# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

# Das Hepatozelluläre Karzinom - Biomarker in der Prädiktion eines Frührezidivs nach kurativer Resektion

#### Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Berit Christine Görden aus Eckernförde

Hamburg 2024

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.02.2025

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Felix Stahl

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Henning Wege

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5	
1.1.	Das Hepatozelluläre Karzinom	5	
	1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie	5	
	1.1.2. Einführung in Diagnostik und Staging	6	
	1.1.3. Einführung in Therapie und Nachsorge	10	
1.2.	Biomarker im klinischen Management des Hepatozellulären Karzinoms	11	
	1.2.1. Alpha-Fetoprotein und seine Lens culinaris Agglutinin-reaktive Fraktion		
	1.2.2. Des-gamma-carboxy Prothrombin		
	1.2.3. Zusammenfassung - Das Biomarker Triplet		
	1.2.4. Zirkulierende Tumorzellen	15	
1.3.	Arbeitshypothese und Fragestellung	18	
2.	Material und Methoden	19	
2.1.	Studiendesign und Vorgehen	19	
2.2.	Messverfahren	23	
	2.2.1. μTASWako ™ i30		
	<ul> <li>2.2.1.1. Liquid-phase binding assay</li> <li>2.2.1.2. Electrokinetic analyte transport assay</li> <li>2.2.1.3. Erhebung der Biomarker Triplet Messdaten</li> <li>2.2.1.4. Auswertung der Biomarker Triplet Messungen</li> <li>2.2.1.5. Qualitätssicherung und Gerätevalidierung</li> </ul>	23 23 26 30 30	
	2.2.2. Dimension Vista® 1500	31	
	2.2.3. CellSearch™ System	32	
2.3.	Statistische Auswertung	33	
	2.3.1. Validierungsdaten µTAS Immunoassay System	33	
	<ul><li>2.3.1.1. Präzision</li><li>2.3.1.2. Richtigkeit</li><li>2.3.1.3. Passing-Bablok-Regression</li><li>2.3.1.4. Bland-Altman-Plot</li></ul>	33 33 34 34	
	2.3.2. Biomarker Messdaten und klinische Charakteristika	34	
2.4.	Materialien	36	
3.	Ergebnisse	41	
3.1.	µTAS Immunoassay System – Validierungsdaten	41	
	3.1.1. Präzision, Richtigkeit und Messabweichung	41 3	

	3.1.2.	Passing-	Bablok-Regression und Bland-Altman-Plot	43
		3.1.2.1. 3.1.2.2.	AFP-Konzentrationsbereich <1000 ng/ml AFP-Konzentrationsbereich >1000 ng/ml	43 44
3.2.	Klinis	che Anwei	ndung zur Prädiktion von Frührezidiven nach kurativ-	
	intend	lierter Res	sektion eines Hepatozellularen Karzinoms	50
	3.2.1.	Klinische	Charakteristika	50
	3.2.2.	Klinische	Endpunkte	50
	3.2.3.	und/oder	positivem Biomarker Triplet	55
	3.2.4.	Analyse von CTC	der Klinischen Endpunkte bezogen auf den Nachweis und/oder positivem Biomarker Triplet	56
	3.2.5.	Kaplan-N	leier-Modell	62
		3.2.5.1. 3.2.5.2. 3.2.5.3.	Analyse zum Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf Analyse zum Frührezidiv-freien Überleben Analyse zum Gesamtüberleben	62 63 64
	3.2.6.	Vorhersa	ge von Rezidiv und Frührezidiv durch die Biomarker	68
	3.2.7.	Univariat Frührezio	e und Multivariate Cox-Regressionsanalyse des div-freien Krankheitsverlaufs	76
	3.2.8.	Univariat Frührezio Resektio	e und Multivariate Cox-Regressionsanalyse für das div-freie Überleben innerhalb von 24 Monaten nach HCC- n	78
4.	Disku	ission		80
4.1.	Metho	odenvergle	eich	80
4.2.	Kliniso	cher Absc	hnitt	82
4.3.	Zusammenfassende Einordnung		87	
5.	Zusammenfassung		88	
6.	Summary		89	
7.	Abkürzungsverzeichnis		90	
8.	Tabel	lenverzei	chnis	91
9.	Abbil	dungsver	zeichnis	93
10.	Litera	turverzei	chnis	94
Dank	sagun	g		107
Lebe	nslauf			108
Eides	sstattlio	che Versi	cherung	109
				4

# 1. Einleitung

Onkologische Erkrankungen stellen die Betroffenen und ihr Umfeld vor enorme emotionale, physische und finanzielle Herausforderungen. Die Prävalenz nimmt stetig zu und somit auch die sozioökonomische Bedeutung.

Onkologische Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache weltweit dar, mit geschätzten 10 Millionen Toten im Jahr 2020.

Es wurden bereits deutliche Fortschritte in der Prävention und Diagnostik von Krebserkrankungen, sowie ihrer Therapie und Nachsorge erzielt.

2019 wurde durch die Bundesministerien für Gesundheit, Bildung und Forschung in Deutschland die Initiative "Nationale Dekade gegen den Krebs" ausgerufen mit dem Ziel, die Wissenschaft zu stärken und die Versorgung von Patienten nachhaltig zu verbessern.

Die Früherkennung von Tumorerkrankungen und möglichen Rezidiven gilt als wichtigster Baustein, um Patienten effektiv und erfolgreich therapieren zu können (WHO, 2020, BMBF, 2019, IARC, 2020a).

### 1.1. Das Hepatozelluläre Karzinom

### 1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

Primäre Lebertumore stellen weltweit die dritthäufigste Tumor-assoziierte Todesursache dar und stehen in der Anzahl neu auftretender onkologischer Erkrankungen international an sechster Stelle. Laut WHO wird die Anzahl der Todesfälle in den nächsten Jahrzehnten deutlich zunehmen und bereits im Jahr 2040 über eine Millionen Fälle betragen. Beim relativen 5-Jahresüberleben der häufigsten malignen Krebserkrankungen in den USA zwischen 2006 und 2012 stellten primäre Lebertumore die zweittödlichste onkologische Erkrankung dar, direkt hinter dem Pankreaskarzinom. Weltweit ist die Inzidenz heterogen verteilt. Die überwiegende Mehrzahl von primären Lebertumoren tritt durch die hohe endemische Prävalenz an chronischer Hepatitis in Asien und Afrika auf, aber auch in den westlichen Ländern steigt die Anzahl der Erkrankungen deutlich. Insgesamt sind Männer häufiger betroffen als Frauen und das Erkrankungsrisiko steigt mit dem Alter an. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) macht histologisch den häufigsten Typ der primären Lebertumore aus und hat ein relatives 5-Jahresüberleben von nur 18%. Das HCC ist assoziiert mit chronischen Lebererkrankungen. Die Leberzirrhose stellt die häufigste Präkanzerose dar (Vogel et al., 2022, IARC, 2020a, IARC, 2020b, Jemal et al., 2017, Ryerson et al., 2016).

Zu den Risikogruppen für die Entstehung eines HCCs zählen die chronischen Hepatitiden B und C, Alkoholabusus, die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH), außerdem seltene genetische Aberrationen, wie z.B. Morbus Wilson und Hämochromatose, sowie Alpha-1-Antitrypsin-Mangel. Als karzinogen gelten zudem der Konsum von Tabak und Aflatoxinen. Autoimmunerkrankungen der Leber, einschließlich der Autoimmunhepatitis und der Primären Biliären Cholangitis, können die Entwicklung einer Leberzirrhose verursachen und die Entwicklung eines HCCs begünstigen.

Wie Vogel et al. in ihrem Review erläutern, ist die Inzidenz von HCCs, die auf dem Boden einer viralen Hepatitis entstehen, seit den 2000er Jahren deutlich zurückgegangen, was zum einen durch eine höhere Impfrate gegen Hepatitis B und zum anderen durch deutlich verbesserte antivirale Therapien bedingt ist. Die Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCCs sind weltweit heterogen verteilt. Im asiatischen Raum dominiert die Hepatitis B, in Japan die Hepatitis C, während in Europa und den USA neben der chronischen Hepatitis C und den alkoholassoziierten Erkrankungen die NASH zunehmend an Bedeutung gewinnt.

Obwohl in den USA, einer repräsentativen westlichen Population, aktuell die chronische Hepatitis C weiterhin eine der häufigsten Ätiologien darstellt, wächst die Anzahl der HCC-Patienten mit einer NASH rapide und die NASH wird in den nächsten Jahren zu den führenden Ursachen für die Entstehung eines HCCs zählen. In einer 2019 erschienenen Arbeit über zur Lebertransplantation gelistete Patienten in den USA zeigte sich, dass zwischen 2002 und 2017 die NASH als zugrundeliegende Lebererkrankung für das HCC um das 8-fache gestiegen ist. Schon jetzt ist die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von 25% die häufigste chronische Lebererkrankung (Makarova-Rusher et al., 2016, Younossi et al., 2019, McGlynn and London, 2011, Lleo et al., 2019, Teufel et al., 2009, Vogel et al., 2022).

Um die Erkennung und Betreuung von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C und gegebenenfalls assoziierten Suchterkrankungen in den USA zu verbessern, wurde 2012 von den "Centers for Disease Control and Prevention" eine Empfehlung zur verbesserten Identifikation von Hepatitis C herausgegeben, die sich vor allem auf die zwischen 1945 und 1965 geborene Bevölkerungsgruppe bezieht. Im Vergleich zur Restbevölkerung weist diese Kohorte eine deutlich höhere Prävalenz von Hepatitis C auf. Somit steigen auch die Zahlen von Hepatitis C-assoziierten Spätfolgen, wie dem HCC, an, wenn die Betroffenen nicht gezielt identifiziert und therapiert werden (Smith et al., 2012, Smith et al., 2014).

Wie Villanueva in seinem Review zusammenfassend erläutert, können chronische Lebererkrankungen hepatische Inflammation und fibrotischen Umbau des Gewebes verursachen, sowie die Regenerationsfähigkeit von Hepatozyten stören. In der Folge kann eine Leberzirrhose entstehen und genetische und epigenetische Veränderungen auftreten, die sich wiederum leichter zu präneoplastischen Läsionen entwickeln. Allerdings kann das HCC auch bei Patienten diagnostiziert werden, die noch keine fortgeschrittenen fibrotischen Veränderungen des Lebergewebes aufzeigen, was beispielsweise bei nichtalkoholischer Steatohepatitis und chronischen Hepatitis-B-Infektionen beobachtet wird, oder auf dem Boden von Leberadenomen, die sich über eine maligne Transformation zu einem HCC entwickeln können, insbesondere beim Vorliegen von CTNNB1 Mutationen (Sorensen et al., 2003, Villanueva, 2019).

#### 1.1.2. Einführung in Diagnostik und Staging

Zur Früherkennung des HCCs wird bei Risikopatienten die Leber alle 6 Monate sonographisch untersucht. Je nach Leitlinie wird zusätzlich eine Bestimmung des Alpha-Fetoproteins (AFP) im Serum empfohlen. Zu der Zielgruppe der Früherkennung gehören Patienten mit Leberzirrhose (Child Pugh-Stadium-A und -B oder Child Pugh-Stadium-C mit geplanter Lebertransplantation), chronischer Hepatitis-B, sowie chronischer Hepatitis-C mit fortgeschrittener Fibrose. Im Fokus steht die Möglichkeit kurativer Therapieansätze bei HCC-Erkennung im lokal begrenzten Tumorstadium (EASL, 2018, Tzartzeva et al., 2018, Villanueva, 2019).

Die Diagnostik des HCCs beruht bei Patienten mit gesicherter Leberzirrhose maßgeblich auf bildgebenden Verfahren. Dabei sind hämodynamische kontrastmittelverstärkte bildgebende Untersuchungen mittels CT, Sonographie und MRT geeignet, um das typische Perfusionsverhalten des HCCs nachzuweisen, dessen Grundlage die zunehmende Arterialisation während der Hepatokarzinogenese bildet. Die in der Bildgebung erhobenen Befunde sind in den meisten Fällen so spezifisch für das HCC, dass auf eine histopathologische Diagnosesicherung verzichtet werden kann. Eine diagnostische Biopsie der Leber wird somit in deutlich selteneren Fällen durchgeführt (Matsui et al., 2011, Villanueva, 2019, Deutsche Krebsgesellschaft, 2023, Vogel et al., 2022).

Histopathologische Befunde nach chirurgischer Tumorresektion umfassen unter anderem das Vorliegen von mikro- oder makrovaskulärer Gefäßinvasion des Tumors (V-Status) und die Feststellung ob die Resektionsränder tumorfrei sind oder mikroskopisch bzw. makroskopisch Resttumorgewebe detektierbar ist (R-Status). Der V-Status ist ein prädiktiver Marker für die Prognose von HCC-Patienten und ein unabhängiger Risikofaktor für das Rezidiv-freie Überleben nach Tumorresektion. Für den R-Status wurde 2020 in einer multizentrischen retrospektiven Studie eine signifikante Assoziation zwischen der R1 Resektion und dem Auftreten von Rezidiven bei BCLC 0-A Patienten festgestellt. Der Zusammenhang zwischen dem R-Status und dem klinischen Verlauf der Tumorerkrankung wird in der Literatur bisher allerdings kontrovers beschrieben (Roayaie et al., 2009, von Felden et al., 2017, Sumie et al., 2014, Lee et al., 2016, Gruttadauria et al., 2020, Tsilimigras et al., 2020, Imamura et al., 2003, Ikai et al., 2004).

Für die klinische Stadieneinteilung stehen verschiedene Staging-Systeme zur Verfügung. Das Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Klassifikationssystem wurde 1999 mit dem Ziel entwickelt, Aussagen über die Prognose von HCC-Patienten und deren Therapie in einer Klassifikation abzubilden. Die Klassifizierung wurde seither stetig weiterentwickelt. Es handelt sich um das Standard-Klassifikationssystem für das HCC in Europa und den USA und wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Es werden fünf Stadien (0-D) unterschieden. Das Stadium 0 nach BCLC umfasst alle Patienten in einem sehr frühen Erkrankungsstadium des HCCs mit solitärem Tumor ≤2 cm. Bei einem Tumorherd <5 cm oder bei bis zu drei Tumorherden mit einer Größe <3 cm werden die Patienten dem BCLC-Stadium A zugeordnet. Sowohl Patienten im Stadium als auch Stadium nach BCLC haben 0 А keine Leberfunktionseinschränkungen und keine klinische Symptomatik und es liegen weder vaskuläre Infiltrationen noch extrahepatische Tumormanifestationen vor. In den frühen Erkrankungsstadien wird ein kurativer Therapieansatz verfolgt beispielsweise durch chirurgische Resektion des Tumors.

Beim Stadium B nach BCLC handelt es sich um das intermediäre HCC-Stadium mit einem multilokulären Tumorbefall der Leber, aber ohne vaskuläre Infiltration oder extrahepatische Metastasierung. Die Patienten sind weiterhin in einem guten Allgemeinzustand ohne Einschränkungen durch die Tumorerkrankung und haben eine kompensierte Leberfunktion. Sie kommen für verschiedene Therapiekonzepte in Frage, wie beispielsweise die Transarterielle Chemoembolisation (TACE).

Erst beim fortgeschrittenen Stadium C nach BCLC zeigen die Patienten einen symptomatischen Verlauf mit verminderter physischer Aktivität und Einschränkungen im Alltag oder es liegen vaskuläre Infiltrationen und/oder extrahepatische Tumormanifestationen vor. Diese Patienten werden in der Regel einer Systemtherapie unterzogen.

Das HCC im Endstadium wird als BCLC D klassifiziert und ist dadurch charakterisiert, dass eine dekompensierte Leberfunktion vorliegt, unabhängig vom Tumorbefund in der Leber. Bei Patienten, die dem Endstadium zugeordnet werden, steht die symptomatische Therapie in einem palliativen Setting im Vordergrund (Llovet et al., 1999, Villanueva, 2019, Deutsche Krebsgesellschaft, 2023, Reig et al., 2022). Die fünf BCLC-Stadien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Zur Beurteilung der Leberfunktion bei Leberzirrhose Patienten wird die Child-Pugh-Klassifikation verwendet (siehe Tabelle 1). Anhand der Prothrombinzeit in Sekunden oder des INR, dem Albumin und Bilirubin in mg/dl im Serum, sowie dem klinischen Nachweis von Aszites und dem Grad einer bestehenden Enzephalopathie kann anhand eines Punktesystems der Child-Pugh-Wert von A bis C ermittelt werden, wobei Child-Pugh A eine kompensierte Leberfunktion beschreibt. Das Ausmaß der Leberfunktionsstörung, abgebildet in der Child-Pugh-Klassifikation, korreliert mit der Prognose von sowohl Leberzirrhose- als auch HCC-Patienten und hat einen festen Stellenwert im klinischen Alltag gefunden. Child A wird bei 5-6 ermittelten Punkten vergeben, Child B bei 7-9 und Child C bei 10-15 Punkten. Wie Reig et al. in ihrem 2022 erschienenen Review zum aktuellen Stand der BCLC-Klassifikation darstellen, sollte die Beurteilung der Leberfunktion von HCC-Patienten allerdings nicht mehr nur auf dem Child-Pugh Score basieren, sondern durch Parameter wie dem AFP und dem Albumin-Bilirubin-Score (ALBI-Score) ergänzt werden. Der ALBI-Score ist ein Index zur objektiven Bewertung der Leberfunktion von HCC-Patienten, der mithilfe der beiden Messgrößen Bilirubin und Albumin ermittelt wird. In der Zusammenschau der genannten Parameter kann die Leberfunktion der Patienten als kompensiert oder dekompensiert eingestuft werden (Pugh et al., 1973, Mondazzi et al., 1994, Greten and Manns, 2008, Garcia-Tsao, 2016, Reig et al., 2022, Pinato et al., 2017).

Der Allgemeinzustand der Patienten wird im klinischen Alltag unter anderem durch den Performance Status gemäß der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) angegeben, der ebenfalls Berücksichtigung in der BCLC-Klassifikation findet. Es wird der physische Zustand von onkologischen Patienten beschrieben einschließlich ihrer körperlichen Einschränkungen im Alltag. Die Skala reicht von Grad 0, dem Normalzustand wie vor der Erkrankung mit uneingeschränkter Aktivität, bis zum Tod, der als Grad 5 definiert ist. Grad 1 umfasst eine verminderte physische Aktivität, die dem Patienten aber dennoch erlaubt im ambulanten Setting therapiert zu werden und leichte körperliche Arbeit zu verrichten, wie z.B. Haus- oder Büroarbeiten. Im Performance Status 2 nach ECOG ist keinerlei Arbeit mehr möglich, der Patient kann sich aber noch selbstversorgen und kann über 50% seiner Wach Zeit aufstehen (Oken et al., 1982, Azam et al., 2019).

Tabelle 1 und 2 geben einen Überblick über die beiden genannten Systeme zur Stadienbestimmung des HCCs (Deutsche Krebsgesellschaft, 2023, Greten and Manns, 2008, Reig et al., 2022).

Tabelle 1: Child-Pugh-Klassifikation

Parameter	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Bilirubin im Serum (mg/dl)	<2	2-3	>3
Albumin im Serum (mg/dl)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Prothrombinzeit (Sekunden)	<4	4-6	>6
Aszites (klinisch nachweisbar)	fehlend	leicht	deutlich
Enzephalopathie (Grad)	keine	Grad 1-2	Grad 3-4

Tabelle 2: Barcelona-Klassifikation (BCLC)

BCLC-Stadium	Allgemeinzustand	Tumor	Leberfunktion
0	ECOG 0	1 Herd <2 cm	kompensiert
A	ECOG 0	singulär oder ≤ 3 Herde < 3 cm	kompensiert
В	ECOG 0	multilokulär	kompensiert
С	ECOG 1-2	Gefäßinvasion/ extrahepatische Metastasen	kompensiert
D	ECOG 3-4	jedes Stadium	dekompensiert

#### 1.1.3. Einführung in Therapie und Nachsorge

Je nach Tumorstadium unterscheiden sich die Therapieoptionen des HCCs, wie Villanueva in seinem 2019 veröffentlichten Review zusammenträgt. Sie reichen von der chirurgischen Tumorresektion über transarterielle Therapien hinzu systemisch medikamentöser Behandlung des Tumors. Patienten mit einem HCC im Stadium 0/A und einer gut erhaltenen Leberfunktion mit allenfalls moderater portaler Hypertension eignen sich für einen kurativen Therapieansatz mittels Tumorresektion. Jedoch entwickeln innerhalb von 5 Jahren bis zu 70% der Patienten ein Rezidiv.

Patienten mit geringer Tumorlast und nicht resektablen Tumoren kommen möglicherweise für eine Lebertransplantation in Betracht, die den Vorteil hat, die zugrundeliegende Lebererkrankung zu heilen.

Die Tumorablation kommt bei BCLC 0/A Patienten beim Vorliegen von Kontraindikationen für die chirurgische Therapie in Frage. Dabei kommt vor allem die perkutane Radiofrequenzablation zum Einsatz, aber auch die Mikrowellenablation wurde als äquivalentes Verfahren in die Leitlinie aufgenommen.

Aufgrund der hohen Rezidivraten nach kurativ intendierter Therapie benötigen diese Patienten eine anschließende engmaschige Überwachung. Die Nachsorge wird üblicherweise durch CT- oder MRT-Untersuchungen alle 3 Monate nach erfolgter lokaler Therapie abgebildet und sollte bei erhöhten AFP-Werten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung durch regelmäßige Bestimmung des Tumormarkers ergänzt werden. In der Regel werden die Patienten nach 2 Jahren wieder in das aufgenommen mit halbjährlicher Früherkennungsprogramm sonographischer Kontrolle.

Die TACE eignet sich neben der transarteriellen Radioembolisation (TARE) zur Behandlung von HCC-Patienten im intermediären Stadium (BCLC B) mit erhaltener Leberfunktion.

Schreitet die Tumorerkrankung trotz transarterieller Therapie weiter fort oder liegt bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor (BCLC C), so wird auf den Einsatz von medikamentöser Systemtherapie zurückgegriffen. Lange Zeit war der Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib als einziges Medikament in der Erstlinientherapie des HCCs zugelassen. Mittlerweile steht mit Lenvatinib ein weiterer Tyrosinkinasen-Inhibitor zur Verfügung. 2021 wurde mit der Kombination des PD-L1-gerichteten Antikörpers VEGF-gerichteten Antikörpers Atezolizumab und des Bevacizumab eine Überlegenheit zur bisherigen Erstlinientherapie präsentiert, die entsprechend den neuen Standard in der Erstlinientherapie darstellt und in die Leitlinie aufgenommen wurde. Auch Durvalumab in Kombination mit Tremelimumab sind in der Erstlinientherapie empfohlen. In der Zweit- und Drittlinie finden weitere Medikamente ihren Einsatz (Regorafenib, Cabozantinib, Ramucirumab) (Villanueva, 2019, EASL, 2018, Deutsche Krebsgesellschaft, 2023, Finn et al., 2020).

#### 1.2. Biomarker im klinischen Management des Hepatozellulären Karzinoms

Bisher konnte in der Diagnostik des HCCs kein uneingeschränkt nutzbarer Biomarker etabliert werden.

In der Primärdiagnostik des HCCs ist die radiologische Diagnostik hinsichtlich Sensitivität und Spezifität möglichen Biomarkern überlegen. Hinzu kommt, dass entzündliche (z.B. virale Hepatitiden) oder auch neoplastische Lebererkrankungen (z.B. Cholangiokarzinom, Lebermetastasen) zu unspezifischen Erhöhungen genau der Biomarker führen können, die auch für die Diagnostik des HCCs interessant sind (Di Bisceglie et al., 2005, Yamashita et al., 2008, Koike et al., 2001, Sato et al., 1994, Adachi et al., 2003).

In der Verlaufsbeurteilung des HCCs haben Biomarker jedoch einen Stellenwert gefunden. Nichts destotrotz befinden sie sich in der klinischen Entwicklung und bisher konnten keine klaren Empfehlungen für die Verwendung ausgesprochen werden. Eine Ausnahme stellt das AFP dar (Deutsche Krebsgesellschaft, 2023).

### 1.2.1. Alpha-Fetoprotein und seine Lens culinaris Agglutinin-reaktive Fraktion

Das AFP wurde 1956 als neue Proteinfraktion in einer Papier-Elektrophorese aus fetalen Seren beschrieben, die dadurch auffiel, dass die zugehörige Bande in den Darstellungen der maternalen Seren fehlte. Es wurde angenommen, dass diese Proteinfraktion spezifisch für die frühe embryonale Entwicklung sein könnte (Bergstrand and Czar, 1956, Halbrecht and Klibanski, 1956).

Im weiteren Verlauf konnte festgestellt werden, dass Patienten mit HCC ebenfalls dieses zunächst als alpha-f-Globulin bezeichnete Protein im Serum aufwiesen (Nishi, 1970). Es wurde beobachtet, dass nur bei manchen der Patienten mit einem histologisch gesicherten HCC erhöhte AFP-Werte im Serum nachweisbar waren (Foli et al., 1969).

HCC-Patienten wiesen zudem sehr unterschiedlich hohe Serum AFP-Konzentrationen auf und der initiale Wert schien nicht immer mit der Tumorgröße und der Prognose der Patienten zu korrelieren. Dafür gab es einen Zusammenhang zwischen dem AFP und dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Resektion des Tumors zu einem signifikanten Abfall der AFP-Konzentration führte. Im Rahmen eines Rezidivs kam es zu einem erneuten Anstieg der Serumwerte und das AFP wurde als Marker für die Aktivität der Tumorerkrankung interessant (McIntire et al., 1972).

Heute ist das AFP im Serum der am breitesten eingesetzte Tumormarker für das HCC. In der aktuellen S3 Leitlinie wird das AFP als prognostischer Marker und zur Verlaufsbeurteilung empfohlen. Es eignet sich jedoch nicht zum Screening oder als alleiniger primärdiagnostischer Parameter, sondern kann in Kombination mit einer sonographischen Untersuchung die Sensitivität für die Früherkennung des HCCs verbessern (Tzartzeva et al., 2018, Deutsche Krebsgesellschaft, 2023, Trevisani et al., 2001, Marrero et al., 2009, Bruix et al., 2011).

Für Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung hat sich das AFP mit einem Cutoff-Wert von 20 ng/ml als Entscheidungshilfe für die Einleitung von Folgeuntersuchungen bewährt. Als diagnostisches Tool für das HCC ist der Biomarker allein nicht aussagekräftig genug, da zum einen nicht alle Tumoren zuverlässig erfasst werden und zum anderen Patienten mit einer anderen Grunderkrankung der Leber, die mit einer AFP-Erhöhung einhergeht, fälschlicherweise als tumorverdächtig gelten können. Das kann insbesondere bei einer viralen Genese zutreffen. Zum Beispiel haben HBV- und HCV-Patienten mit Leberzirrhose aber ohne HCC vergleichsweise hohe AFP-Werte, und zwar auch im Vergleich zu Patienten mit chronischer Hepatitis ohne Leberzirrhose. Ein Serum-Wert über 100 ng/ml ist schon spezifischer. Dieser kann als Bestätigungstest nach Bildgebung für Patienten mit HCC-Verdacht erwogen werden (Trevisani et al., 2001, Durazo et al., 2008).

Bei der Untersuchung von AFP als diagnostischer Biomarker für das HCC im Frühstadium hat sich in einer Arbeit aus den USA der Biomarker schon bei einem Cut-Off-Wert von 10,9 ng/ml als sensitiv (66%) und spezifisch (81%) gezeigt (Marrero et al., 2009).

Bei Patienten mit einem HCC sind hohe AFP-Serumwerte mit einer Vielzahl von Tumoreigenschaften vergesellschaftet, wie beispielsweise mit der Größe des Tumors, einem niedrigen Differenzierungsgrad, einer verstärkten Zellproliferation und dem Vorliegen von vaskulärer Gefäßinvasion. Die AFP-Konzentration korreliert signifikant mit dem Vorliegen multipler Läsionen und ist auch bei einer hohen Tumorlast, sowie beim metastasierten HCC deutlich erhöht. Hohe AFP-Serumwerte sind zudem assoziiert mit einem schlechten Gesamtüberleben und einem erhöhten Risiko für Rezidive. Der Schwellenwert von AFP-Konzentrationen über 400 ng/ml gilt als prognostischer Indikator (Montal et al., 2019, Tangkijvanich et al., 2000, Ikai et al., 2004, Ma et al., 2013, Durazo et al., 2008).

Zudem wurde beobachtet, dass präoperative AFP-Werte über 1000 ng/ml das Vorhandensein einer Gefäßinvasion des Tumorgewebes anzeigen können sowie das erhöhte Risiko, nach Lebertransplantation ein Rezidiv zu erleiden. Bei einer Lebertransplantation zur Therapie von HCC-Patienten sind schon erhöhte AFP-Werte ab 16 ng/ml zum Zeitpunkt der Transplantation mit einem deutlich schlechteren postoperativen Überleben vergesellschaftet und der Biomarker kann in diesem Zusammenhang unabhängig von der Gesamttumorlast für die Einschätzung der Prognose berücksichtigt werden (Hameed et al., 2014, Berry and Ioannou, 2013).

AFP-L3 ist die Lens culinaris Agglutinin (LCA)-reaktive Fraktion des Gesamt-AFP und wird als Tumormarker für das HCC eingesetzt (Toyoda et al., 2011, Jia et al., 2014). Man kann die Isoform des AFP bereits in der Frühdiagnostik des HCCs unterstützend verwenden (Durazo et al., 2008, Sato et al., 1993).

In den 1970er Jahren konnten zunächst zwei verschieden geladene AFP-Moleküle nachgewiesen werden und es wurde vermutet, dass diese einen Unterschied in den Kohlenhydrat-Anteilen aufwiesen (Alpert et al., 1972). Es stellte sich heraus, dass es sich um Isoproteine des AFP handelte, die sich durch ihre Lektin-Reaktivität unterschieden. Patienten mit einem HCC wiesen einen erhöhten Anteil des Lektinreaktiven, fukosylierten AFP am Gesamt-AFP im Serum auf (Buamah et al., 1986, Aoyagi et al., 1985).

