index (0,55).

Patienten mit BCLC ≤ 2 hatten diesbezüglich vergleichbare AUROC-Werte. Die Kombination von Markern bewirkte prinzipiell eine Steigerung der Fläche, mit keinem eindeutigen Vorteil für die Kombination aller drei Tumormarker bei den kalkulierten Werten (siehe Abb. 87 und 80).

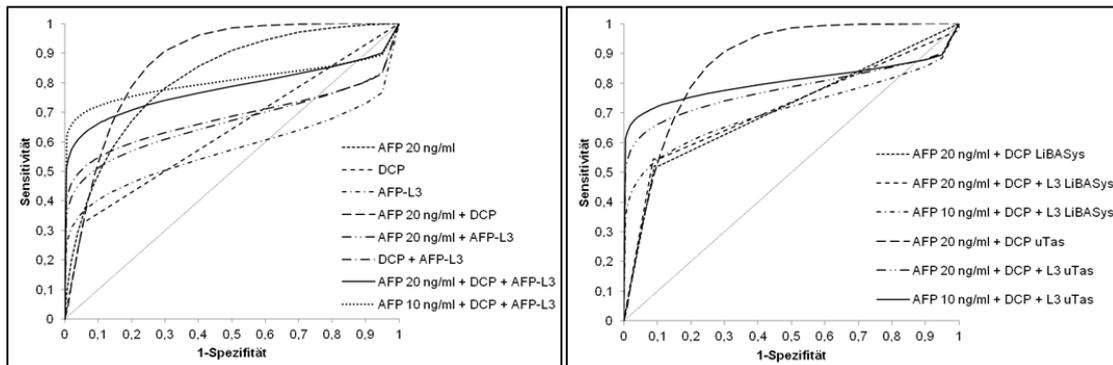


Abb. 79 und Abb. 80: Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker (links, μ TAS) sowie verschiedener Kombinationen (rechts) in den Stadien BCLC ≤ 2

Auffällig ist auch die hohe Leistung für AFP (μ TAS) in Kombination mit DCP (0,87) sowie die von AFP als einzelner Marker (0,82). Für die häufig favorisierte Variante aus AFP (≥ 10 ng/ml) zusammen mit DCP und AFP-L3 ergab sich eine AUC von 0,80 (μ TAS) (vgl. Tab 17). Der Youden-Index stieg mit der Anzahl der eingesetzten Marker und war für Patienten mit BCLC ≤ 2 am höchsten in der Kombination der drei Faktoren bei einem Cut-off für AFP ≥ 10 ng/ml (0,56).

Parameter	μ Tas, n=457							LiBASys, n=475			
	AFP (20 ng/ml)	DCP	L3	DCP + L3	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	AFP + DCP	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	35,0	32,5	37,5	55,0	55,0	50,0	67,5	75,0	52,3	54,5	56,8
Spezifität (%)	94,2	94,5	91,4	87,5	89,0	89,7	86,3	80,6	90,5	90,7	88,6
Genauigkeit (%)	89,1	89,1	86,7	84,7	86,0	86,2	84,7	80,1	86,9	87,4	85,7
ROC Area (emp)	0,658	0,635	0,596	0,685	0,732	0,668	0,757	0,752	0,713	0,715	0,715
ROC Area (calc)	0,820	n.a.	0,570	0,680	0,872	0,664	0,779	0,804	n.a.	n.a.	0,709
SDAbw	0,203	n.a.	0,070	0,066	0,059	0,066	0,058	0,057	n.a.	n.a.	0,070
unteres 95% KI	0,618	n.a.	0,500	0,613	0,813	0,598	0,721	0,747	n.a.	n.a.	0,638
oberes 95% KI	1,023	n.a.	0,639	0,746	0,931	0,730	0,836	0,861	n.a.	n.a.	0,779
pos. predictive Value	0,368	0,361	0,294	0,297	0,324	0,317	0,321	0,270	0,359	0,375	0,338
neg. predictive Value	0,938	0,936	0,938	0,953	0,954	0,949	0,965	0,971	0,949	0,951	0,953
positive Prävalenz	0,088	0,088	0,088	0,088	0,088	0,088	0,088	0,088	0,093	0,093	0,093
negative Prävalenz	0,912	0,912	0,912	0,912	0,912	0,912	0,912	0,912	0,907	0,907	0,907
LR+	6,034	5,909	4,360	4,400	5,000	4,854	4,927	3,866	5,505	5,860	4,982
LR-	0,690	0,714	0,684	0,514	0,506	0,557	0,377	0,310	0,527	0,502	0,488
LR+ gewichtet	0,579	0,567	0,418	0,422	0,480	0,466	0,473	0,371	0,562	0,598	0,509
LR- gewichtet	7,193	7,446	7,129	5,361	5,271	5,811	3,926	3,234	5,163	4,914	4,776
Youden Index (J)	0,292	0,270	0,289	0,425	0,440	0,397	0,538	0,556	0,428	0,452	0,454

Tab. 17: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen im Stadium BCLC ≤ 2

Der Vergleich der Youden-Indizes favorisierte hinsichtlich der Kombination von Markern deutlich die mit μ TAS gemessenen Werte. Insgesamt waren die Reihe der Indizes vergleichbar mit den weiter oben beschriebenen, welche Patienten mit BCLC Stadium ≤ 2 und TNM Stadium > 2

einbeziehen. In dieser tendenziell noch weniger fortgeschrittenen Gruppe hier waren die positiv prädiktiven Werte niedriger und lagen unterhalb von 40%, teilweise unter 30%. Es zeigte sich diesbezüglich kein Vorteil für eine Kombination von Markern gegenüber einzelnen. Die negativ prädiktiven Werte lagen jedoch zwischen 94% und 97% und damit hoch.

3.5.2. Patienten mit oder ohne Zirrhose

Die Werte der AUROCs für μ TAS bei zirrhotischen Patienten waren relativ hoch. AFP lag bei einem Cut-off von 20 ng/ml bei 0,77. Für DCP konnte nur der empirische Wert ermittelt werden (0,68). Für AFP-L3 als einzelnen Tumormarker ergab sich eine Fläche von 0,71. Die Kurvenverläufe der Einzelmarker werden in Abb. 81. veranschaulicht. Bei der Kombination von zwei Markern wurde die AUC größer als für die Einzelmessungen und noch größer für die Kombination aller drei Marker. Für AFP/DCP/AFP-L3 lag AUROC bei 0,83 (AFP \geq 20 ng/ml) bzw. 0,85 (AFP \geq 10 ng/ml), während die Werte im LiBASys unter 0,80 blieben (vgl. Abb. 82).

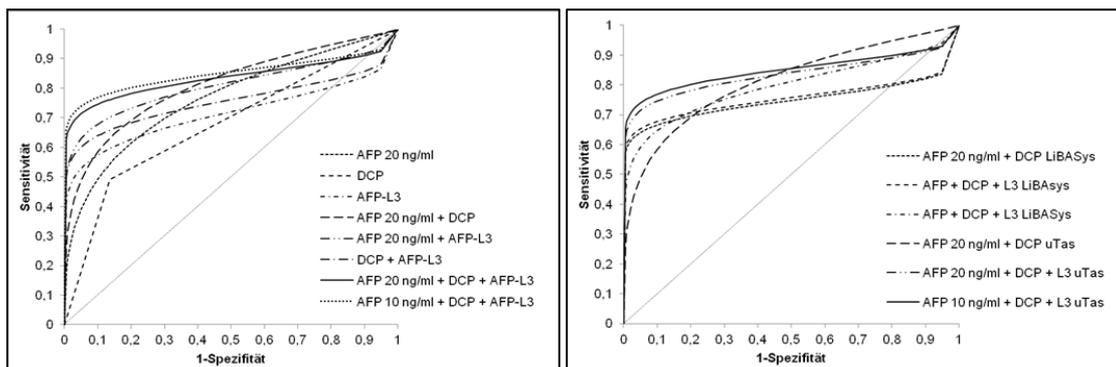


Abb. 81 und Abb. 82: Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker (links) sowie verschiedener Kombinationen (rechts) für Patienten mit Zirrhose

Der Youden-Index stieg auch hier mit der Anzahl der eingesetzten Marker. Die höchsten Indizes gab es für Kombination der drei Tumormarker im μ TAS bei einem Cut-off für AFP \geq 20ng/ml (0,55). Sowohl im μ TAS als auch im LiBASys fiel J in besagter Kombination etwas niedriger aus, wenn die Grenze für AFP auf \geq 10 ng/ml herabgesetzt wurde (0,46 bzw. 0,48). Ein im Vergleich mit den anderen Werten hoher Index von 0,54 ergab sich auch mit der Kombination aus AFP und AFP-L3 (μ TAS) (Tab. 18). Die für Patienten mit Leberzirrhose errechneten negativ prädiktiven Werte konnten gesteigert werden, wenn Tumormarker kombiniert wurden. Die beste Vorhersage diesbezüglich ergab AFP/DCP/AFP-L3 mit 72,6% für AFP \geq 20 ng/ml und 72,9% für AFP \geq 10 ng/ml im μ TAS. Die gleichen Kombinationen ergaben im LiBASys 64,7% und 65,3%. Die positiv prädiktiven Werte dazu lagen zumeist über 80%. Für die Kombination ergab sich kein Vorteil im Hinblick auf Kombinationen gegenüber Einzelmarkern.

Parameter	µTas, n=195								LiBASys, n=208		
	AFP (20 ng/ml)	DCP	L3	DCP + L3	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	AFP + DCP	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	51,8	49,1	59,6	69,3	71,9	72,8	79,8	83,3	70,4	71,2	73,6
Spezifität (%)	87,7	86,4	86,4	77,8	75,3	81,5	75,3	63,0	78,3	79,5	74,7
Genauigkeit (%)	66,7	64,6	70,8	72,8	73,3	76,4	77,9	74,9	73,6	74,5	74,0
ROC Area (emp)	0,704	0,678	0,724	0,724	0,744	0,781	0,768	0,727	0,743	0,744	0,744
ROC Area (calc)	0,766	n.a.	0,712	0,754	0,812	0,808	0,833	0,848	0,745	0,753	0,795
SDAbw	0,170	n.a.	0,042	0,039	0,058	0,034	0,033	0,033	0,058	0,059	0,036
unteres 95% KI	0,596	n.a.	0,671	0,715	0,754	0,774	0,800	0,815	0,686	0,695	0,759
oberes 95% KI	0,935	n.a.	0,754	0,792	0,869	0,842	0,866	0,880	0,803	0,812	0,831
pos. predictive Value	0,855	0,836	0,861	0,814	0,804	0,847	0,820	0,760	0,830	0,840	0,814
neg. predictive Value	0,563	0,547	0,603	0,643	0,656	0,680	0,726	0,729	0,637	0,647	0,653
positive Prävalenz	0,585	0,585	0,585	0,585	0,585	0,585	0,585	0,585	0,601	0,601	0,601
negative Prävalenz	0,415	0,415	0,415	0,415	0,415	0,415	0,415	0,415	0,399	0,399	0,399
LR+	4,211	3,610	4,382	3,122	2,911	3,935	3,231	2,251	3,244	3,473	2,909
LR-	0,550	0,589	0,468	0,395	0,373	0,334	0,268	0,265	0,378	0,362	0,353
LR+ gewichtet	5,927	5,081	6,168	4,393	4,097	5,538	4,547	3,169	4,886	5,231	4,381
LR- gewichtet	0,391	0,419	0,332	0,280	0,265	0,237	0,191	0,188	0,251	0,241	0,235
Youden Index (J)	0,395	0,355	0,460	0,471	0,472	0,543	0,551	0,463	0,487	0,507	0,483

Tab. 18: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit Zirrhose

Bei Patienten mit nicht-zirrhotoser Leber war AUROC insgesamt höher als für solche mit Zirrhose. Die Kombination von zwei Markern erwies sich, ausgehend von den empirischen Werten, als vorteilhaft gegenüber den Einzelmarkern AFP und AFP-L3 (siehe Abb. 83). AUROC lag für DCP als Einzelmarker bereits bei 0,84. Bei den errechneten Werten zeigte die Kombination aus drei Markern das beste Ergebnis mit µTAS. AUROC lag dort bei 0,93 bei AFP \geq 10 ng/ml. Der korrespondierende Wert aus dem LiBASys lag mit 0,81 darunter. Allerdings ergab sich dort mit 0,95 ein recht hoher Wert für AFP in Verbindung mit DCP (siehe Abb. 84).

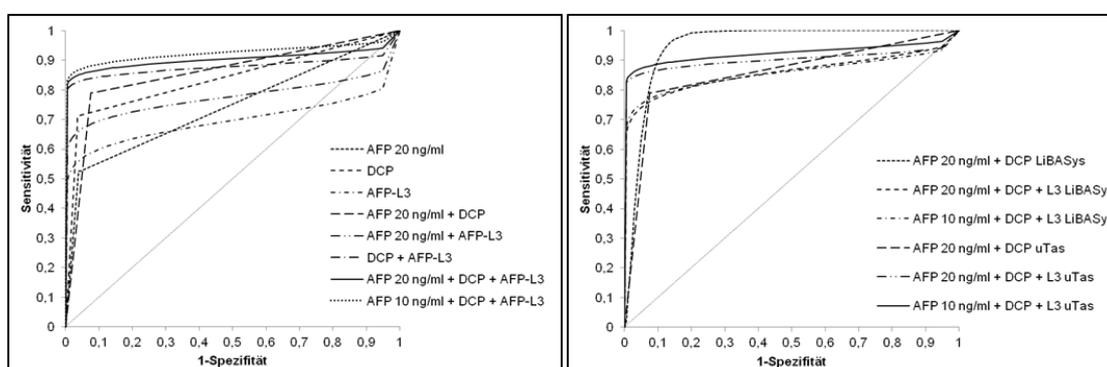


Abb. 83 und Abb. 84: Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker (links) sowie verschiedener Kombinationen (rechts) für Patienten ohne Zirrhose

Die positiv prädiktiven Werte lagen niedriger, wenn Patienten keine Leberzirrhose hatten. Die Kombination von mehreren Markern führte hier nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung der Leistung. Auf die besten Ergebnisse kamen AFP bzw. DCP mit 58,8% und 69,2% im µTAS. Im Vergleich dazu ergaben sich bei diesen Patienten für Einzelmarker sowie Kombinationen insgesamt hohe negativ prädiktive Werte zwischen 94% und 99% (siehe Tab. 19). Für die einzelnen Faktoren AFP und AFP-L3 war der Youden-Index niedriger als für die Kombinationen. Für DCP lag J mit 0,68 (und in Anlehnung an AUROC) deutlich darüber. Auch die Kombination

DCP/AFP-L3 lieferte ein vergleichsweise hohes Ergebnis. Das beste Resultat für J lieferte AFP/DCP/AFP-L3 bei AFP ≥ 20 ng/ml (0,76) mit μ Tas. LiBASys zeigte den höchsten Wert mit der gleichen Kombination, jedoch bei AFP ≥ 10 ng/ml (0,74).

Keine Zirrhose	μ Tas, n=372								LiBASys, n=385		
	AFP (20 ng/ml)	DCP	L3	DCP + L3	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	AFP + DCP	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	52,6	71,1	57,9	84,2	78,9	68,4	86,8	89,5	76,9	76,9	79,5
Spezifität (%)	95,8	96,4	92,5	89,8	92,2	91,6	88,9	84,7	93,4	93,4	91,9
Genauigkeit (%)	91,4	93,8	89,0	89,2	90,9	89,2	88,7	85,2	91,7	91,7	90,6
ROC Area (emp)	0,742	0,837	0,700	0,848	0,857	0,761	0,863	0,866	0,863	0,851	0,843
ROC Area (calc)	n.a.	n.a.	0,694	0,878	n.a.	0,774	0,903	0,925	0,952	0,860	0,857
SDAbw	n.a.	n.a.	0,069	0,050	n.a.	0,062	0,045	0,039	0,013	0,050	0,051
unteres 95% KI	n.a.	n.a.	0,625	0,827	n.a.	0,712	0,858	0,886	0,938	0,809	0,806
oberes 95% KI	n.a.	n.a.	0,763	0,928	n.a.	0,836	0,947	0,963	0,965	0,910	0,908
pos. predictive Value	0,588	0,692	0,468	0,485	0,536	0,481	0,471	0,400	0,566	0,566	0,544
neg. predictive Value	0,947	0,967	0,951	0,980	0,975	0,962	0,983	0,986	0,973	0,973	0,976
positive Prävalenz	0,102	0,102	0,102	0,102	0,102	0,102	0,102	0,102	0,101	0,101	0,101
negative Prävalenz	0,898	0,898	0,898	0,898	0,898	0,898	0,898	0,898	0,899	0,899	0,899
LR+	12,524	19,750	7,720	8,255	10,115	8,143	7,820	5,850	11,652	11,652	9,815
LR-	0,495	0,300	0,455	0,176	0,229	0,345	0,148	0,124	0,247	0,247	0,223
LR+ gewichtet	1,425	2,247	0,878	0,939	1,151	0,926	0,890	0,666	1,313	1,313	1,106
LR- gewichtet	4,349	2,635	4,000	1,546	2,011	3,032	1,305	1,090	2,194	2,194	1,979
Youden Index (J)	0,484	0,675	0,504	0,740	0,711	0,600	0,757	0,703	0,703	0,714	0,742

Tab. 19: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten ohne Zirrhose

3.5.3. Unterschiedliche Grade der Lebererkrankung

Bei Vorliegen einer stärker eingeschränkten Leberfunktion (Child B oder C) war die AUC kleiner als bei weniger stark geschädigter Leber (Child A) (vgl. Abb. 85 und 86). Im ersten Fall erwies sich die Kombination der drei Tumormarker mit AFP ≥ 10 ng/ml als Schwellenwert als die erfolgreichste Messung (0,83). Der Vergleichswert mit LiBASys lag bei 0,71 (siehe Tab. 21). Patienten mit Child A hatten mit derselben Variante bei beiden Cut-offs für AFP eine AUC von 0,86 (LiBASys: 0,87). Die Kombination der drei Marker war damit, unabhängig vom Child Status, die effektivste Variante.