Es gelang anhand einer Elektrophorese, welche die Lektin-Reaktivität der verschiedenen AFP-Anteile darstellen konnte, ein AFP-Profil zu erstellen und in diesem Zusammenhang wurden erstmals die Banden AFP-L1, AFP-L2 und AFP-L3 beschrieben. Insbesondere die Fraktionen AFP-L1 und AFP-L3 unterschieden sich deutlich je nach Grunderkrankung der Patienten (z.B. fulminante Hepatitis, HCC, Kolonkarzinom, benigne Lebererkrankungen, Leberzirrhose). Es wurde beobachtet, unabhängig AFP-L3-Anteil am Gesamt-AFP dessen dass der von Gesamtkonzentration im Serum bei Patienten mit HCC deutlich erhöht war. Auch Patienten mit fulminanter Hepatitis zeigten erhöhte AFP-L3-%-Werte. Wurde das AFP-L3 in Prozent vom Gesamt-AFP angegeben gewann es an Aussagekraft, denn die Konzentrationsangabe als absolute Zahl hing von der Gesamtkonzentration des AFP ab, von Bedeutung war aber der prozentuale Anteil am Gesamt-AFP. Dennoch stieg die Sensitivität der AFP-L3 Fraktion in Prozent leicht mit dem Anstieg der Gesamtkonzentration des AFP. Die Höhe des AFP-L3 korrelierte nicht mit der Tumorgröße, allerdings wiesen gut differenzierte HCCs eher niedrigere AFP-L3-%-Werte auf. Das AFP-L3 wurde also schon in den frühen 1990er Jahren als HCC-Biomarker bekannt und als diagnostisches Tool zur Abgrenzung eines HCCs von einer chronischen Lebererkrankung beschrieben. AFP-L2 hingegen war als Fraktion bei extrahepatisch malignen Erkrankungen z.B. im Gastrointestinal-Trakt mit adenokarzinomatöser Differenzierung des Tumors erhöht und ließ sich schon damals in der Elektrophorese häufig nicht gut von der AFP-L3 Fraktion abgrenzen (Taketa et al., 1990, Taketa et al., 1993).

Heute ist bekannt, dass die kombinierte Bestimmung von Gesamt-AFP und AFP-L3 die Sensitivität in der Diagnostik eines HCCs erhöhen kann. Das AFP-L3 gilt in diesem Zusammenhang als spezifischer im Vergleich zum Gesamt-AFP. Taketa et al. konnten schon 1993 in einer Arbeit zeigen, dass AFP-L3 bereits ungefähr 4 Monate vor Auftreten des HCCs positiv sein kann, zwar mit einer Sensitivität von 49%, aber einer Spezifität von 81% (Marrero et al., 2009, Taketa et al., 1993, Durazo et al., 2008, Chen et al., 2020). Patienten, die erhöhte AFP-L3-Werte und eine Leberzirrhose haben, haben möglicherweise bereits ein HCC oder können innerhalb der nächsten Monate eine in bildgebenden Verfahren nachweisbare Läsion entwickeln. In diesem Zusammenhang kann das AFP-L3 also als prädiktiver Marker für die HCC-Entwicklung dienen. Da nicht alle HCC-Patienten eine erhöhte L3-Fraktion aufweisen, kann der Marker allerdings nur in einigen Fällen helfen zwischen einer Leberzirrhose und einem bereits bestehenden HCC zu differenzieren (Sato et al., 1993).

Eine Studie aus dem Jahr 2014 beschreibt eine signifikante Erhöhung von AFP und AFP-L3 bei HCC-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und der Gruppe mit benignen Lebererkrankungen. AFP-L3 kann demnach insbesondere im Bereich von einem AFP-Serumwert zwischen 10-200 ng/ml helfen, zwischen einem HCC und einer benignen Lebererkrankung zu unterscheiden, weil in diesem Bereich das Gesamt-AFP eben häufiger auch durch eine chronische Hepatitis erhöht ist. Zusammenfassend erhöht AFP-L3 die Sensitivität und Spezifität in der Primärdiagnostik des HCCs insbesondere bei Patienten mit Gesamt-AFP-Konzentrationen <400 ng/ml (Jia et al., 2014).

Seitdem es 2011 das erste Mal gelungen ist die L3-Fraktion bei Gesamt-AFP- Werten unter 20 ng/ml zu bestimmen, kann auch in diesem niedrigen Konzentrationsbereich das HCC im frühen Erkrankungsstadium mithilfe von Biomarkern detektiert werden. Eine höhere Sensitivität wird in diesem Konzentrations-Bereich durch die kombinierte Bestimmung von AFP-L3 und Des-gamma-carboxy Prothrombin (DCP) erreicht (Toyoda et al., 2011).

positive AFP-L3 HCCs zeigen Erstdiagnose bei häufig aggressivere Tumoreigenschaften, Portalveneninvasion, eine wie die sowie niedrigere Differenzierung des Tumorgewebes, sowohl unabhängig von der eigentlichen Größe des Tumors als auch von der Gesamt-AFP-Konzentration. Der Nachweis von AFP-L3 kann somit für das Outcome der Patienten relevant sein und die Bestimmung vor Therapiebeginn hat prognostische Aussagekraft hinsichtlich des Gesamtüberlebens (Oka et al., 2001, Carr et al., 2007, Toyoda et al., 2011).

Insgesamt verändert sich bei HCC-Patienten der AFP-L3-Anteil wenig mit dem Anstieg des Gesamt-AFPs, wenn beispielsweise im Verlauf der Erkrankung die Tumorlast steigt (Durazo et al., 2008).

#### 1.2.2. Des-gamma-carboxy Prothrombin

Das DCP wird als abnormales Prothrombin oder auch als PIVKAII ("protein induced by vitamin K absence or antagonist II") bezeichnet und stellt die Vorstufe des Gerinnungsfaktors Prothrombin dar. Posttranslational wird DCP durch die Vitamin-K abhängige Gamma-Glutamylcarboxylase zu Prothrombin modifiziert. DCP selbst geht keine Interaktionen mit Gerinnungsfaktoren ein. Die Ursache für den vermehrten Anfall von DCP bei HCC ist noch nicht gänzlich verstanden, wird aber mit einer exzessiven Produktion von DCP durch die malignen HCC-Zellen erklärt (Inagaki et al., 2011).

In den 1980er Jahren wurde erstmals beobachtet, dass DCP bei HCC-Patienten erhöht sein kann. Das war gerade bei solchen Patienten interessant, die sehr niedrige oder sogar nicht nachweisbare AFP-Werte aufzeigten. DCP schien mit der Größe des Tumors anzusteigen, sodass es als diagnostisches Tool in kleinen Tumoren zunächst keinen Benefit erbrachte. DCP fiel nach einer Tumorresektion ab und wurde bei einem Rezidiv des HCCs wieder positiv (Fujiyama et al., 1988, Liebman et al., 1984).

Es fiel auf, dass ein Vitamin-K Mangel nicht immer einhergeht mit erhöhten DCP-Werten und dass also andersherum ein Vitamin-K Mangel ein erhöhtes DCP nicht ausreichend erklärt. Auch die Vitamin-K Substitution vor der DCP-Messung schien keinen relevanten Einfluss auf die gemessene DCP-Konzentration im Serum der HCC-Patienten zu nehmen (Fujiyama et al., 1988, Liebman et al., 1984). Dennoch ist der Vitamin-K Spiegel eine mögliche Einflussgröße auf gemessene DCP-Werte im Serum (Inagaki et al., 2011).

Wie in den letzten Jahren in verschiedenen Reviews herausgearbeitet wurde, wird DCP klinisch als Tumormarker in der Primärdiagnostik des HCCs, sowie in der Nachsorge nach kurativ intendierter Therapie verwendet und ist insofern spezifisch. als dass chronische Lebererkrankungen wie Leberzirrhose oder Hepatitis in der Regel nicht mit einer DCP-Erhöhung einhergehen. Die Sensitivität des DCP kann durch die von ihm unabhängigen Biomarker AFP und AFP-L3 erhöht werden, aber auch bei AFP-negativen Patienten ermöglicht DCP die HCC-Detektion (Inagaki et al., 2011, De et al., 2016, Zhu et al., 2014, Feng et al., 2021). Marrero et al. stellten 2009 fest, dass sich die diagnostische Aussagekraft von DCP bei der Früherkennung des HCCs je nach zugrundeliegender Lebererkrankung unterscheidet, zugunsten der viralen Ätiologie (Marrero et al., 2009). Hingegen untersuchte eine 2021 veröffentlichte Arbeit aus Japan die präoperativen DCP-Spiegel von Patienten mit HCC-Resektion und stellte sie in inversem Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer Virushepatitis. Dabei stellte sich heraus, dass Patienten, deren HCC nicht auf einer chronischen Hepatitis B oder C basierte, sondern z.B. auf einer NASH oder einer Alkoholischen Steatohepatitis (ASH), signifikant höhere DCP-Spiegel aufwiesen. Diese waren mit einem signifikant kürzeren Rezidiv-freien Überleben assoziiert. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten gingen bei allen HCC-Patienten der Studie erhöhte DCP-Spiegel mit einem schlechteren Gesamtüberleben einher und waren assoziiert mit aggressiven Tumoreigenschaften des HCCs, wie der Tumorgefäßinvasion, einem schlechten Differenzierungsgrad des Tumorgewebes und insgesamt einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit schlechterer Prognose (Hayashi et al., 2021, Kobayashi et al., 2011, Feng et al., 2021). Bei der Evaluation des Biomarkers bei Patienten mit histologisch gesichertem HCC in den USA 2011, wurde eine Assoziation von DCP mit dem Vorhandensein von Metastasen gefunden. Es war bereits 2001 in einer prospektiven Studie in Japan gezeigt worden, dass erhöhte DCP-Spiegel bei Erstdiagnose des HCCs mit dem Tumoreinbruch in die Portalvene im weiteren Krankheitsverlauf assoziiert sind. Beide Kriterien wirken sich auf die Prognose der Patienten aus (Carr et al., 2007, Koike et al., 2001).

# 1.2.3. Zusammenfassung - Das Biomarker Triplet

Zusammenfassend sind AFP, AFP-L3 und DCP bei HCC-Patienten im Vergleich zu Patienten mit einer akuten oder chronischen Lebererkrankung ohne HCC häufig erhöht (Durazo et al., 2008, Qi et al., 2020, Jia et al., 2014).

DCP scheint AFP und AFP-L3 überlegen, um ein HCC von einer chronischen Lebererkrankung zu unterscheiden. Insbesondere die Kombination von DCP und AFP-L3 kann die diagnostische Sensitivität für die Detektion eines HCCs erhöhen. Jedoch wird angenommen, dass sich die Sensitivität der einzelnen Marker und deren Kombination in der asiatischen und westlichen Population unterscheidet. So ergab die Untersuchung von HCC-Patienten in den USA eine überlegene Sensitivität für die Kombination aller drei Messgrößen des sogenannten Biomarker Triplets. Dennoch scheint auch in der westlichen Population die Spezifität von AFP-L3 und DCP für das HCC der des AFP überlegen zu sein. Zusammenfassend ergänzt sich das Biomarker Triplet in der Primärdiagnostik des HCCs und führt folglich zu einer höheren Detektionsrate auf der einen Seite und zu einer niedrigeren Rate falsch-positiver Ergebnisse auf der anderen Seite (Qi et al., 2020, Carr et al., 2007).

Welche Rolle das Triplet in Bezug auf die Prädiktion von Rezidiven nach HCC-Resektion spielt ist Gegenstand aktueller Forschung.

Studien für Patientenkollektive im asiatischen Raum mit entsprechend hohen Anteilen an Hepatitis B konnten zeigen, dass die Erhöhung von sowohl AFP als auch DCP zum Zeitpunkt der Resektion in einem signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten von Rezidiven in den folgenden 2 Jahren steht. Zudem gehen hohe DCP-Level vor geplanter Lebertransplantation mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einher, ein Rezidiv zu erleiden. (Kamiyama et al., 2015, Chon et al., 2012, Lai et al., 2017). Kobayashi et al., die in ihrer 2011 veröffentlichten Studie die AFP-L3-Fraktion mittels "µTAS Immunoassay System" bestimmten, stellten bei einem Cut-off Wert von >5% eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten eines Rezidivs nach kurativ intendierter HCC-Therapie fest, bei einem Patientenkollektiv, das zu 68% aus HCV-infizierten, zu 21% aus HBV-infizierten Patienten und zu 11% aus anderen Ätiologien für das HCC bestand (Kobayashi et al., 2011). In der S3 Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des HCCs, die im August 2023 in einer erneuerten Version erschienen ist, wird AFP als einziger Marker genannt, für den eine ausreichende Datenlage vorhanden ist, die bestätigt, dass hohe AFP-Werte mit einer schlechteren postoperativen Prognose hinsichtlich der Entwicklung von Rezidiven einhergehen können. Dieser Zusammenhang bezieht sich allerdings auf Patienten, die eine Lebertransplantation erhalten haben (Deutsche Krebsgesellschaft, 2023, Berry and Ioannou, 2013, Hameed et al., 2014).

#### 1.2.4. Zirkulierende Tumorzellen

Bei bestimmten Tumorentitäten lassen sich im peripheren Blut CTC nachweisen, die möglicherweise einen wertvollen Beitrag für die präzise Diagnostik und Prognoseabschätzung onkologischer Erkrankungen leisten können. Die klinische Relevanz und Routinetauglichkeit sind Gegenstand aktueller Forschung. Ein geeignetes Messverfahren zur Detektion von CTC kam erstmals 2004 zum Einsatz. Dabei handelt es sich um das halbautomatisierte Gerät "CellSearchTM system" (CSS). In der Studie wurden CTC bei Patienten gemessen, die an einem metastasierten Mammakarzinom erkrankt waren. Erhöhte CTC-Level (>= 5 Zellen pro 7,5 ml Blut) vor der Einleitung einer neuen Therapie, sowie beim ersten anschließenden Follow-up, waren valide Prädiktoren für das schlechtere progressionsfreie Überleben und das schlechtere Gesamtüberleben der Patienten. Durch ihre frühe prognostische Aussagekraft waren erhöhte CTC-Level den bildgebenden Verfahren überlegen (Cristofanilli et al., 2004).

In einer multizentrische Validierungsstudie konnte später anhand von Kriterien wie der laborinternen Reproduzierbarkeit, der Richtigkeit und Präzision, sowie der Übereinstimmung im externen Laborvergleich, die analytische Leistungsfähigkeit des CSS erfolgreich geprüft werden. Die genannte Validierungsstudie bezog sich auf die Detektion von CTC im peripheren Blut von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom.

Das CSS, das auch zur Bestimmung der CTC in dieser Arbeit zum Einsatz kam, ausschließlich Tumorzellen, die sowohl epitheliales detektiert ein Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) als auch Zytokeratine exprimieren. EpCAM-positive CTC haben per Definition eine ovale bis runde Form, besitzen einen intakten Nukleus und sind Keratin-positiv, sowie CD45-negativ (zur Unterscheidung von Leukozyten). Im Rahmen des halbautomatisierten Verfahrens werden im letzten Analyseschritt mikroskopische Bilder durch zwei unabhängige Untersucher beurteilt und EpCAMpositive CTC quantifiziert. Die Probenstabilität der CTC bei Raumtemperatur im für Lagerung und Transport vorgesehenen Röhrchen beträgt 72 Stunden (CellSaveTM Preservative Tubes, Veridex)(Riethdorf et al., 2007).

Schulze et al. fanden 2013 heraus, dass das Vorhandensein EpCAM-positiver CTC im peripheren Blut von HCC-Patienten, gemessen mit dem CSS, mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben korreliert, und sowohl mit mikroskopischer als auch makroskopischer Tumorgefäßinvasion, sowie einer systemischen Tumorlast assoziiert ist (i.e. Metastasen oder Gefäßinfiltration, entsprechend BCLC Stadium C). Die pathologischen Befunde des resezierten Tumorgewebes zeigten, dass 91% der CTC positiven Patienten mikroskopisch nachweisbare Gefäßinvasionen aufwiesen (positiv prädiktiver Wert). Zudem bestand eine hohe Spezifität (92%), während die Sensitivität nur 56% betrug. Die Autoren der Studie konnten auch einen Zusammenhang zwischen CTC-Nachweis und stark erhöhten AFP-Werten (>400 ng/ml) feststellen. Bei Patienten mit einem HCC im fortgeschrittenen Tumorstadium nach BCLC (Stadium B und C) wurden CTC häufiger nachgewiesen, insbesondere bei vorliegender makroskopischer Gefäßinvasion und/oder extrahepatischen Metastasen. 61% der Patienten mit CTC-Nachweis waren BCLC C klassifiziert (positiv prädiktiver Wert), die Sensitivität betrug 58% bei einer Spezifität von 83%. Von den insgesamt 41 negativen CTC-Befunden in der Studie (insgesamt n=78, davon n=59 mit HCC) waren 33 Patienten im Stadium A oder B nach BCLC. Dennoch gab es auch Patienten, die trotz ihres noch frühen Tumorstadiums, CTC positiv waren (Schulze et al., 2013).

Im weiteren Verlauf wurde anhand sowohl eines westlichen als auch eines asiatischen Patientenkollektivs mit entsprechend unterschiedlichen Ätiologien der Zusammenhang zwischen dem Nachweis EpCAM-positiver CTC und dem Auftreten von Rezidiven nach kurativ intendierter HCC-Resektion untersucht. In beiden Arbeiten wurde gezeigt, dass der präoperative Nachweis von EpCAM-positiven CTC, gemessen mit dem CSS, mit einem deutlich erhöhten Risiko einhergeht, ein Frührezidiv zu entwickeln. So konnten von Felden et al. in ihrer 2017 veröffentlichten Arbeit, die 57 HCC-Patienten im Stadium 0-A nach BCLC umfasste, anhand des Nachweises von EpCAMpositiven CTC, Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein Frührezidiv innerhalb von 2 Jahren nach ihrer kurativ intendierten Leberresektion identifizieren. Der positiv prädikative Wert lag bei 89% und nachdem solche Patienten ausgeschlossen wurden, bei denen der Rezidivstatus nach Resektion unbekannt blieb, sogar bei 100 %. Allerdings blieb die Sensitivität der CTC mit 22% niedrig mit der Konsequenz, dass man viele Patienten verpasste. Das Rezidiv-freie Überleben war mit 5,0 ± 1,5 Monaten bei Patienten mit Nachweis von EpCAM-positiven CTC im Vergleich zu Patienten ohne CTC (12,0 ± 2,5 Monate) deutlich verkürzt (p=0,027). Es handelte sich um die erste Studie, die den Einfluss EpCAM-positiver CTC-Detektion als Biomarker in einer westlichen Kohorte mit kurativ intendierter Resektion bei frühem HCC untersuchte. Sun et al. konnten bereits 2013 in einer prospektiven Studie aus Shanghai anhand einer Kohorte mit überwiegend HBV-und HCV-assoziierten HCCs feststellen, dass Patienten, die präoperativ über 2 CTC pro 7,5 ml Blut aufwiesen, ein signifikant erhöhtes Risiko hatten im Zeitraum von einem Jahr nach OP an einem Rezidiv zu erkranken. Eine Rezidivprädiktion war in diesem Zusammenhang auch für Patienten mit niedrigeren AFP-Spiegeln im Bereich unter 400 ng/ml möglich (von Felden et al., 2017, Sun et al., 2013).

#### 1.3. Arbeitshypothese und Fragestellung

In der Versorgung des HCCs erfolgt eine Stadieneinteilung nach BCLC. Tumore im Frühstadium (BCLC 0-A) werden in kurativer Absicht chirurgisch reseziert.

Nach HCC-Resektion treten bereits innerhalb der ersten 24 Monate bei über 50% der Patienten Rezidive auf. Um diese Frührezidive rechtzeitig zu erkennen, ist ein engmaschiges postoperatives Monitoring in Form von Schnittbilddiagnostik unerlässlich.

Ziel dieser Arbeit ist es, Biomarker zu evaluieren, die Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein Frührezidiv bereits zum Zeitpunkt der Resektion identifizieren.

Bei einem im Frühstadium diagnostizierten HCC ist der Nachweis EpCAM-positiver CTC im peripheren Blut mit einem erhöhten Risiko für Frührezidive und Mikrometastasen assoziiert. Trotz des hohen positiv prädiktiven Wertes ist die Sensitivität dieses Biomarkers jedoch nicht ausreichend.

Die Serum-Biomarker AFP, AFP-L3 und DCP werden mit dem Gerät "µTASWako ™ i30" bestimmt und sind vielversprechende diagnostische und prognostische Marker für das HCC. Sie werden zusammenfassend als Biomarker Triplet bezeichnet.

Ziel dieser Arbeit ist es,

- die Validierungsdaten f
  ür Quantitative Messmethoden nach der Rili-B
  ÄK f
  ür das Ger
  ät "µTASWako ™ i30" zu erheben.

Die Hypothesen dieser Arbeit lauten,

- 1. dass der Methodenvergleich mit der Messgröße AFP Messdifferenzen zwischen den beiden analytischen Methoden aufzeigt, wie sie für Immunoassays in der Literatur vorbeschrieben sind.
- 2. dass die kombinierte Berücksichtigung des Nachweises von EpCAM-positiven CTC und/oder die Erhöhung des Biomarker Triplets zum Zeitpunkt der kurativ intendierten HCC-Resektion die Prädiktionsrate von Frührezidiven verbessert.

#### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Studiendesign und Vorgehen

In der vorgelegten Arbeit wurde in einer retrospektiven monozentrischen Datenerhebung der postoperative Krankheitsverlauf nach kurativ intendierter Tumorresektion von 58 Patienten mit HCC im Frühstadium beobachtet und mit ausgewählten Biomarkern in Zusammenhang gestellt, deren Nachweis aus präoperativ entnommenen Blutproben erfolgte. Der primäre Endpunkt war das Auftreten eines Frührezidivs innerhalb von 24 Monaten nach HCC-Resektion, die sekundären Endpunkte stellten das Frührezidiv-freie Überleben, das Rezidiv-freie Überleben und das Gesamtüberleben dar.

Es wurden folgende Patientengruppen gebildet:

- Positives Biomarker Triplet versus normwertiges Biomarker Triplet: mindestens ein beliebiger Biomarker des Biomarker Triplets AFP, AFP-L3 und DCP erhöht versus alle Biomarker des Triplets normwertig
- Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet versus keinen CTC-Nachweis und normwertiges Biomarker Triplet: entweder mindestens ein beliebiger Biomarker des Triplets AFP, AFP-L3 und DCP erhöht und/oder Nachweis von EpCAM-positiven CTC versus alle Biomarker des Triplets normwertig und kein CTC-Nachweis

Das Studiendesign ist in der Abbildung 1 zusammengefasst.

Die Rekrutierung der HCC-Patienten erfolgte über die I. Medizinische Klinik und Poliklinik und über die Klinik für Viszerale Transplantationschirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE). Die Studie wurde von der Ethik Kommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (Ethikvotum PV3578) und alle Patienten wurden vor Beginn der Studie über das Studienprotokoll aufgeklärt und die schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Einschlusskriterium war die Diagnose eines HCCs mit kurativ intendierter Resektion. Minderjährige Patienten und Patienten mit aktiven Zweitmalignomen wurden ausgeschlossen.

Die Blutproben wurden zwischen Juli 2011 und September 2015 am UKE gesammelt. Die Serumproben wurden durch die I. Medizinische Klinik und Poliklinik in Proben-Aliquots bei -80° Celsius asserviert.

Aus den Serumproben wurden das Biomarker Triplet AFP, AFP-L3 und DCP mittels des Analysegerätes "µTASWako ™ i30" bestimmt. Die Messungen des Biomarker Triplets wurden im Juli und August 2019 durchgeführt. Die Referenzwerte für das Biomarker-Triplet sind im Kapitel 2.2.1.3. aufgeführt.

EpCAM-positive CTC wurden aus CellSave<sup>™</sup> Preservative Tubes (Veridex) mittels des halbautomatisierten Messgerätes CSS bestimmt.

Die klinischen Daten des Patientenkollektivs wurden aus den elektronischen Patientenakten in "Soarian Clinicals" der Firma "Cerner Health Services" pseudonymisiert und in einer passwortgeschützten Datenbank ohne Unique-Identifier und einer zweiten passwortgeschützten Patientenliste erhoben.

Es wurden die Messergebnisse der Biomarker für jeden Patienten in Excel-Tabellen erfasst und weitere Laborwerte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aus dem Laborinformationssystem "GLIMS" der Firma "MIPS" erhoben. Zudem wurden die folgenden klinischen Patientencharakteristika aus den elektronischen Patientenakten erfasst. Neben Alter und Geschlecht der Patienten wurden die histopathologischen Daten zum Zeitpunkt der Resektion erhoben und geprüft, ob eine mikro- (V1) oder makrovaskuläre (V2) Gefäßinvasion vorlag (oder keine = V0), und ob die Resektionsränder tumorfrei waren (R0) oder nicht (R1 = mikroskopisch Tumor am Rand detektierbar, R2 = makroskopisch Tumorgewebe detektierbar). Es wurde das Tumor Stadium nach BCLC-Klassifikation eingeteilt und bei Vorliegen einer Leberzirrhose die Leberfunktion nach Child-Pugh eingeschätzt. Zudem wurde die Ätiologie des HCCs erfasst.

Im postoperativen Verlauf wurde beobachtet, ob und nach welchem Zeitraum die Patienten an einem Rezidiv erkrankten und/oder verstarben. Ein Rezidiv des HCCs wurde primär durch kontrastmittelgestützte bildgebende Verfahren (CT oder MRT alle 8-12 Wochen) diagnostiziert, deren Auswertung den Kriterien der European Association for the Liver (EASL) folgte (EASL, 2018).

Den primären Endpunkt stellte das Auftreten eines Frührezidivs innerhalb von 24 Monaten nach kurativ intendierter HCC-Resektion dar. Demgegenüber wurden Patienten gestellt, bei denen durch Bildgebung keine Diagnose eines Rezidivs erfolgte oder deren Rezidiv erst nach über 2 Jahren auftrat. Ausschlusskriterium für die Analyse des Frührezidiv-freien Krankheitsverlaufs stellte die fehlende Bildgebung zur Erhebung des Rezidivstatus dar.

Es wurden 3 sekundäre Endpunkte untersucht.

Für das Rezidiv-freie Überleben wurden sowohl der Tod als auch das Auftreten eines Rezidivs als Ereignis gezählt. Zensiert wurden Patienten, die zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups kein Rezidiv oder Tod erlebt haben, einer Lebertransplantation zugeführt wurden und solche ohne Verlaufsdaten ("lost to follow-up").

Beim Frührezidiv-freien Überleben hingegen wurden nur die Ereignisse Tod oder Frührezidiv innerhalb von 24 Monaten nach Tumorresektion gezählt. Da sich diese Auswertung nur auf 24 Monate nach der Resektion beschränkt, wurden, im Vergleich zum Rezidiv-freien Überleben, Patienten mit Eintritt von Tod oder Rezidiv nach über 2 Jahren als ohne Ereignis gewertet.

Der dritte sekundäre Endpunkt war das Gesamtüberleben der untersuchten Kohorte. Es wurde der Todeseintritt über den gesamten Beobachtungszeitraum als Ereignis berücksichtigt. Das Datum der letzten Verlaufskontrolle oder einer Lebertransplantation wurde als Zeitpunkt der Zensur gewertet.

Im Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie des UKW erfolgte die histopathologische Aufarbeitung der HCC-Resektate zur Diagnosesicherung und Erhebung der histologischen Charakteristika des Tumorgewebes und Tumor-freien Lebergewebes in Anlehnung an die TNM-Klassifikation und dem METAVIR-Score (F0-1 nicht-fibrotisch, F2-3 fibrotisch und F4 zirrhotisch). Die Durchführung entsprach dem Standardvorgehen und es wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angewandt, sowie eine immunhistochemische Aufarbeitung der Gewebeproben durchgeführt. Dabei kamen die Standard-Antikörper in der HCC-Diagnostik Anti-GPC3 (Glypican-3, 1/100, Clone IG12; Biomosaics, USA), Anti-HSP-70 (Heat-Shock-Protein 70, 1/250, Clone SC24; Santa Cruz Biotechnology, USA) und Anti-GS (Glutaminsynthetase, 1/500, Clone MAB 302; Chemicon International, USA) zum Einsatz. Glypican-3 und HSP-70 waren positiv, wenn mehr

als 5 % der Hepatozyten immunreaktiv waren, während die Glutaminsynthetase-Färbung bei einer Reaktivität von mehr als 50% der Hepatozyten als positiv galt (Di Tommaso et al., 2009). In Einzelfällen wurden ergänzende immunhistochemische Sonderfärbungen durchgeführt.

_
σ
Ś
Û
Ā
<u> </u>
Ð
-
σ
_
S

Kohorte (n= 58) Kurativ intendierte HCC-Resektion\*

Tag 0

lag u				
	Follow-up Untersuchunge	en alle 3 Monate		Studienende: Letztes Follow-up
	Frührezidiv	91snoM ₽S		Lebertransplantation Tod
	Rezidiv			
Primärer Endpunkt:	Sekundäre Endpunkte:			
Frührezidiv-freier Krankheitsverlauf	Rezidiv-freies Überleben	Frührezidiv-freies Überleben	Gesamtüberleben	
Ereignis: Frührezidiv <= 24 Monate	Ereignis: Rezidiv/Tod	Ereignis: Rezidiv/Tod <= 24 Monate	Ereignis: Tod	
Tag -1 Blutentnahme 24 Stunden vor Operation 1. Serum Aliquot (-80°C) → Biomarker	Triplet Bestimmung am µTASWa	ako <sup>TM</sup> i30		

Serum Aliquot (-80°C) → Biomarker Triplet Bestimmung am μTASWako<sup>TI</sup>
 Cell Save <sup>TM</sup> (Raumtemperatur) → Bestimmung EpCAM-positiver CTC

Abbildung 1

Das Studiendesign ist schematisch anhand eines Zeitstrahls in Form der blauen horizontalen Linie dargestellt. Die HCC-Resektion stellte den Startpunkt des Frührezidive gewertet (orange). Primärer klinischer Endpunkt war der Frührezidiv-freie Krankheitsverlauf. Es wurden als sekundäre klinische Endpunkte das Beobachtungszeitraums dar. Die Blutentnahme der Patienten erfolgte 24 Stunden vor der Operation. Das Studienende wurde durch das Datum der letzten Follow-up Untersuchung, Lebertransplantation oder Versterben des Patienten bestimmt. Die Patienten wurden im Zeitraum nach der HCC-Resektion im Rahmen der Nachsorge alle 3 Monate hinsichtlich der Entwicklung eines Rezidivs untersucht. In der Studie wurde der Zeitraum von 24 Monaten nach Resektion (orange Linie) von dem gesamten Beobachtungszeitraum (grüne Linie) unterschieden. Innerhalb der ersten 24 Monate wurden Rezidive als Rezidiv-freie Überleben, das Frührezidiv-freie Überleben und das Gesamtüberleben beurteilt. \* Histopathologische Befundung des Resektats

### 2.2. Messverfahren

Um die dargestellte Fragestellung zu bearbeiten, wurden unterschiedliche Messverfahren zur Quantifizierung der Messgrößen genutzt, die im Folgenden dargestellt werden.

### 2.2.1. µTASWako ™ i30

Bei dem Gerät " $\mu$ TASWako  $^{\text{TM}}$  i30" der Firma FUJIFILM Wako Diagnostics U.S.A. Corporation handelt es sich um ein vollautomatisiertes Verfahren zur Messung der drei Analyten AFP, AFP-L3 und DCP.

Die Messmethode setzt sich aus den zwei Komponenten "liquid-phase binding assay" (LBA) und "elektrokinetic analyte transport assay" (EATA) zusammen.

### 2.2.1.1. Liquid-phase binding assay

Beim LBA wird ein zu detektierendes Antigen mit Antikörpern oder deren Fragmenten vermischt und nach einer Inkubationszeit von wenigen Minuten werden die freien Antikörper von den entstandenen Immunkomplexen mit einer geeigneten Methode getrennt und die gewünschte Substanz wird dann meist indirekt detektiert. Der Vorteil dieser Flüssigphasen-Bindungsreaktion ist, dass sich die Bedingungen für das Assay gut beeinflussen lassen. So können beispielsweise unterschiedliche sehr Konzentrationen der monoklonalen Antikörper hinzugegeben werden und Temperatur und pH können leicht ermittelt und optimiert werden. Um unspezifische Bindungen an Antikörper zu verhindern, können im LBA zudem genau die Fragmente des Antikörpers genutzt werden, die das jeweilige Antigen bzw. dessen Epitope spezifisch binden (Fab-Antikörper), wodurch eine lineare, eins zu eins Bindungsreaktion entsteht. Meist handelt es sich um ein Antikörperfragment, das die Separation des Immunkomplexes von den freien Fragmenten verbessert und dafür zum Beispiel über eine bestimmte Ladung verfügt. Je nach Versuchsprotokoll kann zudem ein geeignetes Verfahren zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe gewählt werden, beispielsweise durch ein Enzym-gekoppeltes oder Farbstoff-gekoppeltes Antikörperfragment, das dann die indirekte Detektion der untersuchten Messgröße ermöglicht (Nakamura et al., 1993, Nakamura et al., 1998, Yamagata et al., 1998).

#### 2.2.1.2. Electrokinetic analyte transport assay

Das Testverfahren EATA basiert auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und setzt sich aus zwei Messmethoden zusammen, der Isotachophorese (ITP) und der "plugplug electrophoretically mediated microanalysis" (EMMA) (Kawabata et al., 2008).

Bei der Kapillarelektrophorese wird, vereinfacht dargestellt, eine Kapillare mit Pufferlösung gefüllt und an beiden Enden eine Spannung angelegt. Einem Ende der Kapillare werden geladene Teilchen zugeführt, die dann in Richtung des Gegenpols durch die Kapillare wandern und schließlich durch eine detektierende Einheit registriert werden. Auf diese Weise entsteht ein Elektropherogramm (Jorgenson and DeArman Lukacs, 1981).

Bei der ITP, einer Weiterentwicklung der Kapillarelektrophorese, befindet sich eine Elektrolytlösung sowie zwei Puffer-Ionen, das sogenannte Leit-Ion und das nachlaufende Ion, in der Kapillare, die sich in ihrer elektrophoretischen

Geschwindigkeit voneinander unterscheiden. Praktisch bedeutet das, dass das Leitlon die maximale Geschwindigkeit begrenzt, während das nachlaufende Ion dafür sorgt, dass eine bestimmte Geschwindigkeit nicht unterschritten wird. Zwischen den beiden Puffer-Ionen entsteht ein elektrisches Feld, in dem die zu untersuchenden Ionen aus der Probe sich zunächst auftrennen, sich bedingt durch ihre eigenen elektrophoretischen Mobilitätseigenschaften in eine bestimmte Zone einordnen, um dann mit konstanter Geschwindigkeit zusammengelagert durch die Kapillare zu wandern, ohne sich dabei wesentlich voneinander entfernen zu können. Das führt zu einer Auf-Konzentration der jeweiligen Ionen in ihrer Bande (Au - Garcia-Schwarz et al., 2012).

Beim plug-plug EMMA werden aufeinanderfolgend zwei Reaktionspartner mit unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitätseigenschaften in eine Kapillare gegeben und die anschließenden Reaktions- und Separationsschritte finden durch Anlegen des elektrischen Feldes statt (Bao and Regnier, 1992, Avila and Whitesides, 1993, Sanders et al., 2005, Harmon et al., 1994).

1992 stellten Boa und Regnier das Prinzip der "Ultra-Micro-Enzym-Assays" vor, die die Grundlage für das System EMMA bilden. Die enzymatische Reaktion des Assays und die elektrophoretische Auftrennung der Analyten fanden dabei erstmals in derselben Kapillare statt. Dazu wurden Enzym, Substrat und Ko-Faktoren in der Pufferlösung der Kapillare zusammengeführt und nach einer Inkubationszeit wurde das entstandene Produkt detektiert. Die unterschiedliche Größe und Ladung der Teilchen mit den resultierenden unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitätseigenschaften der einzelnen Komponenten des Assays wurden genutzt, um nach der Durchmischung der Probe in der Kapillare das entstandene Produkt in einem möglichst scharfen Peak abzutrennen. Versuchsweise wurde dazu während der Potential Inkubation für einige Minuten das unterbrochen. sodass die elektrophoretische Wanderung resultierende aussetzte. Die verlängerte Inkubationszeit führte zu einer Akkumulierung des Produkts und somit nach Wiederanlegen der Spannung zu einer deutlichen Reduzierung der Bandenspreizung, im Vergleich zum Versuch mit konstant-angelegtem Potenzial (Bao and Regnier, 1992).

Die "plug-plug"-Reaktion in einer Kapillarelektrophorese wurde 1993 von Avila und Whitesides beschrieben. Die Enzym-katalysierte Reaktion fand dabei unter stetiger Wanderung von Substrat und Enzym während der Kapillarelektrophorese statt. Praktisch wurde die Komponente, die langsam wandert zuerst in die Kapillare gegeben und es folgte zeitversetzt die Zugabe der zweiten Substanz, die aufgrund ihrer schnelleren Mobilität die erste Substanz durchwanderte, sodass es zu einer Reaktion der beiden Komponenten kommen konnte. Beide Substanzen wanderten dabei im Sinne der Elektrophorese weiter in Richtung der detektierenden Einheit (Avila and Whitesides, 1993).

Komplexe Testverfahren wie die Enzym- und Immuno-Assays in eine Kapillarelektophorese zu verorten, brachte einige Vorteile mit sich. Es gelang die Nachweisgrenze für Enzyme deutlich zu verringern und dabei eine hohe Sensitivität zu erzielen. Die elektrophoretische Durchmischung der Probe bot zudem drei Vorteile: kaum Verdünnungseffekt, keine entstehenden Turbulenzen bei der Vermengung und einen minimalen Zeitaufwand (Bao and Regnier, 1992).

Auch im Bereich der Immunoassays zeigte die Kapillarelektrophorese bereits in den frühen 1990er Jahren vielversprechende Ergebnisse. 1991 wurde eine Arbeit über die erfolgreiche Immunreaktion und anschließende Auftrennung von Antigen-Antikörper-Komplexen in einer Kapillare veröffentlicht. Die Analyse nahm weniger als 10 Minuten in Anspruch, aber wies noch erhebliche Peak-Verbreiterungen in der Elektrophorese auf (Nielsen et al., 1991).

Das komplexe analytische Verfahren der Kapillarelektrophorese in eine kleine ebenflächige Trägerglasplatte zu integrieren und auch die Probenbearbeitung ins Miniatursystem zu verlagern, gelang ebenfalls bereits Anfang der 1990er Jahre und versprach eine kostenreduzierte effiziente und automatisierte Analytik kleinster Probenmengen (Harrison et al., 1992, Nguyen and Kang, 2019).

Nicht zuletzt durch die Laser induzierte fluoreszenzbasierte Detektion (CE-LIF) bei Enzym- und Immuno-Assays hat das diagnostische Testverfahren der Kapillarelektrophorese aufgrund seiner hohen Testsensitivität verbunden mit kurzen Analysezeiten und guter Auftrennung der Peaks im letzten Jahrzehnt zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Laser induzierte Fluoreszenz konnte erfolgreich in die Systeme der Kapillarelektrophorese integriert werden und hat sich als sensitive Methode zur Detektion von verschiedenen mit Fluoreszenzfarbstoff versehenden Molekülen erwiesen (Nguyen and Kang, 2019).

Mit dem EATA schließlich konnte 2008 ein schnell durchführbares und sehr sensitives kapillarelektrophoretisches Immuno-Assay zur AFP-Bestimmung durchgeführt werden. Die einzelnen Schritte Vermengung, Reaktion, Trennschritte und Nachweis wurden dazu auf einen Chip integriert, was sowohl die Präzision der Messung durch genau definierte Volumina ermöglichte, als auch bedingt durch die geringe Reagenzmenge, die das Verfahren benötigte, eine deutliche Kostenreduzierung erzielte (Kawabata et al., 2008). Das 2008 von Kawabata et al. vorgestellte Testverfahren bildet die Grundlage für das µTAS Immunoassay System und wird für das bessere Verständnis der Methode im Folgenden genauer beschrieben. Die Bindungsreaktionen, die beim "µTASWako ™ i30" im Rahmen des LBAs (siehe oben) erfolgen, fanden auch in der Arbeit von Kawabata et al. in einer Flüssigphase statt.

Es wurden ein DNA-gekoppeltes und ein Farbstoff-gekoppeltes Antikörperfragment (Fab) genutzt. Die Architektur des Trägerchips und die Verteilung der einzelnen Reagenzien, Pufferlösungen und des Probenmaterials auf die dafür vorgesehenen Einlassungen spielte eine bedeutende Rolle, denn die Kapillare wurde sukzessive mittels Vakuums mit Reagenzien gefüllt. Dafür hatte jede Einlassung eine Verbindung über die horizontal angrenzende Kapillare in eine leere Einlassung, an welche das Vakuum angelegt und so das jeweils eigene Reagenz angezogen wurde. Dieses Reagenz kreuzte auf seinem Weg die Kapillare, in der somit Reagenz-Zonen in einer ganz bestimmten Anordnung entstanden und die Moleküle wurden dann auf ihrem Weg durch die einzelnen Zonen in Richtung Anode zusammengeführt und durchmischt. Als erstes füllte das DNA-gekoppelte Antikörperfragment die Kapillare. Dieses wies durch die negative Ladung der DNA eine hohe elektrophoretische Mobilität auf und durchquerte auf seinem Weg zur Anode die nächste Zone in der Kapillare mit der AFP-haltigen Probe. Hier kam es bereits zu einer Zusammenlagerung von Antigen und Antikörper, die durch den Farbstoff-gekoppelten Antikörper in der nächsten Zone komplettiert wurde. Der entstandene, durch die zugrundeliegende Isotachophorese aufkonzentrierte Sandwich Immunkomplex wurde in der sich anschließenden Auftrennungsphase durch Einleitung der Kapillargelelektrophorese zu einer deutlichen Bande und schließlich durch laserinduzierte Fluoreszenz detektiert. Die Aufhebung der Isotachophorese erfolgte, indem die angelegte Spannung an die Kapillare örtlich verändert wurde und somit nicht mehr zwischen Leit-Ion (z.B. Chlorid) und nachlaufendem Ion (z.B. HEPES) bestand (Kawabata et al., 2008).

# 2.2.1.3. Erhebung der Biomarker Triplet Messdaten

Die Biomarker Triplet Messdaten für die vorliegende Arbeit wurden aus den asservierten Teilproben erhoben.

Das unter 2.2.1.2. beschriebene Testverfahren EATA, das 2008 von Kawabati et al. veröffentlicht wurde spiegelt das Messprinzip des "µTASWako ™ i30" wider, das zudem in Abbildung 2 und 3 schematisch dargestellt wird.

Zur Messung der Patientenproben für die hier vorgelegte Arbeit wurde das Messgerät "µTASWako ™ i30" mit vier Chipkassetten à 20 Chips vorgefüllt und bediente sich anschließend für das Testverfahren automatisch. Pro Test wurde ein mikrofluider Mikrochip bestehend aus Polymethylmethacrylat verwendet, das bedeutet einer für die Bestimmung von AFP und AFP-L3, sowie einer für die Bestimmung von DCP.

Das Gerät führte, nachdem es ordnungsgemäß mit Reagenz, Chipkassetten und Patientenproben beladen wurde, mit dem Start des Testverfahrens eigenständig alle einzelnen Schritte des Assays durch. Das erste Ergebnis konnte nach ungefähr 9 Minuten abgelesen werden und nach einer Stunde lagen ca. 25 Messergebnisse vor. Die einzelnen Schritte des Tests am Beispiel des Analyten AFP waren wie folgt (gilt analog für DCP):

- 1. Farbstoff-Fab`(AFP) und Patientenprobe wurden im Proben-Puffer vermengt und anschließend in die Einlassung 3 des Trägerchips gegeben (siehe Abbildung 2).
- DNA-Fab`(AFP) und alle benötigten Pufferlösungen wurden in die jeweiligen ihnen zugeordneten Einlassungen des Trägerchips pipettiert (Leit-Ionen Puffer inklusive dem LCA, der Puffer des nachlaufenden Ions, der "Stacking Puffer" und die den Farbstoff fokussierende Lösung).
- 3. Durch Anlage eines Vakuums wurde die Kapillare mit den vordefinierten Volumina der Puffersubstanzen, des DNA-Fab`(AFP) und der Farbstoff-Fab`(AFP)-Patientenproben-Lösung beladen. Durch den resultierenden gerichteten Fluss entstanden die einzelnen Zonen in der Kapillare in standardisierter Reihenfolge.
- 4. Im nächsten Schritt wurde die Spannung an die Kapillare angelegt und die Isotachophorese eingeleitet. Das DNA-Fab`(AFP) bewegte sich am zügigsten in Richtung Anode und kreuzte dabei die Zone mit Farbstoff-Fab`(AFP) angereicherter Patientenprobe. Es bildeten sich Immunkomplexe DNA-Fab`(AFP)-AFP-Farbstoff-Fab`(AFP), die weiter in Richtung Anode wanderten und den nicht gebundenen Farbstoff-Fab`(AFP) zurückließen.
- 5. Sobald der gebildete Immunkomplex und die nachlaufenden Puffer Ionen die Einlassung 5 passierten, fiel an dieser Position die Spannung ab und das Gerät leitete aktiv die Kapillargelelektrophorese ein, indem es die angelegte Spannung veränderte. Die Kathode befand sich jetzt auf Höhe der Einlassung 5.
- 6. Es wurden die Immunkomplexe elektrophoretisch von den anderen in den Pufferlösungen vorkommenden Substanzen und nicht gebundenen Antikörpern separiert. Beim AFP-Assay wurde außerdem durch die Anwesenheit von LCA der AFP-L1-Anteil von dem AFP-L3-Anteil getrennt. Beide bildeten einen eigenen Peak und passierten hintereinander die laserinduzierte Detektionseinheit (Kagebayashi et al., 2009).

Um die AFP-L3 Fraktion zu bestimmen, wurden zeitgleich AFP-L3 und AFP-L1 gemessen und anschließend wurde der prozentuale Anteil des AFP-L3 am Gesamt-AFP berechnet. Die Berechnung erfolgte automatisiert nach der folgenden Formel:

AFP-L3% = AFP-L3 / (AFP-L1 + AFP-L3) x 100

AFP-L1 und AFP-L3 wurden quantifiziert, in dem die Elektrophorese-Peaks, mit den Peaks der in der Kalibration verwendeten Proben mit bekannten Konzentrationen abgeglichen wurden. Die Summe beider Anteile war definiert als das Gesamt-AFP (Kagebayashi et al., 2009).

Bei der Bestimmung der AFP-L3 Fraktion, wurde in dem Separationsteil der Kapillare LCA hinzugefügt. Das im Gegensatz zu AFP-L1 fukosylierte AFP-L3 besitzt einen alpha-1-6 Fukoserest an der Kohlenhydrat-Kette. Dieser Rest konnte an das Lektin binden und erlaubte somit eine elektrophoretische Unterscheidung zwischen den Hauptfraktionen AFP-L1 und AFP-L3. Die AFP-L2 Fraktion wurde in dem vorgestellten Messverfahren laut Herstellerangaben der AFP-L3 Fraktion angerechnet (Fujifilm, 2022a).

Als Referenzmethode für das Verfahren des "µTASWako ™ i30" wurde das Testsystem "LiBASys" verwendet und kann bei Kagebayashi et al. sowie beim Hersteller nachgelesen werden (Kagebayashi et al., 2009).

Der Messbereich von AFP lag bei 0,3-2000 ng/ml mit einem linearen Bereich bis 1000 ng/ml. Der Messbereich des AFP-L3 betrug 0,5 bis 99,5 % und der des DCP 0,1-950 ng/ml. Verdünnungen wurden ab einem AFP-Messwert >1000 ng/ml und ab einem DCP-Messwert >950 ng/ml angesetzt.

Nach der erfolgreichen Triplet-Messung wurde das Probenrestvolumen für mögliche weitere Messungen in der Zukunft bei -80° Celsius re-asserviert.

Eine Materialübersicht für die Messung am Gerät "µTASWako ™ i30" ist in der Tabelle 3 zusammengestellt. Dort sind auch die verwendeten Chargennummern aufgeführt.



# Messmethode $\mu$ TASWako<sup>TM</sup> i30

# Abbildung 2

Schematische Darstellung der Trägerchip Architektur anhand des AFP-Assay, exemplarisch so auch für DCP anwendbar.

Abschnitt der Kapillare findet die Isotachophorese statt. Diese wird durch den Leit-Ionen-Puffer (6) und das nachlaufende Ion (1) begrenzt. Sobald das Kathode wird nun auf die Einlassung (5) verlagert, die Isotachophorese aufgehoben und es beginnt die Kapillarelektrophorese mit Auftrennung der Moleküle und laserinduzierter Detektion, die in der Abbildung nicht dargestellt wird (modifiziert nach Kawabata et al., 2008; Kagebayashi et al., 2009). Zu sehen sind mittig die Kapillare und angeschlossen die einzelnen Einlassungen mit Antikörpern (2,3), Patientenserum (3) und Pufferlösungen (1,4,5,6). Durch die oberhalb der Kapillare dargestellten Einlassungen, an die ein Vakuum angelegt ist, werden die Lösungen mit einem definierten Volumen in Zonen eingeteilt in die Kapillare gezogen. Im Sinne einer klassischen Elektrophorese ist Spannung an die Kapillare angelegt, welche die Bewegung der Moleküle in der Pufferlösung in Richtung Anode verursacht. Dabei findet zunächst die Durchmischung und Reaktion statt (liquid-phase binding assay). Im ersten nachlaufende Ion aus der Einlassung (1) die Einlassung (5) passiert, wird ein Spannungsabfall registriert, der die Änderung des Spannungsfeldes initiiert. Die



#### Liquid-phase binding assay und Isotachophorese

#### Abbildung 3

**A** Die Zonen in der Kapillare während der Reaktionsphase sind schematisch am Beispiel von AFP dargestellt. Die Abbildung ist exemplarisch so auch für DCP anwendbar. Der DNA-Fab`(AFP) migriert aufgrund seiner hohen elektrophoretischen Mobilität durch die nächste Zone, in der bereits zusammengelagerte Komplexe aus Farbstoff-Fab` mit AFP aus der Patientenprobe vorliegen. Es kommt zu einer Reaktion und es entstehen die (Farbstoff-Fab` – AFP – DNA-Fab`) - Immunkomplexe, die in ihrer eigenen Zone weiter in Richtung Anode wandern.

**B** Durch die Isotachophorese wandern die Moleküle dicht zusammengelagert in ihrer jeweiligen Zone, alle mit der gleichen Geschwindigkeit, die durch das Leit-Ion und das nachlaufende Ion begrenzt wird.

**C** Durch die Kapillargelelektrophorese trennen sich schließlich die Moleküle in Banden auf und können mittels Laserinduzierter Detektionseinheit in einem Elektropherogramm dargestellt werden. Bei dem AFP-Test befindet sich Lens culinaris Lektin/Agglutinin (LCA) im Reagenz, sodass sich das Lektin mit der AFP\_L3-Fraktion verbindet und sich anschließend von der AFP\_L1-Fraktion trennt. Das Gerät quantifiziert nun automatisch die einzelnen Anteile und die fertig berechneten Messwerte erscheinen auf dem Geräteausdruck (modifiziert nach Kawabata et al., 2008; Kagebayashi et al., 2009).

Legende Farbstoff-Fab`-AFP DNA-Fab` Lektin + AFP L3-Fraktion

# 2.2.1.4. Auswertung der Biomarker Triplet Messungen

Für die Auswertungen der Triplet Messungen wurden die folgenden Referenzwerte nach Angaben des Herstellers genutzt (Fujifilm, 2022a, Fujifilm, 2022b).

DCP: <7.5 ng/ml AFP-L3: <10 %

Als Referenzwert für das AFP im Serum wurde der als allgemein akzeptiert geltende Cut-off-Wert von 20 ng/ml genutzt (Sterling et al., 2009, Trevisani et al., 2001).

Bei dem Referenzbereich des AFP-L3 bezieht sich der Hersteller auf eine Arbeit aus dem Jahr 2001, die anhand einer multizentrischen prospektiven Studie mit HCC-Patienten in Japan die Tumoreigenschaften in Verbindung mit den AFP-L3-Serumwerten der Patienten bei Erstdiagnose eines HCC untersuchte. Sie konnten dabei feststellen, dass AFP-L3 Werte >10% mit aggressiveren Tumoreigenschaften korrelieren, wie z.B. der Tumorinvasion in die Portalvene und einem niedrigen Tumorgewebes. Differenzierungsgrad des Noch eindeutiger wurde der Zusammenhang bei einem Cut-off Wert >15%, der für eine schon weiter fortgeschrittene Tumorerkrankung sprach (Oka et al., 2001). Eine weitere Arbeit aus dem Jahr 2008 definierte 10% als optimalen Cut-off Wert für das AFP-L3 in der HCC-Diagnostik (Durazo et al., 2008).

#### 2.2.1.5. Qualitätssicherung und Gerätevalidierung

Das Gerät "µTASWako ™ i30" wurde durch den Hersteller angeliefert, installiert und die beteiligten Mitarbeitenden wurden geschult. Die wöchentlichen und monatlichen Wartungen am Gerät wurden stets durchgeführt und dokumentiert (siehe unten), eine SOP (Standard Operation Procedure) wurde erstellt.

Um valide Messergebnisse zu gewährleisten, wurden die im Folgenden beschriebenen Qualitätssicherungsmaßnahmen nach der Rili-BÄK erfüllt (Bundesärztekammer, 2023).

Im Rahmen der internen Qualitätssicherung wurden für die verwendeten Kontrolllösungen Kalibrations-Messungen durchgeführt und dokumentiert, die Kontrollmessungen im physiologischen und pathologischen Konzentrationsbereich wurden zudem jeweils vor und direkt nach den Biomarker Triplet Bestimmungen der Patientenproben durchgeführt.

Es wurden zur Einführung des Gerätes "µTASWako ™ i30" Validierungsdaten für quantitative Messmethoden erhoben.

Dazu zählen Messungen zur Präzision, Richtigkeit und Messabweichung, die im Ergebnisteil dargestellt sind.

Zur Ermittlung der Präzision, Richtigkeit und Messabweichung für das Gerät "µTASWako ™ i30" wurden Kontrollmessungen für die Parameter AFP, AFP-L3 und DCP an 10 verschiedenen Messtagen herangezogen, die jeweils den physiologischen (Kontrolllösung "niedrig", n=10) und den pathologischen (Kontrolllösung "hoch" n=10) Konzentrationsbereich abdecken.

Die Kontrolllösungen gehörten unterschiedlichen Chargen an, hatten aber immer die gleichen Zielwerte. Die zulässige relative Abweichung des Einzelwertes bzw. des

relativen quadratischen Mittelwertes beträgt für das AFP <=17 %. Für AFP-L3 und DCP, als Messgrößen mit geringer Analysefrequenz, die nicht in der Tabelle B1 der Richtlinie der Bundesärztekammer aufgeführt sind, gelten die vom Hersteller der Kontrollproben angegebenen Bereiche. Diese lauten für das AFP-L3 ± 15% vom erwarteten Wert und für das DCP im Bereich >=1 ng/ml ± 15% und im Bereich <1 ng/ml ± 20% vom erwarteten Wert (Fujifilm, 2022a, Fujifilm, 2022b, Bundesärztekammer, 2023).

Die Übereinstimmung (Kohärenz) von Messmethoden ("method agreement") kann anhand einer einzelnen statistischen Maßzahl nicht hinreichend beurteilt werden (Grouven et al., 2007). Zu berücksichtigen sind u.a. die durchschnittliche Abweichung der Verfahren voneinander (Verzerrung), sowie die Abweichung der individuellen Messungen mit der daraus resultierenden Streuung der Abweichungen. Weichen die Messwerte einer Methode systematisch in eine Richtung ab, kann, wenn die Streuung gering ist, die Subtraktion der Bias-Werte zu einer guten Übereinstimmung mit den Messungen der anderen Methode führen, selbst wenn die Verzerrung groß ist. Generell gilt es bei einem Methodenvergleich die Unterschiede zu quantifizieren mit dem Ziel, Aussagen über die Vergleichbarkeit der Messwerte zu treffen und die Bedeutung der Abweichungen klinisch einzuordnen (Grouven et al., 2007).

Für die vorgelegte Arbeit wurde ein Methodenvergleich mit dem Analyten AFP durchgeführt. Hierzu wurden die Messwerte des "µTASWako ™ i30" mit denen des bereits etablierten "Dimension Vista® 1500" verglichen.

Als Vergleichsmaterial dienten Patientenproben aus der Routinediagnostik des UKE zwischen Juli 2019 und Juli 2020. Bei der Anforderung, das AFP im Serum am "µTASWako ™ i30" zu messen, wurde über einen Zeitraum von einem Jahr automatisiert aus demselben Röhrchen die AFP-Bestimmung am "Dimension Vista® 1500" durchgeführt. Dabei kam es zu einer Messtagdifferenz zwischen der Analytik am "Dimension Vista® 1500" (Betrieb an der Laborautomation 24-Stunden/7 Tage die Woche) und am "µTASWako ™ i30" (Offline- und Stand-Alone-Gerät) von maximal 7 Tagen. Bis zur Durchführung der Bestimmung am "µTASWako ™ i30" wurden die Serumproben stets bei -20° Celsius bis zum Messtag zwischengelagert. Der entstandene Datensatz wurde nachträglich aus dem Laborinformationssystem exportiert, die Patientenproben pseudonymisiert und die Vergleichsmessungen ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der beiden statistischen Methoden Passing-Bablok-Regression und Bland-Altman-Plot.

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs sind in den Abbildungen 4 bis 7 dargestellt.

# 2.2.2. Dimension Vista® 1500

Das Laborsystem "Dimension Vista® 1500" der Firma Siemens Healthineers AG wurde als etabliertes Routinemessgerät im Zentrallabor des UKE eingesetzt, um Vergleichsmessungen für das AFP durchzuführen im Sinne eines Methodenvergleichs. Das Messverfahren umfasst laut Herstellerangaben einen homogenen Chemilumineszenz-Immunoassay nach dem Sandwich-Prinzip auf Basis der LOCI® -Technologie. Dafür sind in einem Reagenz Kügelchen mit Chemilumineszenzfarbstoff und monoklonalen Anti-AFP-Antikörpern versehen und in einem zweiten Reagenz Kügelchen mit Streptavidin und Photosensibilisator-Farbstoff angereichert. Die Probe wird mit biotinylierten AFP-Antikörper-Fragmenten und dem ersten Reagenz zusammengeführt. Die sich bildenden Komplexe aus Kügelchen, AFP und biotinylierten Antikörpern werden durch Zugabe des zweiten Reagenzes zu sogenannten Bead-Pair-Immunokomplexen, da die Kügelchen des zweiten Reagenzes, die sogenannten Sensibeads, sich an das Biotin binden. Diese Sensibeads bilden bei Belichtung mit 680 nm zudem Singulett-Sauerstoff, der anschließend in die Kügelchen des ersten Reagenzes diffundiert und dort eine Chemilumineszenzreaktion bedingt, die wiederum ein Signal von 612 nm erzeugt, welches messbar ist und in einem proportionalen Verhältnis zum AFP in der Probe steht (Diagnostics, 2017).

Die Präzision der analytischen Methode wird vom Hersteller bei einem AFP-Mittelwert ng/ml mit einer Standardabweichung von 1,2 von 75.6 und einem Variationskoeffizienten von 1,6% angegeben. Bei einem Mittelwert von 139 ng/ml beträgt die Standardabweichung innerhalb des Labors laut Hersteller 2,6 (VK=1,8%) und 5,1 (VK=2,0) bei einem Mittelwert von 249,0 ng/ml. Die Werte wurden an 20 verschiedenen Tagen anhand verschiedenem Testmaterial in verschiedenen Konzentrationen (Kontrollen und Plasmapool) ermittelt. Die Richtigkeit wurde vom Hersteller anhand der Wiederfindung nach Verdünnung (1:2, 1:5, 1:10, 1:20) von fünf Plasmaproben und zwei Serumproben mit AFP-Werten zwischen 93,2 ng/ml und 761,9 ng/ml ermittelt. Die Wiederfindung reichte von 95,0% bis 112,3% mit einem Mittelwert von 102,9% (Diagnostics, 2017).

# 2.2.3. CellSearch<sup>™</sup> System

Die EpCAM-positiven CTC als mögliche Biomarker von HCC-Patienten, wurden zuvor mit dem CSS (CellSearch; Veridex) aus den Blutproben der Patienten bestimmt (siehe Abbildung 1 zum Studiendesign).

Es handelt sich um ein halbautomatisiertes Testverfahren, das EpCAM-und Keratinpositive CTC aus Blutproben detektiert und quantifiziert. Das Blut wird in 7,5 ml große Probengefäße abgenommen (CellSave™ Preservative Tubes; Veridex) und bei Raumtemperatur ins Labor des Instituts für Tumorbiologie des UKE transportiert.

Die Zellen werden zunächst durch das automatisierte "Celltracks™ AutoPrep system" (AutoPrep; Veridex) mit anti-EpCAM-Antikörpern und anti-Keratin-Antikörpern versehen. Durch DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) wird die Unversehrtheit der Nuklei der Zellen sichergestellt und anti-CD45-Antikörper helfen Leukozyten von Epithelzellen zu unterscheiden. Mit einem halbautomatisierten fluoreszenzbasierten Mikroskop (CellSpotter Analyzer; Veridex) werden durch einen Untersucher die CTC identifiziert, die oval/rund sind, einen intakten Zellkern besitzen, Keratin exprimieren und CD45-negativ sind.

Das Verfahren wurde aufgrund seiner hohen Standardisierung und guten Reproduzierbarkeit von der US-amerikanischen Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit "U.S.Food and Drug Administration

(FDA)" für verschiedene Tumorentitäten zugelassen. Es werden das Testkit "CellSearch Epithelial cell kit (Veridex)", sowie für die täglichen Kontrollmessungen im Labor das Kontrollkit "CellSearch control cells (Veridex)" benötigt (von Felden et al., 2017, Riethdorf et al., 2007).

# 2.3. Statistische Auswertung

### 2.3.1. Validierungsdaten µTAS Immunoassay System

# 2.3.1.1. Präzision

Im Zusammenhang mit der Prüfung der Leistungsfähigkeit eines Messverfahrens wird beurteilt. quantifiziert Vergleichspräzision die Diese das Ausmaß der Übereinstimmung von Messergebnissen derselben Messgröße, die anhand aufeinanderfolgender Messungen (mindestens sechs) unter verschiedenen Bedingungen ermittelt wurden. Die Messbedingungen können unterschiedlich sein durch z.B. den Messzeitpunkt, die untersuchende Person oder durch die Reagenzalterung. Als Maß für die Präzision dienen die Standardabweichung und die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient). Diese Parameter sind als Ausdruck einer zufälligen Messabweichung anzusehen und stehen in umgekehrter Beziehung zur Präzision.