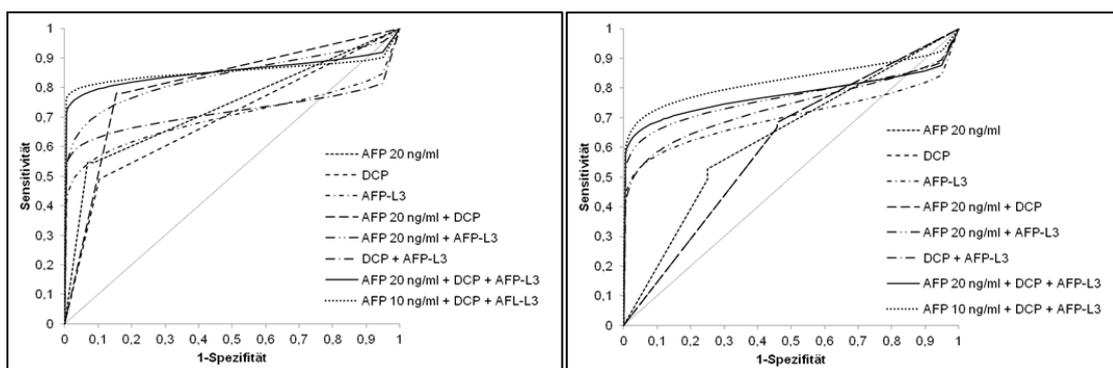


Abb. 85 und Abb. 86: Vergleich der ROC AUC von Patienten mit Child A (links) sowie Child B/C (rechts)

Diese Aussage ließ sich bei Betrachtung der Youden Indizes bestätigen. Für Kombinationen von Tumormarkern war J höher und noch größer für drei Marker, verglichen mit der Kombination aus

nur zwei Markern. Ebenso höher war J bei weniger eingeschränkter Leberfunktion und allgemein für μ TAS im Vergleich zu LiBASys (siehe Tab. 20 und 21). Es konnte kein Vorteil hinsichtlich eines Markers oder einer Kombination von Markern im Bezug auf den positiv prädiktiven Wert gezeigt werden. Die erreichten Werte lagen zwischen 78% und 87%, unabhängig vom Child-Status. Hinsichtlich des negativ prädiktiven Wertes ergab die Verbindung von Markern eine Verbesserung für Patienten mit Child A bis auf 83,6% für AFP \geq 10ng/ml zusammen mit DCP und AFP-L3. Eine Tendenz zu höheren negativ prädiktiven Werten bei der Kombination von Faktoren konnte für Patienten mit Child B/C ebenso gezeigt werden. Allerdings lag der höchste Wert mit 52,6% deutlich unter dem von Patienten mit Child Status A.

Child A	μ Tas, n=113								LiBASys, n=122		
	AFP (20 ng/ml)	DCP	L3	DCP + L3	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	AFP + DCP	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	54,5	49,1	52,7	63,6	78,2	70,9	80,0	81,8	74,6	76,2	76,2
Spezifität (%)	91,4	89,7	93,1	87,9	82,8	87,9	87,9	87,9	86,4	86,4	79,7
Genauigkeit (%)	73,5	69,9	73,5	76,1	80,5	79,6	84,1	85,0	80,3	81,1	77,9
ROC Area (emp)	0,734	0,694	0,736	0,735	0,811	0,823	0,831	0,833	0,806	0,815	0,797
ROC Area (calc)	n.a.	n.a.	0,699	0,716	n.a.	0,837	0,855	0,855	0,802	0,817	0,868
SDAbw	n.a.	n.a.	0,063	0,061	n.a.	0,046	0,046	0,047	0,076	0,074	0,045
unteres 95% KI	n.a.	n.a.	0,636	0,655	n.a.	0,791	0,809	0,808	0,726	0,743	0,823
oberes 95% KI	n.a.	n.a.	0,761	0,777	n.a.	0,882	0,901	0,902	0,878	0,890	0,913
pos. predictive Value	0,857	0,818	0,879	0,833	0,811	0,848	0,863	0,865	0,843	0,846	0,786
neg. predictive Value	0,679	0,650	0,675	0,718	0,800	0,761	0,823	0,836	0,775	0,786	0,773
positive Prävalenz	0,487	0,487	0,487	0,487	0,487	0,487	0,487	0,487	0,484	0,484	0,484
negative Prävalenz	0,513	0,513	0,513	0,513	0,513	0,513	0,513	0,513	0,516	0,516	0,516
LR+	6,337	4,767	7,638	5,256	4,547	5,860	6,612	6,760	5,485	5,603	3,754
LR-	0,498	0,567	0,508	0,414	0,263	0,331	0,228	0,207	0,294	0,275	0,299
LR+ gewichtet	6,009	4,520	7,243	4,984	4,311	5,556	6,270	6,411	5,137	5,247	3,515
LR- gewichtet	0,525	0,598	0,536	0,437	0,278	0,349	0,240	0,218	0,314	0,294	0,319
Youden Index (J)	0,459	0,388	0,458	0,515	0,610	0,588	0,679	0,697	0,610	0,626	0,559

Tab. 20: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit Child A

Child B/C	μ Tas, n=85								LiBASys, n=81		
	AFP (20 ng/ml)	DCP	L3	DCP + L3	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	AFP + DCP	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	50,9	49,1	66,7	73,7	66,7	75,4	78,9	84,2	66,7	65,0	70,0
Spezifität (%)	75,0	79,2	66,7	50,0	54,2	62,5	41,7	41,7	56,0	60,0	60,0
Genauigkeit (%)	58,0	58,0	66,7	66,7	63,0	71,6	67,9	81,6	63,5	63,5	67,1
ROC Area (emp)	0,634	0,641	0,649	0,625	0,609	0,680	0,604	0,638	0,613	0,610	0,631
ROC Area (calc)	n.a.	n.a.	0,701	0,736	n.a.	0,768	0,776	0,825	n.a.	n.a.	0,705
SDAbw	n.a.	n.a.	0,059	0,064	n.a.	0,055	0,061	0,059	n.a.	n.a.	0,062
unteres 95% KI	n.a.	n.a.	0,642	0,672	n.a.	0,713	0,716	0,767	n.a.	n.a.	0,643
oberes 95% KI	n.a.	n.a.	0,760	0,800	n.a.	0,823	0,837	0,884	n.a.	n.a.	0,767
pos. predictive Value	0,829	0,848	0,826	0,778	0,776	0,827	0,763	0,774	0,784	0,796	0,808
neg. predictive Value	0,391	0,396	0,457	0,444	0,406	0,517	0,455	0,526	0,412	0,417	0,455
positive Prävalenz	0,704	0,704	0,704	0,704	0,704	0,704	0,704	0,704	0,706	0,706	0,706
negative Prävalenz	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296	0,294	0,294	0,294
LR+	2,036	2,361	2,003	1,474	1,456	2,011	1,353	1,444	1,516	1,625	1,750
LR-	0,655	0,643	0,499	0,526	0,614	0,394	0,506	0,379	0,595	0,583	0,500
LR+ gewichtet	4,836	5,606	4,757	3,501	3,459	4,775	3,214	3,430	3,638	3,900	4,200
LR- gewichtet	0,276	0,271	0,210	0,221	0,259	0,166	0,213	0,160	0,248	0,243	0,208
Youden Index (J)	0,259	0,283	0,334	0,237	0,209	0,379	0,206	0,259	0,227	0,250	0,300

Tab. 21: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit Child B/C

Bei einer Aufteilung nach MELD ergaben sich hohe AUROCs für die Kombination von Markern. Jedoch zeigte sich in Patienten mit MELD \leq 10 speziell für die Kombination von drei Markern keine größere Fläche (siehe Abb. 87). Die Verläufe sind jedoch unterschiedlich. Die höchsten Werte

lieferten die Kombinationen AFP/DCP und AFP/AFP-L3 mit jeweils 0,93 (μ TAS). Für Patienten mit höherem MELD-Score ließ sich von einer Steigerung der AUC durch die Kombination von Markern ausgehen (vgl. Abb. 88). Allerdings sind die meisten der dargestellten Kurven empirisch, die höchsten jedoch errechnet und damit nicht direkt vergleichbar. So ergab sich für Patienten mit MELD >10 ein maximaler Wert von 0,87 für AFP \leq 10 ng/ml mit DCP und AFP-L3 (μ TAS).

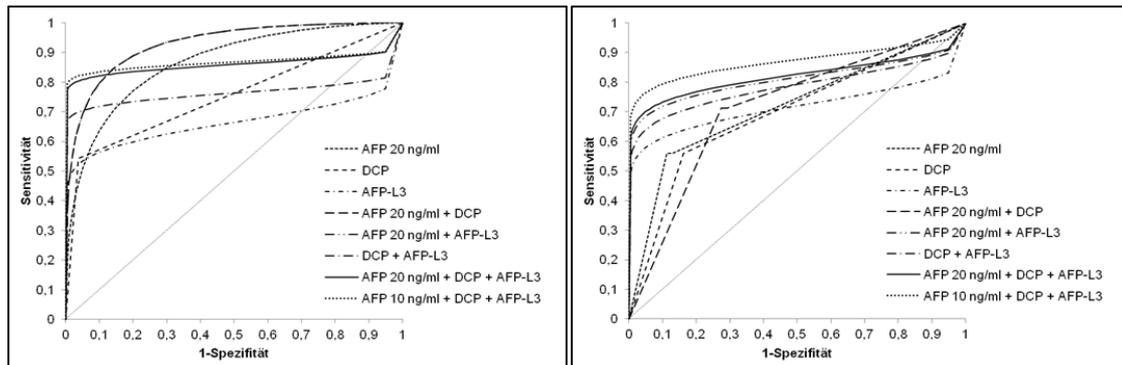


Abb. 87 und Abb. 88: Vergleich der ROC AUC von Patienten mit MELD \leq 10 (links) sowie MELD >10 (rechts)

Der Youden Index stieg für die Kombination von Markern bei Patienten mit MELD \leq 10 und war am größten für AFP (\geq 20 ng/ml) mit DCP und AFP-L3 im μ TAS (0,72). Für Patienten mit MELD >10 war J mit 0,57 am höchsten für die Kombination aus AFP und AFP-L3 (siehe Tab. 22 und 23). Für die Patienten mit MELD \leq 10 führte die Kombination von Markern zu einem tendenziell kleineren positiv prädiktiven Wert. Hinsichtlich des negativ prädiktiven Wertes führte die Addition von Markern zu einem geringen Zuwachs auf bis zu 95,0% für AFP/DCP/AFP-L3 (μ TAS, AFP \geq 20 ng/ml).

Parameter	μ Tas, n=449							LiBASys, n=467				
	AFP (20 ng/ml)	DCP	L3	DCP + L3	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	AFP + DCP	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	
Sensitivität (%)	48,9	54,3	53,2	71,3	75,5	75,5	81,9	84,0	73,3	74,3	76,2	
Spezifität (%)	95,5	96,3	93,0	91,0	92,1	91,8	90,1	84,5	93,4	93,4	91,8	
Genauigkeit (%)	85,7	87,5	84,6	86,9	88,6	88,4	88,4	84,4	89,1	89,3	88,4	
ROC Area (emp)	0,727	0,753	0,688	0,765	0,844	0,777	0,836	0,820	0,837	0,833	0,834	
ROC Area (calc)	0,867	n.a.	0,661	0,762	0,929	0,929	0,858	0,866	0,924	0,848	0,853	
SDAbw	0,136	n.a.	0,046	0,042	0,051	n.a.	0,034	0,034	0,040	0,034	0,032	
unteres 95% KI	0,731	n.a.	0,616	0,719	0,879	n.a.	0,824	0,833	0,884	0,813	0,821	
oberes 95% KI	1,004	n.a.	0,707	0,804	0,980	n.a.	0,892	0,900	0,964	0,882	0,886	
pos. predictive Value	0,742	0,797	0,667	0,677	0,717	0,710	0,688	0,577	0,755	0,758	0,720	
neg. predictive Value	0,876	0,888	0,882	0,923	0,934	0,934	0,950	0,940	0,927	0,929	0,933	
positive Prävalenz	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,216	0,216	0,216	
negative Prävalenz	0,791	0,791	0,791	0,791	0,791	0,791	0,791	0,791	0,784	0,784	0,784	
LR+	10,867	14,676	7,600	7,922	9,557	9,207	8,273	5,419	11,106	11,258	9,293	
LR-	0,535	0,475	0,503	0,315	0,266	0,267	0,201	0,189	0,286	0,275	0,259	
LR+ gewichtet	2,877	3,886	2,012	2,098	2,531	2,438	2,191	1,435	3,065	3,107	2,564	
LR- gewichtet	2,021	1,792	1,900	1,191	1,005	1,008	0,759	0,715	1,036	0,997	0,939	
Youden Index (J)	0,444	0,506	0,462	0,623	0,676	0,673	0,720	0,685	0,667	0,677	0,680	

Tab. 22: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit MELD \leq 10

MELD > 10	μTas, n=121								LiBASys, n=129		
Parameter	AFP (20 ng/ml)	DCP	L3	DCP + L3	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)	AFP + DCP	AFP + DCP + L3 (20 ng/ml)	AFP + DCP + L3 (10 ng/ml)
Sensitivität (%)	55,9	55,9	67,8	76,3	71,2	79,7	81,4	86,4	70,3	70,3	70,8
Spezifität (%)	87,1	83,9	82,3	67,7	71,0	77,4	64,5	58,1	73,8	75,4	73,4
Genauigkeit (%)	71,9	70,2	75,2	71,9	71,1	78,5	72,7	71,9	72,1	72,9	72,1
ROC Area (emp)	0,720	0,699	0,699	0,705	0,717	0,765	0,715	0,714	0,726	0,722	0,725
ROC Area (calc)	n.a.	n.a.	0,715	0,784	n.a.	0,810	0,819	0,869	n.a.	n.a.	n.a.
SDAbw	n.a.	n.a.	0,055	0,050	n.a.	0,047	0,048	0,044	n.a.	n.a.	n.a.
unteres 95% KI	n.a.	n.a.	0,660	0,733	n.a.	0,763	0,772	0,825	n.a.	n.a.	n.a.
oberes 95% KI	n.a.	n.a.	0,770	0,834	n.a.	0,857	0,867	0,912	n.a.	n.a.	n.a.
pos. predictive Value	0,805	0,767	0,784	0,692	0,700	0,770	0,686	0,662	0,726	0,738	0,712
neg. predictive Value	0,675	0,667	0,729	0,750	0,721	0,800	0,784	0,818	0,716	0,721	0,730
positive Prävalenz	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,496	0,496	0,496
negative Prävalenz	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,504	0,504	0,504
LR+	4,333	3,472	3,831	2,362	2,455	3,527	2,293	2,062	2,683	2,858	2,662
LR-	0,506	0,526	0,391	0,350	0,406	0,406	0,288	0,234	0,402	0,394	0,398
LR+ gewichtet	4,124	3,304	3,645	2,248	2,336	3,356	2,182	1,962	2,642	2,814	2,621
LR- gewichtet	0,532	0,552	0,411	0,368	0,426	0,276	0,303	0,246	0,409	0,400	0,404
Youden Index (J)	0,430	0,398	0,501	0,440	0,422	0,571	0,459	0,445	0,441	0,457	0,442

Tab. 23: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit MELD >10

Die negativ prädiktiven Werte (vgl. Tab. 22) lagen allerdings schon für die Einzelmarker bei mindestens 87,6%. Auch bei Patienten mit MELD >10 zeigte sich ein Trend zu niedrigeren positiv prädiktiven Werten angesichts einer Kombination von Faktoren. Die höchsten Resultate ergaben sich für die Einzelmarker mit 76,7% bis 80,5%. Gleichzeitig kam es auch hier zu einem Anstieg des negativ prädiktiven Wertes, sobald mehrere Marker kombiniert wurden. Den besten Wert erreichte erneut die Kombination AFP/DCP/AFP-L3 (81,8%) mit AFP <10ng/ml (μTAS).

3.6. Korrelation der Tumormarker mit anderen Faktoren

In der zunächst linearen Regressionsanalyse zeigten sich in der Gruppe der HCC-Patienten Zusammenhänge zwischen GOT und GGT ($p=0,005$) sowie GOT und GPT ($p<0,001$), jedoch nicht zwischen GPT und GGT. Zusammenhänge zwischen den Transaminasen waren auch in vielen Subgruppen nachweisbar. Für HCC-Patienten gab es darüber hinaus eine Verbindung zwischen Bilirubin und GGT ($p=0,005$) und hoch signifikante Zusammenhänge zwischen Bilirubin und Kreatinin, INR und MELD sowie TNM und BCLC-Stadium. Zwischen den Tumormarkern und beiden Stagings konnte kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden.

In der Kontrollgruppe konnten hoch signifikante Zusammenhänge zwischen den Transaminasen untereinander, zwischen Bilirubin und den Transaminasen sowie Albumin, GOT und Bilirubin festgestellt werden. Weitere hoch signifikante Zusammenhänge bestanden zwischen MELD und GOT, Bilirubin, Albumin, Kreatinin und statistisch signifikante Verbindungen zwischen MELD und GGT ($p=0,049$), GPT ($p=0,026$) und INR ($p=0,001$). Da sich MELD aus Bilirubin, Kreatinin und INR errechnet, war diese Korrelation zwingend und wurde insofern bestätigt. In Abwesenheit eines HCCs war der Child Status mit GOT ($p=0,001$), INR ($p=0,003$) und hoch signifikant mit Bilirubin, Albumin und MELD verbunden. Zudem zeigte sich Abhängigkeiten zwischen dem Child

Status und AFP ($p < 0,0005$) sowie AFP-L3 ($p = 0,002$). Diese beiden Zusammenhänge ergaben sich nur mit LiBASys.

Die Aufteilung der Kohorten nach vorhandener oder nicht vorhandener Leberzirrhose zeigte für Patienten mit HCC keine Zusammenhänge hinsichtlich der Marker, ebenso nicht für Patienten mit Zirrhose in der Kontrollgruppe. Für Patienten der Kontrolle ohne Zirrhose ergab sich jeweils ein hoch signifikanter, jedoch schwacher Zusammenhang zwischen AFP und AFP-L3 mit GOT.