Die relative Standardabweichung (Variationskoeffizienz (VK) in %) wurde anhand von physiologischen Messungen der Kontrollproben im und pathologischen Konzentrationsbereich an 10 Arbeitstagen ermittelt. Die Formel lautet VK= Standardabweichung/Mittelwert Х 100 (The International Conference on Harmonization, 2005 (01/11/1994 (part I); 01/12/1996 (part II)), Bundesärztekammer, 2023).

### 2.3.1.2. Richtigkeit

Die Richtigkeit ("trueness", "accuracy of the mean") einer analytischen Methode beschreibt die Übereinstimmung zwischen einem akzeptierten wahren Wert (Referenzwert) und dem gemessenen Wert. Sie ist ein Maß für die Abweichung vom richtigen Wert aufgrund eines systematischen Fehlers. Die Richtigkeit kann anhand verschiedener Methoden ermittelt werden, zum Beispiel über die Messung von Referenzmaterial mit der bekannten Konzentration eines Analyten. Die Messwerte müssen in verschiedenen Konzentrationsbereichen anhand unabhängiger Proben erhoben werden. Die Richtigkeit wird als systematische Messabweichung, also Unrichtigkeit in Prozent angegeben (The International Conference on Harmonization, 2005 (01/11/1994 (part I); 01/12/1996 (part II)), Bundesärztekammer, 2023).

In der vorliegenden Arbeit wurde die relative systematische Messabweichung (D in %) im physiologischen und pathologischen Konzentrationsbereich aus der folgenden Formel ermittelt:

D% = (Zielwert-Mittelwert der Wiederholungsmessungen) x 100/ Zielwert.

Um die Streuung der Messwerte um den wahren Wert der Messgröße, hier dem Zielwert der Kontrollprobe, zu ermitteln, wurde der relative quadratische Mittelwert der Messabweichung ( $\Delta$  in %) im physiologischen und pathologischen Konzentrationsbereich gebildet. Er wurde aus der folgenden Formel bestimmt:  $\Delta$ % = ( $\Delta$ /Zielwert x 100)

 $\Delta$  = Wurzel [(n-1) /n x (VK%/100 x Mittelwert)<sup>2</sup> + (D%/100 x Zielwert)<sup>2</sup>] (Bundesärztekammer, 2023).

# 2.3.1.3. Passing-Bablok-Regression

Die Passing-Bablok-Regression ist ein einfaches statistisches nicht-parametrisches Auswertungsverfahren zum Vergleich zweier analytischer Messmethoden. Es setzt keine besonderen Annahmen für die Verteilung von Stichproben und Messfehlern voraus und die Ergebnisse sind von der Zuordnung der Methoden zu den Variablen X und Y unabhängig. Es wird geprüft, ob ein linearer Zusammenhang zwischen den Variablen vorliegt und die Steigung (= slope) und der Anfangspunkt, also der Schnittpunkt mit der Ordinate (= intercept) werden beurteilt.

Die Ergebnisse werden mit einem Streudiagramm, einer Regressionsgerade und einer Regressionsgleichung dargestellt.

Voraussetzung für die Anwendung der Passing-Bablok-Regression ist die lineare Beziehung zwischen den mit den zwei analytischen Methoden gemessenen Variablen. Ausreißer werden nicht als Messfehler eingeordnet und in die statistische Prüfung miteinbezogen. Der Schnittpunkt mit der Ordinate (= intercept) zeigt einen systematischen Fehler in Form einer Achsenverschiebung an, während die Steigung (= slope) eine proportionale Differenz zwischen beiden Messmethoden beschreibt.

Sind die 95%-Konfidenzintervalle vom Schnittpunkt der Ordinate und/oder der Steigung abweichend von 0 bzw. 1, ist die Übereinstimmung der beiden Messmethoden gering. Die Passing-Bablok-Regression gilt als robustes Auswertungsverfahren gegenüber Messausreißern (Passing and Bablok, 1983, Passing and Bablok, 1984).

# 2.3.1.4. Bland-Altman-Plot

Der Bland-Altman-Plot gilt als Verfahren der Wahl zur Auswertung von Methodenvergleichsdaten. Die Übereinstimmung der Messmethoden wird anschaulich in Form eines Streudiagramms dargestellt. Größenordnungen und mögliche Muster der individuellen Messabweichungen zwischen den zwei untersuchten Verfahren können so erfasst und bewertet werden.

Dazu werden jeweils die Differenzen der anhand der verschiedenen Methoden ermittelten Messwertepaare berechnet und anschließend gegen den Mittelwert der beiden Einzelmessungen aufgetragen, der eine Schätzung des unbekannten, wahren Wertes darstellt.

Der Bland-Altman-Plot eignet sich, um systematische Fehler und Ausreißer zu beurteilen. Zudem wird das Verhältnis der Abweichung der Messwertdifferenzen vom Mittelwert zur Höhe des Konzentrationsbereiches deutlich.

Zusätzlich werden im Diagramm die Übereinstimmungsgrenzen ("limits of agreement") und die Verzerrung, also der Mittelwert aller Messwertdifferenzen/durchschnittliche Differenz der Messwerte, dargestellt. Die Übereinstimmungsgrenzen errechnen sich aus der Verzerrung ±2 Standardabweichungen (SD) und zeigen den Bereich an, in dem 95% der Messwerte liegen, vorausgesetzt die Verteilung der Differenzen ist hinreichend symmetrisch (Bland and Altman, 1986, Altman and Bland, 1983, Grouven et al., 2007).

# 2.3.2. Biomarker Messdaten und klinische Charakteristika

Die erhobenen Biomarker Messdaten und klinischen Charakteristika wurden statistisch ausgewertet, um eine Aussage über die Signifikanz der erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit treffen zu können.

Hierfür stand die Software "SPSS Statistics" der Firma IBM zur Verfügung (siehe 2.3. Materialien). Das Signifikanzniveau wurde festgelegt auf den Wert  $p \le 0.05$ . Ein p-Wert von  $\le 0.05$  galt somit als signifikant, ein p-Wert  $\le 0.01$  war stark signifikant und eine hohe Signifikanz bestand ab einem p-Wert  $\le 0.001$ .

Die Ergebnisse der Analysen sind je nach Auswertung in Form von Mittelwerten ± Standardabweichung und/oder als medianer Wert dargestellt. Um die Gruppen mit verschiedenen Messergebnissen zu EpCAM-positiven CTC und Biomarker Triplet hinsichtlich verschiedener klinischer. diagnostischer und laborchemischer Einflussgrößen miteinander zu vergleichen, wurden für kategoriale Variablen der Exakte Test nach Fischer und für den Mittelwert-Vergleich der Laborparameter der ungepaarte T-Test angewendet. Dazu wurde zunächst die Normalverteilung der abhängigen Variablen nach Kolmogorov-Smirnov geprüft, die ergab, dass die Messgrößen AFP, AFP-L3, DCP, CTC, Leukozyten, Thrombozyten, Bilirubin, Kreatinin, AST, ALT, GGT und der INR nicht normalverteilt waren. Daher wurde für diese Parameter der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die klinischen Endpunkte wurden mit dem Log-Rang-Test ausgewertet. Statistische Analysen zur potenziellen Korrelation des positiven Biomarker Triplet bzw. vom CTC-Nachweis und/oder positivem Biomarker Triplet mit klinischen Daten zum Frührezidivfreien Krankheitsverlauf, zur Frührezidiv-freien Überlebenszeit (über einen Zeitraum von 24 Monaten nach HCC-Resektion) und zum Gesamtüberleben wurden mittels Kaplan-Meier-Verfahren und dem Log-Rang-Test durchgeführt. Der Kurvenverlauf beginnt zum Zeitpunkt der Tumorresektion mit allen (100 %) Patienten. Der Median ist der Zeitpunkt, zu dem die Hälfte der Patienten das definierte Ereignis des jeweiligen Endpunkts erreicht haben. Zensierte Patienten sind durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet und wurden in der Berechnung des Kaplan-Meier Verfahrens berücksichtigt. Der Log-Rang-Test ermöglicht den einfachen Gruppenvergleich hinsichtlich in der Überlebenszeitanalyse. Anhand des Kaplan-Meier-Verfahrens wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt, und zwar auch dann, wenn die Beobachtungszeiträume der Patienten unterschiedlich sind, so wie in der vorgelegten Arbeit (Ziegler et al., 2007c, Ziegler et al., 2007b).

Analysen Multifaktorielle zum möglichen Einfluss ausgewählter klinischer. diagnostischer und laborchemischer Variablen auf die Entstehung von Frührezidiven, sowie das Frührezidiv-freie Überleben der Patienten erfolgten mittels Proportionalem Hazard Modell. Die untersuchten Einflussgrößen wurden zunächst univariat ausgewertet und flossen je nach Signifikanzniveau in die multivariate Cox-Regressionsanalyse ein. Durch das Hazard Ratio (HR). das aus den Regressionskoeffizienten berechnet wird, erhält man einen Schätzer für die Größe des Einflusses einer Variablen (Ziegler et al., 2007a). In dieser Arbeit wurde das positive Biomarker Triplet allein und der Nachweis von EpCAM-positiven CTC und/oder positivem Biomarker Triplet untersucht. Um die statistischen Gütekriterien der beiden Biomarker Gruppen zu prüfen, wurden Vierfeldertafeln für die Prädiktion von Frührezidiven (innerhalb von 24 Monaten nach HCC-Resektion) und Rezidiven (über den gesamten Beobachtungszeitraum) angefertigt. Mittels ROC- ("receiver operating characteristics") Kurve wurden die Unterschiede der Flächen unterhalb der Kurve ("area under the curve", AUC) ausgewertet, anhand derer die Testgüte bewertet werden kann. Auf der Y-Achse wird für jeden untersuchten Schwellenwert die Sensitivität und auf der X-Achse die Rate der Falsch-Positiven (= 1-Spezifität) aufgetragen. Dieses Vorgehen macht eine visuelle Begutachtung hinsichtlich der Qualität der Messungen und der Aussagekraft einer analytischen Methode möglich. Ein hoher AUC-Wert entspricht einem guten diagnostischen Verfahren mit guter Sensitivität und Spezifität. Die errechneten Werte der AUC-ROC liegen zwischen 0,5 und 1 (Hajian-Tilaki, 2013).

### 2.4. Materialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Reagenzien, Kontrollen, Kalibratoren und Materialien für das µTASWako ™ i30 nach Herstellerangaben

Pro	dukt	Chargendokumentation
μTΑ	SWako AFP-L3 Reagenzkassette:	Charge: AL 146
	1. 5,6 ml Elektrophorese Puffer	Eingang: 26.06.2019
	79 mmol/l Tris-Puffer pH 8,0	Haltbarkeit: 31.10.2019
	2. 4,5 ml Elektrophorese Puffer	Anbruch: 18.07.2019
	80 mmol/l Tris-Puffer pH 7,6	Beipackzettelversion:
	4 mg/ml Lens culinaris Agglutinin	18.7.18 K13
	<ol><li>2,6 ml Elektrophorese Puffer</li></ol>	
	79 mmol/l Tris-Puffer pH 7,5	
4	<ol> <li>1,4 ml Elektrophorese Puffer</li> </ol>	
	79 mmol/l Tris-Puffer pH 7,6	
:	5. 0,77 ml Markierte Antikörper Lösung	
	82 mmol/l Good`s-Puffer pH 6,0	
	200 nmol/I Anion-konjugierter anti-human AFP-	
	Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper)	
	(DNA-Fab`(AFP))	
	6. 0,82 ml Markierte Antikörper Lösung	
	51 mmol/l Phosphat-Putter pH 5,5	
	1000 nmol/l Fluoreszenz-markierter anti-human	
	AFP-Antikorper (monoklonaler Maus-Antikorper)	
	(Farbstoff-Fab (AFP))	
	7. 1,4 ml Fluoreszenztarbstoff-Losung	
	50 mmol/I Good s-Putter pH 6,0	
	SWako AFP-L3 Calibrator	
<u>µ1</u>	SWako AFP-L3 Control L	
<u>µ</u> ]A	SWako AFP-L3 Control H	
<u>µ</u> ] <i>A</i>	SWako AFP-L3 Sample Dilution Buffer	
μIA	SWako DCP-Reagenzkassette:	Charge: AF 513
1. 3	5,4 mi Elektrophorese Puffer	Eingang: 13.05.2019
~	105 mmol/l Tris-Puπer pH 7,9	Haltbarkelt: 30.11.2019
Ζ. ί	4,4 mi Elektrophorese Puffer	Andruch: 16.05.2019
2	42 mmol/I Tris-Puffer pH 8,0	Belpackzettelversion:
3	2,6 mi Elektrophorese Putter	18.7.18 KTT
1	79 mmol/i ms-Puller pri 7, i 2.77 ml Markiarta Antikärnar Läaung	
4. (	0,77 mil Markiene Antikorper Losung	
	201 nmol/l Anion-konjugiortar anti human DCP	
	Antikörnor (monoklonglor Maus Antikörnor)	
	$(DNA_Fah)(DCP))$	
5	ן דסט טר <i>י</i> ו מענידע גענידע גענידע איזעט גענידע איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען א א א געניגען איזעען גענען גענען גענען איזעען גענען איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען איזעען איזע	
5.		
5. (	0,92 ml Markierte Antikörper Lösung	
<ul> <li>707 nmol/l Fluoreszenz-markierter anti-human</li> <li>Prothrombin-Antikörper (monoklonaler Maus- Antikörper) (Farbstoff-Fab`(Prothrombin))</li> <li>6. 1,4 ml Fluoreszenzfarbstoff-Lösung</li> <li>50 mmol/l Good`s-Puffer pH 6,0</li> </ul>		
---	--	
µTASWako DCP Calibrator		
µTASWako DCP Control L		
µTASWako DCP Control H		
μTASWako Wash Solution		
µTASWako Chip Cassette		
µTAS Sample Cup S		
Printer Paper		
Pure Water		

# Tabelle 4: Auflistung der Gerätewartungen des µTASWako ™ i30

Wöchentliche Wartung:	Reagenzien prüfen		
	Wasser füllen und Flüssigabfall entleeren		
	Festabfall entleeren		
	Chips laden		
	Autostart		
	Spülvorgang Elektroden		
Monatliche Wartung:	Reinigung des Frischwassertanks		
	Reinigung des Abwassertanks		
	Reinigung der Probenladefläche		
	Reinigung des Chip Abfallbehälters		
	Reinigung der optischen Einheit		
	Reinigung der Gummidichtung		
	Reinigung des Luftfilters		

Tabelle 5: Übersicht der Ergebniscodes des µTASWako ™ i30 nach Herstellerangaben

Parameter	Ergebniscode	Maßnahme
AFP/AFP-L3	AFP:	Verdünnung 1:200 mit AFP-L3
	>2000.0 HH!	Verdünnungspuffer,
		Nachmessung (Dilution Factor
	AFP-L3:	200 eingeben)
	NR	
	AFP:	Verdünnung 1:20 mit AFP-L3
	>2000.0 H!	Verdünnungspuffer,
		Nachmessung (Dilution Factor
	AFP-L3:	20 eingeben)
	NR	- /
	AFP-gesamt:	Verdünnung 1:20 mit AFP-L3
	Wert über 1000.0 H	Verdünnungspuffer,

	AFP-L3:	Nachmessung (Dilution Factor
	AFP:	AFP-L3 ist unter 0,3 ng/ml, daher
	Messergebnis	kann AFP-L3% nicht bestimmt
		werden, es wird ein Wert von
	AFP-L3:	AFP-L3 = 0,5 % angenommen
	NC L1!	
	AFP:	AFP-L1 ist unter 0,3 ng/ml, daher
	Messergebnis	kann AFP-L3% nicht bestimmt werden, kein valides Ergebnis
	AFP-L3	ermittelbar
	NC L3!	omittelbai
	AFP:	Abnormaler Peak zwischen L1
	Messergebnis	und L3; kein valides Ergebnis ermittelbar
	AFP-L3:	
	Wert A	
	AFP <sup>.</sup>	AFP-I 1 und AFP-I 3 sind unter
	<0.3 ND	0.3 ng/ml
		Fraebniseingabe 0.3 ng/ml für
	AFP-L3	AFP und 0.5% für AFP-L3
	ND	
DCP		Verdünnung 1.200 mit Blank
	>950 00 HHI	Lösung aus dem DCP-Kalibrator
	× 000.00 mm	(Dilution Eactor 200 eingeben)
	>950 00 HI	Verdünnung 1:100 mit Blank
	2000.0011	Lösung aus dom DCP
		Kalibrator Nachmossung
		(Dilution Easter 100 singshap)
	Most A	(Dilution Factor 100 eingeben)
	WentA	Abhormaler Peak (Storende
		Faktoren), kein valides Ergebnis
		ermittelbar. Verdunnung 1:4 mit
		Blank Losung aus dem DCP-
		Kalibrator, Nachmessung
		(Dilution Factor 4 eingeben)
	<0.1 ND	DCP ist unter 0,1 ng/ml und kann
		nicht bestimmt werden,
		Ergebniseingabe DCP = 0,1
		ng/ml

Tabelle 6: Auflistung der Reagenzien des Dimension Vista® 1500 nach Herstellerangaben

Therstellerangaberr			
Inhaltsstoff	Konzentration	Ursprung	Form
AFP-biotinylierter Antikörper	8.5 µg/ml	Maus, monoklonal	flüssig
AFP-Chemibeads	300 µg/ml	Maus, monoklonal	flüssig
Streptavidin Sensibeads	160 µg/ml	Rekombinante E. coli	flüssig

Mitgelieferte Materialien:	
AFP Flex®-Reagenzkassette	
Erforderliche, aber nicht mitgelieferte	
Materialien:	
LOCI 5 CAL oder LOCI 6 CAL	
Qualitätskontrollmaterialien	
Testschritte:	
Probenentnahme, Reagenzzugabe,	
Mischung und Bearbeitung werden vom	
Dimension Vista® System automatisch	
durchgeführt	
Testbedingungen:	
Probenvolumen	2 µl
Volumen AFP-biotinylierter Antikorper	25 µl
Volumen AFP-Chemibeads	25 µl
Volumen Streptavidin-Sensibeads	100 µl
	37,0 °C
	10 Minuten
wellenlange	680 nm Belichtung
Manayarfahran	612 nm Emission
	Cnemilumineszenz
Kalibration:	
Kalibrationsmaterial	LUCI 5 CAL OUER LUCI 6 CAL
	5  Level, 11 - 5
Liillellell <sup>+</sup> Typiacha Kalibratar Layal	$(19/111 \times 0.020) = 10/111$
	Level 1 (Kalibrator A). 0,0 fig/fil
	Level 2 (Kalibrator C): 100.0 pg/ml
	Level 4 (Kalibrator D): 500.0 ng/ml
	Level 5 (Kalibrator E): $1050.0 \text{ ng/ml}$
Kalibrationshäufickeit	nach 30 Tagen mit derselben Charge
eine neue Kalibration ist erforderlich	für jede neue Charge von Elev®-
ene nede raibration ist enordemen	Reagenzkassetten
	nach größeren Wartungs- oder
	Servicemaßnahmen falls die
	Frgebnisse der Qualitätskontrolle dies
	nahelegen
	nach Maßgabe der
	Qualitätskontrollverfahren des Labors
	nach Maßgabe behördlicher
	Vorschriften

\*die entsprechenden Kat.-Nummern variieren je nach verwendeter Charge und sind nicht aufgeführt

l abelle 8: Auflistung der verwendeten Softwares			
Software, verwendete Versionen	Hersteller		
GLIMS, Version 8.11.25	© CliniSys Group, MIPS Diagnostics		
	Intelligence		
Endnote X9.3.3 (BLD 15659)	Clarivate Analytics, © 2006-2013		
	Michael O. McCracken		
Microsoft ® Word für Mac, Version 16.36	© 2020 Microsoft, Office 365		
Microsoft ® Excel für Mac, Version 16.36	© 2020 Microsoft, Office 365		
Microsoft ® PowerPoint für Mac, Version	© 2020 Microsoft, Office 365		
16.36			
IBM ® SPSS ® Statistics, Version	© IBM Corporation and its licensors		
26.0.0.1	1989, 2019		
Cerner Soarian ® Clinicals, Version	© Cerner Health Services, Inc., Cerner		
4.3.200	Corporation		
MEDCALC ®, Version 19.4.1	© 2020 MedCalc Software Ltd		

### 3. Ergebnisse

Die vorgelegte Arbeit unterteilt sich in zwei Abschnitte. Im ersten Teil wurden die Validierungsdaten für Quantitative Messmethoden nach der Rili-BÄK für den "µTASWako ™ i30" erhoben und in diesem Zusammenhang wurde ein Methodenvergleich mit dem bereits etablierten Messgerät "Dimension Vista® 1500" durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1).

Im zweiten Teil wurde das Biomarker Triplet sowie die EpCAM-positiven CTC nach präoperativer Messung mit dem klinischen Verlauf der HCC-resezierten Patienten korreliert (siehe Abschnitt 3.2).

### 3.1. µTAS Immunoassay System – Validierungsdaten

Das Gerät "µTASWako <sup>™</sup> i30" wurde anhand von geeigneten Qualitätskriterien für Quantitative Messmethoden, wie bereits im Teil "Material und Methoden" beschrieben, validiert (Bundesärztekammer, 2023). Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Ermittlung von Präzision, Richtigkeit und Messabweichung, sowie der Methodenvergleich zwischen dem "Dimension Vista® 1500" und dem "µTASWako <sup>™</sup> i30" bei 508 Patientenproben anhand der Passing-Bablok-Regression und dem Bland-Altman-Plot dargestellt.

### 3.1.1. Präzision, Richtigkeit und Messabweichung

Die Ergebnisse dieser Validierungsmessungen sind in der Tabelle 9 dargestellt. Eine Ungenauigkeit, die durch eine Analyse von 10 Proben mit jeweils 2 verschiedenen Konzentrationen von AFP, AFP-L3 und DCP an 10 folgenden Tagen ermittelt wurde, lag unter 6% für alle Proben mit dem höchsten Variationskoeffizienten (VK) für die niedrigen (5,7%) und hohen DCP-Spiegel (5,8%). Die Unrichtigkeiten, die mit demselben Datensatz berechnet wurden, ergaben eine Abweichung vom Zielwert unter 4% für alle untersuchten Messergebnisse. Die relativen geringen Abweichungen der Messwerte vom Mittelwert sind als ein gutes Maß für die Präzision und Richtigkeit der neu etablierten Methode anzusehen. Demensprechend lagen die hier ermittelten Werte des relativen quadratischen Mittelwertes für alle getesteten Parameter unter 5% und erfüllten somit die in der Richtlinie der Bundesärztekammer definierten Mindestanforderungen (Bundesärztekammer, 2023).

	AFP (ng/m	nl)	AFP-L3 (%)		DCP (ng/ml)	
	niedrige Kontrolle (n=10)	hohe Kontrolle (n=10)	niedrige Kontrolle (n=10)	hohe Kontrolle (n=10)	niedrige Kontrolle (n=10)	hohe Kontrolle (n=10)
Zielwert	51	199	20	33	1,04	22,99
1.Messtag	52,8	196,3	19,3	32,4	1,08	25,25
2.Messtag	50,3	193	19,2	32,7	1,07	23,76
3.Messtag	53,2	203,8	19,4	32,4	1,17	24,88
4.Messtag	50,3	198,4	19,6	32,4	1,09	23,9
5.Messtag	50,1	199	19,8	32,4	1,09	23,4
6.Messtag	51,1	203,9	19,4	31,7	1,09	24,62
7.Messtag	52,1	204,2	18,8	31,3	1,05	23,36
8.Messtag	49,8	195,9	19,1	31,4	0,99	22,01
9.Messtag	50,2	196,1	19,1	31,3	0,98	21,92
10.Messtag	49,2	190	18,8	31,2	0,98	21,06
Mittelwert	50,91	198,06	19,25	31,92	1,059	23,416
Standard- abweichung	1,35	4,81	0,32	0,59	0,06	1,38
VK (%)	2,65	2,43	1,67	1,85	5,73	5,88
D (%)	0,18	0,47	3,75	3,27	-1,83	-1,85
Δ (%)	1,33	4,56	1,27	0,56	0,42	1,31

Tabelle 9: Validierungsdaten Präzision, Richtigkeit und Messabweichung zur Methode der Quantitativen Bestimmung von AFP, AFP-L3 und DCP

Abkürzungen:

AFP= Gesamt-Alpha-Fetoprotein, AFP-L3=Lektin-reaktives Alpha-Fetoprotein, DCP= des-gammacarboxy Prothrombin, VK=Variationskoeffizient (relative Interassay-Unpräzision), D=relative systematische Unrichtigkeit,  $\Delta$  =relativer quadratischer Mittelwert der Messabweichung.

### 3.1.2. Passing-Bablok-Regression und Bland-Altman-Plot

Der Konzentrationsbereich der insgesamt 508 Patientenmessungen, die für den Methodenvergleich zwischen dem "Dimension Vista® 1500" und dem "µTASWako ™ i30" herangezogen wurden, erstreckte sich über ein sehr breites Spektrum (siehe Tabelle 10), sodass die Auswertung der Daten in zwei Kategorien, AFP <1000 ng/ml (n=429) und AFP >1000 ng/ml (n=79), erfolgte, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten.

Tabelle 10: Konzentrationsbereich der Patientenmessungen für den Methodenvergleich zwischen "Dimension Vista® 1500" und "µTASWako ™ i30" (n=508)

	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert ± Standardabweichung
AFP_Vista (ng/ml)	13,1	1,0	257343,6	4554,0 ± 24239,6
AFP_µTasWako (ng/ml)	11,6	0,4	285685,6	4153,2 ± 23861,7

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs für den Konzentrationsbereich AFP <1000 ng/ml sind in der Abbildungen 4 und 5 und für den Konzentrationsbereich AFP >1000 ng/ml in der Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

### 3.1.2.1. AFP-Konzentrationsbereich <1000 ng/ml

Die Passing-Bablok-Regression im AFP-Konzentrationsbereich <1000 ng/ml umfasste 429 Patientenproben. Sie ist in den Abbildungen 4 und 5 und der dazugehörigen Tabelle 11 dargestellt. Die Regressionsgleichung lautet y = 0,292191 + 1,051952 x, wobei das Messverfahren "Dimension Vista® 1500" auf der Y-Achse und das Messverfahren "µTASWako ™ i30" auf der X-Achse dargestellt ist. Minimaler und Maximaler Messwert, arithmetisches Mittel und der Median, sowie Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes sind in Abbildung 4 für beide Messverfahren aufgeführt.

Der Cusum Test für Linearität ergab eine signifikante Abweichung von der Linearität (P=0,01). Somit ist die Passing-Bablok-Regression als Auswertungsverfahren für den Vergleich der beiden Methoden in diesem Konzentrationsbereich nicht aussagekräftig. Der Achsenabschnitt (Intercept A) weist mit einem 95% Konfidenzintervall von 0,20-0,40 keinen systematischen Fehler in Form einer Achsenverschiebung auf.

Die Steigung der Regressionsgleichung (Slope B) zeigt mit einem 95% Konfidenzintervall von 1,04-1,07 keinen proportionalen Fehler, sondern die Übereinstimmungsgerade hat die Steigung=1.

Beide Ergebnisse weisen auf eine gute Übereinstimmung der Messverfahren hin.

Der Standardfehler der Residuen, also der zufällige Fehler der beiden Methoden, wurde mit 34, 2 berechnet mit einem  $\pm$  1.96 RSD-Intervall von -67,1 – 67,1. 95% der Standardfehler sollten in diesem Intervall liegen. Ist das Intervall groß, haben die beiden Methoden wahrscheinlich keine hohe Übereinstimmung.

Der Bland-Altman-Plot für den AFP-Konzentrationsbereich <1000 ng/ml und ist in Abbildung 5 dargestellt (429 Patientenproben). Auf der X-Achse sind die Mittelwerte der beiden Messungen aufgetragen, also ((AFP\_Vista + AFP\_TasWako) /2), auf der Y-Achse befinden sich die Differenzen der einzelnen Messwiederholungen, also (AFP\_Vista - AFP\_TasWako). Der Mittelwert (Mean) der Messdifferenzen, also die Verzerrung, beträgt 11,8 ng/ml und ist durch die blaue horizontale Linie dargestellt. Die Übereinstimmungsgrenzen ("Limits of Agreement") sind definiert als der Mittelwert der Messdifferenzen ± 1.96 Standardabweichungen (SD) der Differenzen und durch die horizontalen gestrichelten Linien dargestellt. Sie betragen -89,7 ng/ml und 113,2 ng/ml. Sie entsprechen dem 95% Konfidenzintervall der Übereinstimmungsgrenzen, d.h. zu 95% liegen die Messdifferenzen innerhalb dieser Grenzen.

Es zeigt sich deutlich eine höhere Variabilität mit zunehmender Konzentration der Messwerte, während im Bereich der Mittelwerte beider Methoden (X-Achse) von bis zu 500 ng/ml gute Übereinstimmungen erreicht werden. Mindestens eine der Messmethoden zeigt also eine Abhängigkeit zu der Höhe des gemessenen Konzentrationsbereichs. Zudem lassen sich Ausreißer identifizieren, die außerhalb der Übereinstimmungsgrenzen liegen.

Insgesamt liegen die Übereinstimmungsgrenzen in einem hohen Konzentrationsbereich, was bei der ausreichend großen Anzahl an Messungen die hohe Variation des Messunterschiede wieder spiegelt (Passing and Bablok, 1983, Passing and Bablok, 1984).

### 3.1.2.2. AFP-Konzentrationsbereich >1000 ng/ml

Die Passing-Bablok-Regression im AFP-Konzentrationsbereich >1000 ng/ml umfasste 79 Patientenproben. Sie ist in den Abbildungen 6 und 7 und der dazugehörigen Tabelle 12 dargestellt. Die Regressionsgleichung lautet y = -165, 158975 + 1, 191710 x. Minimaler und Maximaler Messwert, arithmetisches Mittel und der Median, sowie Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes sind in Abbildung 6 für beide Messverfahren aufgeführt.

Der Cusum Test für Linearität ergab keine signifikante Abweichung von der Linearität (P=0,54). Somit ist die Passing-Bablok-Regression als Auswertungsverfahren für den Vergleich der beiden Methoden geeignet.

Der Achsenabschnitt (Intercept A) weist mit einem 95% Konfidenzintervall von -281,13 - -44,53 einen systematischen Fehler in Form einer Achsenverschiebung auf.

Die Steigung der Regressionsgleichung (Slope B) zeigt mit einem 95% Konfidenzintervall von 1,16-1,24 keinen proportionalen Fehler, sondern die Übereinstimmungsgerade hat die Steigung=1.

Der Standardfehler der Residuen als zufälliger Fehler der beiden Methoden wurde mit 10492,6 berechnet mit einem ± 1.96 RSD-Intervall von -20565,4 – 20565,4. 95% der Standardfehler sollten in diesem Intervall liegen.

Bei den AFP-Konzentrationsbereichen >1000 ng/ml ergibt sich also eine deutlich von der Identitätslinie abweichende Regressionsgerade (Passing and Bablok, 1983, Passing and Bablok, 1984).

Der Bland-Altman-Plot für den AFP-Konzentrationsbereich >1000 ng/ml ist in Abbildung 7 dargestellt (79 Patientenproben). Der Mittelwert (Mean) der Messdifferenzen betrug 2563,9 ng/ml. Die Übereinstimmungsgrenzen ("Limits of Agreement") betrugen -19016,3 ng/ml und 24144,2 ng/ml. Sie entsprechen dem 95% Konfidenzintervall der Übereinstimmungsgrenzen, d.h. zu 95% liegen die Messdifferenzen innerhalb dieser Grenzen.

Es zeigt sich auch hier eine deutlich höhere Variabilität mit zunehmender Konzentration der Messwerte, während im Bereich der Mittelwerte beider Methoden (X-Achse) von bis zu 50000 ng/ml gute Übereinstimmungen erreicht werden. Zudem lassen sich Ausreißer identifizieren, die außerhalb der Übereinstimmungsgrenzen liegen.



Abbildung 4 Passing-Bablok-Regression: AFP <1000 ng/ml blaue Linie= Regressionsgerade, gestrichelte Linie=95% Konfidenzintervall, gepunktete Linie= Identitätslinie der Regression

Tabelle	11:	Passing-Bablok-Regression	zum	Methodenvergleich	der	Quantitativen
Bestimm	nung	von AFP <1000 ng/ml, n=429	)			

Regressionsgleichung	y = 0,292191 + 1,051952 x	
Sytematischer Fehler		
Achsenabschnitt (Intercept A)	0,2922	
95% Konfidenzintervall	0,2000 - 0,3962	
Proportionaler Fehler		
Steigung (Slope B)	1,0520	
95% Konfidenzintervall	1,0385 - 1,0667	
Zufällige Fehler		
Standardfehler der Residuen	34,2364	
± 1.96 RSD Intervall	-67,1033 - 67,1033	
Lineare Modellvalidität		
Cusum-Test für Linearität	Signifikante Abweichung vor	n der Linearität (P=0,01)
	Variable X=AFF µTASWako ™ i30	Variable Y=AFP Dimension Vista® 1500
minimaler Messwert	0,4000	1,0000
maximaler Messwert	869,6000	968,2000
arithmetisches Mittel	79,8415	91,6254
Median	7,1000	7,9000
Standardabweichung	166,7328	192,6683
Standardfehler des Mittelwertes	8,0499	9,3021



Abbildung 5

Bland-Altman-Plot: AFP <1000 ng/ml

blaue Linie=Mittelwert (Mean) der Messdifferenzen (Verzerrung), gestrichelte Linien=Mittelwert der Messdifferenzen ± 1.96 Standardabweichungen (SD)



Abbildung 6 Passing-Bablok-Regression: AFP >1000 ng/ml blaue Linie= Regressionsgerade, gestrichelte Linie=95% Konfidenzintervall, gepunktete Linie= Identitätslinie der Regression

Tabelle	12:	Passing-Bablok-Regression	zum	Methodenvergleich	der	Quantitativen
Bestimm	nung	von AFP >1000 ng/ml, n=79				

Regressionsgleichung	y = -165,158975 + 1,191710	X	
Sytematischer Fehler			
Achsenabschnitt (Intercept A)	-165,1590		
95% Konfidenzintervall	-281,127644,5302		
Proportionaler Fehler			
Steigung (Slope B)	1,1917		
95% Konfidenzintervall	1,1565 - 1,2394		
Zufälliger Fehler			
Standardfehler der Residuen	10492,5617		
± 1.96 RSD Intervall	-20565,4209 - 20565,4209		
Lineare Modellvalidität			
Cusum-Test für Linearität	keine signifikante Abweichun	g von der Linearität (P=0,54)	
	Variable X=AFP µTASWako ™ i30	Variable Y=AFP Dimension Vista® 1500	
minimaler Messwert	934,4000	1078,0000	
maximaler Messwert	285685,6000	257343,6000	
arithmetisches Mittel	26222,6519	28786,5987	
Median	3461,1000	3968,5000	
Standardabweichung	55759,8280	55809,2246	
Standardfehler des Mittelwertes	6273,4708	6279,0283	



Abbildung 7 Bland-Altman-Plot: AFP >1000 ng/ml blaue Linie=Mittelwert (Mean) der Messdifferenzen (Verzerrung), gestrichelte Linien=Mittelwert der Messdifferenzen ± 1.96 Standardabweichungen (SD)

### 3.2. Klinische Anwendung zur Prädiktion von Frührezidiven nach kurativintendierter Resektion eines Hepatozellulären Karzinoms

Im Folgenden werden die Ergebnisse zum Einfluss einer Biomarker Triplet Bestimmung allein oder in Kombination mit der Detektion von EpCAM-positiven CTC auf die Vorhersagbarkeit eines frühen Rezidivs innerhalb von 24 Monaten nach kurativer Resektion eines HCCs präsentiert. Als sekundäre Endpunkte wurden das Frührezidiv-freie Überleben, das Rezidiv-freie Überleben sowie das Gesamtüberleben untersucht.

### 3.2.1. Klinische Charakteristika

Insgesamt wurden 58 Patienten in die Analyse eingeschlossen. Die klinischen Patientencharakteristika wurden anhand elektronischer Patientenakten erfasst. Die Kohorte umfasste neun weibliche und 49 männliche Patienten mit einem durchschnittlichen Alter bei Tumorresektion von 64,78 Jahren mit einer Standardabweichung von ± 10,64 Jahren. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Resektion 33 Jahre alt, der älteste Patient 84 Jahre alt.

Die Ätiologie des HCCs ist im Folgenden beschrieben. Multiple Ätiologien wurden aufgeschlüsselt und einzeln gezählt (Gesamtkohorte n=58 mit n=65 gezählten Ätiologien). Insgesamt 25 Patienten hatten eine chronische virale Hepatitis (n=10 chronische Hepatitis B, n=15 chronische Hepatitis C), 14 Patienten eine alkoholassoziierte Lebererkrankung, bei weiteren zehn wurde eine NASH festgestellt. Zudem gab es einen Fall mit Hämochromatose, eine Lebervenenobstruktion, drei kryptogene Leberzirrhosen und bei neun Patienten konnte keine zugrundeliegende Lebererkrankung festgestellt werden. Zwei Patienten litten unter einer autoimmunen Lebererkrankung (Autoimmunhepatitis (AIH) mit Primärer Biliärer Cholangitis (PBC)).

Es traten folgende Kombinationen auf: eine Autoimmune Lebererkrankung (AIH/PBC) mit HCV, eine HBV mit HCV und alkoholassoziierter Lebererkrankung, drei HCV mit alkoholassoziierter Lebererkrankung, eine NASH mit Hämochromatose.

Bei 27 der insgesamt 58 Patienten wurde eine Leberzirrhose festgestellt, für die der Child-Pugh-Score bestimmt wurde (Child A: n=25, Child B: n=2). Zum Zeitpunkt der Operation wurden 44 Patienten (75,9%) dem Tumorstadium BCLC A und 14 Patienten (24,1%) dem Tumorstadium BCLC B zugeordnet.

Die histopathologische Aufarbeitung der Resektate ergab, dass 54 Patienten vollständig (R0) reseziert wurden, vier Patienten mikro- oder makroskopisch nicht komplett reseziert wurden (R1/2) und eine Gefäßinvasion V1/2 konnte bei 22 von 57 Patienten festgestellt werden (38,6%) und blieb bei einem Patienten unklar.

Laborchemisch wurden präoperativ verschiedene Messgrößen im Zentrallabor des UKE bestimmt, die der Tabelle 13.1 zu entnehmen sind.

### 3.2.2. Klinische Endpunkte

Im weiteren postoperativen Krankheitsverlauf entwickelten 33 der insgesamt 58 Patienten (56,9%) ein Frührezidiv innerhalb von 24 Monaten nach Resektion und vier Patienten (6,9%) ein Spätrezidiv nach über 24 Monaten postoperativ. Zwölf Patienten (20,7) blieben Rezidiv-frei und bei neun Patienten (15,5%) lag eine entsprechende Bildgebung nicht vor, da die Patienten entweder vorzeitig verstorben sind (n=6) oder ohne Verlaufsdaten waren (n=2). Ein Patient erhielt einen Monat nach Resektion eine Lebertransplantation ohne, dass Angaben über ein vorliegendes Rezidiv zu dem Zeitpunkt gemacht werden konnten. Der mediane Beobachtungszeitraum der 49 Patienten mit bekanntem Rezidivstatus lag bei 9,5 Monaten. Insgesamt waren nach 24 Monaten noch 42 der insgesamt 58 Patienten am Leben (72,4%). Die Todesrate innerhalb der ersten zwei Jahre betrug somit 27,6% (n=16). Die 5-Jahres Mortalität lag bei 65,5% (n=38). Von den 49 Patienten mit vorliegenden Daten zum Rezidivstatus erlitten 33 ein Frührezidiv (67,3%), vier ein Spätrezidiv (8,2%) und zwölf kein Rezidiv (24,5%).

In Hinblick auf das Frührezidiv-freie Überleben wurde festgestellt, dass 69,0% der Patienten (n=40 von insgesamt n=58) in den ersten zwei Jahren nach HCC-Resektion ein Rezidiv entwickelten oder verstarben. Über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg erhöhte sich diese Rate auf 79,3% (n=46 von insgesamt n=58), da bei der Betrachtung des Rezidiv-freien Überlebens auch die vier Patienten mit Spätrezidiv berücksichtigt wurden, sowie zwei Patienten, die nach über 24 Monaten verstarben.

Die detaillierten klinischen Charakteristika der Kohorte, sowie die Aufschlüsselung der klinischen Endpunkte können den Tabellen 13.1 und 13.2 entnommen werden.

Charakteristika	Patienten, n=58 (%)
Geschlecht (%)	
männlich weiblich	49 (84,5) 9 (15,5)
Alter (Jahre)	
Mittelwert ± Standardabweichung Minimum Maximum	64,78 ± 10,64 33 84
Leberzirrhose (%)	
ja nein	27 (46,55) 31 (53,45)
Child Pugh Klassifikation (%) *	
A B	25 (92,6) 2 (7,4)
Ätiologie der Lebererkrankung **	
Alkohol HCV HBV NASH Hämochromatose Lebervenenobstruktion PBC mit AIH Kryptogene Zirrhose Keine	14 (21,5) 15 (23,1) 10 (15,4) 10 (15,4) 1 (1,5) 1 (1,5) 2 (3,1) 3 (4,6) 9 (13,9)
BCLC-Klassifikation	
A B	44 (75,9) 14 (24,1)
Gefäßinvasion (V) #	
Nein Ja unbekannt	35 (60,4) 22 (37,9) 1 (1,7)
Residualtumor (R)	
Nein Ja	54 (93,1) 4 (6.9)
AFP (%)	
<400 ng/ml >400 ng/ml	48 (82,8) 10 (17,2)
Laborparameter präoperativ (Referenzbereich)	
AFP (<20 ng/ml)	
Messbereich Median Mittelwert ± Standardabweichung	1,6-275296,5 19,3 5472,7 ± 36142,2
<b>AFP-L3</b> (<10%)	
Messbereich	0,5-91,9

Tabelle 13.1: demographische Charakteristika der Patienten mit HCC-Resektion

Median	8,7
Mittelwert ± Standardabweichung	23,2 ± 28,6
DCP (<7,5 ng/ml)	
Messbereich	0,16-708,2
Median	3,3
Mittelwert ± Standardabweichung	74,6 ± 166,9
CTC (Zellen/7,5 ml Blut)	
Messbereich	0-4
Median	0
Mittelwert ± Standardabweichung	0.3 ± 0.8
Albumin ## (35-50 g/l)	
Messbereich	24,8-45,2
Median	36,7
Mittelwert ± Standardabweichung	36,6 ± 4,4
Bilirubin_gesamt (<1,2 mg/dl)	
Messbereich	0,2-2,6
Median	0,5
Mittelwert ± Standardabweichung	0,8 ± 0,6
<b>Kreatinin</b> (m: 0,6-1,3/w: 0,5-1,0 mg/dl)	
Messbereich	0,6-4,2
Median	0,9
Mittelwert ± Standardabweichung	1,1 ± 0,6
<b>AST</b> (m: 10-50/w: 10-35 U/I)	
Messbereich	16-369
Median	41,5
Mittelwert ± Standardabweichung	56,8 ± 52,6
<b>ALT</b> (m: 10-50/w: 10-35 U/I)	
Messbereich	6-219
Median	36
Mittelwert ± Standardabweichung	46,6 ± 36,9
<b>GGT</b> (m: <65/w: <38 U/I)	
Messbereich	25-1088
Median	139,5
Mittelwert ± Standardabweichung	207,9 ± 208,9
INR	
Messbereich	0,9-1,6
Median	1,0
Mittelwert ± Standardabweichung	1,1 ± 0,1
Thrombozyten (150-400 Mrd/l)	
Messbereich	59-820
Median	206,5

Mittelwert ± Standardabweichung	217,2 ± 118,7
Leukozyten (3,8-11,0 Mrd/l)	
Messbereich	2,4-17
Median	6,7
Mittelwert ± Standardabweichung	$7,2 \pm 2,6$
<b>Hb</b> (m: 14-17,5/w: 12,3-15,3 g/dl)	
Messbereich	8,8-17,4
Median	13,85
Mittelwert ± Standardabweichung	13,8 ± 2,0
Abkürzungen:	

HCC=Hepatozelluläres Karzinom, CTC=zirkulierende Tumorzellen, HCV=Hepatitis-C-Virusinfektion, HBV=Hepatitis-B-Virusinfektion, NASH=Nichtalkoholische Steatohepatitis, PBC=Primär biliäre Cholangitis, AIH=Autoimmunhepatitis, BCLC=Barcelona-Klassifikation, AFP= Gesamt-Alpha-Fetoprotein, AFP-L3=Lektin-reaktives Alpha-Fetoprotein, DCP= des-gammacarboxy Prothrombin, AST=Aspartat-Aminotransferase, ALT=Alanin-Aminotransferase, GGT=Gamma-Glutamyltransferase, INR=International Normalized Ratio, Hb=Hämoglobin, \*nur für n=27 Patienten mit Leberzirrhose berechnet, \*\*multiple Ätiologien wurden aufgeschlüsselt und einzeln gezählt (n=65). Es traten folgende Kombinationen auf: n=1 PBC mit AIH + HCV, n=1 HBV + HCV + Alkohol, n=3 HCV + Alkohol, n=1 NASH + Hämochromatose, # bei n=1 Patient blieb der Gefäßinvasionsstatus unklar, ## es wurde nur bei n=54 Patienten ein präoperatives Albumin im Zentrallabor des UKE bestimmt.

Klinische Endpunkte	Patienten, n=58 (%)
Rezidiv Status (%) #	
Frührezidiv (<24 Monate) kein Frührezidiv	33 (56,9) 16 (27,6)
Rezidiv kein Rezidiv	37 (63,8) 12 (20,7)
keine Angabe*	9 (15,5)
Mortalität (%)	
2-Jahres Mortalität 5-Jahres Mortalität	16 (27,6) 38 (65,5)
Frührezidiv/Tod <24 Monate (%)	
ja nein	40 (69,0) 18 (31,0)
Rezidiv/Tod (%)	
ja nein	46 (79,3) 12 (20,7)

Tabelle 13.2: Klinische Endpunkte aufgeschlüsselt in die Patientenanzahl

# n=49, \* davon n=6 verstorben ohne Bildgebung, n=2 lost-to follow-up, n=1 Lebertransplantation ohne Bildgebung. Hinweis: Durch die Aufrundung der einzelnen Werte können die addierten Prozentzahlen den Wert 100 % überschreiten

# 3.2.3. Klinische Charakteristika bezogen auf den Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet

Um den Einfluss eines Nachweises von CTC und/oder des positiven Biomarker Triplets zu untersuchen, wurde die Kohorte in Abhängigkeit dieser Parameter in Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet und Patienten ohne Nachweis von CTC und normwertigem Biomarker Triplet eingeteilt. Ein positives Biomarker Triplet wurde als Erhöhung eines einzelnen oder mehrerer der Marker AFP, AFP-L3 oder DCP definiert. In der Tabelle 14 sind klinische und laborchemische Charakteristika der beiden Gruppen zusammengefasst.

Insgesamt waren 44 Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet, gegenüber 14 Patienten, bei denen alle vier untersuchten Marker negativ bzw. normwertig waren.

Bei den klinischen Einflussgrößen Alter und Geschlecht konnte kein signifikanter Zusammenhang mit den Biomarkern festgestellt werden.

Auch das Vorhandensein einer Leberzirrhose und der erhobene Child-Pugh-Score bei den 27 Patienten mit Leberzirrhose standen in keinem Zusammenhang zum Nachweis der CTC oder des Biomarker Triplets.

Die Ätiologie der Erkrankung war jedoch hochsignifikant assoziiert (P-Wert=0,0003, Exakter Test nach Fischer). Interessanterweise hatten alle Patienten mit viraler Ätiologie einen Nachweis von CTC und/oder ein positives Biomarker Triplet (n=15 mit HCV und n=10 mit HBV, davon folgende Kombinationen: n=1 HCV-Patient mit begleitender Diagnose eines PBC/AIH Overlaps, n=4 HCV-Patienten mit begleitendem Alkoholabusus, von denen wiederum n=1 Patient zusätzlich an einer HBV-Infektion litt).

Für das initiale Staging vor OP ist die BCLC-Klassifikation maßgeblich. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen Tumorstadium nach BCLC mit dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet gezeigt werden (P-Wert=0,014, Exakter Test nach Fischer). Alle 14 Patienten, die das Tumorstadium B nach BCLC aufwiesen, wurden positiv auf CTC getestet und/oder hatten ein positives Biomarker Triplet gegenüber 30 der insgesamt 44 BCLC A Patienten.

Histopathologisch bzw. intraoperativ wurde das Vorhandensein von mikroskopischem (R1) oder makroskopischem (R2) Residualtumorgewebe nach Resektion untersucht (gruppiert in R0 vs. R1/2), sowie Angaben zur Invasion des Tumors in umliegende Gefäße gemacht (V0 vs. V1/2). Bei insgesamt vier Patienten, die alle einen Nachweis und/oder hatten Biomarker Triplet-positiv von CTC waren. wurde Residualtumorgewebe gefunden (9,1% der positiv getesteten Patienten). Die übrigen 54 Patienten waren R0 reseziert, davon gehörten 40 der positiv getesteten Gruppe an (90,9% der insgesamt n=44). Bei allen normwertig getesteten Patienten ohne Nachweis von CTC (n=14) war kein Residualtumorgewebe vorhanden. Von den 57 Patienten, bei denen eine Beurteilung des V-Status vorlag, wurde bei 19 mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet (43.2% von insgesamt n=44) und bei drei ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet (23,1% von insgesamt n=13) eine mikroskopische oder makroskopische Gefäßinvasion des Tumors beschrieben. Bei den übrigen 35 Tumoren lag keine Gefäßinvasion vor. Davon waren zehn Patienten ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet (76,9% von n=13) und 25 Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet (56,8% von insgesamt n=44 positiv getesteten). Es wurde kein signifikanter Zusammenhang mit den Biomarkern festgestellt.

Unter den laborchemischen Messgrößen, die präoperativ im Zentrallabor des UKE bestimmt wurden, konnte für die Mehrzahl kein signifikanter Unterschied zwischen

Patienten mit und ohne Nachweis von CTC bzw. positiven und normwertigen Biomarker Triplet festgestellt werden mit Ausnahme der Thrombozyten (p=0,023, Mann-Whitney-U-Test).

Durch die Definition der Gruppen bedingt stellten die Messgrößen AFP, AFP-L3 und DCP eine Ausnahme dar. Das DCP unterschied sich deutlich zwischen den Patientengruppen und es wurde ein hochsignifikanter Unterschied der Mittelwerte mit einem p-Wert von 0,000 nach Mann-Whitney-U-Test festgestellt. Entsprechend unterschieden sich auch das AFP und AFP-L3 zwischen den Gruppen (AFP-L3: p-Wert=0,002, AFP: p-Wert=0,000, Mann-Whitney-U-Test).

Die detaillierten klinischen Charakteristika der Kohorte bezogen auf den Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet können der Tabelle 14.1 entnommen werden.

# 3.2.4. Analyse der Klinischen Endpunkte bezogen auf den Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet

Nach der HCC-Resektion wurde der weitere Krankheitsverlauf der Patienten in Hinblick auf das Überleben und die Rezidiventwicklung beobachtet.

Der Rezidivstatus konnte bei insgesamt 49 der 58 Patienten erhoben werden. Die neun Patienten, bei denen keine Bildgebung zum Rezidivstatus vorlag, hatten alle einen Nachweis von CTC und/oder ein positives Biomarker Triplet (20,5% der insgesamt n=44). Hiervon verstarben sechs Patienten (13,6%), ein Patient erhielt eine Lebertransplantation (2,3%), jeweils ohne vorherige Bildgebung, und zwei Patienten waren ohne ausreichende Verlaufsdaten (4,6%).

Beim Vorliegen eines Rezidivs wurde zwischen Frührezidiv (<24 Monaten) und Rezidiv (gesamter Beobachtungszeitraum) unterschieden.

Bei insgesamt 33 Patienten trat ein Frührezidiv auf, davon hatten 26 Patienten einen Nachweis von CTC und/oder ein positives Biomarker Triplet. In der statistischen Auswertung des Auftretens von Frührezidiven und Rezidiven wurden die 9 Patienten mit unklarem Rezidivstatus ausgeschlossen (n=49 statt n=58). Die Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet (n=26) entwickelten im Median nach 5.8 ± 1.5 Monaten ein Frührezidiv, während die Patienten ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet und vorhandenem Frührezidiv (n=7) im Median nach 23,2 ± 2,5 Monaten nach Resektion erneut erkrankten (p-Wert=0,030, Log-Rang-Test (siehe Kaplan-Meier-Kurven: Abb. 8.1 und 8.2)). Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf und dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet festgestellt werden. Die Frührezidivrate in der Patientengruppe mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet (n=44) betrug 59,1%. Bei einem Anteil von 20,4% wurde ein Frührezidiv ausgeschlossen (n=9). In der Gruppe ohne Nachweis von CTC und normwertigem Biomarker Triplet (n=14) hatten 50% der Patienten ein Frührezidiv und bei den anderen 50% wurde ein Rezidiv per Bildgebung ausgeschlossen. In der statistischen Auswertung wurde kein signifikanter Zusammenhang mit dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet festgestellt (p-Wert=0,176, Exakter Test nach Fischer).

Durch die Berücksichtigung der Rezidive, die nach über 24 Monaten nach HCC-Resektion auftraten, vergrößerten sich die beiden Biomarker Gruppen jeweils um zwei Ereignisse, sodass insgesamt bei 63,6% der Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet (n=28) und bei 64,3% der Patienten ohne Nachweis von CTC und normwertigem Biomarker Triplet (n=9) ein Rezidiv diagnostiziert wurde. Der Exakte Test nach Fischer ergab auch in dieser kategorialen Auswertung keinen signifikanten Zusammenhang (p-Wert=0,285).

Die 2-Jahres-Mortalität nach HCC-Resektion hingegen war signifikant assoziiert mit dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet (p=0,006, Exakter Test nach Fischer). In der Patientengruppe ohne Nachweis von CTC und normwertigem Biomarker Triplet überlebten alle Patienten die ersten 24 Monate (n=14 von insgesamt n=14), während in der Gruppe mit CTC-Nachweis und/oder positivem Biomarker Triplet 36,4% der Patienten bereits innerhalb der ersten zwei Jahre nach HCC-Resektion verstarben (n=16 von insgesamt n=44). In dieser Gruppe lag die 2-Jahres-Überlebensrate somit bei 63,6% (n=28). Die 5-Jahres-Mortalität war nicht signifikant assoziiert mit dem Nachweis der untersuchten Biomarker (p=0,203, Exakter Test nach Fischer). 70,5% der Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet verstarben in den fünf Jahren nach HCC-Resektion (n=31 von insgesamt n=44) und die 5-Jahres-Überlebensrate lag in dieser Gruppe somit noch bei 29,5 % (n=13 von ingesamt n=44). In der Gruppe ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet überlebten 50 % der Patienten die ersten fünf Jahre nach HCC-Resektion (n=7).

Es wurde zudem das Frührezidiv-freie Überleben untersucht. Dafür wurden ein Rezidiv oder Todesereignis in den ersten 24 Monaten nach Resektion als Ereignis gezählt. Durch die erweiterte Ereignisdefinition wurden neun weitere Patienten berücksichtigt, von denen sechs in den ersten zwei Jahren nach Resektion verstarben. Die restlichen drei Patienten blieben bis zum Zeitpunkt der jeweiligen Datenerhebung am Leben und wurden somit als kein Ereignis in der Auswertung zum Frührezidiv-freien und Rezidivfreien Überleben berücksichtigt. Alle diese neun Patienten hatten einen Nachweis von CTC und/oder ein positives Biomarker Triplet. Sie wurden den entsprechenden Gruppen zugeordnet. Auch das Frührezidiv-freie Überleben stand in einem signifikanten Zusammenhang mit dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet. Bei den positiv getesteten Patienten (n=33) betrug das mediane Frührezidiv-freie Überleben 5,8 ± 1,4 Monate, bei den Patienten ohne CTC-Nachweis und normwertigen Biomarker Triplet hingegen (n=7) 23,2 ± n.d. Monate (p-Wert=0,014, Log-Rang-Test (siehe Kaplan-Meier-Kurve: Abb. 9.1 und 9.2)).

Zuletzt wurde das Rezidiv-freie Überleben für den gesamten Beobachtungszeitraum untersucht, also über den Zeitraum von 24 Monaten postoperativ hinaus. Dadurch vergrößerten sich die beiden Biomarker Gruppen um jeweils zwei Ereignisse mehr, da diese Patienten ein Rezidiv entwickelten, allerdings nach über zwei Jahren nach Resektion (Spätrezidiv: n=4). In der Gruppe ohne CTC-Nachweis und normwertigen Biomarker Triplet erhöhte sich die Zahl der Patienten mit eingetretenem Ereignis zudem um weitere zwei Fälle, die nach über 24 Monaten verstarben und in dieser Analyse somit gezählt wurden. Das Rezidiv-freie Überleben zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit den untersuchten Biomarkern. Patienten, die einen Nachweis von CTC und/oder ein positives Biomarker Triplet aufwiesen (n=35), verstarben bzw. erkrankten an einem Rezidiv im Median nach  $5,8 \pm 1,4$  Monaten postoperativ, die normwertig getesteten Patienten ohne Nachweis von CTC (n=11) hingegen nach 23,15  $\pm$  3,7 Monaten (p-Wert=0,087, Log-Rang-Test).

Die Klinischen Endpunkte bezogen auf den Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet sind in der Tabelle 14.2 dargestellt.

	Patienten		
Charakteristika	mit CTC- Nachweis und/oder positivem Triplet, n=44 (%)	ohne CTC- Nachweis und normwertigem Triplet, n=14 (%)	p-Wert
Geschlecht (%)			0,431
männlich weiblich	36 (81,8) 8 (18,2)	13 (92,9) 1 (7,1)	
Alter (Jahre)			0,646
Mittelwert ± Standardabweichung	64,41 ± 10,6	65,93 ± 11,1	
Leberzirrhose (%)			0,540
ja nein	19 (43,2) 25 (56,8)	8 (57,1) 6 (42,9)	
Child Pugh Klassifikation (%) *			1,000
A B	17 (89,5) 2 (10,5)	8 (100) 0 (0)	
Ätiologie der Lebererkrankung **			<0,001
Alkohol HCV HBV NASH Hämochromatose Lebervenenobstruktion PBC mit AIH Kryptogene Zirrhose Keine	10 (20) 15 (30) 10 (20) 4 (8) 0 (0) 0 (0) 1 (2) 2 (4) 8 (16)	4 (26,67) 0 (0) 0 (0) 6 (40) 1 (6,67) 1 (6,67) 1 (6,67) 1 (6,67) 1 (6,67)	
BCLC-Klassifikation (%)			0,014
A B	30 (68,2) 14 (31,8)	14 (100) 0 (0)	
Gefäßinvasion (%) #			0,331
V0 V1/2	25 (56,8) 19 (43,2)	10 (76,9) 3 (23,1)	
Residualtumor (%)			0,563
R0 R1/2	40 (90,9) 4 (9,1)	14 (100) 0 (0)	
AFP (%)			0,098
<400 ng/ml >400 ng/ml	34 (77,3) 10 (22,7)	14 (100) 0 (0)	
Laborparameter präoperativ (Referenzbereich)			
<b>AFP</b> (<20 ng/ml)			0,000
Messbereich Median Mittelwert ± Standardabweichung	1,8-275296,2 53,6 7211,8 ± 41457,6	1,6-15,3 6,8 6,9 ± 4,2	
AFP-L3			0,002

Tabelle 14.1: Charakteristika der Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet vs. ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet

(<10%)			
Messbereich	0,5-91,9	0,5-8,8	
Median	11,6	4,3	
	29,3 ± 30,4	4,0 ± 3,1	
<b>DCP</b> (<7,5 ng/ml)			0,000
Messbereich	0,2-708,0	0,2-5,8	
Median	7,8	1,1	
Mittelwert ± Standardabweichung	97,7 ± 186,1	1,7 ± 1,8	
CTC (Zellen/7,5 ml Blut)			0,069
Messbereich	0-4	0-0	
Median	0	0	
Mittelwert ± Standardabweichung	$0,4 \pm 0,9$	$0,0 \pm 0,0$	
<b>Albumin ##</b> (35-50 g/l)			0,663
Messbereich	29,2-43,1	24,8-45,2	
Median	36	37,8	
Mittelwert ± Standardabweichung	36,4 ± 4,2	37,1 ± 5,0	
Bilirubin_gesamt (<1,2 mg/dl)	n=44	n=14	0,126
Messbereich	0,2-2,5	0,5-2,6	
Median	0,5	0,6	
Mittelwert ± Standardabweichung	$0,7 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,7$	
<b>Kreatinin</b> (m: 0,6-1,3/w: 0,5-1,0 mg/dl)			0,547
Messbereich	0,6-4,2	0,8-1,4	
Median	0,9	1,0	
Mittelwert ± Standardabweichung	1,1 ± 0,6	1,0 ± 0,2	
<b>AST</b> (m: 10-50/w: 10-35 U/I)			0,716
Messbereich	16-369	22-102	
Median	39,5	42,5	
Mittelwert ± Standardabweichung	58,8 ± 59,0	50,6 ± 23,5	
<b>ALT</b> (m: 10-50/w: 10-35 U/I)			0,197
Messbereich	6-219	22-95	
Median	34	44	
Mittelwert ± Standardabweichung	46,0 ± 40,5	48,5 ± 23,0	
<b>GGT</b> (m: <65/w: <38 U/I)			0,573
Messbereich	25-807	26-1088	
Median	139,5	151	
Mittelwert ± Standardabweichung	188,8 ± 172,3	267,8 ± 296,7	
INR			0,539
Messbereich	0.9-1.6	0.9-1.3	
Median	1,0	1,0	
Mittelwert ± Standardabweichung	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	
Thrombozyten (150-400 Mrd/l)			0,023

Messbereich	59-820	87-248	
Median	231	182	
Mittelwert ± Standardabweichung	234,0 ± 129,4	164,6 ± 50,4	
Leukozyten (3,8-11,0 Mrd/l)			0,573
Messbereich	2,4-17,0	4,3-15,3	
Median	6,8	6,3	
Mittelwert ± Standardabweichung	7,2 ± 2,5	7,3 ± 3,0	
<b>Hb</b> (m: 14-17,5/w: 12,3-15,3 g/dl)			0,185
Messbereich	8,8-17,4	12,3-16,8	
Median	13,7	14,2	
Mittelwert ± Standardabweichung	13,6 ± 2,1	14,4 ± 1,4	

Abkürzungen:

HCC=Hepatozelluläres Karzinom, CTC=zirkulierende Tumorzellen, HCV=Hepatitis-C-Virusinfektion, HBV=Hepatitis-B-Virusinfektion, NASH=Nichtalkoholische Steatohepatitis, PBC=Primär biliäre Cholangitis, AIH=Autoimmunhepatitis, BCLC=Barcelona-Klassifikation, LTX=Lebertransplantation, AFP= Gesamt-Alpha-Fetoprotein, AFP-L3=Lektin-reaktives Alpha-Fetoprotein, DCP= des-gamma-carboxy Prothrombin, AST=Aspartat-Aminotransferase, ALT=Alanin-Aminotransferase, GGT=Gamma-Glutamyltransferase, INR=International Normalized Ratio, Hb=Hämoglobin, \*nur für n=27 Patienten mit Leberzirrhose berechnet, \*\*multiple Ätiologien wurden aufgeschlüsselt und einzeln gezählt (n=50 vs. n=15). Es traten folgende Kombinationen auf: n=1 PBC mit AIH + HCV, n=1 HBV + HCV + Alkohol, n=3 HCV + Alkohol, n=1 NASH + Hämochromatose, # bei n=1 Patient blieb der Gefäßinvasionsstatus unklar, ## es wurde nur bei n=54 Patienten ein präoperatives Albumin im Zentrallabor des UKE bestimmt.