Eine Betrachtung von Patienten in frühen Stadien (BCLC ≤ 2 oder TNM ≤ 2) lieferte keine Korrelationen in Bezug auf die Tumormarker. Bei ausschließlicher Betrachtung von Patienten mit BCLC ≤ 2 zeigen sich in beiden Testsystemen signifikante bis hoch signifikante und zudem starke Zusammenhänge zwischen allen drei Markern und Kreatinin sowie MELD. Für Patienten mit BCLC > 2 zeigte sich mit μ TAS eine hoch signifikante Verbindung mit GOT.

Patienten mit HBV-Ätiologie und HCC zeigten mit LiBASys eine Korrelation zwischen DCP und GOT ($p = 0,001$) sowie im Trend zwischen DCP und GGT ($p = 0,063$). In der Messreihe mit μ TAS war DCP ebenfalls mit GOT vergesellschaftet ($p = 0,009$) und zudem mit Bilirubin ($p = 0,010$). Keiner dieser Zusammenhänge zeigte sich in der Gruppe der übrigen HCC-Patienten oder in der Kontrolle mit HBV-Ätiologie.

Für Patienten mit HCV-Hintergrund und HCC bestanden Trends zwischen DCP und GOT in beiden Testreihen (LiBASys: $p = 0,070$; μ TAS: $p = 0,067$). Für die verbleibende Kohorte mit HCC konnte dies nicht gezeigt werden. In der Kontrolle mit HBV ergaben sich statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen AFP (LiBASys) und GOT ($p = 0,005$), Bilirubin ($p = 0,002$) und Child Status ($p = 0,002$) sowie AFP-L3 (LiBASys) und GOT ($p = 0,012$), Bilirubin ($p = 0,005$) und Child Status ($p = 0,027$). DCP in dieser Gruppe war in beiden Systemen hoch-signifikant mit INR verbunden.

Im Gegensatz zu den Hepatitis-Infektionen zeigten Patienten mit Alkohol-Ätiologie oder NASH in dieser Auswertung keine Korrelation der Marker mit anderen Parametern, unabhängig vom HCC.

Patienten mit kryptogener Lebererkrankung wiesen hoch signifikante Zusammenhänge in beiden Systemen zwischen AFP und AFP-L3 einerseits und Kreatinin andererseits auf. Auch MELD war mit AFP (LiBASys: $p = 0,022$; μ TAS: $p = 0,010$) und AFP-L3 (LiBASys: $p = 0,062$; μ TAS: $p = 0,098$) korreliert. Die mit μ TAS gemessenen Werte für DCP waren zudem mit Bilirubin verknüpft ($p = 0,028$).

Hinsichtlich der Patienten jedweder anderen Ätiologie konnten für die HCC-Gruppe keine Zusammenhänge zwischen den Tumormarkern und anderen Faktoren gefunden werden. Allerdings gehen die Daten auf sehr wenige Patienten zurück (LiBASys: $n = 8$, μ TAS: $n = 6$). In der dazugehörigen Kontrollgruppe deuten die μ TAS-Daten auf eine Verbindung zwischen DCP und AFP-L3 hin ($p = 0,009$).

Angesichts dieser sehr heterogenen Gruppe und der nicht-normalen Verteilung der Messwerte müssen die Ergebnisse jedoch vorsichtig interpretiert werden und bedürfen weiterer Analysen (siehe Kapitel 3.7 bis 3.9).

3.7. Unabhängigkeit der Tumormarker

Mittels Fisher-Test zeigten sich eindeutige Abhängigkeiten zwischen allen drei Markern untereinander und in beiden Messverfahren (jeweils $p < 0,001$). Dies galt sowohl für die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Grenzen für AFP von 20ng/ml, AFP-L3 bei 10% und DCP von 7,5 ng/ml als auch für die ein Kapitel 3.5 ermittelten neuen Cut-offs (AFP $\geq 2,65$ ng/ml, DCP $\geq 1,45$ ng/ml; μ TAS: AFP $\geq 6,15$ ng/ml, DCP $\geq 0,69$ ng/ml und AFP-L3 $\geq 0,55$ ng/ml). Sowohl im LiBASys als auch im μ TAS folgten die Messwerte für AFP, DCP und AFP-L3 allerdings keiner Normalverteilung. Zudem gab es keine vollständige Überlappung bei positiven Markern (vgl. Kap. 3.3), und die Häufigkeiten unterschieden sich in den Kontingenztabellen.

Um besagter Verteilung der Daten gerecht zu werden, wurde das Bootstrap-Verfahren eingesetzt. Für beide Messgeräte ergaben sich dort hochsignifikante Abhängigkeiten für die drei Marker untereinander. Die Pearson-Korrelationen betrug im LiBASys 0,927 für AFP/AFP-L3, 0,295 für AFP/DCP und 0,182 für AFP-L3/DCP, sowie 0,770 für AFP/AFP-L3, 0,151 für AFP/DCP und 0,268 für AFP-L3/DCP im μ TAS. Angesichts eines Konfidenzintervalls von 95% sind die Marker in diesem Patientenkollektiv sehr wahrscheinlich nicht voneinander unabhängig (siehe Tab. 24).

		AFP LiBASys	AFP-L3 LiBASys	DCP LiBASys	AFP-L3 µTAS	AFP µTAS	DCP µTAS	
AFP LiBASys	Pearson-Korrelation	1	0,927**	0,295**	0,516**	0,491**	0,159**	
	Sig. (2-seitig)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
	N	570	570	570	570	570	570	
	Bootstrap*	Verzerrung	0	0,005	0,022	0,062	0,069	0,026
		Standardfehler	0	0,042	0,165	0,205	0,216	0,104
		95 % Konfidenz- intervall	Unterer	1	0,831	0,075	0,219	0,166
Oberer			1	0,993	0,717	0,92	0,964	0,445
AFP-L3 LiBASys	Pearson-Korrelation	0,927**	1	0,182**	0,348**	0,259**	0,163**	
	Sig. (2-seitig)	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
	N	570	570	570	570	570	570	
	Bootstrap*	Verzerrung	0,005	0	0,077	0,169	0,142	0,054
		Standardfehler	0,042	0	0,156	0,307	0,262	0,13
		95 % Konfidenz- intervall	Unterer	0,0831	1	0,073	0,144	0,067
Oberer			0,993	1	0,639	0,981	0,928	0,549
DCP LiBASys	Pearson-Korrelation	0,295**	0,182**	1	0,337**	0,305**	0,556**	
	Sig. (2-seitig)	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	
	N	570	570	570	570	570	570	
	Bootstrap*	Verzerrung	0,022	0,077	0	0	0,004	0,036
		Standardfehler	0,165	0,156	0	0,139	0,161	0,229
		95 % Konfidenz- intervall	Unterer	0,075	0,073	1	0,056	0,033
Oberer			0,717	0,639	1	0,6	0,65	0,944
AFP-L3 µTAS	Pearson-Korrelation	0,516**	0,348**	0,337**	1	0,770**	0,268**	
	Sig. (2-seitig)	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	
	N	570	570	570	570	570	570	
	Bootstrap*	Verzerrung	0,062	0,169	0	0	0,021	0,002
		Standardfehler	0,205	0,307	0,139	0	0,121	0,166
		95 % Konfidenz- intervall	Unterer	0,219	0,144	0,056	1	0,558
Oberer			0,92	0,981	0,6	1	0,974	0,636
AFP µTAS	Pearson-Korrelation	0,491**	0,259**	0,305**	0,770**	1	0,151**	
	Sig. (2-seitig)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	
	N	570	570	570	570	570	570	
	Bootstrap*	Verzerrung	0,069	0,142	-0,004	0,021	0	0,016
		Standardfehler	0,216	0,262	0,161	0,121	0	0,116
		95 % Konfidenz- intervall	Unterer	0,166	0,067	0,033	0,558	1
Oberer			0,964	0,928	0,65	0,974	1	0,437
DCP µTAS	Pearson-Korrelation	0,159**	0,163**	0,556**	0,268**	0,151**	1	
	Sig. (2-seitig)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
	N	570	570	570	570	570	570	
	Bootstrap*	Verzerrung	0,026	0,054	0,036	0,002	0,016	0
		Standardfehler	0,104	0,13	0,229	0,166	0,116	0
		95 % Konfidenz- intervall	Unterer	0,008	0,023	0,127	0,002	-0,004
Oberer			0,445	0,549	0,944	0,636	0,437	1

* Bootstrap-Ergebnisse beruhen auf 1000 Stichproben ** Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

Tab. 24: Korrelationen der Tumormarker im Bootstrapverfahren

3.8. Ausprägung und Genauigkeit der Tumormarker

Als Konsequenz aus der Verteilung der Messwerte wurde in einem weiteren Ansatz mittels geeigneteren Verfahren untersucht, ob sich die Marker in ihrer Ausprägung zwischen der HCC- und der Kontrollgruppe unterscheiden. Bei nicht normalverteilten Daten können z.B. das Mann-Whitney- und das Bootstrap-Verfahren eingesetzt werden. Ein unabhängiges Patientenkollektiv zur Validierung der Genauigkeit des Testverfahrens stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

Grundsätzlich waren die Messwerte der Marker jeweils höher in der HCC- als in der Kontrollgruppe (vgl. Kap. 3.2.1, Tab. 10). Zunächst wurden die Ausprägungen zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-Verfahren untersucht. Zwar ergaben sich in allen Fällen hochsignifikante Unterschiede in der Ausprägung der Marker zwischen HCC- und Kontrollgruppe, jedoch setzt der Test Varianzhomogenität voraus. Der Levene-Test auf Varianzhomogenität zeigte für alle drei Marker in beiden Testgeräten ungleiche Varianzen an, weswegen das Ergebnis aus dem Mann-Whitney-Verfahren nicht verlässlich war. Die robusteren, durch Bootstrap ermittelten Signifikanzniveaus zeigt Tab. 25. Signifikante Zusammenhänge konnten hier für AFP μ Tas ($p=0,030$) und AFP-L3 μ Tas ($p=0,024$) nachgewiesen werden.

	Mittelwertdifferenz	Bootstrap				
		Verzerrung	Standardfehler	Sig. (2-seitig)	95 % Konfidenzintervall	
					Unterer	Oberer
AFP LiBASys	-73.559.587	-355.599	28.152.256	0.073	-135.814.710	-26.586.875
AFP-L3 LiBASys	-444.841.345	-1.025.438	227.001.868	0.238	-992.774.416	-110.516.214
DCP LiBASys	-3.769.635	0.4851	1.227.408	0.075	-6.516.349	-1.680.653
DCP μ TAS	-2.617.221.035	33.769.884	1.039.754.069	0.068	-4.809.125.346	-796.894.318
AFP-L3 μ TAS	-2.456.599	-9.043	793.681	0.024	-4.182.498	-1.095.802
AFP μ TAS	-61.599.906	-679.564	19.495.427	0.030	-102.610.370	-27.508.654

Tab. 25: Bootstrap für Test bei unabhängigen Stichproben (basierend auf 1000 Proben)

Zuletzt ergab der Fisher-Test für alle Marker und mit beiden Testgeräten jeweils einen hochsignifikanten Zusammenhang ($p<0,001$) zwischen einem positiven Marker (Cut-offs: AFP \geq 20 ng/ml, DCP \geq 10 ng/ml, AFP-L3 \geq 10%) bzw. dem Auftreten eines HCCs. Auch der Einsatz der in Kapitel 3.4 über das Youden-Verfahren ermittelten Cut-offs (LiBASys: AFP \geq 2,65 ng/ml, DCP \geq 1,45 ng/ml, AFP-L3 \geq 10%; μ TAS: AFP \geq 6,15 ng/ml, DCP \geq 0,69 ng/ml, AFP-L3 \geq 0,55 ng/ml) führt zu solchen hochsignifikanten Ergebnissen mittels Fisher-Test.

3.9. Multivariate Analysen

Sämtliche Marker sowie das Vorhandensein eines HCCs wurden auch im Rahmen einer logistischen Regression untersucht. Die Tabellen 26 bis 28 zeigen die Zusammenhänge verschiedener der in diesem Patientenkollektiv untersuchten Parameter mit einer HCC-Erkrankung und den Biomarkern AFP, DCP und AFP-L3. Das Bestimmtheitsmaß nach Nagelkerke ergab in den meisten Fällen eine mittlere Modellgüte bei einer brauchbaren Modellanpassung (Hosmer-Lemeshow-Test nicht signifikant).

In einem ersten Ansatz wurde ein Modell gewählt, bei dem möglichst viele Variablen Eingang fanden („großes Modell“). Gemessene Variablen waren: Geschlecht, HBV, HCV, C2, AIH, PSC, NASH, Kryptogen, Andere Ätiologie, LZ, CHILd, GGT, GOT, GPT, Kreatinin, INR, MELD, DeRitis, Alter, Frühstadien, CLIP, Albumin, Bilirubin, μ TAS-Messung = vorhanden. Da diese Betrachtung das Tumorstadium sowie die Ätiologien NASH und kryptogen mit einschließt, befinden sich in diesem Modell ausschließlich Patienten mit einem HCC. Signifikante Einflüsse in diesem Modell können als besonders stark gelten, da sie sich gegen viele Variablen durchgesetzt haben.

Gerät	Zielvariable	Standard *					Ermittelt nach Youden ¹						
		Prädiktor	Exp (B)	p-Wert	R ²	n	Prädiktor	Exp (B)	p-Wert	R ²	n		
LiBASys	AFP	LZ	21,061	0,013	0,463	152	HCV	16,653	0,015	0,463	152		
		Child ²		0,050			NASH	14,622	0,037				
							LZ	24,968	0,026				
							Child ²	-	0,046				
							INR	150,365	0,026				
							Alter	0,935	0,013				
				CLIP ²	-	0,001							
		AFP-L3	LZ	27,442	0,070	0,431	152						
			Child		0,026								
			Alter	0,939	0,009								
	CLIP		-	0,002									
μ TAS	AFP	LZ	15,848	0,023	0,431	141							
		Alter	0,945	0,035									
		CLIP ²	-	0,120									
	AFP-L3	Child ²	-	0,017	0,366	141							
	DCP						MELD	0,672	0,031	0,333	141		

* AFP >20 ng/ml, DCP >7,5 ng/ml, AFP-L3 >10%

¹ LiBASys: AFP \geq 2,65 ng/ml, DCP \geq 1,45 ng/ml, AFP-L3 \geq 10%; μ TAS: AFP \geq 6,15 ng/ml, DCP \geq 0,69 ng/ml, Werte für AFP-L3 nicht aufgeführt

² Kategorialer Wert ohne Exp (B)

Tab. 26: Großes multivariates Modell für die Marker als Zielvariablen (Bestimmtheitsmaß nach Nagelkerke)

Innerhalb des großen Modells zeigt sich, dass die Chance für erhöhte AFP- und AFP-L3-Werte besonders hoch in Abwesenheit einer Leberzirrhose war und mit dem Alter sank. Im Hinblick auf die nach Youden ermittelten Cut-offs hatten zudem Patienten mit einer niedrigen Blutgerinnung und solche ohne HCV- oder NASH-Ätiologie eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit für einen erhöhten AFP-Wert und Patienten mit einem höheren MELD-Score eine geringere Chance für erhöhtes DCP.

Insgesamt zeigen sich auch Abhängigkeiten der Marker AFP und AFP-L3 vom Child- und vom CLIP-Score. Die Variablen sind jedoch kategorial, zudem enthält der CLIP-Score den Child-Status sowie den AFP-Wert, und der Child-Status wird von der Leberzirrhose bestimmt, diese Zusammenhänge sind daher schlüssig.

Anschließend wurde ein Modell ausgesucht, bei dem möglichst viele Patienten analysiert sowie HCC als Variable verwendet wurden („kleines Modell“, siehe Tab. 27). Gemessene Variablen waren: HCC, Geschlecht, HBV, HCV, C2, AIH, PSC, PBC, Andere Ätiologie, LZ, CHILD, GGT, GOT, GPT, Kreatinin, INR, MELD, DeRitis, Alter, CLIP, Albumin, Bilirubin, μ TAS-Messung = vorhanden).

Gerät	Cut-offs	Standard *				Ermittelt nach Youden ¹					
		Zielvariable	Prädiktor	Exp (B)	p-Wert	R ²	n	Prädiktor	Exp (B)	p-Wert	R ²
LiBASys	AFP	HCC	0,154	0,008	0,544	576	HCC	0,250	0,010	0,491	576
		C2	0,391	0,045			HCV	0,364	0,010		
		Kreatinin	0,390	0,014			C2	0,383	0,028		
		MELD	1,163	0,029							
		CLIP ²	-	0,001							
	AFP-L3 ¹	HCC	0,025	0,001	0,598	576					
		Child ²	-	0,041							
		Alter	0,948	0,007							
		CLIP ²	-	<0,001							
	DCP	HCC	0,118	0,002	0,524	573	HCC	0,124	<0,001	0,539	576
		HBV	3,332	0,006			HBV	2,260	0,027		
							INR	7,094	0,039		
Alter		1,029	0,023	Bilirubin			1,223	0,041			
μ TAS	AFP	HCC	0,127	0,002	0,485	551	HCC	0,246	0,010	0,463	551
		Kreatinin	0,466	0,025							
		MELD	1,144	0,040							
		CLIP ²	-	0,012							
	AFP-L3	HCC	0,296	0,053	0,460	552	HCC	0,217	0,006	0,530	551
		Albumin	0,499	0,018			HCV	0,475	0,027		
	DCP	HCC	0,116	0,001	0,508	551	HCC	0,138	0,001	0,566	551
							HBV	2,744	0,010		
							GGT	1,002	0,014		
							Alter	1,024	0,026		
		Kreatinin	0,497	0,007							
MELD		1,148	0,019								
Albumin	0,557	0,050									

*AFP >20 ng/ml, DCP>7,5 ng/ml, AFP-L3>10%

¹ LiBASys: AFP≥2,65 ng/ml, DCP≥1,45 ng/ml, AFP-L3≥10%; μ TAS: AFP≥6,15 ng/ml, DCP≥0,69 ng/ml, Werte für AFP-L3 nicht aufgeführt

² Kategorialer Wert ohne Exp (B)

Tab. 27: Kleines multivariates Modell für die Marker als Zielvariablen (Bestimmtheitsmaß nach Nagelkerke)

In dem kleinen Modell zeigte sich, dass sämtliche Marker signifikant häufiger zusammen mit einem HCC auftreten. Je nach Wahl der Cut-offs zeigten sich weitere Einflüsse auf die Biomarker. Bei einem Cut-off von 20ng/ml zeigte sich auch hier der Zusammenhang zwischen AFP und CLIP.