	Patier	nten	
Klinische Endpunkte	mit CTC- Nachweis und/oder positivem Triplet, n=44 (%)	ohne CTC- Nachweis und normwertigem Triplet, n=14 (%)	p-Wert
Rezidiv Status (%) #			
Frührezidiv (<24 Monate) kein Frührezidiv	26 (59,1) 9 (20,4)	7 (50) 7 (50)	0,176
Frührezidiv-freier Krankheitsverlauf in Monaten	5,77 ± 1,5	23,15 ± 2,45	0,030
Rezidiv kein Rezidiv	28 (63,6) 7 (15,9)	9 (64,3) 5 (35,7)	0,285
keine Angabe*	9 (20,5)	0 (0)	
Mortalität (%)			
2-Jahres Mortalität 2-Jahres Überleben	16 (36,4) 28 (63,6)	0 (0) 14 (100)	0,006
5-Jahres Mortalität 5-Jahres Überleben	31 (70,5) 13 (29,5)	7 (50) 7 (50)	0,203
Frührezidiv/Tod <24 Monate (%)			
Ja Nein	33 (75) 11(25)	7 (50,0) 7 (50,0)	0,102
Frührezidiv-freies Überleben in Monaten	5,77 ± 1,4	23,15 ± n.d.	0,014
Rezidiv/Tod (%)			
Ja	35 (79,6)	11 (78,6)	1,000
ivein Rezidiv-freies Überleben in Monaten	9 (20,4) 5.77 ± 1.4	3 (21,4) 23,15 ± 3 7	0.087
Abkürzungen:	<u> </u>		

Tabelle 14.2: Klinische Endpunkte aufgeschlüsselt in Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet vs. ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet

CTC=zirkulierende Tumorzellen, # n=49, \* davon n=6 verstorben ohne Bildgebung, n=2 lost-to followup, n=1 Lebertransplantation ohne Bildgebung. Die n=9 Patienten ohne Rezidiv Status wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

### 3.2.5. Kaplan-Meier-Modell

Um den Zusammenhang der in dieser Arbeit untersuchten Biomarker mit den Endpunkten Frührezidiv-freier Krankheitsverlauf, Frührezidiv-freien Überlebens und Gesamtüberleben im zeitlichen Verlauf nach der Tumorresektion zu untersuchen, wurde das Kaplan-Meier-Verfahren angewandt (Abbildungen 8.1 bis 10.2). Hierbei wurde zunächst für jeden Endpunkt eine Analyse hinsichtlich positiven versus normwertigen Biomarker Triplet durchgeführt. In einer zweiten Analyse wurde dann für jeden Endpunkt der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet im Vergleich zu normwertigem Biomarker Triplet ohne CTC-Nachweis mit den jeweiligen Endpunkten geprüft.

Auf der Y-Achse ist die relative Wahrscheinlichkeit der verschiedenen Endpunkte dargestellt. Auf der X-Achse ist die Zeit ab Resektionsdatum in Monaten abgebildet. Die rote Kurve beschreibt den Verlauf der Wahrscheinlichkeiten für die Patientengruppe mit einem positiven Biomarker Triplet bzw. mit einem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet. Die blaue Kurve hingegen stellt die Grafik für die Patienten mit normwertigen Biomarker Triplet bzw. ohne Nachweis von CTC und normwertigen Triplet dar.

### 3.2.5.1. Analyse zum Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf

Es wurde bei 33 (67,3%) von den insgesamt 49 Patienten ein Rezidiv innerhalb der ersten 24 Monate nach HCC-Resektion diagnostiziert, die übrigen 16 Patienten (32,7%) wurden zensiert, weil sie entweder zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups kein Rezidiv hatten oder erst nach über 24 Monaten an einem Rezidiv erkrankten.

### Abbildung 8.1 - Biomarker Triplet

Das positive Biomarker Triplet korrelierte statistisch signifikant mit dem Auftreten eines Frührezidivs (p=0,034). 33 Patienten waren Biomarker Triplet-positiv und entwickelten nach einem Median von 5,8  $\pm$  1,5 Monaten ein Frührezidiv. Im Vergleich dazu betrug das mediane Auftreten eines Frührezidivs bei Patienten mit normwertigen Biomarker Triplet (n=16) 21,0  $\pm$  2,4 Monate.

Wenn man sich den zeitlichen Verlauf der Kaplan-Meier-Kurve ansieht, stellt man fest, dass es in der Patientengruppe mit positivem Biomarker Triplet insbesondere in den ersten Monaten nach der Operation zu vielen Rezidivereignissen kam. Nach 6,0 Monaten waren hier bereits 18 von insgesamt 25 Patienten an einem Frührezidiv erkrankt. Zu diesem Zeitpunkt war noch ein Anteil von 0,455 ± 0,087 Patienten Frührezidiv-frei und es ergab sich eine verbleibende Zahl von 15 Patienten unter Risiko ("number at risk"). Nach 22,0 Monaten waren 25 von 25 Frührezidive aufgetreten und es blieben noch sechs Patienten unter Risiko, ein Anteil von 0,223 ± 0,075. Die Wahrscheinlichkeit über den Zeitraum von 22 Monaten nach Resektion Rezidiv-frei zu bleiben, betrug also  $22,3 \pm 7,5\%$ .

Die Gruppe der Patienten mit normwertigen Biomarker Triplet war kleiner (n=16). Hier fand sich nach 21,0 Monaten ein Frührezidiv-freier Patientenanteil von 0,485  $\pm$  0,139 mit verbleibenden sechs Patienten unter Risiko, sieben von insgesamt acht Ereignissen hatten stattgefunden. Die Wahrscheinlichkeit mindestens 21 Monate Rezidiv-frei zu bleiben, betrug hier also 48,5  $\pm$  13,9 %.

Abbildung 8.2 CTC und/oder Biomarker Triplet

Sieht man sich die Kaplan-Meier-Kurve für den Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf bei Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet an (n=35), zeigt sich ein ähnliches Bild.

Durch die Berücksichtigung von CTC wurden in dieser Auswertung zwei Patienten in die positiv getestete Gruppe verschoben. Es lässt sich bereits in der Grafik erkennen, dass der Frührezidiv-freie Krankheitsverlauf in der Gruppe der Patienten ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet (n=14) auch hier länger andauerte. Der Unterschied zwischen den Frührezidiv-freien Krankheitsverläufen der beiden Patientengruppen war in der statistischen Auswertung mit einem p-Wert von 0,030 signifikant.

Der Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet korrelierte mit einem Median von 5,8  $\pm$  1,5 Monaten im Vergleich zu den normwertig getesteten Patienten ohne CTC-Nachweis (Median von 23,2  $\pm$  2,5 Monate) mit einem signifikant kürzeren Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf.

Nach 6,0 Monaten waren in der Gruppe mit Nachweis von CTC und/oder positiven Biomarker Triplet noch 16 der insgesamt 35 Patienten dieser Gruppe unter Risiko ("number at risk"), ein Anteil von 0,457  $\pm$  0,084. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits 19 von 26 Frührezidiven aufgetreten. Genau wie in der Kaplan-Meier-Auswertung in Grafik 1 waren nach 22,0 Monaten alle Ereignisse (n=26) eingetreten. Sechs Patienten blieben unter Risiko, ein Anteil von 0,225  $\pm$  0,075, sodass hier die Wahrscheinlichkeit nach 22 Monaten Rezidiv-frei zu sein ebenfalls 22,5  $\pm$  7,5% betrug.

In der Gruppe ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet waren nach 21,0 Monaten noch sechs von 14 Risikofälle verblieben, anteilig 0,511  $\pm$  0,144, und sechs der insgesamt sieben gezählten Frührezidive waren diagnostiziert, sodass die Rezidivrate nach 21 Monaten hier mit 51,1  $\pm$  14,4% beschrieben werden konnte.

### 3.2.5.2. Analyse zum Frührezidiv-freien Überleben

Die Auswertung des Frührezidiv-freien Überlebens ergab, dass 40 der insgesamt 58 Patienten innerhalb der ersten 24 Monate nach Resektion ein Frührezidiv entwickelt haben oder verstorben sind (69,0%). 18 Fälle wurden zensiert (31,0%) entweder bei Rezidivausschluss, bei Lebertransplantation, bei unzureichenden Verlaufsdaten oder bei Eintritt von Rezidiv oder Tod nach >24 Monaten.

### Abbildung 9.1 Biomarker Triplet

Das positive Biomarker Triplet korrelierte statistisch signifikant mit dem Frührezidivfreien Überleben (p=0,011) und war bei der Biomarker Triplet-positiven Patientengruppe (n=41) mit einem Median von 5,6  $\pm$  0,8 signifikant verkürzt. Im Vergleich dazu überlebte die Patientengruppe mit normwertigen Biomarker Triplet (n=17) im Median 23,2  $\pm$  3,1 Monate, ohne ein Frührezidiv zu entwickeln.

Nach den ersten 6,0 Monaten betrug die Frührezidiv-freie Überlebensrate in der Kohorte mit positivem Biomarker Triplet noch  $43,7 \pm 7,9\%$ . Zu diesem Zeitpunkt befanden sich noch 17 Patienten unter Risiko und es waren von den insgesamt 31 Frührezidiv oder Todesereignissen bereits 22 eingetreten. Nach 22,0 Monaten hatten alle 31 Ereignisse stattgefunden und es verblieben sieben Patienten unter Risiko. Die Wahrscheinlichkeit, mindestens bis zum Ende des 22. Monats Rezidiv-frei zu überleben, lag bei 19,2 % ± 6,4%. Insgesamt wurden zehn Patienten zensiert.

Bei den Patienten mit normwertigen Biomarker Triplet lag die Wahrscheinlichkeit des Frührezidiv-freien Überlebens nach 21,0 Monaten bei 50,7  $\pm$  12,5 %, zu diesem Zeitpunkt hatten acht von insgesamt neun Ereignissen stattgefunden und es verblieben acht von 17 Patienten unter Risiko. Acht Patienten wurden zensiert.

### Abbildung 9.2 CTC und/oder Biomarker Triplet

Unter ergänzender Berücksichtigung von CTC zählten 44 Patienten in die Gruppe mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet und 14 Patienten in die Gruppe ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet. Der Unterschied im medianen Frührezidiv-freien Überleben der ersten 24 Monate nach Resektion war auch hier zwischen den beiden Gruppen signifikant (p=0,014). Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet wiesen im Median 5,8 ± 1,4 Monate kein Rezidiv oder Todesereignis auf im Vergleich zu 23,2 ± n.d. Monaten in der Gruppe ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet.

Die Wahrscheinlichkeit für ein mindestens 6-monatiges Frührezidiv-freies Überleben betrug 45,3  $\pm$  7,7 % in der Gruppe mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet, bei 23 von insgesamt 33 eingetretenen Ereignissen mit weiteren 19 Patienten unter Risiko. Nach 22,0 Monaten betrug die Frührezidiv-freie Überlebensrate noch 20,2  $\pm$  6,3% und es blieben nach allen 33 gezählten Ereignissen noch acht Patienten unter Risiko.

Bei der wesentlich kleineren Gruppe ohne CTC-Nachweis und normwertigen Biomarker Triplet hatten nach 21,0 Monaten sechs von sieben Todes-und Frührezidiv-Ereignissen stattgefunden und sieben Patienten blieben unter Risiko. Nach 21,0 Monaten betrug die Frührezidiv-freie Überlebensrate somit 54,5  $\pm$  1,4 %.

### 3.2.5.3. Analyse zum Gesamtüberleben

In der dritten Auswertung nach Kaplan-Meier wurde das Gesamtüberleben der Patienten (n=58) analysiert. 24 Patienten sind verstorben und 34 Patienten wurden zensiert. Es wurde entweder die letzte Verlaufskontrolle als Zeitpunkt der Zensur gewertet oder das Datum der Lebertransplantation.

Abbildung 10.1 und 10.2 Biomarker Triplet und CTC und/oder Biomarker Triplet Weder das positive Biomarker Triplet (p=0,224), noch der Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet (p=0,107) hatten einen signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben. Die Kohorte mit positiven Biomarker Triplet (n=41, davon Tod: n=18) überlebte im Median 71,8 ± 28,6 Monate. Bei den Patienten mit normwertigen Biomarker Triplet (n=17, davon Tod: n=6) lag der Kaplan-Meier-Schätzer in der gesamten Beobachtungszeit über 50% und der Median war somit nicht zu bestimmen. Bis zur maximalen Beobachtungszeit von 89,5 Monaten verstarben in dieser Gruppe weniger als die Hälfte der Patienten. Das mediane Follow-up betrug 43,5 Monate. Bei Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet (n=44, davon Tod: n=20) wurde ein Median von 42,9 ± 23,9 Monaten berechnet, in der Patientengruppe ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet (n=14, davon Tod: n=4) wurde auch hier in der maximalen Beobachtungszeit von 89,5 Monaten der Median nicht erreicht und das mediane Follow-up betrug 38,9 Monate.









### Abbildung 8.1 und 8.2: Frührezidiv-freier Krankheitsverlauf

Kaplan-Meier-Kurven der 49 Patienten mit bekanntem Rezidiv Status. Dargestellt sind die Frührezidiv-freie Krankheitsverlaufsrate über die Zeit von 24 Monaten hinsichtlich positiven versus normwertigen Biomarker Triplet (8.1) bzw. dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet versus keinem CTC-Nachweis und normwertigen Biomarker Triplet (8.2), sowie das Signifikanzniveau nach Log-rank Test. Ereignisse nach 24 Monaten postoperativ wurden zensiert. Abkürzungen: HCC=Hepatozelluläres Karzinom, CTC=EpCAM-positive zirkulierende Tumorzellen.









#### Abbildung 9.1 und 9.2: Frührezidiv-freies Überleben

Kaplan-Meier-Kurven aller 58 Patienten. Dargestellt sind die Frührezidiv-freie Überlebensrate über die Zeit von 24 Monaten ab dem Zeitpunkt der HCC-Resektion hinsichtlich positiven versus normwertigen Biomarker Triplet (9.1) bzw. dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet versus keinem CTC-Nachweis und normwertigen Biomarker Triplet (9.2), sowie das Signifikanzniveau nach Log-rank Test. Ereignisse nach 24 Monaten postoperativ wurden zensiert. Abkürzungen: HCC=Hepatozelluläres Karzinom, CTC=EpCAM-positive zirkulierende Tumorzellen.

Seite 1











Kaplan-Meier-Kurven aller 58 Patienten. Dargestellt sind die Gesamtüberlebensrate über die Zeit hinsichtlich positiven versus normwertigen Biomarker Triplet (10.1) bzw. dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet versus keinem CTC-Nachweis und normwertigen Biomarker Triplet (10.2), sowie das Signifikanzniveau nach Log-rank Test. Abkürzungen: HCC=Hepatozelluläres Karzinom, CTC=EpCAM-positive zirkulierende Tumorzellen

Seite 1

### 3.2.6. Vorhersage von Rezidiv und Frührezidiv durch die Biomarker

In den Tabellen 15.1 bis 16.2 sind die Vierfeldertafeln zur Erhebung der statistischen Gütekriterien der gemessenen Biomarker für die Prädiktion von Frührezidiven und Rezidiven der untersuchten Kohorte dargestellt.

Es wurde bei 33 von 49 Patienten mit bekanntem postoperativen Rezidivstatus ein Frührezidiv (<24 Monate) festgestellt. Das entspricht einer Prävalenz von 67,3%. Ein Rezidiv trat in der Verlaufsbeobachtung über 24 Monate hinaus bei weiteren vier Patienten auf. Die Rezidivhäufigkeit betrug hier 75,5%.

In Bezug auf das Auftreten eines Frührezidivs ergab sich für das positive Biomarker Triplet eine Sensitivität von 75,8% bei einer Spezifität von 50%. Bei einer Frührezidivhäufigkeit von 67,3 % betrug der positiv prädiktive Wert hier 75,8%. Die Wahrscheinlichkeit bei normwertigen Testergebnis tatsächlich Rezidiv-frei zu bleiben, lag bei 50% (negativ prädiktiver Wert).

Die Sensitivität des Biomarker Triplets für die Prädiktion von Rezidiven war mit 73,0% niedriger bei gleichbleibender Spezifität von 50%. Allerdings lag der positiv prädiktive Wert bei 81,8 %. Der negative prädiktive Wert betrug 37,5%.

Die Auswertung der Daten in Bezug auf den Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet für die Vorhersage des Auftretens von Frührezidiven zeigte mit 78,8% eine höhere Sensitivität bei einer geringeren Spezifität von 43,8% im Vergleich zur Analyse des positiven Biomarker Triplets allein. Der positive prädiktive Wert war mit 74,3% im Vergleich zum positiven Biomarker Triplet allein etwas niedriger, während der negative prädiktive Wert gleichbleibend bei 50% lag.

Für die Prädiktion eines Rezidivs betrug die Sensitivität hier 75,7% bei einer Spezifität von 41,7%. Die Patienten waren bei Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet zu 80,0% im Verlauf an einem Rezidiv erkrankt (positiver prädiktiver Wert). Der negative prädiktive Wert lag bei 35,7%.

Die Tabellen 17.1 und 17.2 zeigen die Vierfeldertafeln und die zugehörigen statistischen Gütekriterien für die Prädiktion von Frührezidiven in einer Subgruppen-Analyse. Um als Frührezidiv-frei eingestuft zu werden, mussten Patienten neben der vorhandenen Bildgebung einen Follow-up Zeitraum von mindestens 24 Monaten aufweisen. Durch das neue Kriterium verkleinerten sich die Gruppen der Frührezidiv-freien Patienten von acht auf sechs Fälle mit positivem Biomarker Triplet und von acht auf vier Fälle mit normwertigen Biomarker Triplet, sowie von neun auf sechs Fälle mit CTC-Nachweis und/oder positivem Biomarker Triplet und von sieben auf vier Fälle ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet. 33 von nunmehr 43 Patienten erkrankten an einem Frührezidiv. Das entsprach einer Häufigkeit von 76,7%.

In der Subgruppen-Analyse betrug die Sensitivität für das positive Biomarker Triplet weiterhin 75,8% bei einer geringeren Spezifität von 40%. Der positive prädiktive Wert stieg auf 80,6% und der negative prädiktive Wert betrug 33,3%. Unter zusätzlicher Berücksichtigung vom CTC-Nachweis zum positiven Biomarker Triplet stieg sowohl die Sensitivität auf 78,8% an (Spezifität 40%) als auch der positive prädiktive Wert auf 81,3%. Die Wahrscheinlichkeit bei normwertigen Testergebnis tatsächlich Frührezidiv-frei zu bleiben, erhöhte sich auf 36,4% (negativer prädiktiver Wert).

In Abbildung 11, 12 und 13 sind die ROC-Kurven zur grafischen Interpretation der statistischen Güte der Biomarker Messungen dargestellt.

Die Sensitivität (Y-Achse) ist gegen den Wert "1 – Spezifität" (X-Achse) aufgetragen und die diagonale Bezugslinie grün hinterlegt dargestellt. Die blaue Kurve beschreibt den Sensitivitätsverlauf bezogen auf die Spezifität für das positive Biomarker Triplet, die zusätzliche Berücksichtigung des CTC-Nachweises wird in der roten Linie veranschaulicht. Das Patientenkollektiv bestand aus 49 von 58 Patienten mit bekanntem Rezidivstatus. Die übrigen neun Patienten wurden in der Analyse nicht berücksichtigt. Abbildung 13 zeigt die Auswertung der Subgruppen-Analyse, die 43 der insgesamt 58 Studienpatienten berücksichtigt. Das positive Biomarker Triplet zeigte keine signifikante Assoziation mit dem tatsächlichen Vorhandensein eines Frührezidivs (n=33 von 49 bzw. n=33 von 43 in der Subgruppen-Analyse) oder Rezidivs (n=37 von 49) im jeweiligen Beobachtungszeitraum nach HCC-Resektion. Auch die zusätzliche Berücksichtigung des CTC-Nachweises konnte keine statistisch signifikanten Ergebnisse erzielen. Überprüft wurde die Nullhypothese, dass die Fläche unterhalb der ROC-Kurve (AUC=Area under the Curve) 0,5 beträgt. Die p-Werte waren für beide Testkombinationen jeweils für das Frührezidiv und das Rezidiv ≥0,05, in jedem der 95% Konfidenzintervalle war der Wert von 0,5 enthalten.

			Frührezi	idiv	
			nein	ja	gesamt
	Diamarkar	positiv (n)	8	25	33
positives Triplot	Biomarker	negativ (n)	8	8	16
Inplet		gesamt (n)	16	33	49
		%	n		
Sensitivität		75,8	25/33		
positiv prädikt	tiver Wert	75,8	25/33		
Häufigkeit (Prävalenz)	Frührezidiv	67,3	33/49		
Spezifität		50	8/16		
negativ prädik	tiver Wert	50	8/16		

Tabelle 15.1: Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion von Frührezidiven durch positives Biomarker Triplet

Tabelle 15.2: Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion von Frührezidiven durch Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet

positivem b					
			Frührezi	idiv	
			nein	ja	gesamt
Nachweis	von CTC	positiv (n)	9	26	35
und/oder	positivem	negativ (n)	7	7	14
Biomarker T	riplet	gesamt (n)	16	33	49
		%	n		
Sensitivität		78,8	26/33		
positiv prädi	iktiver Wert	74,3	26/35		
Häufigkeit (Prävalenz)	Frührezidiv	67,3	33/49		
Spezifität		43,8	7/16		
negativ präd	liktiver Wert	50	7/14		

			Rezidiv		
			nein	ja	gesamt
positives Triplet	Biomarker	positiv (n)	6	27	33
		negativ (n)	6	10	16
		gesamt (n)	12	37	49
		%	n		
Sensitivität		73,0	27/37		
positiv prädiktiver Wert		81,8	27/33		
Häufigkeit (Prävalenz)	Rezidiv	75,5	37/49		
Spezifität		50	6/12		
negativ prädik	tiver Wert	37,5	6/16		

Tabelle 16.1: Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für diePrädiktion von Rezidiven durch positives Biomarker Triplet

Tabelle 16.2: Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion von Rezidiven durch Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet

		Rezidiv		
		nein	ja	gesamt
Nachweis von CTC	positiv (n)	7	28	35
und/oder positivem	negativ (n)	5	9	14
Biomarker Triplet	gesamt (n)	12	37	49
	%	n		
Sensitivität	75,7	28/37		
positiv prädiktiver Wert	80,0	28/35		
Häufigkeit Rezidiv (Prävalenz)	75,5	37/49		
Spezifität	41,7	5/12		
n o notiv, nuë dilativou Mout	0F 7	E / 1 /		

			Frührezidiv		
			nein	ja	gesamt
	Biomarker	positiv (n)	6	25	31
positives Triplot		negativ (n)	4	8	12
Inpier		gesamt (n)	10	33	43
		%	n		
Sensitivität		75,8	25/33		
positiv prädikt	tiver Wert	80,6	25/31		
Häufigkeit (Prävalenz)	Frührezidiv	76,7	33/43		
Spezifität		40	4/10		
negativ prädik	tiver Wert	33,3	4/12		

Tabelle 17.1: Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion von Frührezidiven durch positives Biomarker Triplet in der Subgruppe: Frührezidiv vs. mindestens 2 Jahre Rezidiv-frei

Tabelle 17.2: Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion von Frührezidiven durch Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet in der Subgruppe: Frührezidiv vs. mindestens 2 Jahre Rezidiv-frei

		Frührezidiv		
		nein	ja	gesamt
Nachweis von CTC	positiv (n)	6	26	32
und/oder positivem	negativ (n)	4	7	11
Biomarker Triplet	gesamt (n)	10	33	43
	%	n		
Sensitivität	78,8	26/33		
positiv prädiktiver Wert	81,3	26/32		
Häufigkeit Frührezidiv (Prävalenz)	76,7	33/43		
Spezifität	40	4/10		
negativ prädiktiver Wert	36,4	4/11		
# Abbildung 11 ROC-Kurve für die Prädiktion eines Frührezidivs



Frührezidiv	n
ја	33
nein	16

#### Fläche unter der Kurve

	Fläche (AUC)	StdFehler	p-Wert	95% KI
positives Biomarker Triplet	0,629	0,088	0,147	0,46 - 0,80
Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet	0,613	0,089	0,205	0,44 – 0,79

## Abbildung 12

ROC-Kurve für die Prädiktion eines Rezidivs



Rezidiv	Ν
ја	37
nein	12

#### Fläche unter der Kurve

	Fläche (AUC)	StdFehler	p-Wert	95% KI
positives Biomarker Triplet	0,615	0,097	0,236	0,43 – 0,81
Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet	0,587	0,098	0,371	0,39 – 0,78

### Abbildung 13

ROC-Kurve für die Prädiktion eines Frührezidivs – Subgruppe Frührezidiv vs. mindestens 2 Jahre Rezidiv-frei



Frührezidiv	n
ја	33
nein	10

Fläche	unter	der	Kurve
--------	-------	-----	-------

	Fläche (AUC)	StdFehler	p-Wert	95% KI
positives Biomarker Triplet	0,579	0,107	0,455	0,37 – 0,79
Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet	0,594	0,108	0,373	0,38 – 0,81

#### 3.2.7. Univariate und Multivariate Cox-Regressionsanalyse des Frührezidivfreien Krankheitsverlaufs

In der Tabelle 18 sind die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Cox-Regressionsanalyse von ausgewählten klinischen, diagnostischen und laborchemischen Einflussgrößen auf die Entstehung von Frührezidiven nach HCC-Resektion abgebildet.

Die untersuchte Kohorte bestand aus der Subgruppe der 49 Patienten mit bekanntem Frührezidivstatus (siehe Tabelle 13). Die übrigen neun Patienten wurden von der Analyse ausgeschlossen, um die Ergebnisse über die Entwicklung von Frührezidiven zu präzisieren.

Die univariate Cox-Regression zeigte, dass die Ausdehnung des Tumors (Gefäßinvasion, Stadium gemäß BCLC), die Ätiologie (virale vs. nicht-virale Genese), das Vorliegen einer Leberzirrhose und klinische Charakteristika des Patientenkollektivs (Alter, Geschlecht) keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf nahmen.

Patienten mit positivem Biomarker Triplet hatten hingegen ein deutlich erhöhtes HR von 2,3 für die Entwicklung eines Frührezidivs nach HCC-Resektion mit einem 95% Konfidenzintervall von 1,04-5,16 (n=49). Diese Beobachtung war signifikant (p=0,039). Bei zusätzlicher Berücksichtigung des Nachweises von CTC erhöhte sich das HR auf 2,5 mit einem Signifikanzniveau von p=0,036 (95% KI 1,06-5,70, n=49). Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet zum Zeitpunkt der HCC-Resektion hatten also ein 2,5-fach erhöhtes Risiko innerhalb der ersten 24 Monate postoperativ ein Rezidiv zu entwickeln.

Der Nachweis von CTC allein sowohl kategorial (nein vs. ja) als auch in der absoluten Zahl von CTC verfehlte die Grenze zur statistischen Signifikanz knapp (p=0,067 bzw. p=0,089).

Anders verhielt es sich für die einzelnen Marker des Biomarker Triplets. Eine Erhöhung des AFP über 400 ng/ml wirkte sich mit einem HR von 2,8 signifikant auf die frühe Erkrankung an einem Rezidiv aus, im Vergleich zu Patienten mit AFP-Werten unter 400 ng/ml (p=0,023, 95% KI 1,15 – 6,90, n=49).

Das HR von 1,0 für die einzelnen Variablen AFP (HR 1,0, p=0,002, 95% KI 1,00-1,00, n=49), AFP-L3 (HR 1,0, p=0,013, 95% KI 1,01-1,03, n=49) und DCP (HR 1,0, p=0,020, 95% KI 1,00-1,01, n=49) zeigte weiter, dass sich das Risiko für die Entstehung eines Frührezidivs mit erhöhten Werten der einzelnen Messgrößen nicht veränderte.

Wie zu erwarten, konnte bei Patienten, deren HCC nicht im Gesunden entfernt wurde, ein erhöhtes Risiko für ein Frührezidiv beobachtet werden. Bei R1- oder R2resezierten Tumoren stieg das Risiko der Frührezidiventwicklung um das 3,1-fache an (HR 3,1, p=0,043, 95% KI 1,04-9,47, n=49).

In der multivariaten Regression wurden alle signifikanten Einflussgrößen der univariaten Analyse eingeschlossen. Es konnte kein statistisch signifikanter Effekt der ausgewählten Einflussgrößen auf die Entstehung von Frührezidiven unter gleichzeitiger Berücksichtigung aller relevanten Variablen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 18).