Im LiBASys war die Chance auf einen erhöhten AFP-Wert (Cut-off bei 20 ng/ml) höher für Patienten mit Alkohol-Ätiologie, niedrigem Kreatinin sowie hohem MELD-Score.

Bei dem über das Youden-Verfahren ermittelten Cut-off für AFP von 2,65 ng/ml zeigt sich eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen positiven Marker bei HCV- und bei Alkohol-Ätiologie. Die dazu ermittelten p-Werte betragen $p=0,010$ bzw. $p=0,028$. Trotzdem ist das Ergebnis als Trend zu werten, da das Modell an der Stelle nicht aussagekräftig genug ist (Hosmer-Lemeshow-Test signifikant, $p=0,010$).

AFP-L3 stand im Zusammenhang mit dem Child-Status. Zudem hatten ältere Patienten eine geringere Chance für einen erhöhten AFP-L3-Wert. Patienten ohne HBV-Ätiologie hatten im LiBASys eine geringere Wahrscheinlichkeit für einen positiven DCP-Wert. Ein erhöhter DCP-Wert stand bei einem Cut-off von 1,45 ng/ml auch im Zusammenhang mit höheren Werten für INR und Bilirubin. Bei einem Cut-off von 7,5 ng/ml stieg die Wahrscheinlichkeit für einen positiven DCP-Wert mit dem Alter der Patienten an.

Bei den Messungen mit dem μ TAS war die Chance auf einen erhöhten AFP-Wert ebenfalls geringer bei erhöhten Kreatinin und höher bei höherem MELD-Score. AFP-L3 war für Patienten mit höheren Albumin-Werten seltener positiv. Mit über das Youden-Verfahren bestimmten Cut-offs waren Patienten ohne HCV-Erkrankung seltener positiv hinsichtlich AFP-L3. Die Wahrscheinlichkeit für einen erhöhten DCP-Wert stieg mit ebenfalls mit dem MELD-Score und wurde geringer bei einem Anstieg von Kreatinin oder Albumin. Bei einem Cut-off von 0,69 ng/ml für DCP stieg die Chance für einen positiven DCP-Wert zusammen mit dem Alter und mit GGT, jedoch minimal. Patienten mit HBV hatten auch bei diesem niedrigeren Cut-off seltener DCP erhöht.

Zuletzt wurde ein Modell gebildet, bei dem schrittweise Variablen mit hohem Erklärungswert für ein HCC aufgenommen wurden („Abschlussmodell“, siehe Tab. 28).

Cut-offs		Standard *				Ermittelt nach Youden ¹				
Prädiktor	Exp (B)	p-Wert	R ²	n	Prädiktor	Exp (B)	p-Wert	R ²	n	
Andere Ätiologie	20,714	0,026	0,996	548	Andere Ätiologie	24,494	0,025	0,924	551	
Alter	1,097	0,002			Alter	1,086	0,002			
					AFP-L3 positiv ³	0,045	0,005			
DCP positiv ²	0,035	<0,001			DCP positiv ³	0,085	<0,001			
AFP positiv ²	0,167	0,030								
LZ	0,075	<0,001								
MELD	0,705	0,034								

* AFP >20 ng/ml, DCP >7,5 ng/ml, AFP-L3 >10%

¹ LiBASys: AFP \geq 2,65 ng/ml, DCP \geq 1,45 ng/ml, AFP-L3 \geq 10%; μ TAS: AFP \geq 6,15 ng/ml, DCP \geq 0,69 ng/ml, Werte für AFP-L3 nicht aufgeführt

² μ TAS

³ LiBASys

Tab. 28: Abschlussmodell (Bestimmtheitsmaß nach Nagelkerke)

Die Variablen im Endmodell waren: AIH, „Andere Ätiologie“, LZ, MELD, Alter, CLIP, AFP-L3 erhöht, AFP erhöht, DCP erhöht (Youden Cut-offs), bzw. AIH, Andere Ätiologie, LZ, MELD, Alter, CLIP, AFP-L3 erhöht, AFP μ TAS erhöht, DCP μ TAS erhöht (Standard Cut-offs). Das Modell für

die nach Youden ermittelten Cut-offs für Marker wurde in 11 Schritten gebildet, wobei ein Bestimmtheitsmaß von 0,924 erreicht wurde. Für die Standard-Cut-offs wurde die Prozedur nach 9 Schritten gestoppt, da jede weitere Variable zu einem vorherigen Szenario führte. Das Bestimmtheitsmaß lag bei 0,996. Die Modellgüte ist in beiden Fällen also sehr hoch.

Das Auftreten eines HCCs ist im Abschlussmodell signifikant häufiger bei höherem Alter. Mit Cut-offs für AFP von 20 ng/ml und 7,5 ng/ml für DCP war die Wahrscheinlichkeit für ein HCC 5,99 mal höher, wenn AFP positiv war ($p=0,030$) und 28,8 mal höher im Fall von einem positiven Wert für DCP ($p<0,001$). In Abwesenheit einer Zirrhose, bei Vorliegen „anderer Ätiologie“ oder bei einem hohem MELD-Score hatten Patienten eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit auf ein vorhandenes HCC. Sofern Cut-offs von 6,15 ng/ml für AFP und 0,69 ng/ml für DCP verwendet wurden, war die Wahrscheinlichkeit für ein HCC 22,2 Mal höher bei einem positiven Wert für AFP-L3 ($p=0,005$) und 11,8 Mal höher bei erhöhtem DCP-Wert ($p<0,001$).

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination der drei Tumormarker AFP, DCP und AFP-L3 die Sensitivität für die Diagnose eines HCCs erhöht. Dies galt auch für Patienten in frühen Tumorstadien.

Im klinischen Alltag und Umgang mit einer Krebserkrankung haben Sensitivität und Spezifität nicht den gleichen Stellenwert. Generell würde bei einer vorliegenden HCC-Erkrankung ein falsch negatives Ergebnis durch die sich ergebenden Konsequenzen für Patienten schädliche Auswirkungen haben, u.a. durch eine potenzielle Therapieverzögerung. Im Falle eines falsch positiven Resultats müssten weitere Testverfahren das Ergebnis zunächst validieren. Die in dieser Arbeit untersuchten Tumormarker AFP, DCP und AFP-L3 waren für Patienten mit einem HCC signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Auch die Erhöhung in Bezug auf die jeweils gewählten Schwellenwerte war im Fisher's exact Test für alle drei Marker statistisch signifikant. Dabei stieg die Sensitivität von AFP mit sinkendem Cut-off. Sie betrug für 200 ng/ml, 20 ng/ml und 10 ng/ml 30,7%, 51,6% und 61,7% (μ TAS). Ähnliche Sensitivitäten konnten in Einzelmessungen mit DCP und AFP-L3 erzielt werden (54,9% und 58,8%, μ TAS). Angesichts dieser relativ niedrigen Werte waren alle drei Parameter für sich genommen als Tumormarker ungeeignet und kein Faktor den anderen überlegen. Ein durch die Ergebnisse einer großen Studie (Marerro et al., 2009) nahe gelegter Vorteil von AFP gegenüber DCP konnte im Hinblick auf die Sensitivität nicht bestätigt, die diesbezüglichen Resultate der Studie von Ertle et al. hingegen untermauert werden (Ertle et al., 2013). DCP ist bei fortgeschrittenen Gruppen häufiger anzutreffen und gilt daher als weniger spezifisch. Für die Anwendung ist die Spezifität in frühen Stadien aufgrund der Möglichkeit zur Heilung wichtiger.

Absolut betrachtet zeigte μ TAS 10,3% mehr positive Fälle als das LiBASys an (83,0% vs. 72,7%). Dabei ist die Überschneidung der positiven Signale für AFP und DCP recht groß. Erhöhte Werte wurden in 92,6% für AFP und in 82,1% für DCP in beiden Systemen angezeigt. Leichte Abweichungen kommen unter anderem durch 12 Patienten (7,2%) zu Stande, die nur mit LiBASys untersucht wurden und für welche die Werte im μ TAS nicht vorliegen. Fünf dieser Patienten waren dreifach negativ. Ein Patient hatte AFP und AFP-L3 erhöht, die übrigen sechs Patienten waren dreifach positiv. Die Verteilung der Parameter weicht vom Gesamtkollektiv ab. Dort ist im LiBASys jeweils nur etwa ein Viertel entweder für alle drei Werte positiv oder vollständig negativ. Unterschiede im Bereich rund um die Grenzwerte, bei denen im einen System ein Wert gerade positiv, im anderen knapp negativ, fallen hier kaum ins Gewicht. Sie treten bei DCP mit einem Grenzwert von 7,5 ng/ml lediglich in vier Fällen, bei AFP mit einem Grenzwert von 20 ng/ml nur bei einem einzigen Patienten auf. Hieraus resultiert die relative Vergleichbarkeit der Systeme bei diesem Patientenkollektiv hinsichtlich AFP und DCP. Die Auswertung der Messreihen mit dem Student's *t*-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen μ TAS und LiBASys in Bezug auf DCP als einzelner Faktor ($p=0,013$), der sich nicht durch überlappende Konfidenzintervalle erklären ließ. Allerdings verdeutlichen negative untere Intervallgrenzen und die dazugehörige grafische Betrachtung, dass die Werte keiner Normalverteilung folgen. Daher ist dieses Resultat mit Vorsicht zu interpretieren. Angesichts der Tatsache, dass der Unterschied innerhalb der Abweichungen der Messgeräte liegt (Produktinformationen LiBASys, μ TAS, Stand 2013), handelt es sich um eine Varianz im erwarteten Bereich.

Die Zusammenhänge der drei Tumormarker sind in kaukasischen Patientenkollektiven bislang kaum untersucht (Marrero et al., 2009; Sterling et al. 2009). Während AFP und AFP-L3 miteinander korrelieren, gehen beispielsweise Sterling et al. (Sterling et al. 2009) davon aus, dass AFP und DCP nicht in direktem Zusammenhang stehen. In der multivariaten Analyse ihrer Studie anhand von 372 Patienten, davon 74 mit HCC, zeigten sich AFP >20ng/ml, DCP >7,5ng/ml und AFP-L3 >10% als signifikant mit einem HCC assoziiert ($p=0,0269$, $p=0,0001$, $p=0,0005$). In dieser Analyse war DCP nicht von AFP ($p=0,1269$) oder AFP-L3 ($p=0,8701$) abhängig. Zwischen AFP und AFP-3 bestand ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,0127$). Die Aussagekraft der Studie ist laut Autoren jedoch durch die Patientenselektion und die zeitliche Begrenzung limitiert. Das Studiendesign unterscheidet sich von der vorliegenden Arbeit, so wird die HCC-Gruppe etwa nicht getrennt, dafür sämtliche Patienten im zeitlichen Verlauf betrachtet. Zudem kommt in der Studie das Mann-Whitney-Verfahren zum Einsatz, das Varianzhomogenität voraussetzt, die in der vorliegenden Arbeit nicht gegeben ist (Sterling et al. 2009). In der Studie von Marrero et al. mit 836 Patienten, davon 419 mit HCC, erwiesen sich (ohne Angabe der *p*-Werte) AFP (Odds Ratio 4.2; 95% CI: 3.0 –5.9) und DCP (Odds Ratio 3.0; 95% CI: 2.1– 4.2), jedoch nicht AFP-L3 (Odds

Ratio 1.1; 95% CI: 0.8 –1.7), als unabhängige Marker für ein HCC im Frühstadium (BCLC Stadien 0 und A) (Marrero et al., 2009).

In der vorliegenden Studie ergab sowohl der Fisher-Test als auch das Mann-Whitney-Verfahren für alle Marker und mit beiden Testgeräten jeweils einen hochsignifikanten Zusammenhang ($p < 0,001$) zwischen einem positiven Marker und einem HCC. Der Fischer-Test hängt allerdings von der Wahl der Cut-offs ab und der Mann-Whitney Test war bei den gegebenen ungleichen Varianzen wenig verlässlich. Mit dem Bootstrap-Verfahren konnten schließlich signifikante Zusammenhänge für AFP ($p = 0,030$) und AFP-L3 ($p = 0,024$) im μ TAS nachgewiesen werden. Mittels Fisher-Test zeigten sich in dieser Arbeit hochsignifikante Abhängigkeiten zwischen allen drei Markern untereinander und in beiden Messverfahren. Auch das Bootstrap-Verfahren ergab hochsignifikante Abhängigkeiten für die drei Marker untereinander. Für AFP und AFP-L3 ist ein Zusammenhang berichtet worden (Sterling et al. 2009). Im Fall von DCP betrug die Pearson-Korrelation im LiBASys 0,295 mit AFP und 0,182 mit AFP-L3 sowie 0,151 für AFP und 0,268 für AFP-L3 im μ TAS. Da es sich um einen signifikanten, jedoch schwachen Zusammenhang handelt und die Marker kombiniert eingesetzt werden, ist die klinische Relevanz einer Korrelation der Tumormarker AFP und DCP untereinander fraglich.

Ertle et al. konnten 2013 anhand von einer europäischen Patientenkohorte belegen, dass niedrigere Cut-offs zu einer höheren Sensitivität hinsichtlich AFP oder DCP führen und die Kombination von AFP und DCP den einzelnen Markern deutlich überlegen ist (Ertle et al., 2013). Dort konnten Sensitivitäten für die Serummarker in Kombination bis zu 78% erreicht werden (Cut-offs: AFP ≥ 10 ng/ml und DCP ≥ 5 ng/ml). Gleichzeitig war die Spezifität oberhalb von 90%. Die Ergebnisse decken sich mit der Empfehlung mehrerer Autoren zum kombinierten Einsatz der Marker (Malaguarnera et al., 2010; Marrero et al., 2009; Sterling et al., 2009). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich dazu eine relative Vergleichbarkeit der Systeme im Einsatz der Kombination aus AFP und DCP. LiBASys erkannte damit 72,3% und μ TAS 73,9% der Patienten richtig positiv.

AFP-L3 hat sich in der Vergangenheit als prädiktiver Marker für Patienten mit HCC erwiesen (Okuda et al., 1999). Verschiedene kürzlich publizierte Arbeiten demonstrierten den hohen diagnostischen Stellenwert von AFP-L3, insbesondere anhand von asiatischen Patienten und überwiegend bei niedrigen Serumwerten (Hanaoka et al., 2011; Kobayashi et al., 2011; Morimoto et al., 2011; Oda et al., 2011; Sterling et al., 2007; Sterling et al., 2009; Toyoda et al., 2011; Toyoda et al., 2012). Für Patienten mit AFP-Spiegeln < 20 ng/ml hat sich das konventionelle Messverfahren mit LiBASys in Bezug auf AFP-L3 (conventional, c-AFP-L3%) als weniger effektiv im Vergleich zum μ TAS gezeigt (high sensitive, hs-AFP-L3%) (Toyoda et al., 2011). Das LiBASys kann AFP ab 0,8 ng/ml bestimmen, aber gerätespezifisch wird AFP-L3 unterhalb von 10 ng/ml für Gesamt-AFP nicht angegeben. Auch in dieser Studie konnte ein allgemeiner Vorteil bezüglich

AFP-L3 für hs-AFP-L3 bei einem Cut-off von 10% demonstriert werden. Das μ TAS zeigte 65,6% häufiger AFP-L3 als erhöht an. 39 Patienten sind ausschließlich im μ TAS positiv für AFP-L3, während vier Patienten nur mit LiBASys, jedoch nicht mit μ TAS, erhöhte AFP-L3 Werte zeigten. So wurden mit der Kombination aus AFP und AFP-L3, bei einem Cut-off von 20 ng/ml bzw. 10%, mit dem LiBASys 49,7%, mit μ TAS jedoch 71,2% der Fälle richtig positiv erkannt. Damit wäre die Kombination AFP/AFP-L3 im μ TAS der Kombination AFP/DCP in beiden Systemen zumindest ebenbürtig. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass sich in dieser Arbeit eine bessere Effektivität von μ TAS hinsichtlich AFP-L3 schon bei einem vergleichsweise hohen Schwellenwert von AFP-L3, jedoch auch AFP (>20 ng/ml) ergab (Toyoda et al., 2011).

Die Kombination aller drei Marker führte zum besten Resultat im Spannungsfeld von Sensitivität und Spezifität. Die so erreichten Sensitivitäten lagen, mit einem Grenzwert von 20 ng/ml für AFP, bei 72,7% für LiBASys und 81,7% für μ TAS. Gleichzeitig lieferte diese Kombination noch hohe Spezifitäten (LiBASys: 90,7%; μ TAS: 86,3%). Bei einer Absenkung der Schwelle für AFP auf 10 ng/ml ergab sich eine weitere Steigerung der Sensitivität auf 75,2% (LiBASys) und 85,0% (μ TAS). Der Effekt führte zu einer Absenkung der Spezifität auf 88,6% (LiBASys) bzw. 80,6% (μ TAS). Das Ergebnis für die drei Tumormarker in Kombination korrespondiert grundsätzlich mit den von Sterling et al. publizierten Daten einer großen Studie in einem nordamerikanischen Patientenkollektiv (Sterling et al., 2007; Sterling et al., 2009). Dort lag die Sensitivität bei 77,0% und die Spezifität bei 59,4% für AFP (>20 ng/ml) zusammen mit DCP und AFP-L3. Neben unterschiedlichen Patientencharakteristika mag die bessere Leistungsfähigkeit des für die vorliegende Arbeit eingesetzten μ TAS zu den höheren Werten in der vorliegenden Studie beigetragen haben.

Wie eingangs erwähnt, kommt der frühen Detektion des HCCs aufgrund der eingeschränkten kurativen Möglichkeiten ein ganz besonderer Stellenwert zu. Hinzu kommt die Tatsache, dass der Behandlungsalgorithmus des HCCs zum großen Teil vom Staging abhängig ist. Mehrere Arbeiten konnten bislang den Wert von AFP-L3 als Tumormarker für HCC-Patienten in Frühstadien demonstrieren (Marrero et al., 2009; Moriya et al., 2013; Oda et al., 2011; Toyoda et al., 2011). Daher wurden in dieser Arbeit die Tumormarker in Bezug auf verschiedene Stadien untersucht. Für Patienten in den Stadien BCLC ≤ 2 oder TNM ≤ 2 (n=69) konnten mit der Kombination der drei Tumormarker im Vergleich zu AFP/DCP eine relative Verbesserung der Sensitivität um 18,1% auf 66,7%, bei einer Spezifität von 86,3%, erreicht werden. Bei einem Grenzwert für AFP >10 ng/ml wurde eine Sensitivität noch einmal auf 73,9% gesteigert, bei einer Spezifität von 80,6%. Für Patienten mit BCLC ≤ 2 (n=40) konnte die Sensitivität relativ um 36,4% auf 75,0% erhöht werden (AFP ≥ 10 ng/ml). Dies würde eine erhebliche Intensivierung zu der von Ertle et al. 2013 als Standardmethode bewährten Kombination aus AFP (≥ 10 ng/ml) und DCP (≥ 5 ng/ml) bedeuten,

mit der noch immer die Hälfte der Patienten in dieser wichtigen Subgruppe nicht detektiert werden konnten (Ertle et al., 2013).

Hanaoka et al. berichteten über den erfolgreichen kombinierten Einsatz von AFP-L3 und DCP in 241 Patienten mit verschiedenen chronischen Lebererkrankungen und niedrigem AFP-Serumspiegel (Hanaoka et al., 2011). Für das dortige Gesamtkollektiv betrug die Sensitivität 77,7% und die Spezifität 85,6%. Sterling et al. publizierten Ergebnisse zur Effektivität von AFP-L3 in Verbindung mit AFP bei Patienten mit HCV-Ätiologie und Zirrhose (Sterling et al., 2007). Bislang ist die Effektivität von AFP-L3 bzw. der Effekt der Kombination für Subgruppen kaum untersucht. Die vorliegende Arbeit bestand zu einem größeren Teil in der Auswertung der Daten der drei Tumormarker in verschiedenen Subgruppen. Die Verbindung aller drei Marker erwies sich als Verbesserung in sämtlichen hier betrachteten Kollektiven, einschließlich derer der im Rahmen dieser Arbeit nicht berichteten (etwa Unterscheidung nach weiteren Serumwerten oder auffälligen Tumormarkern). Die relativen Steigerungen der Sensitivität durch das Addieren von AFP-L3 zur Kombination aus AFP und DCP betragen für die weiteren hier näher beschriebenen Kollektive 11,0% auf 79,8% und 10,0% auf 86,8% für Patienten mit und ohne Zirrhose, 2,3% auf 80,0% für Patienten mit Child A, 18,3% auf 78,9% für die Child Stadien B oder C sowie 8,5% auf 81,9% und 14,3% auf 81,4% für Patienten mit MELD Score ≤ 10 bzw. > 10 . Für Patienten mit einer stärker geschädigten Leber bzw. fortgeschrittenen Grunderkrankung war der Effekt damit besonders deutlich. Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass AFP-L3 den Tumormarkern AFP und DCP ebenbürtig ist und dass die Kombination aller drei Faktoren in der Regel allen anderen Varianten vorzuziehen ist. Dieses Resultat ergab sich unabhängig vom Zirrhose- bzw. Leberfunktionsstatus, Alter, Geschlecht oder Ätiologie und ist von besonderer Bedeutung, da sich die hier ausgewerteten Patientencharakteristika von Studien mit asiatischen Patienten (Hanaoka et al., 2011; Kobayashi et al., 2011; Morimoto et al., 2011; Moriya et al., 2013; Oda et al., 2011; Toyoda et al., 2011) unterscheiden. Dort liegen ein besonders hoher Anteil HCV-Infektionen, erheblich weniger Fälle von ASH oder NASH sowie ein deutlich geringeres Durchschnittsalter und eine andere Geschlechterverteilung vor. Unterschiede existieren auch im Vergleich zu Arbeiten mit vorwiegend kaukasischen Patientenkollektiven, unter anderem durch ein geringeres Child-Stadium (Sterling et al., 2009), weniger Zirrhose-Anteil, späteres BCLC-Stadium (Marrero et al., 2009) und vor allem geringere Anzahl Hepatitis-Infektionen (Durazo et al., 2008; Marrero et al., 2009; Sterlin et al. 2007; Sterling et al., 2009). Die bisher vorliegenden Publikationen, wie die aus der HALT-C-Studie (Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis), zeigen einen Fokus auf Patienten mit Hepatitis C und frühe Stadien. Die HCC-Patienten in der vorliegenden Studie* hatten hingegen zu 18,2% eine HBV- bzw. zu 17,6% eine HCV-Erkrankung, jedoch in 21,2% der Fälle eine NASH, zu 13,9% Alkohol und zu 15,8% eine kryptogene Erkrankung als

* LiBASys, n=165

Ursache. Mehrere Faktoren gleichzeitig lagen für 8,5% der Patienten vor. Bei 4,8% war die Ursache eine andere oder unbekannt. Zurzeit existieren kaum Daten hinsichtlich einer besseren Anwendbarkeit eines der Tumormarker in den hier besprochenen Kohorten im Vergleich zu anderen (Ertle et al., 2013). Ein unabhängiges Patientenkollektiv zur Validierung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stand nicht zur Verfügung.

Bezüglich der vorliegenden Ursache der Krebserkrankung in dieser Arbeit war AFP vor allem für Patienten mit HBV oder NASH prominent, DCP dagegen für HBV- und HCV-Infektionen, Alkohol, kryptogene Erkrankungen und in geringerem Maße für NASH. AFP-L3 zeigte sich vermehrt bei HBV, Alkohol und besonders NASH als Grunderkrankung. Die Betrachtung der Patienten mit singularer Ätiologie mittels Student's *t*-Test lieferte jedoch keinen eindeutigen Aufschluss sondern unterstreicht den Nutzen des Tests mit allen drei Tumormarkern. Die veränderten Kontraste zu den Ergebnissen von Ertle et al. (Ertle et al., 2013) lassen sich prinzipiell durch die Verschiebung der Marker im Zusammenhang mit AFP-L3 und das andere Testsystem (μ TAS vs. LiBASys) erklären. Insgesamt wurden die Mittelwerte auch von Ausreißern beeinflusst. Die dazugehörigen Mediane für die Serumspiegel erwiesen sich als robuster und im Prinzip unauffällig.

Um die Einflüsse von verschiedenen unabhängigen Faktoren auf die Marker zu prüfen, wurde eine schrittweise logistische Regression durchgeführt. Bei der Betrachtung des Gesamtkollektivs zeigte sich, dass AFP, DCP und AFP-L3 in beiden Messgeräten immer signifikant häufiger bei einem HCC auftreten. Bei einem Grenzwert von 20 ng/ml für AFP (LiBASys) war die Chance für einen erhöhten Marker signifikant höher für Patienten mit Alkohol-Ätiologie ($p=0,045$). Gleiches galt bei niedrigen Kreatinin-Werten ($p=0,014$) und hohen MELD-Scores ($p=0,029$). Die Wahrscheinlichkeit für einen positiven AFP-L3-Wert war im LiBASys bei höherem Alter etwas geringer ($p=0,007$). DCP war in Abwesenheit einer HBV-Erkrankung im LiBASys öfter positiv ($p=0,006$), ebenso mit steigendem Alter ($p=0,023$). Mit dem μ TAS war die Chance für einen erhöhten AFP-Wert (≥ 20 ng/ml) ebenfalls höher bei niedrigem Kreatinin-Wert ($p=0,025$) und höherem MELD-Score ($p=0,019$). AFP-L3 war hier bei niedrigem Albumin-Wert seltener positiv ($p=0,018$). Schließlich stand auch ein positiver DCP-Wert in Verbindung mit niedrigem Kreatinin ($p=0,007$) und höherem MELD-Score.

Bei der Betrachtung der HCC-Patienten zeigte sich, dass Patienten mit Leberzirrhose eine wesentlich geringere Wahrscheinlichkeit für einen erhöhten AFP-Wert haben (LiBASys: $p=0,012$; μ TAS: $p=0,023$). Im Fall von LiBASys galt das auch für AFP-L3 ($p=0,026$). In beiden Messsystemen war ein positiver AFP-Wert mit einem etwas geringeren Alter verknüpft (LiBASys: $p=0,013$; μ TAS: $p=0,035$), im LiBASys zusätzlich AFP-L3 ($p=0,009$). Hinzu kamen Abhängigkeiten vom Child-Status und CLIP-Score, die jedoch von der Leberzirrhose und dem AFP-Wert beeinflusst werden.

Dieses Bild verschob sich z.T. in Richtung anderer Variablen, sobald die über das Youden-Verfahren ermittelten Cut-offs eingesetzt werden. Das galt sowohl für das gesamte Kollektiv als auch für die HCC-Gruppe.

Bei der schrittweisen Annäherung an ein Modell mit möglichst hohem Erklärungswert für ein vorliegendes HCC ergab höhere Wahrscheinlichkeiten bei höherem Alter ($p=0,002$) und höherem MELD-Score und deutlich höhere Wahrscheinlichkeiten bei Vorliegen einer Leberzirrhose ($p=0,075$) sowie positiven Werten für AFP ($p=0,030$) oder DCP ($p<0,001$). Das Bestimmtheitsmaß lag bei 0,996, was einer ausgesprochen hohen Modellgüte entspricht. Hierbei zeigte sich auch eine geringere Wahrscheinlichkeit für ein HCC für Patienten mit anderer Ätiologie ($p=0,026$). Letzteres Ergebnis ist jedoch haltlos, da formal der Anteil der Patienten in der HCC-Gruppe weit geringer als in der Kontrollgruppe war (3,9% vs. 45,3%), letztere in dieser Kategorie aber auch eine unbekannte Anzahl nicht zugeordneter Patienten mit NASH oder kryptogener Ätiologie enthielt. Wurden die über das Youden-Verfahren ermittelten Cut-offs eingesetzt, ergab sich ebenfalls ein Modell mit einem hohem Bestimmtheitsmaß (0,924). Höheres Alter blieb als signifikanter Faktor für ein HCC bestehen ($p=0,002$), jedoch ausdrücklich kein mit μ TAS gemessener Marker. In diesem Fall war die Wahrscheinlichkeit für ein HCC höher bei positiven Werten für DCP und AFP-L3 im LiBASys ($p<0,001$ und $p=0,045$).

Sterling et al. stießen in der multivariaten Analyse ebenfalls auf signifikante Zusammenhänge zwischen mehreren Variablen und einem HCC (Sterling et al., 2007). So stieg die Wahrscheinlichkeit für ein HCC mit dem Alter signifikant an ($p=0,043$). Erhöhtes AFP (>20 ng/ml) stand im Zusammenhang mit niedrigem Albumin (<3.0 g/dl, $p=0,0184$) und einem höheren Wert für GPT ($p=0,0007$). Marrero et al. fanden in ihrer logistischen Regression der bereits erwähnten Studie (Marrero et al., 2009) einen Zusammenhang zwischen vorliegender Virushepatitis und DCP ($p=0,04$, Odds Ratio nicht angegeben), während alle sonstigen untersuchten Variablen (Alter, Herkunft, Geschlecht) keinen signifikanten Einfluss auf die Marker hatten. Allerdings sind die Patientenkollektive beider Studien nicht direkt miteinander oder mit dem hier untersuchten vergleichbar. Insgesamt ergaben die multivariaten Ansätze in der vorliegenden Untersuchung kein einheitliches Bild. Sie reflektieren damit die Heterogenität des HCCs und zeigen zudem eine Anfälligkeit der Analysen für die Wahl der Cut-offs. Die Tatsache, dass sich keine prominenten, eindeutigen Abhängigkeiten, etwa von Tumor-Stadien, ergaben, unterstreicht daher erneut den Nutzen des Tests mit allen drei Tumormarkern.

Im Rahmen dieser Studie wurden über das Youden-Verfahren auch die optimalen Cut-offs für die Einzelmarker bestimmt. Diese lagen im LiBASys für AFP bei 2,65 ng/ml und für DCP bei 1,45 ng/ml, sowie im μ TAS für AFP bei 6,15 ng/ml, DCP bei 0,69 ng/ml und AFP-L3 bei 0,55 ng/ml und damit insgesamt niedriger als die bislang im klinischen Alltag verbreiteten Grenzen. Für das LiBASys ergab sich ein irrationaler Wert von 0,2843 ng/ml für AFP-L3, der jedoch durch die

Geräte-spezifische Limitierung des LiBASys lediglich ein Produkt des Selektionsbias ist. Daher wurde weiterhin mit einem Cut-off von 10% für AFP-L3 für beide Messgeräte gearbeitet. Der erfolgreiche Einsatz von niedrigen Cut-offs für die Marker AFP, DCP und AFP-L3 ist in Publikationen der jüngeren Vergangenheit belegt. (Hanaoka et al., 2011; Kobayashi et al., 2011; Morimoto et al., 2011; Oda et al., 2011; Sterling et al., 2007; Sterling et al., 2009; Toyoda et al., 2011; Toyoda et al., 2012). Für die einzelnen Marker in der vorliegenden Studie konnten so insbesondere mit dem μ TAS vergleichsweise hohe Sensitivitäten und Spezifitäten erreicht werden. Die Sensitivität lag für AFP bei 75,2% bei einer Spezifität von 83,5%. Für DCP ergaben sich analog dazu 77,8% und 87,3%. Die so erreichten Youden-Indizes lagen bei 0,587 für AFP und 0,651 für DCP und damit wesentlich höher als bei jedem anderen hier eingesetzten Cut-off. Die Kombination der Marker ergab eine Steigerung der Sensitivität auf bis zu 91,5% beim Einsatz aller drei Marker. Die Spezifität sank dabei jedoch auf 64,7% und damit deutlich unter das Niveau bei Cut-offs von beispielsweise 10 ng/ml für AFP und 7,5 ng/ml für DCP in der Dreierkombination (LiBASys: 88,6%, μ TAS: 80,6%). Auch der Youden-Index lag für die Kombination der Marker mit den errechneten Cut-offs in diesem Beispiel niedriger (LiBASys: 0,586 vs. 0,638; μ TAS: 0,562 vs. 0,656). Im klinischen Alltag wären mit dem μ TAS-Gerät anhand der errechneten Cut-offs im kombinierten Einsatz der Marker lediglich 13 Patienten (8,4%) falsch negativ angezeigt worden, jedoch 147 (35,2%) falsch positiv. Bei 10 ng/ml für AFP und 7,5 ng/ml für DCP als Grenze würden 23 Patienten (15,0%) falsch positiv und 81 Patienten (19,4%) als falsch negativ angezeigt werden. Der Einsatz der Marker mit solch niedrigen Cut-offs sollte daher weiter in klinischen Studien untersucht werden.

Angesichts der in der veröffentlichten Literatur sehr uneinheitlich gehandhabten Cut-offs (Hanaoka et al., 2011; Kobayashi et al., 2011; Morimoto et al., 2011; Oda et al., 2011; Toyoda et al., 2011; Toyoda et al., 2012; Singal et al., 2009; Sterling et al., 2007) für AFP-L3 bzw. AFP wurde auch die Praktikabilität einer Grenze für AFP-L3 von 10% evaluiert. Die Betrachtung war eng an die Nachweisgrenze von μ TAS für AFP gekoppelt. Die erhaltenen p-Werte ($p=1,0$) in den nicht korrelierten Analysen zeigten, dass es praktisch keinen Unterschied macht ob sämtliche Ergebnisse angesichts eines AFP-Werts von ≤ 3 ng/ml im Ergebnis als 0 oder als 0,2999 ng/ml angegeben werden. Daher erwies sich der Cut-off für AFP-L3 von 10% im klinischen Alltag als zweckmäßig. Dies gilt ausdrücklich in Verbindung mit den hier bewährten Konzentrationen von AFP >20 ng/ml bzw. 10 ng/ml und DCP $>7,5$ ng/ml.

Diverse Studien beschäftigen sich mit der Rolle von AFP-L3 in der Überwachung von Risikopatienten bzw. dem Überleben und der Rezidivrate unter HCC-Patienten (Kobayashi et al., 2011; Morimoto et al., 2011; Toyoda et al., 2011; Toyoda et al., 2012). Die Überlebensraten von Patienten nach einem, zwei oder drei Jahren lagen für solche ohne negative prognostische Faktoren nach einer Einteilung von Llovet et al. aus dem Jahr 1999 bei 80%, 65% und 50% und

für Patienten mit wenigstens einem negativen prognostischen Faktor bei 29%, 16% und 8% ($p=0,00001$) (Llovet et al., 1999).