Entwicklung eines i funie		1030Kilon		
	univariate HR (95% KI)	p-Wert	multivariate HR (95% KI)	p-Wert
Geschlecht	0,590 (0,24-1,44)	0,246		
Alter bei OP	0,978 (0,95-1,01)	0,141		
BCLC B vs. A	1,300 (0,59-2,89)	0,520		
Leberzirrhose	0,756 (0,38-1,51)	0,430		
virale Ätiologie	1,314 (0,65-2,65)	0,445		
R1/2 vs. R0	3,136 (1,04-9,47)	0,043	1,715 (0,43-6,84)	0,445
V1/2 vs. V0*	1,828 (0,91-3,69)	0,092		
AFP (ng/ml)	1,000 (1,00-1,00)	0,002	1,000 (1,00-1,00)	0,058
AFP >=400 vs. <400 (ng/ml)	2,819 (1,15-6,90)	0,023	1,044 (0,26-4,27)	0,952
DCP (ng/ml)	1,003 (1,00-1,01)	0,020	1,001 (1,00-1,01)	0,496
AFP-L3 (%)	1,017 (1,00-1,03)	0,013	1,010 (0,99-1,03)	0,239
CTC (Zellen/7,5 ml Blut)	1,403 (0,95-2,07)	0,089		
Nachweis von CTC	2,198 (0,95-5,11)	0,067		
positives Biomarker Triplet	2,321 (1,04-5,16)	0,039	0,642 (0,08-5,26)	0,680
Nachweis von CTC und/oder positives Biomarker Triplet	2,458 (1,06-5,70)	0,036	2,363 (0,28-20,02)	0,430

Tabelle 18: Univariate und Multivariate Cox-Regressionsanalyse über die Entwicklung eines Frührezidivs nach HCC-Resektion

Abkürzungen:

n=49, Ereignisse=33, zensiert=16, HR=Hazard Ratio, KI=Konfidenzintervall, HCC=Hepatozelluläres Karzinom, vs.=versus, CTC=zirkulierende Tumorzellen, BCLC=Barcelona-Klassifikation, R=Residualtumor, V=Gefäßinvasion des Tumors, AFP= Gesamt-Alpha-Fetoprotein, AFP-L3=Lektin-reaktives Alpha-Fetoprotein, DCP= des-gamma-carboxy Prothrombin, \*n=48 (davon n=33 Ereignisse und n=15 zensierte Fälle), da bei n=1 Patienten postoperativ keine pathologischen Befundangaben zur Gefäßinvasion des Tumors gemacht wurden. Dieser Patient wurde von der Analyse ausgeschlossen.

#### 3.2.8. Univariate und Multivariate Cox-Regressionsanalyse für das Frührezidivfreie Überleben innerhalb von 24 Monaten nach HCC-Resektion

In der Tabelle 19 sind die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Cox-Regressionsanalyse von ausgewählten klinischen, diagnostischen und laborchemischen Einflussgrößen in Hinblick auf das Frührezidiv-freie Überleben innerhalb der ersten 24 Monate nach HCC-Resektion dargestellt.

Die untersuchte Kohorte bestand aus 58 Patienten, von denen 40 ein Frührezidiv entwickelten oder in den ersten zwei Jahren nach ihrer Tumorresektion verstarben. Die übrigen 18 Fälle wurden zensiert. Aufgrund der fehlenden Information über das Vorliegen von mikro- oder makrovaskulärer Gefäßinvasion des Tumors bei einem Patienten, umfasste die multivariate Cox-Regressionsanalyse nur 57 Patienten (Ereignisse n=40, zensiert n=17).

Im Vergleich zu der Analyse der Entstehung von Frührezidiven aus Tabelle 18 fällt auf, dass der p-Wert des univariaten HR nur bei sechs von den insgesamt 15 untersuchten Variablen signifikant ausfiel.

Mit der Erhöhung von DCP in ng/ml ging, mit einem HR von 1,0, kein erhöhtes Risiko einher, an einem Frührezidiv zu erkranken oder innerhalb von zwei Jahren postoperativ zu versterben (p=0,001, 95% KI 1,00-1,01, n=58). Diese Beobachtung blieb auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse mit einer HR von 1,0 (95% KI 1,00-1,01) bei einem p-Wert von 0,025 signifikant. In die multivariate Auswertung wurden die Einflussgrößen AFP >=400 (ng/ml), AFP-L3 (%), positives Biomarker Triplet, Nachweis von CTC und/oder positives Biomarker Triplet sowie V-Status einbezogen, da sie in der univariaten Regressionsanalyse signifikante Ergebnisse aezeiat hatten. Der HR von 3.2 für AFP-Messwerte >=400 ng/ml zeiat an. dass Patienten, die zum Zeitpunkt der HCC-Resektion ein stark erhöhtes AFP aufwiesen (>400 ng/ml), ein 3,2-fach erhöhtes Risiko hatten, ein Frührezidiv zu entwickeln oder in den ersten 24 Monaten postoperativ zu versterben (p=0,004, 95% KI 1,43-7,00, n=58). Die Unterscheidung der AFP-Bestimmung in >= und <400 ng/ml resultierte also in einem signifikanten Einfluss auf das Frührezidiv-freie Überleben der Patienten und auch diese Beobachtung blieb in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse mit einer HR von 2,4 (95% KI 1,01-5,50) bei einem p-Wert von 0,047 signifikant.

Wie auch in der Analyse über die alleinige Erkrankung an Frührezidiven in Tabelle 18 war das positive Biomarker Triplet zum Zeitpunkt der Tumorresektion mit einem deutlich erhöhten Risiko assoziiert (HR 2,6, p=0,014, 95% KI 1,21-5,38, n=58). Ebenso führte der kombinierte Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet zu einem erhöhten Risiko in den zwei Jahren nach HCC-Resektion an einem Rezidiv zu erkranken oder zu versterben (HR 2,7, p=0,018, 95% KI 1,19-6,13, n=58), während sich das Risiko mit Erhöhung von AFP-L3 in % in der Einzelanalyse nicht veränderte (HR 1,0, p=0,013, 95% KI 1,00-1,03, n=58). In der Auswertung der 57 Patienten mit vorliegendem pathologischem Befund über die Invasion des Tumorgewebes in umliegende Gefäße wurde ein HR von 2,0 ermittelt. Das Risiko für das Eintreten von Frührezidiv oder Tod innerhalb der ersten zwei Jahre nach HCC-Resektion bei nachweisbarer mikroskopischer oder makroskopischer Gefäßinvasion war somit um das 2,0-fache erhöht (p=0,031, 95% KI 1,07-3,77, n=57).

Jedoch blieben diese Beobachtungen in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 19).

	univariate HR (95% KI)	p-Wert	multivariate HR (95% KI)	p-Wert
Geschlecht	0,494 (0,23-1,08)	0,077		
Alter bei OP	0,984 (0,96-1,01)	0,259		
BCLC B vs. A	1,313 (0,64-2,69)	0,457		
Leberzirrhose	0,633 (0,34-1,20)	0,160		
virale Ätiologie	1,324 (0,70-2,50)	0,386		
R1/2 vs. R0	2,809 (0,95-8,27)	0,061		
V1/2 vs. V0*	2,007 (1,07-3,77)	0,031	1,630 (0,82-3,24)	0,164
AFP (ng/ml)	1,000 (1,00-1,00)	0,203		
AFP >=400 vs. <400 (ng/ml)	3,167 (1,43-7,00)	0,004	2,357 (1,01-5,50)	0,047
DCP (ng/ml)	1,003 (1,00-1,01)	0,001	1,002 (1,00-1,01)	0,025
AFP-L3 (%)	1,014 (1,00-1,03)	0,013	1,003 (0,99-1,02)	0,691
CTC (Zellen/7,5 ml Blut)	1,042 (0,75-1,44)	0,801		
Nachweis von CTC	1,612 (0,74-3,51)	0,228		
positives Biomarker Triplet	2,547 (1,21-5,38)	0,014	0,966 (0,22-4,30)	0,964
Nachweis von CTC und/oder positives Biomarker Triplet	2,695 (1,19-6,13)	0,018	1,701 (0,35-8,25)	0,510

Tabelle 19: Univariate (n=58) und Multivariate (n=57) Cox-Regressionsanalyse über das Frührezidiv-freie Überleben 24 Monate nach HCC-Resektion

Abkürzungen:

n=58, Ereignisse n=40, zensiert n=18, HR=Hazard Ratio, KI=Konfidenzintervall, HCC=Hepatozelluläres Karzinom, vs.=versus, CTC=zirkulierende Tumorzellen, BCLC=Barcelona-Klassifikation, R=Residualtumor, V=Gefäßinvasion des Tumors, AFP= Gesamt-Alpha-Fetoprotein, AFP-L3=Lektin-reaktives Alpha-Fetoprotein, DCP= des-gamma-carboxy Prothrombin, \*bei n=1 Patienten wurden postoperativ keine pathologischen Befundangaben zur Gefäßinvasion des Tumors gemacht. Dieser Patient wurde ausgeschlossen, sodass n=57 Patienten in die Auswertung V1/2 vs. V0 einflossen und folglich auch in die multivariate Cox-Regressionsanalyse (Ereignisse n=40, zensiert n=17).

## 4. Diskussion

#### 4.1. Methodenvergleich

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Methodenvergleich zwischen "uTASWako ™ i30" und dem langjährig etablierten Verfahren "Dimension Vista® 1500" zeigte in beiden untersuchten Messbereichen hohe Variationen in den Messunterschieden, die mit zunehmendem Konzentrationsbereich anstiegen. Die Passing-Bablok-Regression, die sich bei vorhandener Linearität in der Auswertung der Messergebnisse im Bereich AFP >1000 ng/ml als Verfahren eignet, zeigte einen systematischen Fehler in Form einer Achsenverschiebung, die suggeriert, dass der "Dimension Vista® 1500" in Konzentrationsbereich tendenziell höher misst. Somit erlaubt die diesem unzureichende Übereinstimmung der beiden Messmethoden nicht, die eine Messmethode, gegen die andere auszutauschen. Dabei handelt es sich um ein bei der Messung von Tumormarkern häufig vorkommendes Phänomen wie Sturgeon et al. in den 2008 veröffentlichten Richtlinien der "American Association of Clinical Chemistry (AACC), formerly the National Academy of Clinical Biochemistry (NACB)" für den Einsatz von Tumormarkern erläutern. Aus diesem Grund ist jedes Labor angehalten, eingeführte Methoden genau zu überprüfen und sich generell neu Fehleranfälligkeit von Immunoassays bewusst zu sein. Oremek et al. führten eine Untersuchung explizit für das AFP durch, in der 25 Laboratorien mit insgesamt acht verschiedenen Testverfahren eingeschlossen wurden mit dem Ergebnis, dass die Messwerte sich zwischen den Laboratorien deutlich unterschieden. Gründe für beobachtete Messdifferenzen zwischen analytischen Methoden, die komplexe Analyten wie Tumormarker untersuchen, sind ungenügende Kalibrationen, sowie Unterschiede in der Antikörperspezifität und unterschiedlich zusammengesetzte Assays, die sich auch im methodischen Vorgehen deutlich unterscheiden können (Sturgeon et al., 2008, Sturgeon and Seth, 1996, Lamerz and Stieber, 2004, Oremek et al., 2011, Tate and Ward, 2004). Die bei Tumorpatienten beobachtete Abweichung von z.B. der Glykosylierung der Proteine kann zu deutlich abweichenden Messergebnissen unterschiedlicher bei Anwendung Testverfahren mit unterschiedlichen Antikörpern führen. Da es sich um Patientenproben handelt, können Messausreißer nicht immer mit Messfehlern der Methoden erklärt werden, da sich auch Störfaktoren (in vitro) und Einflussgrößen (in vivo) je nach angewandtem Verfahren unterschiedlich auf die Messungen auswirken. Zu nennen sind hier unter anderem Phänomene wie der High-Dose-Hook-Effekt, der bei einem Antigenüberschuss mit beeinträchtigter Antigen-Antikörper-Komplexbildung die Proteinkonzentration im Immunoassay unterschätzt oder der Einsatz heterophiler Antikörper, die mit mehreren Antigenen kreuzreagieren können. Die Eigenschaften der Messmethoden hinsichtlich ihrer Spezifität und ihrer Anfälligkeit für Störungen kann dabei sehr unterschiedlich sein. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der High-Dose-Hook-Effekt seltener auftritt. wenn die primäre Antiaen-Antikörperfragment-Bindung zeitlich getrennt von der Zugabe der markierten Antikörper für die anschließende Detektion erfolgt (Altman and Bland, 1983, Dolscheid-Pommerich et al., 2017, Sturgeon et al., 2008, Bundesärztekammer, 2023, Bertsch et al., 2014, Tate and Ward, 2004).

In der Routineversorgung von Patienten ist ein etabliertes Vorgehen, um mit der beschriebenen Differenz zwischen Messungen der Tumormarker bei Etablierung eines neuen Messverfahrens umzugehen, dass ein Zeitraum von z.B. 6 Monaten gesetzt wird, in dem Parallelmessungen an beiden Geräten erfolgen. Das Ziel ist, dass für jeden Tumorpatienten mindestens ein Wert doppelt an beiden Geräten bestimmt wird, was dem Kliniker einen individuellen Vergleich erlaubt (Sturgeon et al., 2010, Dolscheid-Pommerich et al., 2017). Wichtig ist dabei, dass Tumormarker nicht als Absolutwerte in der Diagnostik tragend sind, sondern die Verlaufsbeurteilung im Vordergrund steht, also die Messwertentwicklung in Relation zu den Vorwerten. Dafür muss immer dasselbe Assay als Referenz dienen, wie in diesem Abschnitt erläutert wurde. Die klinisch chemische Diagnostik im Bereich der Tumormarker wurde durch strenge Richtlinien bereits verbessert und muss durch die konsequente Umsetzung von Qualitätskriterien und den intensivierten Austausch zwischen Herstellern, den Laboratorien und den Klinikern weiterentwickelt werden (Diamandis et al., 2008, Lamerz and Stieber, 2004).

Da die Ergebnisse der Validierungsmessungen (Präzision, Richtigkeit und Messabweichung) für die Messgrößen AFP, AFP-L3 und DCP alle im vorgegebenen Bereich der Richtlinie der Bundesärztekammer bzw. des Herstellers lagen, wurde das "µTASWako ™ i30" in Zusammenschau mit den weiteren erforderlichen Prüfungen der externen Qualitätssicherung für die uneingeschränkte Nutzung in der Routineanalytik freigegeben.

## 4.2. Klinischer Abschnitt

In der vorgelegten Arbeit wurde der klinische Stellenwert von den Biomarkern AFP, AFP-L3 und DCP in Kombination mit EpCAM-positiven CTC für die Prädiktion von Frührezidiven nach kurativ intendierter HCC-Resektion untersucht. Es wurde geprüft, ob die Kombination dieser Biomarker eine ausreichende Sensitivität für die Erkennung von Risikopatienten erzielt.

Der primäre klinisch relevante Endpunkt war der Frührezidiv-freie Krankheitsverlauf innerhalb der ersten 24 Monate nach Tumorresektion.

Es wurde für insgesamt 49 Patienten nach der HCC-Resektion ein Rezidivstatus erhoben. In diesem Patientenkollektiv korrelierte der Nachweis von EpCAM-positiven CTC und/oder die Erhöhung des Biomarker Triplets zum Zeitpunkt der HCC-Resektion mit einem signifikant erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Frührezidivs mit einer HR von 2,5 (95% KI 1,06-5,70, p=0,036). Es bestätigte sich die Hypothese, dass die Kombination der untersuchten Biomarker einen Mehrgewinn im klinischen Alltag bringen kann, um Patienten bereits zum Zeitpunkt der Operation als gefährdetes Kollektiv für das Auftreten von Rezidiven in den folgenden 2 Jahren zu erkennen. Die Erhöhung eines beliebigen Markers des Triplets ging bereits mit einer HR von 2,3 (95% KI 1,04-5,16, p=0,039) mit einem deutlich erhöhten Risiko für Rezidive einher, aber bei zusätzlicher Berücksichtigung von EpCAM-positiven CTC erhöhte sich das Erkrankungsrisiko auf das 2.5-fache. Der Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet korrelierte mit einem signifikant kürzeren Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf. Patienten entwickelten im Median nach 5,8 ± 1,5 Monaten ein Frührezidiv im Vergleich zu 23.2 ± 2.5 Monaten bei Patienten ohne CTC-Nachweis und normwertigen Biomarker Triplet (p=0.030, Log-Rang-Test).

Schaut man sich die Sensitivität hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven für Patienten mit Nachweis von CTC und/oder Erhöhung von AFP, AFP-L3- oder DCP an, so lag sie bei 75,7% bei einer Spezifität von 41,7%. Für die Erhöhung eines beliebigen Markers des Triplets allein ohne Berücksichtigung von CTC lag die Sensitivität nur bei 73% (Spezifität 50%). Bezogen auf die Prädiktion von Frührezidiven im Zeitraum von 2 Jahren nach HCC-Resektion konnte durch den Einschluss der CTC in die Auswertung die Sensitivität sogar auf 78,8% (Spezifität 43,8%) angehoben werden, während sie unter Berücksichtigung des Biomarker Triplets allein nur bei 75.8% (Spezifität 50%) lag. Der positive prädiktive Wert verschlechterte sich allerdings bezogen auf die Prädiktion von Rezidiven und Frührezidiven durch zusätzliche Berücksichtigung von CTC von 81,8% auf 80% bzw. 75,8% auf 74,3% bei einer Rezidiv Häufigkeit von 75,5% bzw. 67,3%. Diese Beobachtung ist, genau wie die scheinbare Überlegenheit des Biomarker Triplets in der alleinigen Messung, die in der ROC-Kurve (blaue versus rote Kurve) dargestellt ist, am ehesten auf die kleine Patientenzahl dieser Arbeit zurückzuführen, die auch die schlechte Güte der Tests erklären könnte, die in der jeweiligen Fläche unter der Kurve (AUC: Area under the curve) ausgedrückt wird. Die Auswertungen zur grafischen Interpretation der statistischen Güte der Biomarker Messungen waren nicht signifikant.

Durch die anschließend durchgeführte Subgruppen-Analyse zur Prädiktion von Frührezidiven wurde ein weiterer wichtiger Aspekt herausgearbeitet, den es in der Evaluation der Aussagekraft der Biomarker zu berücksichtigen gilt. Es wurden dabei nur solche Patienten in die Auswertung eingeschlossen, die neben der vorhandenen Bildgebung zum Rezidivstatus einen Follow-up Zeitraum von mindestens 24 Monaten erfüllten. Durch die Anwendung dieses Kriteriums wurden sechs Patienten aus der Analyse ausgeschlossen. Bei diesen Patienten war ein Rezidivausschluss per Bildgebung bereits vor Ablauf der ersten 24 Monate nach HCC-Resektion erfolgt. Insgesamt stieg der positive prädiktive Wert für das Biomarker Triplet so auf 80,6% bei gleichbleibender Sensitivität von 75,8% (Spezifität 40%). Unter zusätzlicher Berücksichtigung vom CTC-Nachweis zum positiven Biomarker Triplet stieg sowohl die Sensitivität auf 78,8% an (Spezifität 40%) als auch der positive prädiktive Wert auf 81,3%. Die Rezidivhäufigkeit in der Subgruppe betrug 76,7%. In der Auswertung zur grafischen Interpretation war in der Subgruppen-Analyse die Kombination von Biomarker Triplet und CTC-Nachweis in der Prädiktion von Frührezidiven dem alleinigen Biomarker Triplet überlegen, die Ergebnisse blieben allerdings nicht signifikant und müssen anhand eines größeren Patientenkollektivs überprüft werden.

In der vorgelegten Arbeit wurde außerdem das Frührezidiv-freie Überleben anhand der gesamten Kohorte (n=58) untersucht und war signifikant mit dem Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet assoziiert (P-Wert=0,014, Log-Rang-Test). Im Median betrug das Frührezidiv-freie Überleben bei Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet 5,8  $\pm$  1,4 Monate und bei Patienten ohne CTC-Nachweis und normwertigen Biomarker 23,2  $\pm$  n.d. Monate. Die alleinige Berücksichtigung des Biomarker Triplets ergab für Patienten mit Erhöhung der drei Messgrößen bereits ein signifikant verkürztes Frührezidiv-freies Überleben bei einem 2,6-fach erhöhten Risiko innerhalb von zwei Jahren nach OP zu versterben oder an einem Rezidiv zu erkranken (HR 2,6, 95% KI 1,21-5,38, p=0,014). Das Risiko erhöhte sich auf das 2,7-fache für Patienten mit CTC-Nachweis und/oder erhöhten Biomarker Triplet (HR 2,7, 95% KI 1,19-6,13, p=0,018).

Das Biomarker Triplet bestehend aus AFP, AFP-L3 und DCP wurde ursprünglich in der Diagnostik des HCCs eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Kombination aller drei Biomarker in der HCC-Früherkennung der alleinigen Bestimmung einzelner Marker überlegen ist (Qi et al., 2020, Caviglia et al., 2016, Carr et al., 2007, Durazo et al., 2008).

Die 5-Jahres Rezidivrate beim HCC nach chirurgischer Resektion liegt bei 70%. Bisher wurde kein uneingeschränkt nutzbarer Biomarker gefunden, der Hochrisikopatienten für die Entwicklung eines Rezidivs frühzeitig identifizieren und zum Beispiel für adjuvante Therapieansätze auswählen kann (Pinyol et al., 2019, Tsilimigras et al., 2020, Imamura et al., 2003, Villanueva, 2019, Ishizawa et al., 2008, Vogel et al., 2022). Die Überprüfung von potenziell geeigneten prädiktiven Biomarkern für die Rezidiventstehung ist daher von hoher klinischer Relevanz.

Da sich das Biomarker Triplet bereits bei der Primärdiagnostik des HCCs bewährt hat, wurde der diagnostische Wert auch in Zusammenhang mit der Früherkennung von Rezidiven untersucht. Im asiatischen Raum gibt es dazu bereits erste Studien.

Die Erhöhung der einzelnen Triplet Biomarker wurde mit dem Auftreten von Rezidiven nach HCC-Resektion in einen signifikanten Zusammenhang gestellt. Sowohl DCP als auch AFP wurden als prognostisch relevante Messgrößen für die Rezidiventwicklung im Zeitraum von zwei Jahren nach Tumorresektion identifiziert. Auch AFP-L3 wurde als prädiktiver präoperativer Marker als relevant eingestuft, insbesondere bei solchen Patienten deren AFP-Werte im Referenzbereich lagen (Kamiyama et al., 2015, Chon et al., 2012, Kobayashi et al., 2011). Dennoch findet das Biomarker Triplet als prädiktiver Marker für ein Rezidiv bisher, mit Ausnahme des AFP im Rahmen von Lebertransplantationen, keinen Einzug in die S3 Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des HCCs (Deutsche Krebsgesellschaft, 2023). Dies mag daran liegen, dass bisher der diagnostische Wert des Biomarker Triplets für die Früherkennung von Rezidiven nach HCC-Resektion für die westlichen Industrienationen nicht ausreichend untersucht wurde. Während im asiatischen und afrikanischen Raum das HCC eher auf dem Boden einer chronischen Hepatitis B oder in Folge von Aflatoxin-Exposition entsteht, überwiegen in der westlichen Population Risikofaktoren wie die Hepatitis C, Alkoholabusus und Stoffwechselerkrankungen, wie Adipositas und Diabetes mellitus (McGlynn and London, 2011, Makarova-Rusher et al., 2016, Younossi et al., 2019). Ein Ziel dieser Arbeit war daher, das Biomarker Triplet in der Rezidivdiagnostik anhand einer europäischen HCC-Kohorte zu evaluieren. Interessanterweise ergab die Auswertung der einzelnen Biomarker AFP, AFP-L3 und DCP keine Risikodifferenz für das Auftreten eines Frührezidivs zwischen den Patientengruppen mit erhöhten und normwertigen Messwerten mit einer HR von jeweils 1,0 (AFP: 95% KI 1,00-1,00, p=0,002; AFP-L3: 95% KI 1,00-1,03, p=0,013; DCP: 95% KI 1,00-1,01, p=0,020). Für die kombinierte Berücksichtigung der drei Messgrößen wurde die Erhöhung eines beliebigen oder mehrerer Marker als positives Biomarker Triplet gewertet und das Risiko für die Frührezidiv Entwicklung stieg signifikant an (HR 2,3, 95% KI 1,04-5,16, p=0,039).

Ein weiteres Ziel der vorgelegten Arbeit war zu überprüfen, ob die Kombination von EpCAM-positiven CTC mit dem Biomarker Triplet eine Früherkennung von Rezidiven nach kurativ intendierter HCC-Resektion erlaubt.

Von Felden et al. zeigten 2017 in ihrer Arbeit, dass der Nachweis von EpCAMpositiven CTC bei BCLC A unmittelbar vor HCC-Resektion mit einem signifikant erhöhten Risiko einhergeht, postoperativ an einem Rezidiv zu erkranken (HR 2,3, 95%) KI 1,0-5,2). Das Rezidiv-freie Überleben bei Nachweis von CTC war signifikant niedriger im Vergleich zu CTC-negativen Patienten und alle Patienten der Studie mit Nachweis von CTC entwickelten ein Frührezidiv innerhalb der ersten 24 Monate postoperativ. In diesem Zeitraum entstehende Rezidive bilden sich auf der Grundlage von Mikrometastasen, die bereits zum Zeitpunkt der Resektion in der Leber vorliegen und aber mit herkömmlichen Verfahren der Bildgebung nicht dargestellt werden können. Rezidive, die nach mehr als 24 Monaten auftreten, werden hingegen einem De-Novo-Karzinom zugeschrieben. das im Rahmen der vorliegenden Grunderkrankung auf dem Boden derselben Präkanzerose entsteht (von Felden et al., 2017, Dikilitas, 2020, Imamura et al., 2003). Auch in dieser Arbeit war der Nachweis von CTC mit einem über 2-fach erhöhten Risiko für das Auftreten eines Frührezidivs verbunden (HR 2,2,95% KI 0,95-5,11), allerdings war diese Beobachtung statistisch knapp nicht signifikant (p=0,067). Am Ehesten kann dies darauf zurückgeführt werden, bei einer insgesamt kleinen Kohorte bei einem HCC-Patienten mit dass Rezidivausschluss präoperativ ein Messwert von 1 CTC/7.5 ml Blut erhoben wurde. Dieser Patient hatte eine Leberzirrhose auf dem Boden einer Hepatitis C. Der Rezidivstatus wurde bereits zehn Monate postoperativ erhoben und der Patient verstarb nach weiteren 2,6 Monaten, sodass nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass im weiteren Verlauf ggf. ein Rezidiv aufgetreten sein könnte. Interessanterweise fanden Sun et al. 2013 einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Rezidiven im Zeitraum von einem Jahr nach HCC-Resektion und dem Nachweis von über 2 CTC pro 7,5 ml Blut (Sun et al., 2013). Somit scheint nicht nur der Nachweis von CTC allein unter der Berücksichtigung des Followup Zeitraums, sondern auch der verwendete Cut-Off-Wert in der Rezidiv Prädiktion von Bedeutung zu sein.

Die Analysen der vorgelegten Arbeit konnten eindeutig zeigen, dass durch die kombinierte Bestimmung von EpCAM-positiven CTC und dem Biomarker Triplet unmittelbar vor der kurativ intendierten HCC-Resektion die Prädiktionsrate von

Frührezidiven signifikant verbessert wird. Von Felden et al. zeigten, dass sich der Biomarker CTC für die Prädiktion von Frührezidiven eignet, was daran liegen könnte, dass möglicherweise vorhandene Mikrometastasen durch das CTC detektiert werden (von Felden et al., 2017). Das Triplet wiederum könnte ergänzend weitere aggressive Tumoren identifizieren, die durch die alleinige CTC-Bestimmung nicht detektiert werden. Steigende DCP-Level scheinen mit einer höhergradigen Aggressivität und schlechteren Prognose des HCCs einherzugehen. Zudem wird angenommen, dass das präoperativ gemessene AFP im Serum von Patienten mit HCC-Resektion einen prädiktiven Wert für das Vorliegen von aggressiveren Tumoreigenschaften und eine schlechtere Prognose der Erkrankung hat (Feng et al., 2021, Ma et al., 2013, Ikai et al., 2004). In der Primärdiagnostik des HCCs hat sich ergänzend gezeigt, dass AFP bei aggressiv wachsenden HCCs im Normbereich liegen kann bzw. häufig Tumoren erst mit Fortschreiten der Erkrankung identifiziert (von Felden and Villanueva, 2020). In diesem Zusammenhang von besonderer Relevanz könnte daher auch in der Rezidivdiagnostik das AFP-L3 sein. Die Messmethode des "µTASWako ™ i30" erlaubt die Bestimmung des prozentualen Anteils des AFPs, auch im Bereich von Gesamt-AFP-Werten <20ng/ml. Es konnte gezeigt werden, dass AFP-L3 im Serum insbesondere bei Patienten mit Gesamt-AFP-Konzentrationen zwischen 10 und 400 ng/ml in der HCC-Detektion wertvoll ist (Toyoda et al., 2011, Jia et al., 2014). Ob diese Erkenntnisse aus der HCC-Primärdiagnostik für die Prädiktion von Rezidiven gelten, muss in weiteren Studien überprüft werden.

Tsilimigras et al. untersuchten in einer 2020 veröffentlichten multizentrischen retrospektiven Studie das Rezidivmuster von HCC-Patienten nach Resektion in verschiedenen Stadien nach BCLC. Die Rezidive der BCLC 0-A-Patienten traten am häufigsten im ersten Jahr nach HCC-Resektion auf und waren zu 70% intrahepatisch lokalisiert. Das Auftreten von Rezidiven war assoziiert mit einem geringen Differenzierungsgrad des Tumorgewebes, einer schlechten Kapselintegrität, dem Vorhandensein von Residualtumorgewebe (R1-Resektion) und AFP-Werten >400 ng/ml (Tsilimigras et al., 2020). Auch in dieser Arbeit konnte bei Patienten, deren HCC nicht im Gesunden entfernt worden war, eine Auswirkung auf den Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf beobachtet werden. Bei R1- oder R2-resezierten Tumoren stieg das Risiko der Frührezidiventwicklung um das 3,1-fache an (95% KI 1,04-9,47, p=0,043). Es ist bekannt, dass das Vorliegen von mikrovaskulärer Angioinvasion des Tumors (V-Status) einen unabhängigen Risikofaktor in Bezug auf das Rezidiv-freie Überleben in HCC-Patienten nach kurativ intendierter Resektion darstellt und mit dem Auftreten von Frührezidiven assoziiert ist (Sumie et al., 2014, Imamura et al., 2003). Patienten deren histopathologische Untersuchung nach HCC-Resektion das Vorliegen einer Gefäßinvasion beschrieb, hatten auch in dieser Arbeit ein signifikant erhöhtes Risiko für ein verkürztes Frührezidiv-freies Überleben innerhalb von 24 Monaten nach OP (HR 2,0, 95% KI 1,07-3,77, p=0,031). Als Einflussgröße für die Entwicklung von Frührezidiven war der V-Status hingegen nicht signifikant assoziiert (HR 1.8, 95% KI 0,91-3,69, P-Wert=0,092) Allerdings wurde lediglich berücksichtigt, ob eine Gefäßinvasion des Tumors vorlag und somit nicht zwischen mikro-und makrovaskulär unterschieden, was die Ergebnisse beeinflusst haben könnte.