Die aus den Messungen dieser Arbeit errechneten AUROC-Werte lagen höher in den Kombinationen als für die einzelnen Marker und tendenziell etwas höher für Messungen mit μ TAS im Vergleich zu LiBASys. AUROC war für AFP bei Grenzwerten von 20 ng/ml und 10 ng/ml sowie für DCP mit Werten um 0,800 relativ gut, jedoch war damit normalerweise auch eine hohe Standardabweichung verknüpft. Eine Ausnahme bildete hier AFP im μ TAS bei einem Cut-off von 10ng/ml (0,767 empirisch und 0,879 errechnet). Die höchsten Werte für AUROC ergaben sich insgesamt für die Kombinationen aus AFP und DCP sowie allen drei Markern. Für letztere lieferte LiBASys 0,824 sowie 0,838 und μ TAS 0,851 sowie 0,875 bei bei AFP >20 ng/ml bzw. >10 ng/ml. Vor diesem Hintergrund erwies sich die Kombination aus AFP, DCP und AFP-L3 als verlässliches Diagnoseverfahren (Bewick et al., 2004). In manchen Subgruppen (Patienten in Frühstadien oder mit eingeschränkter Leberfunktion) war AUROC generell kleiner. Zur besseren Unterscheidung wurde hier der Youden-Index herangezogen. Grundsätzlich lag J weder für die einzelnen Parameter, noch für die Kombinationen über 0,80, was analog zu AUROC für eine sehr verlässliche Methode gelten sollte. Die höchsten Werte für das Gesamtkollektiv wurden erwartungsgemäß mit der Kombination aller drei Tumormarker erzielt (LiBASys: 0,63; μ TAS: 0,68) Allerdings spiegelt dies vermutlich die Heterogenität der Erkrankung wieder, woraus die unterschiedliche Verteilung der drei hier untersuchten Parameter und damit die vergleichsweise hohe Anzahl einfach und mehrfach negativer Fälle von konkreten HCC-Patienten anhand der Resultate mit den hier eingesetzten Testsystemen resultiert. Weitere nicht-invasive, komplementäre Verfahren, etwa die Sonografie, könnten eingesetzt werden, um dies auszugleichen.

Die bisherigen Studien und das sich daraus ergebene Screening konzentrieren sich meist auf Patienten mit Hepatitis, bei denen dadurch vermehrt die Chance besteht, ein mögliches HCC früh zu entdecken. In dieser Studie befanden sich Patienten mit NASH tendenziell in weiter fortgeschrittenen Stadien. Daraus ließe sich die Konsequenz ableiten, Patienten mit NASH ebenso zu überwachen, wie andere Risikogruppen, etwa mit bestehender Hepatitis und Zirrhose. In 40,0% der HCC-Patienten mit NASH lag in dieser Studie keine Leberzirrhose vor. Aktuelle Empfehlungen westlicher Organisationen (AASLD (Bruix, Sherman, 2011) oder EASL–EORTC (Autorenkollektiv, 2012) zur Überwachung von Patienten konzentrieren sich zum einen auf Patienten mit hohem Risiko und distanzieren sich zum anderen vom Einsatz der hier untersuchten Serummarker, da ein großer Anteil der Patienten mit HCC unauffällige Werte für AFP aufweist. Eine umfangreiche Analyse der Universität Bologna (Trevisani et al., 2010) zum HCC in nicht zirrhotischen Lebern fasst zusammen, dass bei einem Cut-off für AFP von 20 ng/ml 33% bis 69% der nicht zirrhotischen vs. 16% bis 41% der zirrhotischen Patienten, bei denen ein HCC vorliegt,

AFP-Werte im Normbereich haben. Umgekehrt hatten in einer chinesischen Studie zur Früherkennung (Lok, Lai, 1989) von 44 Patienten mit erhöhtem AFP-Wert lediglich 6 Patienten (13,6%) ein HCC. Von den verbleibenden Patienten war in 18 Fällen die HBV-Erkrankung die Ursache, für die restlichen 20 Patienten war der Grund unbekannt. Bezüglich anderer Serummarker, wie DCP und AFP-L3, war die Datenlage für Empfehlungen in westlichen bzw. europäischen Richtlinie zu keiner Zeit ausreichend. Die aktuellen S3 Richtlinien zum hepatozellulären Karzinom diskutieren die Versorgungslücke für Patienten mit NASH (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Während es unklar ist, wie viele Fälle von NASH tatsächlich in eine Zirrhose münden, lag in einer europäischen Kohortenstudie der Anteil der Zirrhotiker unter HCC-Patienten bei lediglich 42% (Ertle et al., 2011). Die japanischen Konsensus-Richtlinien (Kudo et al., 2011) empfehlen klar den Einsatz aller drei diskutierten Tumormarker und deren Kombination zur Diagnose wie auch zur Überwachung des HCCs im Kontext mit anderen, nicht-invasiven Maßnahmen. In einer groß angelegten Studie an sieben nordamerikanischen Zentren wurden die Serumproben von 437 Patienten hinsichtlich der drei Tumormarker untersucht. Aus den bislang nicht in einem Journal publizierten Daten (Produktinformation LiBASys, μ TAS, Stand 2013) ergab sich ein 7,0 fach höheres Risiko, ein HCC zu entwickeln, wenn mit LiBASys gemessenes AFP-L3 $\geq 10\%$ lag (48,8% vs. 7,0%). In einem ähnlichen Ansatz wie in dieser Arbeit wurden die Proben von 383 Patienten noch einmal mit μ TAS untersucht. Hier ergab sich ein 10,6 fach erhöhtes Risiko für ein HCC (43,3% vs. 4,1%). Auch aus den bereits publizierten Daten (Sterling et al., 2009) zu 372 Patienten gehen die prognostischen Eigenschaften von AFP-L3, jedoch auch von DCP, hervor. AFP-L3- und DCP-positive Patienten hatten im Gegensatz zu Patienten mit auffälligem AFP nach einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren signifikant niedrigere kumulative HCC-freie Raten ($p < 0.0001$ und $p = 0.0005$). Die Autoren dieser Studie raten allerdings zur Zurückhaltung in der Interpretation des serologischen Tests und zumindest zu einer ergänzenden Ultraschalluntersuchung, da etwa 23% der Patienten mit HCC unauffällige Werte und 40% der Patienten ohne HCC wenigstens einen der Marker im positiven Bereich hatten.

Die EASL-EORTC-Richtlinien (Autorenkollektiv der EASL-EORTC, 2012) geben für Ultraschall als alleinige Untersuchungsmethode Sensitivitäten von 58% bis 89% an, bei Spezifitäten von 90% und mehr. Die dort erwähnte Metaanalyse von Singal et al. kommt für Ultraschall im Einsatz beim HCC auf eine gepoolte Sensitivität von 94% (Singal et al., 2009). Diese betrug jedoch nur 63% in Frühstadien, ein unbefriedigendes Ergebnis für den erfahrenen Diagnostiker mit potenziell fatalen Konsequenzen für Patienten.

Für asiatische Patienten konnte demonstriert werden, dass AFP-L3 als Tumormarker prognostische Eigenschaften besitzt sowie die Fähigkeit, Rezidive aufzuzeigen (Kobayashi et al., 2011; Morimoto et al., 2011; Toyoda et al., 2012). Kobayashi et al. belegten, dass Patienten mit

einem Anteil von AFP-L3 über 5% signifikant häufiger Rezidive bildeten, als solche mit Werten unterhalb dieser Grenze ($p=0,001$) (Kobayashi et al., 2011). Gleiches galt für postoperative Patienten, bei denen AFP-L3 oberhalb von 5% blieb ($p=0,001$). In der Arbeit von Toyoda et al. konnte anhand von 173 Patienten nicht belegt werden, dass die Erhöhung der Tumormarker vor einer Hepatektomie prädiktiv für das Gesamtüberleben ist (Toyoda et al. 2012). Es zeigte sich lediglich ein Trend zum längeren Überleben, wenn kein Marker auffällig war vs. einer ($p=0,09$). Allerdings bewies die Studie einen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei postoperativ erhöhten Markern (0 vs. 1: $p=0,03$; 1 vs. 2: $p=0,009$; 2 vs. 3: $p=0,0006$). Die Prognose verschlechterte sich mit der Anzahl der positiven Tumormarker.

Sherman et al. schlossen aus ihrer Studie mit 1.069 HBV-Patienten 1995, dass die Datenlage für einen Vergleich von Ultraschall vs. Serum-AFP nicht ausreicht (Sherman et al., 1995). Wenige Arbeiten widmen sich bislang der Kombination von Serummarkern mit Ultraschall (Daniele et al., 2004; Tremolda et al., 1989). Eine Studie folgert aus einem mathematischen Modell, dass durch die Kombination von Ultraschall mit AFP 90% der Lebertumoren früh erkannt werden können (Kang et al., 1992).

In der jüngsten Ausgabe der S3 Leitlinien zum hepatozellulären Karzinom besteht ein starker Konsens zum möglichen Nutzen von serologischen Biomarkern zur Verlaufsbeurteilung und hinsichtlich AFP als Zusatz in der Primärdiagnose (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Zusammengefasst legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die Kombination aus AFP, DCP und AFP-L3 einen neuen Referenzstandard für die serologische Detektion des HCCs bei europäischen Patienten darstellen kann. Darüber hinaus ergibt sich die Anregung, die Kombination von Markern als weiteren Baustein des diagnostischen Armamentariums in europäische Richtlinien aufzunehmen. Abschließend bleibt die Wahl der Methoden eine individuelle Entscheidung in der Hand des jeweiligen Mediziners, die sich nach vielfältigen Patientenkriterien richtet.

5. Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist einer der häufigsten soliden Tumoren weltweit. In westlichen Ländern ist die Erkrankung noch selten, stellt aber aufgrund der noch immer hohen Mortalität und weiter steigenden Inzidenz ein ernst zu nehmendes Problem dar. Kurative Ansätze sind nur in frühen Stadien möglich, jedoch wird Leberkrebs nach wie vor zu spät erkannt. Ein umfangreiches serologisches Screening findet bereits in Japan statt, ist aber in europäischen Ländern noch nicht etabliert. Da auch in späteren Stadien die Wahl der therapeutischen Mittel wesentlich vom Stadium der Erkrankung abhängig ist, kommt der Diagnostik insgesamt ein besonderer Stellenwert zu. In den gültigen europäischen Leitlinien haben Serummarker aufgrund der uneinheitlichen Datenlage derzeit keinen Stellenwert.

Leberkrebs ist eine biologisch sehr heterogene Entität. In dieser Arbeit konnte in einem europäischen Patientenkollektiv bestätigt werden, dass die Sensitivität von Alfa-Fetoprotein (AFP) und Des-Gamma-Carboxyprothrombin (DCP) zur Diagnose des HCCs jeweils nicht ausreicht. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Kombination der beiden Marker der Einzelbestimmung überlegen ist.

Es wurde gezeigt, dass die Kombination aus AFP und AFP-L3 im Vergleich zu AFP und DCP vergleichbar effektiv ist. Darüber hinaus wurde belegt, dass die Kombination aller drei Tumormarker die Effektivität der Methode noch einmal deutlich steigern kann. AFP-L3 erwies sich diesbezüglich als sinnvolle Ergänzung durch teils bedeutende Sensitivitäts-Gewinne und konstant hohe Spezifität und Genauigkeit in allen untersuchten Konstellationen, einschließlich der als herausfordernd geltenden Subgruppen (Frühstadien, Zirrhotiker, eingeschränkte Leberfunktion).

Es wurde deutlich, dass mit Schwellenwerten von 20 ng/ml und 10 ng/ml für AFP innerhalb der Kombination im klinischen Alltag wünschenswerte Ergebnisse erzielt werden können.

Schlussendlich unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit, übereinstimmend mit den neusten S3-Leitlinien, den hohen Wert der hier untersuchten Tumormarker als komplementäre, nicht invasive Untersuchungsmethode in der Diagnostik des HCCs für europäische Patienten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abelev, G.I., Perova, S.D., Khramkova, N.I., Postinokova, Z.A., Irlin, I.S. (1963): Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1, 174–180.
2. Aoki, Y., Higashino, M., Ishii, S., Tanaka, K. (2005): Yolk sac tumor of the ovary during pregnancy: A case report. *Gyn Oncol* 99, 490–499.
3. Arii, S., Sata, M., Sakamoto, M., Shimada, M., Kumada, T., Shiina, S., et al. (2010): Management of hepatocellular carcinoma: Report of Consensus Meeting in the 45th annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). *Hepatol Res* 40, 667-685.
4. Autorenkollektiv der European Association for the Study of the Liver und der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (2012): EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 56, 908–943.
5. Avila, M.A., Berasain, C., Sangro, B., Prieto, J. (2006): New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25, 3866–3884.
6. Bayati, N., Silverman, A.L., Gordon, S.C. (1998): Serum alphafetoprotein levels and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 93, 2452–2456.
7. Bewick, V., Cheek, L., Ball, J. (2004): Statistics review 13: Receiver operating characteristic curves. *Critical Care* 8, 508-512.
8. Bialecki, E.S., Di Bisceglie, A.M. (2005): Clinical presentation and natural course of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17(5), 485-489.
9. Di Bisceglie, A.M., Hoofnagle, J.H. (1989) Elevations in serum alphafetoprotein levels in patients with chronic hepatitis B. *Cancer* 64, 2117–2120.
10. Di Bisceglie, A.M., Sterling, R.K., Chung, R.T., Everhart, J.E., Dienstag, J.L., Bonkovsky, H.L., et al. (2005), et al. Serum alphafetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: Results from the HALT-C Trial. *J Hepatol* 43, 434–441.
11. Bosch, F.X., Ribes, J., Borràs, J. (1999): Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 19(3), 271-285.
12. Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M., Hobbs, H.H. (2004): Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40, 1387–1395.
13. Bruix, J., Sala, M., Llovet, J.M. (2004): Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127, 179–188.
14. Bruix, J., Sherman, M. (2005): Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42, 1208–1236.
15. Bruix, J., Sherman, M. (2011): Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53, 1020–1022.
16. Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J.M., Beaugrand, M., Lencioni, R., Burroughs, A.K., et al. (2001): Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *J Hepatol* 35, 421-430.

17. The cancer of the liver Italian program (CLIP) investigators (1998): A New Prognostic System for Hepatocellular Carcinoma: A Retrospective Study of 435 Patients. *Hepatology* 28, 751-755.
18. Chen, J.G., Zhu, J., Zhang, Y.H., Chen, Y.S., Ding, L.L., Lu, J.H., Zhu, Y.R. (2006): Trends in the incidence of cancer in Qidong, China, 1978-2002. *Int J Cancer* 119, 1447–1454.
19. Chu, C.-W., Hwang, S.-J., Luo, J.-C., Lai, C.-R., Tsay, S.-H., Li, C.-P., et al. (2001): Clinical, virologic, and pathologic significance of elevated serum alpha-fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 32, 240-244.
20. O'Connor, G.I., Tatarinov, Y.S., Abelev G.I., Uriel, J. (1970): A collaborative study for the evaluation of a serologic test for primary liver cancer. *Cancer* 25, 1091–1098.
21. Daniele, B., Bencivenga, A., Megna, A.S., Tinessa, V. (2004): Alpha-fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127, 108-112.
22. Danta, M., Barnes, E., Dusheiko, G. (2005): The surveillance and diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17, 491–496.
23. Durazo, F.A., Blatt, L.M., Corey, W.G., Lin, J.-H., Han, S., Saab, S., et al. (2008): Des- γ -carboxyprothrombin, α -fetoprotein and AFP-L3 in patients with chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 23(10), 1541-1548.
24. Edge, S.B., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A. (Eds.) (2010): *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th Aufl. New York, NY: Springer.
25. El-Serag, H.B., Rudolph, K.L. (2007): Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132, 2557–2576.
26. Eng J.: ROC analysis, web-based calculator for ROC curves. Baltimore: Johns Hopkins University [updated 2006 May 17; cited 2013]. Available from: <http://www.jrocofit.org>.
27. Ertle, J., Dechêne, A., Sowa, J.-P., Penndorf, V., Herzer, K., Kaiser, G., et al. (2011): Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer* 128(10), 2436-2443.
28. Ertle, J.M., Heider, D., Wichert, M., Keller, B., Kueper, R., Hilgard, P., Gerken, G., Schlaak, J.F. (2013): A combination of α -Fetoprotein and Des- γ -Carboxy Prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. *Digestion* 87, 121–131.
29. Forner, A., Rodríguez-Lopez, C., Reig, M. (2012): Natural History and Staging for Hepatocellular Carcinoma. *Clin Liver Dis* 1(6), 183-185.
30. Fung, J., Lai, C.-L., Yuen, M.-F. (2009): Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis. *Clinical microbiology and infection* 15, 964–970.
31. Hadziyannis, E., Sialevis, K., Georgiou, A., Koskinas, J. (2013): Analysis of serum α -fetoprotein-L3% and des- γ carboxyprothrombin markers in cases with misleading hepatocellular carcinoma total α -fetoprotein levels. *Oncol Rep* 29, 835-839.
32. Hanaoka, T., Sato, S., Tobita, H., Miyake, T., Ishihara, S., Akagi, S., et al. (2011): Clinical significance of the highly sensitive fucosylated fraction of α -fetoprotein in patients with chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 26, 739–744.

33. Hayashi, K., Kumada, T., Nakano, S., Takeda, I., Sugiyama, K., Kiriya, S., et al. (1999): Usefulness of measurement of *lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein as a marker of prognosis and recurrence of small hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 94(10), 3028-3033.
34. Horigome, H., (1999): Limitations of imaging diagnosis for small hepatocellular carcinoma: comparison with histological findings. *J Gastroenterol Hepatol* 14(6), 559-565.
35. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2), 69–90.
36. Kagebayashi, C., Yamaguchi, I., Akinaga, A., Kitano, H., Yokoyama, K., Satomura, M., et al. (2009): Automated immunoassay system for AFP–L3%. *Anal Biochem* 388(2), 306-311.
37. Kang, J.Y., Lee, T.P., Yap, I., Lun, K.C. (1992): Analysis of cost-effectiveness of different strategies for hepatocellular carcinoma screening in hepatitis B virus carriers. *J Gastroenterol Hepatol* 7(5), 463-468.
38. Kawabata, T., Wada, H.G., Watanabe, M., Satomura, S. (2008): Electrokinetic analyte transport assay for alpha-fetoprotein immunoassay integrates mixing, reaction and separation on-chip. *Electrophoresis* 29(7), 1399-1406.
39. Kobayashi, M., Hosaka, T., Ikeda, K., Seko, Y., Kawamura, Y., Sezaki, H., et al. (2011): Highly sensitive AFP-L3% assay is useful for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment pre- and postoperatively. *Hepatol Res* 41(11) 1036–1045.
40. Kudo, M., Izumi, N., Kokudo, N., Matsui, O., Sakamoto, M., Nakashima, O., et al. (2011): Management of hepatocellular carcinoma in Japan: Consensus-based clinical practice guidelines proposed by the Japan Society of Hepatology (JSH) 2010 Updated Version. *Digestive Diseases* 29, 339–364.
41. Kumada, T., Nakano, S., Takeda, I., Kiriya, S. (1999): Clinical utility of *lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinoma: Special reference to imaging diagnosis. *J Hepatol* 30,125–130.
42. Lawrence, T.S., Robertson, J.M., Anscher, M.S., Jirtle, R.L., Ensminger, W.D., Fajardo, L.F. (1995): Hepatic toxicity resulting from cancer treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31,1237–1248.
43. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2013): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-053OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, accessed October 2013.
44. Lencioni, R. (2010): Loco-Regional Treatment of Hepatocellular Carcinoma in the Era of Molecular Targeted Therapies. *Oncology* 78(Suppl. 1), 107–112.
45. Leung, T.W., Tang, A.M., Zee, B., Lau, W.Y., Lai, P.B., Leung, J.F., et al. (2002): Construction of the Chinese university prognostic index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the liver Italian program staging system. A study based on 926 patients. *Cancer* 94, 1760–1769.

46. Levrero, M. (2006): Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25, 3834–3847.
47. Li, D., Mallory, T., Satomura, S. (2001): AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta.* 313, 15–19.
48. Liebman, H.A., Furie, B.C., Tong, M.J., Blanchard, R.A., Lo, K.-J., Lee, S.-D., Coleman, M.S., Furie, B. (1984): Des- γ -Carboxy (Abnormal) Prothrombin as a Serum Marker of Primary Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 310, 1427–1431.
49. Llovet, J. M., Burroughs, A., Bruix, J. (2003): Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 362, 1907–1917.
50. Llovet, J.M., Bustamante, J., Castells, A., Vilana, R., Ayuso, M., Sala, M., et al. (1999): Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: Rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 29(1), 62–67.
51. Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., et al. (2008): Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Eng J Med* 359, 378–390.
52. Lodato, F., Mazzella, G., Festi, D., Azzaroli, F., Colecchia, A., Roda, E. (2006): Hepatocellular carcinoma prevention: a worldwide emergence between the opulence of developed countries and the economic constraints of developing nations. *World J Gastroenterol* 12(45), 7239-7249.
53. Lok, A.S., Lai, C.L. (1989): alpha-Fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection: role in the early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 9, 110-115.
54. Malaguarnera, G., Giordano, M., Paladina, I., Berretta, M., Cappellani, A., Malaguarnera, M. (2010): Serum markers of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 55, 2744–2755.
55. Makuuchi, M., Kokudo, N., (2006): Clinical practice guidelines for hepatocellular carcinoma: the first evidence based guidelines from Japan. *World J Gastroenterol* 12(5), 828-829.
56. Marrero, J.A., Feng, Z., Wang, Y., Nguyen, M.H., Befeler, A.S., Roberts, L.R., et al. (2009): α -Fetoprotein, Des- γ Carboxyprothrombin, and Lectin-bound α -Fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 137, 110–118.
57. Marrero, J.A., Romano, P.R., Nikolaeva, O., Steel, L., Mehta, A., Fimmel, C.J., et al. (2005): GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 43(6), 1007-1012.
58. Marrero, J.A., Su, G.L., Wei, W., Emick, D., Conjeevaram, H.S., Fontana, R.J. et al. (2003): Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology* 37, 1114–1121.
59. Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, S., Bozzetti, F., et al. (1996): Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334, 693-700.
60. McGlynn, K.A., London, W.T. (2005) Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 19(1), 3-23.

61. Moradpour, D., Blum, H.E. (2005): Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17, 477–483.
62. Morimoto, M., Numata, K., Nozaki, A., Kondo, M., Moriya, S., Taguri, M., et al. (2011): Novel *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of α -fetoprotein: a biomarker of hepatocellular carcinoma recurrence in patients with low α -fetoprotein concentrations. *Int J Clin Oncol* 17(4), 373-379.
63. Moriwaki, K., Miyoshi, E. (2010): Fucosylation and gastrointestinal cancer. *World J Hepatol* 2(4), 151-161.
64. Moriya, S., Morimoto, M., Numata, K., Nozaki, A., Shimoyama, Y., Kondo, M., et al. (2013): Fucosylated fraction of α -fetoprotein as a serological marker of early hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 33, 997-1002.
65. Oda, K., Ido, A., Tamai, T., Matsushita, M., Kumagai, K., Mawatari, S.-I., et al. (2011): Highly sensitive *lens culinaris* agglutinin-reactive α -fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep* 26, 1227-1233.
66. Oka, H., Saito, A., Ito, K., Kumada, T., Satomura, S., Kasugai, H., et al. (2001): Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of *lens culinaris* agglutinin-reactive α -fetoprotein. *J Gastroenterol Hepatol* 16, 1378–1383.
67. Okuda, K., Ohtsuki, T., Obata, H., Tomimatsu, M., Okazaki, N., Hasegawa, H., et al. (1985): Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 56, 918-28.
68. Okuda, K., Tanaka, M., Kanazawa, Nagashima, N., Satomura, S., Kinoshita, H., et al. (1999): Evaluation of curability and prediction of prognosis after surgical treatment for hepatocellular carcinoma by *Lens culinaris* agglutinin-reactive α -fetoprotein. *Int J Oncol* 14, 265–271.
69. Owen, W. E., Roberts, R. F., Roberts, W. L. (2008): Performance characteristics of the LiBASys[®] des-gamma-carboxy prothrombin assay. *Clinica Chimica Acta* 389, 183–185.
70. Produktinformationen LiBASys, Version GB 0707 D2, GB 0208 D2, μ TASWako-i30, Version DE 0411 D1, DE 0511 D1.
71. Ruaslahti, E., Salaspuro, M., Pihko, H., Andersson, L., Seppälä, M. (1974): Serum α -Fetoprotein: Diagnostic significance in liver disease. *BMJ* 2, 527-529.
72. Sangro, B., Iñarrairaegui, M., Bilbao, J. I. (2012): Radioembolization for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 56, 464–473.
73. Sato, Y., Nakata, K., Kato, Y., Shima, M., Ishii, N., Koji, T., et al. (1993): Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of α -fetoprotein. *N Engl J Med* 328, 1802-1806.
74. Semela, D., Dufour, J.-F. (2004): Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 41, 864–880.
75. Sell, S. (1980): α -Fetoprotein. *Cancer Markers* 1, 1980, 249-293.

76. Shang, S., Plymoth, A., Ge, S., Feng, Z., Rosen, H.R., Sangrajrang, S., et al. (2012): Identification of Osteopontin as a Novel Marker for Early Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 55(2), 483-490.
77. Sherman, M., Peltekian, K.M., Lee, C. (1995): Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 22, 432-438.
78. Singal, A.G., Marrero, J.A. (2010): Recent advances in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Curr Opin in Gastroenterol* 26, 189-195.
79. Singal, A., Volk, M.L., Waljee, A., Salgia, R., Higgins, P., Rogers, M. a. M., Marrero, J.A. (2009): Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 30, 37-47.
80. Sterling, R.K., Jeffers, L., Gordon, F., Sherman, M., Venook, A.P., Reddy, K.R., et al. (2007): Clinical utility of AFP-L3% measurement in North American patients with HCV-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 102, 2196-2205.
81. Sterling, R.K., Jeffers, L., Gordon, F., Venook, A.P., Reddy, K.R., Satomura, S., et al. (2009): Utility of *lens culinaris* Agglutinin-reactive fraction of α -Fetoprotein and Des-Gamma-Carboxy Prothrombin, alone or in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7, 104-113.
82. Taketa, K., Endo, Y., Sekiya, C., Tanikawa, K., Koji, T., Taga, H., et al. (1993): A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive α -fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 53, 5419-5423.
83. Toyoda, H., Kumada, T., Kiriya, S., Sone, Y., Tanikawa, M., Hisanaga, Y., et al. (2006): Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4, 111-117.
84. Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T. (2011): Highly sensitive *lens culinaris* agglutinin reactive α -Fetoprotein: A new tool for themanagement of hepatocellular carcinoma. *Oncology* 81(suppl 1), 61-65.
85. Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T., Kaneoka, Y., Maeda, A., Kanke, F., Satomura, S. (2011): Clinical utility of highly sensitive *Lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with alpha-fetoprotein <20 ng/ml. *Cancer Sci* 102(5), 1025-1031.
86. Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T., Niinomi, T., Ito, T., Kaneoka, Y., Maeda, A. (2012): Prognostic significance of a combination of pre- and post-treatment tumor markers for hepatocellular carcinoma curatively treated with hepatectomy. *J Hepatol* 57(6), 1251-1257.
87. Tremolda, F., Benevegnu, L., Drago, C., Casarin, C., Cechetto, A., Realdi, G., Ruol, A. (1989): Early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis by α -fetoprotein, ultrasound and fine-needle biopsy. *Hepato-Gastroenterol* 36, 519-521.
88. Trevisani, F., Frigerio, M., Santi, V., Grignaschi, A., Bernardi, M. (2010): Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A reappraisal. *Digest Liver Dis* 42(5), 341-347.

89. Villanueva, A., Llovet, J.M. (2012): Second-line therapies in hepatocellular carcinoma: emergence of resistance to Sorafenib. *Clin Cancer Res* 18(7), 1824–1826.
90. Volk, M.L., Hernandez, J.C., Su, G.L., Lok, A.S., Marrero, J.A. (2007): 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.
91. Wang, X.-Y., Degos, F., Dubois, S., Tessitore, S., Allegretta, M., Guttman, R.D., et al. (2006): Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol* 37(11), 1435-1441.
92. Wigg, A.J., Palumbo, K., Wigg, D.R. (2010): Radiotherapy for hepatocellular carcinoma: systematic review of radiobiology and modeling projections indicate reconsideration of its use. *J Gastroenterol Hepatol* 25, 664–671.
93. Witjes, C.D, Van Aalten, S.M., Steyerberg, E.W., Borsboom, G.J., De Man, R.A., Verhoef, C., IJzermans, J.M. (2013): Recently introduced biomarkers for screening of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Hepatol Int* 7, 59–64.
94. Yamagata, Y., Shimizu, K., Nakamura, K., Henmi, F., Satomura, S., Matsuura, S., Tanaka, M. (2003): Simultaneous determination of percentage of *Lens culinaris* agglutinin-reactive α -fetoprotein and α -fetoprotein concentration using the LiBASys clinical auto-analyzer. *Clinica Chimica Acta* 327, 59–67.
95. Yamaguchi, I., Nakamura, K., Kitano, H., Masuda, Y., Kanke, F., Kobatake, S., Satomura, S. (2008): Development of des- γ -carboxy prothrombin (DCP) measuring reagent using the LiBASys clinical analyzer. *Clin Chem Lab Med* 46, 411–416.
96. Yamamoto, R., Ohkouchi, T., Wakui, Y., Minobe, S., Watari, H., Shilizu, K., et al. (2003): A study on the microheterogeneity of alpha-fetoproteins produced by yolk sac and germ cell tumors. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82(9), 876–882.
97. Yamashita, F., Tanaka, M., Satomura, S., Tanikawa, K. (1995): Monitoring of lectin-reactive alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma treated using transcatheter arterial embolization. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7, 627–633.
98. Yamashita, F., Tanaka, M., Satomura, S., Tanikawa, K. (1996): Prognostic significance of *Lens culinaris* agglutinin A-reactive α -fetoprotein in small hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 111, 996–1001.
99. Yao, F.Y., Hirose, R., LaBerge, J.M., Davern, T.J. III, Bass, N.M., Kerlan, R.K. Jr., et al. (2005): A prospective study on downstaging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation. *Liver Transpl* 11(12), 1505–1514.
100. Yuen, M.-F., Lai, C.-L. (2005): Serological markers of liver cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19, 91–99.

7. Anhang

7.1. Weitere Tabellen

Stadium	Tumor	Node	Metastasen
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

Tab. 29: TNM-Einteilung modifiziert nach dem AJCC Cancer Staging Manual (Edge et al., 2007)
 Legende: T1 = solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion, T2 = solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder multiple Herde jeweils <5 cm, T3a = multiple Tumoren <5 cm, T3b = multiple Tumoren mit Befall eines größeren Astes der Portalvene, T4 = Tumor mit Infiltration von Nachbarorganen oder Perforation des viszeralen Peritoneums, N0 = keine benachbarten Lymphknoten befallen, N1 = lokaler Lymphknotenbefall, M0 = keine Fernmetastasen, M1 = Fernmetastasen

	HCC	Kontrolle	Gesamt
Deutschland	84,8	72,6	75,9
Türkei	4,3	12,8	10,4
Südeuropa	3,0	4	3,7
Osteuropa	3,0	4,7	4,2
Mittlerer Osten	2,4	3,1	2,9
Asien	2,4	2,8	2,7

Tab. 30: Herkunft der Patienten (% , gerundet, LiBASys, n=596)

LiBASys	HBV	HCV	Alkohol	NASH	Kryptogen	Andere	multiple
AFP 20 ng/ml	10,0%	6,9%	4,3%	8,6%	0,0%	0,0%	14,3%
DCP	13,3%	13,8%	17,4%	28,6%	30,8%	25,0%	14,3%
L3	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
AFP 20 ng/ml+DCP	6,7%	10,3%	17,4%	2,9%	15,4%	0,0%	7,1%
AFP 20 ng/ml+L3	6,7%	20,7%	13,0%	5,7%	3,8%	12,5%	14,3%
DCP+L3	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
AFP 20 ng/mg+DCP+L3	13,3%	24,1%	26,1%	28,6%	34,6%	37,5%	14,3%
kein	50,0%	24,1%	21,7%	25,7%	15,4%	25,0%	35,7%

Tab. 31: Verteilung der Marker und deren Kombinationen bei unterschiedlichen Ätiologien (LiBASys)

µTas	HBV	HCV	Alkohol	NASH	Kryptogen	Andere	multiple
AFP 20 ng/ml	7,7%	7,1%	9,5%	6,1%	0,0%	0,0%	7,1%
DCP	3,8%	10,7%	14,3%	12,1%	8,0%	16,7%	0,0%
L3	15,4%	7,1%	19,0%	9,1%	16,0%	0,0%	7,1%
AFP 20 ng/ml+DCP	3,8%	0,0%	9,5%	6,1%	12,0%	0,0%	14,3%
AFP 20 ng/ml+L3	11,5%	21,4%	14,3%	15,2%	4,0%	50,0%	7,1%
DCP+L3	11,5%	3,6%	4,8%	15,2%	8,0%	16,7%	7,1%
AFP 20 ng/mg+DCP+L3	15,4%	25,0%	23,8%	24,2%	40,0%	0,0%	21,4%
kein	30,8%	25,0%	4,8%	12,1%	12,0%	16,7%	35,7%

Tab. 32: Verteilung der Marker und deren Kombinationen bei unterschiedlichen Ätiologien (µTAS)

LiBASys	BCLC ≤ 2 oder TNM ≤ 2	BCLC > 2 und TNM > 2	BCLC ≤ 2	BCLC > 2
AFP 20 ng/ml	7,8%	5,2%	8,9%	5,6%
DCP	19,5%	20,8%	26,7%	16,8%
L3	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
AFP 20 ng/ml+DCP	5,2%	11,7%	2,2%	11,2%
AFP 20 ng/ml+L3	9,1%	13,0%	8,9%	12,1%
DCP+L3	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
AFP 20 ng/mg+DCP+L3	16,9%	32,5%	13,3%	29,9%
kein	41,6%	16,9%	40,0%	24,3%

Tab. 33: Verteilung der Marker und deren Kombinationen in unterschiedlichen Tumorstadien (LiBASys)

μ Tas	BCLC ≤ 2 oder TNM ≤ 2	BCLC > 2 und TNM > 2	BCLC ≤ 2	BCLC > 2
AFP 20 ng/ml	5,7%	5,6%	7,1%	6,1%
DCP	11,4%	8,3%	14,3%	7,1%
L3	11,4%	6,9%	11,9%	8,1%
AFP 20 ng/ml+DCP	4,3%	8,3%	4,8%	7,1%
AFP 20 ng/ml+L3	11,4%	15,3%	11,9%	14,1%
DCP+L3	7,1%	12,5%	11,9%	9,1%
AFP 20 ng/ml+DCP+L3	15,7%	37,5%	7,1%	35,4%
kein	32,9%	5,6%	31,0%	13,1%

Tab. 34: Verteilung der Marker und deren Kombinationen in unterschiedlichen Tumorstadien (μ TAS)

LiBASys	Zirrhose	keine Zirrhose	MELD ≤ 10	MELD > 10
AFP 20 ng/ml	8,0%	2,6%	7,5%	5,1%
DCP	17,6%	28,2%	22,6%	16,9%
L3	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
AFP 20 ng/ml+DCP	8,0%	12,8%	12,3%	13,6%
AFP 20 ng/ml+L3	12,0%	5,1%	6,6%	6,8%
DCP+L3	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
AFP 20 ng/ml+DCP+L3	24,0%	30,8%	22,6%	30,5%
kein	30,4%	20,5%	28,3%	27,1%

Tab. 35: Verteilung der Marker und deren Kombinationen nach Leberstatus (LiBASys)

μ Tas	Zirrhose	keine Zirrhose	MELD ≤ 10	MELD > 10
AFP 20 ng/ml	7,0%	2,6%	7,1%	3,6%
DCP	8,8%	15,8%	14,3%	5,5%
L3	9,6%	10,5%	7,1%	14,5%
AFP 20 ng/ml+DCP	5,3%	7,9%	4,1%	9,1%
AFP 20 ng/ml+L3	16,7%	5,3%	16,3%	9,1%
DCP+L3	12,3%	2,6%	10,2%	9,1%
AFP 20 ng/ml+DCP+L3	21,9%	39,5%	22,4%	32,7%
kein	18,4%	15,8%	18,4%	16,4%

Tab. 36: Verteilung der Marker und deren Kombinationen nach Leberstatus (μ TAS)

Cut-offs nach Youden	LiBASys, n=596					
	AFP (2,65 ng/ml)	DCP (1,45 ng/ml)	L3 (10%)	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3
Sensitivität (%)	73,9	30,3	12,1	73,9	73,9	73,9
Spezifität (%)	84,7	89,1	99,1	84,7	84,7	84,7
Genauigkeit (%)	81,7	79,4	75,0	81,7	81,7	81,7
ROC Area (fitted)	0,863	0,814	0,814	0,863	0,863	0,863
pos. predictive Value	0,649	0,862	0,833	0,649	0,649	0,649
neg. predictive Value	0,895	0,786	0,747	0,895	0,895	0,895
positive Prävalenz	0,277	0,277	0,277	0,277	0,277	0,277
negative Prävalenz	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723
LR+	4,830	15,947	13,444	4,830	4,830	4,830
LR-	0,308	0,710	0,887	0,308	0,308	0,308
LR+ gewichtet	1,849	6,105	5,147	1,849	1,849	1,849
LR- gewichtet	0,805	1,856	2,317	0,805	0,805	0,805
Youden Index (J)	0,586	0,284	0,112	0,586	0,586	0,586

Tab. 37: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen mit Cut-offs nach Youden (LiBASys)

Cut-offs nach Youden	μ Tas, n=570					
	AFP (6,15 ng/ml)	DCP (0,69 ng/ml)	L3 (10%)	AFP + DCP	AFP + L3	AFP + DCP + L3
Sensitivität (%)	75,2	77,8	52,3	85,6	85,6	91,5
Spezifität (%)	83,5	87,3	73,6	73,9	71,2	64,7
Genauigkeit (%)	81,2	84,7	67,9	77,0	75,1	71,9
ROC Area (fitted)	0,863	0,893	0,648	0,893	0,883	0,922
pos. predictive Value	0,625	0,692	0,421	0,546	0,522	0,488
neg. predictive Value	0,902	0,915	0,808	0,933	0,931	0,954
positive Prävalenz	0,268	0,268	0,268	0,268	0,268	0,268
negative Prävalenz	0,732	0,732	0,732	0,732	0,732	0,732
LR+	4,558	6,126	1,981	3,280	2,972	2,592
LR-	0,297	0,254	0,648	0,195	0,202	0,131
LR+ gewichtet	1,672	2,248	0,727	1,203	1,091	0,951
LR- gewichtet	0,809	0,693	1,766	0,531	0,551	0,358
Youden Index (J)	0,587	0,651	0,259	0,595	0,568	0,562

Tab. 38: Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen mit Cut-offs nach Youden (μ TAS)

7.2. Verzeichnis Abbildungen und Tabellen

Abbildung #	Titel	Seite
1	Inzidenz des HCCs weltweit, adaptiert nach McGlynn	5
2	Pathogenese des HCCs, adaptiert nach Fung und Moradbour	7
3	Vereinfachte Darstellung des Nachweis von AFP-L3, modifiziert nach Moriwaki	11
4	BCLC Staging und Behandlungsstrategie, vereinfacht nach Forner und Llovet	12
5	HCC Behandlungsalgorithmus der Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie der Universität Duisburg-Essen	14
6	LiBASys (links) und μ TASWako-i30 (rechts)	18
7	Ätiologie, Faktorenverteilung im Gesamtkollektiv	22
8	Ätiologie, kumulative Faktorenverteilung im Gesamtkollektiv	22
9	Ätiologie, Faktorenverteilung in der HCC-Gruppe	24
10	Ätiologie, kumulative Faktorenverteilung der HCC-Patienten	24
11	Ätiologie, Faktorenverteilung in der Kontrollgruppe	25
12	Ätiologie, kumulative Faktorenverteilung in der Kontrollgruppe	26
13	Messwerte für AFP LiBASys	31
14	Messwerte für AFP μ TAS	31
15	Messwerte für DCP LiBASys	31
16	Messwerte für DCP μ TAS	31
17	Messwerte für AFP-L3 LiBASys	32
18	Messwerte für AFP-L3 μ TAS	32
19	AFP bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose LiBASys	32
20	AFP bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose μ TAS	32
21	DCP bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose LiBASys	33
22	DCP bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose μ TAS	33
23	AFP-L3 bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose LiBASys	34
24	AFP-L3 bei An- oder Abwesenheit einer Zirrhose μ TAS	34
25	Tumormarker in früheren oder späteren Stadien mit LiBASys (AFP)	35
26	Tumormarker in früheren oder späteren Stadien mit LiBASys (DCP)	35
27	Tumormarker in früheren oder späteren Stadien mit LiBASys (AFP-L3)	35
28	Tumormarker in früheren oder späteren Stadien mit μ TAS (AFP)	35
29	Tumormarker in früheren oder späteren Stadien mit μ TAS (DCP)	35
30	Tumormarker in früheren oder späteren Stadien mit μ TAS (AFP-L3)	35
31	Tumormarker für Patienten mit BCLCs2 vs. BCLC>2 (AFP, LiBASys)	36
32	Tumormarker für Patienten mit BCLCs2 vs. BCLC>2 (DCP, LiBASys)	36
33	Tumormarker für Patienten mit BCLCs2 vs. BCLC>2 (AFP-L3, LiBASys)	36
34	Tumormarker für Patienten mit BCLCs2 vs. BCLC>2 (AFP, μ TAS)	37
35	Tumormarker für Patienten mit BCLCs2 vs. BCLC>2 (DCP, μ TAS)	37
36	Tumormarker für Patienten mit BCLCs2 vs. BCLC>2 (AFP-L3, μ TAS)	37
37	Tumormarker für Patienten mit MELD >10 vs. MELD \leq 10 (AFP, LiBASys)	37
38	Tumormarker für Patienten mit MELD >10 vs. MELD \leq 10 (DCP, LiBASys)	37
39	Tumormarker für Patienten mit MELD >10 vs. MELD \leq 10 (AFP-L3, LiBASys)	38
40	Tumormarker für Patienten mit MELD >10 vs. MELD \leq 10 (AFP, μ TAS)	38
41	Tumormarker für Patienten mit MELD >10 vs. MELD \leq 10 (DCP, μ TAS)	39
42	Tumormarker für Patienten mit MELD >10 vs. MELD \leq 10 (AFP-L3, μ TAS)	39
43	AFP bei HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Ätiologie	39
44	DCP bei HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Ätiologie	40
45	AFP-L3 bei HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Ätiologie	40
46	Verteilung der Tumormarker in der HCC-Gruppe (LiBASys)	45
47	Verteilung der Tumormarker in der HCC-Gruppe (μ TAS)	45
48	Verteilung der Tumormarker in der Kontrollgruppe (LiBASys)	45
49	Verteilung der Tumormarker in der Kontrollgruppe (μ TAS)	45
50	Unterschiedliche Verteilung der Marker und deren Kombinationen für Patienten mit HCC	46
51	Unterschiedliche Verteilung der Marker und deren Kombinationen in der Kontrollgruppe	47
52	Verteilung der Marker und deren Kombinationen bei unterschiedlichen Ätiologien (LiBASys)	48
53	Verteilung der Marker und deren Kombinationen bei unterschiedlichen Ätiologien (μ TAS)	48
54	Verteilung der Marker und deren Kombinationen in verschiedenen Tumorstadien (LiBASys)	49
55	Verteilung der Marker und deren Kombinationen nach Leberstatus (LiBASys)	50
56	Verteilung der Marker und deren Kombinationen nach Leberstatus (μ TAS)	51
57	Sensitivität und Spezifität für AFP, DCP und AFP-L3 und deren Kombinationen, Patienten gesamt (%)	53
58	Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit (%) für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten mit Leberzirrhose	54
59	Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit (%) für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten ohne Leberzirrhose	54
60	Vergleich der Sensitivität und Spezifität für Kombinationen von Markern für Patienten mit oder ohne Leberzirrhose, LiBASys vs. μ TAS (%)	55
61	Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit (%) für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen im Stadium TNM \leq 2 oder BCLC \leq 2	55
62	Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit (%) für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen im Stadium BCLC \leq 2	55
63	Vergleich der Sensitivität und Spezifität für Kombinationen von Markern für Patienten in frühen Stadien, LiBASys vs. μ TAS (%)	56
64	Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit (%) für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten mit MELD \leq 10	57
65	Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit (%) für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten mit MELD >10	57
66	Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit (%) für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten mit Child Status A	57
67	Sensitivität und Spezifität und Genauigkeit (%) für AFP, DCP und AFP-L3 sowie Kombinationen für Patienten mit Child Status B oder C	57
68	Vergleich der Sensitivität und Spezifität für Kombinationen von Markern für Patienten mit MELD \leq 10 oder MELD >10, LiBASys vs. μ TAS (%)	58
69	Vergleich der Sensitivität und Spezifität für Kombinationen von Markern für Patienten mit Child A oder Child B/C, LiBASys vs. μ TAS (%)	58
70	Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker in der Gesamtgruppe	59
71	Vergleich der ROC AUC verschiedener Kombinationen	59
72	Vergleich der AUROC der Kombination AFP/DCP/AFP-L3 mit LiBASys und μ TAS	59
73	Veranschaulichung des Effekts von AFP-L3 auf die AUROC in der Dreierkombination	59
74	Rangfolge der empirischen AUROC-Werte	61
75	Rangfolge der kalkulierten AUROC-Werte mit Konfidenzintervallen	61
76	Rangfolge der Youden-Indizes des Gesamtkollektiv	62
77	Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker (μ TAS) in den Stadien TNM \leq 2 oder BCLC \leq 2	63
78	Vergleich der ROC AUC verschiedener Kombinationen in den Stadien TNM \leq 2 oder BCLC \leq 2	63
79	Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker (μ TAS) in den Stadien BCLC \leq 2	64
80	Vergleich der ROC AUC verschiedener Kombinationen in den Stadien BCLC \leq 2	64
81	Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker für Patienten mit Zirrhose	65
82	Vergleich der ROC AUC verschiedener Kombinationen für Patienten mit Zirrhose	65
83	Vergleich der ROC AUC der Einzelmarker für Patienten ohne Zirrhose	66
84	Vergleich der ROC AUC verschiedener Kombinationen (rechts) für Patienten ohne Zirrhose	66
85	Vergleich der ROC AUC von Patienten mit Child A	67
86	Vergleich der ROC AUC von Patienten mit Child B/C	67
87	Vergleich der ROC AUC von Patienten mit MELD \leq 10	69
88	Vergleich der ROC AUC von Patienten MELD >10	69

Tabelle #	Titel	Seite
1	Vergleich verschiedener Stagingssysteme beim HCC	7
2	Stadieneinteilung des BCLC-Systems, adaptiert nach Forner	8
3	Kategorien bei den ROCAUC-Berechnungen für AFP bei einem Cut-off von 20 ng/ml	19
4	Kategorien bei den ROCAUC-Berechnungen für AFP bei einem Cut-off von 7,5 ng/ml	19
5	Kategorien bei den ROCAUC-Berechnungen für AFP-L3% bei einem Cut-off von 10%	19
6	Patientencharakteristika der HCC-Gruppe aufgeschlüsselt nach Ätiologien	23
7	Patientencharakteristika der Kontrollgruppe aufgeschlüsselt nach Ätiologien	25
8	Vergleich der HCC- mit der Kontrollgruppe (Fisher's exact Test)	27
9	Numerischer Vergleich der HCC- mit der Kontrollgruppe (Student's t-Test)	27
10	Ergebnisse der t-Tests für die Gesamtgruppe, verschiedene TNM- und BCLC-Stadien und MELD	30
11	Ergebnisse der t-Tests in unterschiedlichen Ätiologien (HBV, HCV, Alkohol)	42
12	Ergebnisse der t-Tests in unterschiedlichen Ätiologien (kryptogen, NASH, multiple)	43
13	Werte für die Tumormarker von Patienten mit ursprünglichem Verdacht auf HCC	52
14	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen im Gesamtkollektiv (LiBASys)	60
15	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen im Gesamtkollektiv (μ TAS)	60
16	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen in den Stadien TNM oder BCLC ≤ 2	63
17	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen im Stadium BCLC ≤ 2	64
18	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit Zirrhose	66
19	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten ohne Zirrhose	67
20	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit Child A	68
21	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit Child B/C	68
22	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit MELD ≤ 10	69
23	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen für Patienten mit MELD >10	70
24	Korrelationen der Tumormarker im Bootstrapverfahren	73
25	Bootstrap für Test bei unabhängigen Stichproben (basierend auf 1000 Proben)	74
26	Großes multivariates Modell für die Marker als Zielvariablen (Bestimmtheitsmaß nach Nagelkerke)	75
27	Kleines multivariates Modell für die Marker als Zielvariablen (Bestimmtheitsmaß nach Nagelkerke)	76
28	Abschlussmodell (Bestimmtheitsmaß nach Nagelkerke)	77
29	TNM-Einteilung modifiziert nach dem AJCC Cancer Staging Manual	97
30	Herkunft der Patienten (% , gerundet, LiBASys, n=596)	97
31	Verteilung der Marker und deren Kombinationen bei unterschiedlichen Ätiologien (LiBASys)	97
32	Verteilung der Marker und deren Kombinationen bei unterschiedlichen Ätiologien (μ TAS)	97
33	Verteilung der Marker und deren Kombinationen in unterschiedlichen Tumorstadien (LiBASys)	97
34	Verteilung der Marker und deren Kombinationen in unterschiedlichen Tumorstadien (μ TAS)	98
35	Verteilung der Marker und deren Kombinationen nach Leberstatus (LiBASys)	98
36	Verteilung der Marker und deren Kombinationen nach Leberstatus (μ TAS)	98
37	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen mit Cut-offs nach Youden (LiBASys)	98
38	Statistische Ergebnisse für die drei Tumormarker und deren Kombinationen mit Cut-offs nach Youden (μ TAS)	98

7.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb	- Abbildung	IGF	- Insulin-like Growth Factor
AFP	- Alpha-Fetoprotein	INR	- International Normalized Ratio
AFU	- Alpha-I-Fukosidase	JISS	- Japanese Integrated Staging System
AIH	- Autoimmunhepatitis	LBA	- Ligand Phase Binding Assay
AJCC	- American Joint Committee on Cancer	LCA	- <i>Lens culinaris</i> -Agglutinin
AKT	- Proteinkinase B	LZ	- Leberzirrhose
ASH	- Alkoholische Fettleberhepatitis	MELD	- Model of Endstage Liver Disease
AUC	- Area under the Curve	MEK	- Mitogen-Extrazelluläre Kinase
AUROC	- Area under Receiver Operating Curve	MRT	- Magnetresonanztomographie
AZ	- Allgemeinzustand	mTOR	- Mammalian Target of Rapamycin
BCLC	- Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System	NASH	- Nichtalkoholische Fettleberhepatitis
C2	- Alkohol	NC	- Not calculated
calc	- Calculated	PBC	- Primär biliäre Zirrhose
CLIP	- Cancer of the Liver Italian Program	PEI	- Perkutane Ethanol-Injektion
CP	- Child-Pugh	PI3K	- Phosphoinositid-3-Kinase
CUPI	- Chinese University Prognostic Index	pRb	- Phospho-Retinoblastom
CT	- Computertomographie	PSC	- Primär sklerosierende Cholangitis
Da	- Dalton	Raf	- Rat- / Rapidly accelerated Fibrosarcoma (Proteinkinase)
DCP	- Des-Gamma-Carboxyprothrombin	Ras	- Rat Sarcoma (Proto-Onkogen)
EASL	- European Association for the Study of the Liver	RFA	- Radiofrequenzablation
ECOG	- Eastern Cooperative Oncology Group	ROC	- Receiver Operating Calculations
emp	- Empirisch	Sig	- Signifikant
EORTC	- European Organization for Research and Treatment of Cancer	SIRT	- selektive interne Radiotherapie
ERK	- Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase	Tab	- Tabelle
FNH	- Fokale noduläre Hyperplasie	TACE	- Transarterielle Chemoembolisation
Exp	- Exponentialfunktion (Effekt-Koeffizient)	TAE	- Transarterielle Embolisation
GGT	- Gamma-Glutamyl-Transferase	TGF	- Transforming Growth Factor
GOT	- Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	TNM	- Tumor-Node-Metastasen
HBV	- Hepatitis B	VEGF	- Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
HCV	- Hepatitis C	vgl	- vergleiche
HGF	- Hepatocyte Growth Factor	Wnt	- Wingless Integration (Protein)
GPT	- Glutamat-Pyruvat-Transaminase		

8. Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Jörg Schlaak für die Möglichkeit meiner Promotion an der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen in der Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie und für die hochkompetente und jederzeit zuverlässige Begleitung und Betreuung meiner Dissertation.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Schlaak, Herrn PD Dr. med. Philipp Hilgard und Frau Dr. med. Judith Ertle für die Entwicklung und freundliche Überlassung dieses hochinteressanten Themas. Ausdrücklich bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die mir während des gesamten Projektes gewährt wurde und die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Judith Ertle, die mir vor allem in der wichtigen Anfangsphase jederzeit mit Rat, Tat und konstruktiver Kritik zur Seite stand und mir den adäquaten Zugang zu den Rohdaten ermöglicht hat.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Robert Küper für die hervorragende fachliche Unterstützung über die gesamte Zeitachse und die vielen wertvollen sachlichen Hinweise.

In gleicher Weise danke ich Herrn Dr. med. Philipp Keller, dessen Arbeit zur Bedeutung von AFP und DCP in der Diagnose des HCC einen wichtigen Eckpfeiler für weiter führende Arbeiten wie die vorliegende bildet.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Martin Trippler und der AG Schlaak für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bei der Organisation und Durchführung der experimentellen Untersuchungen Rahmen der Projektarbeit vor Beginn der Promotion.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dipl.–Stat. Frederic Klein für die freundliche Überprüfung der deskriptiven und induktiven Statistik und die fachliche Unterstützung bei den multivariaten Ansätzen.

Schließlich und keineswegs zuletzt danke ich meiner geliebten Frau Christina von ganzem Herzen für die Zeit, die ich in diese Arbeit investieren konnte, ihre Geduld und moralische Unterstützung.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht verfügbar.