In Übereinstimmung mit der Beobachtung von Tsilimigras et al. zeigte die Auswertung dieser Arbeit zudem ein 2,8-fach erhöhtes Risiko (95% KI 1,15-6,90, p=0,023) für Patienten mit AFP-Werten >400 ng/ml innerhalb von 2 Jahren nach Resektion an einem Rezidiv zu erkranken. Bei zusätzlicher Berücksichtigung von Patienten, die innerhalb der ersten 24 Monaten postoperativ verstarben, blieb diese Beobachtung bestehen, das Risiko stieg sogar auf das 3,2-fache (95% KI 1,43-7,00, p=0,004). Diese

Beobachtung blieb in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse mit einem 2,4-fach erhöhten Risiko signifikant (95% KI 1,01-5,50, p=0,047). Erhöhte AFP-Werte werden in der Literatur als wesentlicher Einflussfaktor für die Entstehung eines schweren Krankheitsverlauf des HCCs beschrieben. Dabei wird eine AFP-Konzentration von 400 ng/ml als möglicher Schwellenwert diskutiert und diente daher auch in der vorgelegten Arbeit als Grundlage für die kategoriale Einteilung dieser Messgröße (Tangkijvanich et al., 2000, EASL, 2018, Ma et al., 2013, Ikai et al., 2004).

Die Ergebnisse der Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass die Kombination von EpCAM-positiven CTC und dem Biomarker Triplet eindeutig die Prädiktionsrate von Rezidiven bei HCC-Patienten mit kurativ intendierter Resektion verbessert. Die Biomarker identifizieren Hochrisiko-Patienten bereits zum Zeitpunkt der Operation und könnten zukünftig z.B. die Entscheidung zum Einsatz von adjuvanten Therapien oder einer besonders engmaschigen Nachsorge ermöglichen mit dem Ziel, das kurative Outcome der Patienten zu verbessern. Es gab bisher keine evidenzbasierte Grundlage für den Einsatz von adjuvanten Tumortherapien beim HCC. Die aktuelle S3-Leitlinie des HCCs aus August 2023 spricht weiterhin davon, dass eine zugelassene Systemtherapie für die adjuvante Therapie bisher nicht vorliegt, bezieht sich aber bereits auf die vielversprechenden Daten der Phase III IMbrave050-Studie, welche die Kombinationstherapie Atezolizumab und Bevacizumab nach kurativ-intendierter Resektion oder Ablation im Vergleich zur aktiven Nachsorge untersucht hat. Diese Arbeit belegt eine signifikante Verbesserung des Rezidiv-freien Überlebens für Patienten mit oben genannter adjuvanter Therapie (Qin et al., 2023).

Die 2015 veröffentlichte sogenannte STORM-Studie prüfte bereits den Einsatz von Sorafenib nach chirurgischer Resektion oder lokaler Ablation und konnte weder zugunsten des Rezidiv-freien Überlebens noch des Gesamtüberlebens einen Vorteil für die adjuvant-behandelten Patienten feststellen (Bruix et al., 2015). Die Einteilung für die Verabreichung der adjuvanten Therapie bzw. des Placebos erfolgte allerdings im Zufallsprinzip und nicht durch definierte Auswahlkriterien wie beispielsweise die Bestimmung von Biomarkern. Pinyol et al. konnten anschließend in der sogenannten BIOSTORM-Studie zwar keinen Biomarker mit prognostischer Aussagekraft hinsichtlich des Ansprechens auf eine Sorafenib-Therapie identifizieren. Es wurden allerdings, neben genetischen Merkmalen, Biomarker der Angiogenese und Proliferation analysiert (Pinyol et al., 2019), sodass die interessante Fragestellung bleibt, welche Biomarker sich eignen, um eine präzise Auswahl von Patienten für eine adjuvante Therapie zu treffen. Dikilitas schreibt in seinem 2020 erschienenden Review von dem möglichen zukünftigen Erfolg der neueren Immun Checkpoint Inhibitoren in der adjuvanten Therapie des HCCs. Mit Atezolizumab in Kombination mit Bevacizumab scheint hier der erste Durchbruch gelungen zu sein. In seiner Zusammenfassung stellen vor allem histopathologische Eigenschaften des resezierten Tumors, wie z.B. die mikroskopische Gefäßinvasion, Kriterien für die Auswahl von Patienten dar, die von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten (Dikilitas, 2020, Qin et al., 2023). Möglich wäre also, insbesondere vor dem Hintergrund der neuen adjuvanten Therapieoptionen, zu prüfen, ob sich die Kriterien die Biomarker dieser Arbeit erweitern lassen, um zukünftia um die Therapieentscheidungen zu präzisieren.

#### 4.3. Zusammenfassende Einordnung

Zu den Limitationen der vorgelegten Arbeit zählen die kleine Fallzahl, sowie das unizentrische retrospektive Design. Diese Begrenzungen haben sich auf die vorgelegten Ergebnisse ausgewirkt. Ein weiterer Schwachpunkt dieser Arbeit ist die kleine Anzahl an Patienten, bei denen der Rezidivstatus im postoperativen Verlauf tatsächlich erhoben werden konnte. In der Folge verringerte sich die Kohorte von 58 auf 49 Patienten.

In der multivariaten Auswertung der Cox-Regressionsanalyse hinsichtlich der Entwicklung eines Frührezidivs nach HCC-Resektion war kein Parameter signifikant mit dem Endpunkt assoziiert, was am Ehesten darauf zurückzuführen ist, dass insgesamt nur 33 Frührezidivereignisse vorlagen. Für jede untersuchte Einflussgröße in der multivariaten Cox-Regression sollten mindestens zehn Ereignisse vorliegen um valide Ergebnisse zu erzielen (Peduzzi et al., 1995). Dieses Kriterium konnte in unserer Kohorte nicht erfüllt werden und muss in folgenden Untersuchungen evaluiert werden. Dieser Zusammenhang gilt genauso für die Beurteilung der multivariaten Cox-Regression bezogen auf das Frührezidiv-freie Überleben, da auch hier nur 40 Ereignisse bei insgesamt sechs untersuchten Variablen vorlagen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der präoperative Nachweis des Biomarker Triplets in Kombination mit EpCAM-positiven CTC im Serum Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Frührezidiven nach kurativ intendierter HCC-Resektion identifizieren kann. Dieses Patientenkollektiv kann möglicherweise in besonderem Maße von einer adjuvanten Tumortherapie profitieren. Aktuell gibt es noch keine adjuvante Therapie für das HCC, deren Einsatz laut der S3-Leitlinie außerhalb von Studienbedingungen empfohlen wird. Das könnte sich mit Verweis auf die Phase III IMbrave050-Studie allerdings mit der Kombination aus Atezolizumab und Becizumab bald ändern. Zudem müssen die Zusammenhänge zwischen den untersuchten Biomarkern und Rezidiverkrankungen nach HCC-Resektion und ihr klinischer Nutzen in Zukunft in einem multizentrischen Design überprüft werden. Die wenig invasive und nebenwirkungsarme Möglichkeit Biomarker im peripheren Blut von Patienten nachzuweisen und durch sie Schlüsse für Prognose und weitere Therapieentscheidungen zu ziehen, bleibt weiterhin ein vielversprechender Ansatz.

## 5. Zusammenfassung

Das erste Ziel der vorgelegten Arbeit war nach Einführung des Messgerätes "µTASWako ™ i30" im Zentrallabor des UKE zunächst die Validität der neuen Messmethode zu überprüfen. Dazu wurden nach der Rili-BÄK die Validierungsdaten für quantitative Messmethoden erhoben und die Mindestanforderungen erfüllt, sodass das Testverfahren für die Routineanalytik freigegeben werden konnte. Im Methodenvergleich zwischen den AFP-Messwerten des "µTASWako ™ i30" mit denen des bereits etablierten Routinemessgerätes "Dimension Vista® 1500" bestätigten sich die in der Literatur vorbeschriebenen Messdifferenzen zwischen analytischen Methoden im Bereich von Immunoassays, die bei Neueinführung von Testverfahren Parallelmessungen insbesondere von Tumormarkern über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten erforderlich machen, um die Werte in der weiteren Verlaufsbeurteilung beim einzelnen Patienten klinisch richtig einordnen zu können.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war den Stellenwert des Biomarker Triplets bestehend aus AFP, AFP-L3 und DCP allein und in Kombination mit EpCAM-positiven CTC in der Prädiktion von Rezidiven bei Patienten mit kurativ intendierter HCC-Resektion zu untersuchen, um Hochrisikopatienten für ein Frührezidiv bereits zum Zeitpunkt der Operation zu identifizieren.

Die Untersuchung des Biomarker Triplets ergab, dass erhöhte Messwerte eines beliebigen oder mehrerer der drei Triplet-Marker die Frührezidiventwicklung postoperativ mit einer Sensitivität von 75,8% vorhersagen konnten.

Es wurde zudem gezeigt, dass Patienten mit präoperativ erhöhtem Biomarker Triplet ein 2,3-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Frührezidivs aufwiesen (p=0,039) sowie ein 2,6-fach erhöhtes Risiko für ein verkürztes Frührezidiv-freies Überleben (p=0,014).

Die kombinierte Anwendung des Biomarker Triplets mit EpCAM-positiven CTC verbesserte die Prädiktionsrate von Rezidiven zudem eindeutig mit einer Sensitivität von 78,8%. Im Gegensatz zu Patienten ohne Nachweis von EpCAM-positiven CTC und mit normwertigen Biomarker Triplet, die im Median nach  $23,2 \pm 2,5$  Monaten an einem Rezidiv erkrankten, zeigten Patienten, deren Biomarker Triplet kurz vor HCC-Resektion erhöht war und/oder bei denen CTC nachgewiesen wurden, einen signifikant kürzeren Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf von 5,8  $\pm$  1,5 Monaten (p=030).

Ihr Risiko für eine Rezidiv Entwicklung innerhalb von zwei Jahren postoperativ war um das 2,5-fache erhöht (p=0,036). Auch das Frührezidiv-freie Überleben von Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet war mit 5,8  $\pm$  1,4 Monaten im Vergleich zu 23,2  $\pm$  n.d. Monaten signifikant verkürzt (p=0,014) und das Risiko zu versterben oder ein Frührezidiv zu entwickeln um das 2,7-fache erhöht (p=0,018).

Da die Prädiktionsrate von Frührezidiven durch die Bestimmung der in dieser Arbeit untersuchten Biomarker zum Zeitpunkt der chirurgischen Resektion eindeutig verbessert werden kann, würde ihr Einsatz im klinischen Alltag eine Selektion von Patienten ermöglichen, die von adjuvanten Therapieansätzen im besonderen Maße profitieren könnten. Diese Aspekte können nun auf der Basis der hier erhobenen Ergebnisse in weiterführenden multizentrischen Studien näher untersucht werden, womit die Zielvorgaben der vorgelegten Arbeit erfüllt sind.

### 6. Summary

For the successful implementation of the automated immunoassay system " $\mu$ TASWako <sup>TM</sup> i30"in the main laboratory of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf the new method was evaluated according to the guidelines published by the German Medical Association for quality assurance in medical laboratories (Rili-BÄK). The correlation of the test results of AFP was tested with the already approved reference method "Dimension Vista® 1500" and showed the assumed deviation between the two immunoassay systems, that has already been described in the literature before and has led to the established practice of parallel measurements for a period of at least six months when implementing a new method in the field of tumor markers. This practice allows the comparison of measurement results for each patient with each method assures the correct clinical evaluation.

Secondly the clinical utility of AFP, AFP-L3 and DCP (triplet marker) was evaluated also in combination with EpCAM-positive CTC as liquid biomarker to identify patients with HCC that had a high risk of recurrence after liver resection. Bloodstream detection of the biomarkers was performed prior to curative-intended HCC resection.

Increased levels of any triplet marker predicted an early HCC recurrence in the 24 months after resection with a sensitivity of 75,8%. Those patients not only had a 2,3 times higher probability of early recurrence (p=0,039), but they also had a significantly shorter early recurrence free survival (HR 2,6, p=0,014).

Taking the detection of EpCAM-positive CTC into additional consideration the rate of prediction of early recurrence was increased and showed a sensitivity of 78,8%. Patients who were CTC-positive and/or had increased levels of any of the triplet markers stayed recurrence free only for  $5,8 \pm 1,5$  months in comparison to CTC-negative patients with normal triplet levels ( $23,2 \pm 2,5$ , p=0,030) and their risk of early recurrence was 2,5 times higher (p=0,036). They also had a shorter recurrence free survival within 24 months after HCC resection of only  $5,8 \pm 1,4$  months in comparison to  $23,2 \pm n.d.$  months (p=014) and their risk for early death or early recurrence was 2,7 times higher (p=0,018).

In Conclusion the bloodstream detection of the liquid biomarkers CTC, AFP, AFP-L3 and DCP prior to curative-intended liver resection in HCC patients disclosed an elevated risk of early recurrence and therefore could help identify patients who might benefit from adjuvant treatment. These results should now be re-evaluated in a study with a larger group of patients in a multi-center setting.

# 7. Abkürzungsverzeichnis

HCC	Hepatozelluläres Karzinom		
СТС	Zirkulierende Tumorzellen		
μTAS	Micro Total Analysis System		
AFP	Gesamt-Alpha-Fetoprotein		
AFP-L3	Lektin-reaktive, fukosylierte Isoform des Alpha-Fetoproteins		
AFP-L1	Lektin-non-reaktive Isoform des Alpha-Fetoproteins		
AFP-L2	Schwach-Lektin-reaktive Isoform des Alpha-Fetoproteins		
LCA	Lens culinaris Agglutinin		
DCP	Des-gamma-carboxy Prothrombin		
EATA	Electrokinetic analyte transport assay		
LBA	liquid-phase binding assay		
EMMA	electrophoretically mediated microanalysis		
ITP	Isotachophorese		
Fab	Antikörperfragment (antigene-binding fragment)		
SOP	Standard Operation Procedure		
Rili-BÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen		
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
AUC	Area under the curve		
ROC	receiver operating characteristics		
n.d.	nicht durchgeführt (not determined)		

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Child-Pugh-Klassifikation
Tabelle 2	Barcelona-Klassifikation (BCLC)
Tabelle 3	Auflistung der verwendeten Reagenzien, Kontrollen, Kalibratoren und Materialien für das µTAS Immunoassay System
Tabelle 4	Auflistung der Gerätewartungen des µTASWako ™ i30
Tabelle 5	Auflistung der Ergebniscodes des µTASWako ™ i30
Tabelle 6	Auflistung der Reagenzien des Dimension Vista® 1500
Tabelle 7	Auflistung der verwendeten Reagenzien, Kontrollen, Kalibratoren und Materialien für das Laborsystem Dimension Vista® 1500
Tabelle 8	Auflistung der verwendeten Softwares
Tabelle 9	Validierungsdaten Präzision, Richtigkeit und Messabweichung zur Methode der Quantitativen Bestimmung von AFP, AFP-L3 und DCP
Tabelle 10	Konzentrationsbereich der Patientenmessungen für den Methodenvergleich zwischen "Dimension Vista® 1500" und "µTASWako ™ i30"
Tabelle 11	Passing-Bablok-Regression zum Methodenvergleich der Quantitativen Bestimmung von AFP <1000 ng/ml
Tabelle 12	Passing-Bablok-Regression zum Methodenvergleich der Quantitativen Bestimmung von AFP >1000 ng/ml
Tabelle 13.1	Charakteristika der Patienten mit HCC-Resektion
Tabelle 13.2	Klinische Endpunkte aufgeschlüsselt in die Patientenanzahl
Tabelle 14.1	Charakteristika der Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet vs. ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet
Tabelle 14.2	Klinische Endpunkte aufgeschlüsselt in Patienten mit Nachweis von CTC und/oder positivem Biomarker Triplet vs. ohne Nachweis von CTC und normwertigen Biomarker Triplet
Tabelle 15.1	Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion von Frührezidiven durch positives Biomarker Triplet

- Tabelle 15.2Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion<br/>von Frührezidiven durch Nachweis von CTC und/oder positivem<br/>Biomarker Triplet
- Tabelle 16.1Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion<br/>von Rezidiven durch positives Biomarker Triplet
- Tabelle 16.2Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion<br/>von Rezidiven durch Nachweis von CTC und/oder positivem<br/>Biomarker Triplet
- Tabelle 17.1Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion<br/>von Frührezidiven durch positives Biomarker Triplet in der<br/>Subgruppe: Frührezidiv vs. mindestens 2 Jahre Rezidiv-frei
- Tabelle 17.2Kreuztabelle zu den statistischen Gütekriterien für die Prädiktion<br/>von Frührezidiven durch Nachweis von CTC und/oder positivem<br/>Biomarker Triplet in der Subgruppe: Frührezidiv vs. mindestens 2<br/>Jahre Rezidiv-frei
- Tabelle 18Univariate und Multivariate Cox-Regressionsanalyse über die<br/>Entwicklung eines Frührezidivs nach HCC-Resektion
- Tabelle 19Univariate und Multivariate Cox-Regressionsanalyse über das<br/>Frührezidiv-freie Überleben 24 Monate nach HCC-Resektion

# 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Studiendesign
Abbildung 2	Messmethode µTASWako ™ i30
Abbildung 3	Liquid-phase binding assay und Isotachophorese
Abbildung 4	Passing-Bablok-Regression: AFP <1000 ng/ml
Abbildung 5	Bland-Altman-Plot: AFP <1000 ng/ml
Abbildung 6	Passing-Bablok-Regression: AFP >1000 ng/ml
Abbildung 7	Bland-Altman-Plot: AFP >1000 ng/ml
Abbildung 8.1	Analyse zum Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf - Biomarker Triplet
Abbildung 8.2	Analyse zum Frührezidiv-freien Krankheitsverlauf - CTC und/oder Biomarker Triplet
Abbildung 9.1	Analyse zum Frührezidiv-freien Überleben - Biomarker Triplet
Abbildung 9.2	Analyse zum Frührezidiv-freien Überleben - CTC und/oder Biomarker Triplet
Abbildung 10.1	Analyse zum Gesamtüberleben - Biomarker Triplet
Abbildung 10.2	Analyse zum Gesamtüberleben - CTC und/oder Biomarker Triplet
Abbildung 11	ROC-Kurve für die Frührezidiv Prädiktion
Abbildung 12	ROC-Kurve für die Rezidiv Prädiktion
Abbildung 13	ROC-Kurve für die Frührezidiv Prädiktion – Subgruppe Frührezidiv vs. mindestens 2 Jahre Rezidiv-frei

#### 10. Literaturverzeichnis

1. ADACHI, Y., TSUCHIHASHI, J., SHIRAISHI, N., YASUDA, K., ETOH, T. & KITANO, S. 2003. AFP-producing gastric carcinoma: multivariate analysis of prognostic factors in 270 patients. *Oncology*, 65, 95-101.

2. ALPERT, E., DRYSDALE, J. W., ISSELBACHER, K. J. & SCHUR, P. H. 1972. Human -fetoprotein. Isolation, characterization, and demonstration of microheterogeneity. *J Biol Chem*, 247, 3792-8.

3. ALTMAN, D. G. & BLAND, J. M. 1983. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies<sup>†</sup>. *The Statistician 32 (1983) 307-317* © *1983 Institute of Statisticians*.

4. AOYAGI, Y., ISEMURA, M., YOSIZAWA, Z., SUZUKI, Y., SEKINE, C., ONO, T. & ICHIDA, F. 1985. Fucosylation of serum alpha-fetoprotein in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 830, 217-23.

5. AU - GARCIA-SCHWARZ, G., AU - ROGACS, A., AU - BAHGA, S. S. & AU - SANTIAGO, J. G. 2012. On-chip Isotachophoresis for Separation of Ions and Purification of Nucleic Acids. *JoVE*, e3890.

6. AVILA, L. A. & WHITESIDES, G. M. 1993. Catalytic Activity of Native Enzymes during Capillary Electrophoresis: An Enymatic "Microreactor" *J.Org.Chem.*, 58, 5508-5512.

7. AZAM, F., LATIF, M. F., FAROOQ, A., TIRMAZY, S. H., ALSHAHRANI, S., BASHIR, S. & BUKHARI, N. 2019. Performance Status Assessment by Using ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Score for Cancer Patients by Oncology Healthcare Professionals. *Case Rep Oncol,* 12, 728-736.

8. BAO, J. & REGNIER, F. E. 1992. Ultramicro enzyme assays in a capillary electrophoretic system. *J Chromatogr,* 608, 217-24.

9. BERGSTRAND, C. G. & CZAR, B. 1956. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest*, 8, 174.

10. BERRY, K. & IOANNOU, G. N. 2013. Serum alpha-fetoprotein level independently predicts posttransplant survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*, 19, 634-45.

11. BERTSCH, T., BOLLHEIMER, C., HOFFMANN, U., HEPPNER, H. J., TRIEBEL, J., SIEBER, C., CHRIST, M., DUPUY, A. M., CRISTOL, J. P. & KENNY, P. 2014. Alpha-1-fetoprotein (AFP) measurements and the high-dose hook effect. *Clin Lab*, 60, 1585-6.

12. BLAND, J. M. & ALTMAN, D. G. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1, 307-10.

13. BMBF. 2019. Bundesministerium für Bildung und Forschung. Gemeinsame Erklärung, Nationale Dekade gegen Krebs, 2019-2029, Bundesgesundheitsministerium [Online]. Available:

https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3\_Downloads/N/Na tionale\_Dekade\_gegen\_Krebs/Nationale-Dekade-gegen-Krebs\_Gemeinsame-Erklaerung.pdf [Accessed 2022/10/19, 12:40].

14. BRUIX, J., SHERMAN, M. & AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, D. 2011. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 53, 1020-2.

15. BRUIX, J., TAKAYAMA, T., MAZZAFERRO, V., CHAU, G. Y., YANG, J., KUDO, M., CAI, J., POON, R. T., HAN, K. H., TAK, W. Y., LEE, H. C., SONG, T., ROAYAIE, S., BOLONDI, L., LEE, K. S., MAKUUCHI, M., SOUZA, F., BERRE, M. A., MEINHARDT, G., LLOVET, J. M. & INVESTIGATORS, S. 2015. Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol,* 16, 1344-54.

16. BUAMAH, P. K., HARRIS, R., JAMES, O. F. & SKILLEN, A. W. 1986. Lentillectin-reactive alpha-fetoprotein in the differential diagnosis of benign and malignant liver disease. *Clin Chem*, 32, 2083-4.

17. BUNDESÄRZTEKAMMER. 2023. *Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen* [Online]. Deutsches Ärzteblatt Jg.120, Heft 21-22. Available:

https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\_upload/BAEK/Themen/Qualitaet ssicherung/\_Bek\_BAEK\_RiLi\_BAEK\_ONLINE\_FINAL\_VERS\_26\_05\_2023.pdf [Accessed 2024/01/04 11:20].

18. CARR, B. I., KANKE, F., WISE, M. & SATOMURA, S. 2007. Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States. *Dig Dis Sci*, *5*2, 776-82.

19. CAVIGLIA, G. P., ABATE, M. L., PETRINI, E., GAIA, S., RIZZETTO, M. & SMEDILE, A. 2016. Highly sensitive alpha-fetoprotein, Lens culinaris agglutininreactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin for hepatocellular carcinoma detection. *Hepatol Res*, 46, E130-5.

20. CHEN, S., LI, J., TAN, X., XU, Q., MO, Y., QIN, H., ZHOU, L., MA, L. & WEI, Z. 2020. Clinical role of combining alpha-fetoprotein and lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma: Evidence from literature and an original study. *J Clin Lab Anal*, e23262.

21. CHON, Y. E., CHOI, G. H., LEE, M. H., KIM, S. U., KIM, D. Y., AHN, S. H., KIM, K. S., CHOI, J. S., HAN, K. H., CHON, C. Y. & PARK, J. Y. 2012. Combined measurement of preoperative alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin predicts recurrence after curative resection in patients with hepatitis-B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 131, 2332-41.

22. CRISTOFANILLI, M., BUDD, G. T., ELLIS, M. J., STOPECK, A., MATERA, J., MILLER, M. C., REUBEN, J. M., DOYLE, G. V., ALLARD, W. J., TERSTAPPEN, L. W. & HAYES, D. F. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351, 781-91.

23. DE, J., SHEN, Y., QIN, J., FENG, L., WANG, Y. & YANG, L. 2016. A Systematic Review of Des-gamma-Carboxy Prothrombin for the Diagnosis of Primary Hepatocellular Carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 95, e3448.

24. DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF. 2023. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome, Langversion 4.0, 2023, AWMF-Registernummer: 032-053OL https://www.leitlinienprogrammonkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/; Zugriff am 04.01.2024 [Online]. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaerekarzinome/ [Accessed 2024/01/04 10:30].

25. DI BISCEGLIE, A. M., STERLING, R. K., CHUNG, R. T., EVERHART, J. E., DIENSTAG, J. L., BONKOVSKY, H. L., WRIGHT, E. C., EVERSON, G. T., LINDSAY, K. L., LOK, A. S., LEE, W. M., MORGAN, T. R., GHANY, M. G., GRETCH, D. R. & GROUP, H.-C. T. 2005. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol,* 43, 434-41.

26. DI TOMMASO, L., DESTRO, A., SEOK, J. Y., BALLADORE, E., TERRACCIANO, L., SANGIOVANNI, A., IAVARONE, M., COLOMBO, M., JANG, J. J., YU, E., JIN, S. Y., MORENGHI, E., PARK, Y. N. & RONCALLI, M. 2009. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 50, 746-54.

27. DIAGNOSTICS, S. H. 2017. Dimension Vista® System, Flex® reagent cartridge, AFP. Packungsbeilage der AFP-Reagenzien: Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn in Germany.

28. DIAMANDIS, E. P., HOFFMAN, B. R. & STURGEON, C. M. 2008. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for the Use of Tumor Markers. *Clin Chem*, 54, 1935-9.

29. DIKILITAS, M. 2020. Why Adjuvant and Neoadjuvant Therapy Failed in HCC. Can the New Immunotherapy Be Expected to Be Better? *J Gastrointest Cancer*, 51, 1193-1196.

30. DOLSCHEID-POMMERICH, R. C., KEYVER-PAIK, M., HECKING, T., KUHN, W., HARTMANN, G., STOFFEL-WAGNER, B. & HOLDENRIEDER, S. 2017. Clinical performance of LOCI-based tumor marker assays for tumor markers CA 15-3, CA 125, CEA, CA 19-9 and AFP in gynecological cancers. *Tumour Biol,* 39, 1010428317730246.

31. DURAZO, F. A., BLATT, L. M., COREY, W. G., LIN, J. H., HAN, S., SAAB, S., BUSUTTIL, R. W. & TONG, M. J. 2008. Des-gamma-carboxyprothrombin, alpha-fetoprotein and AFP-L3 in patients with chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 23, 1541-8.
30. EASL, E. A. F. T. S. O. T. L. 2018. EASL Clinical Practice Guidelines:

Management of hepatocellular carcinoma. J Hepatol, 69, 182-236.

32. FENG, H., LI, B., LI, Z., WEI, Q. & REN, L. 2021. PIVKA-II serves as a potential biomarker that complements AFP for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 21, 401.

33. FINN, R. S., QIN, S., IKEDA, M., GALLE, P. R., DUCREUX, M., KIM, T. Y., KUDO, M., BREDER, V., MERLE, P., KASEB, A. O., LI, D., VERRET, W., XU, D. Z., HERNANDEZ, S., LIU, J., HUANG, C., MULLA, S., WANG, Y., LIM, H. Y., ZHU, A. X., CHENG, A. L. & INVESTIGATORS, I. M. 2020. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 382, 1894-1905.

34. FOLI, A. K., SHERLOCK, S. & ADINOLFI, M. 1969. SERUM α1-FETOPROTEIN IN PATIENTS WITH LIVER DISEASE. *The Lancet,* 294, 1267-1269.

35. FUJIFILM. 2022a. *Packungsbeilage µTASWako AFP-L3* [Online]. Available: https://www.wako-chemicals.de/de/produkte/diagnostika/hcc-biomarker/taswako-afp-I3-test [Accessed 2022/10/19 12:54].

36. FUJIFILM. 2022b. *Packungsbeilage µTASWako DCP* [Online]. Available: https://www.wako-chemicals.de/de/produkte/diagnostika/hcc-biomarker/taswako-dcp-test [Accessed 2022/10/19 13:08].

37. FUJIYAMA, S., MORISHITA, T., HASHIGUCHI, O. & SATO, T. 1988. Plasma abnormal prothrombin (des-gamma-carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 61, 1621-8.

38. GARCIA-TSAO, G. 2016. The Child–Turcotte Classification: From Gestalt to Sophisticated Statistics and Back. *Digestive Diseases and Sciences*, 61, 3102-3104.

39. GRETEN, T. F. & MANNS, M. P. 2008. [Hepatocellular carcinoma - diagnosis and treatment]. *Dtsch Med Wochenschr*, 133, 1907-10.

40. GROUVEN, U., BENDER, R., ZIEGLER, A. & LANGE, S. 2007. [Comparing methods of measurement]. *Dtsch Med Wochenschr,* 132 Suppl 1, e69-73.

41. GRUTTADAURIA, S., PAGANO, D., CORSINI, L. R., CINTORINO, D., LI PETRI, S., CALAMIA, S., SEIDITA, A. & DI FRANCESCO, F. 2020. Impact of margin status on long-term results of liver resection for hepatocellular carcinoma: single-center time-to-recurrence analysis. *Updates Surg*, 72, 109-117.

42. HAJIAN-TILAKI, K. 2013. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med*, 4, 627-35.

43. HALBRECHT, I. & KLIBANSKI, C. 1956. Identification of a new normal embryonic haemoglobin. *Nature*, 178, 794-5.

44. HAMEED, B., MEHTA, N., SAPISOCHIN, G., ROBERTS, J. P. & YAO, F. Y. 2014. Alpha-fetoprotein level > 1000 ng/mL as an exclusion criterion for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria. *Liver Transpl,* 20, 945-51.

45. HARMON, B. J., LEESONG, I. & REGNIER, F. E. 1994. Selectivity in electrophoretically mediated microanalysis by control of product detection time. *Anal Chem*, 66, 3797-805.

46. HARRISON, D. J., MANZ, A., ZONGHUI, F., LÜDI, H. & WIDMER, H. M. 1992. Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip *Analytical Chemistry*, 64, 1926-1932.

47. HAYASHI, M., YAMADA, S., TAKANO, N., OKAMURA, Y., TAKAMI, H., INOKAWA, Y., SONOHARA, F., TANAKA, N., SHIMIZU, D., HATTORI, N., KANDA, M., TANAKA, C., NAKAYAMA, G., KOIKE, M. & KODERA, Y. 2021. Different Characteristics of Serum Alfa Fetoprotein and Serum Des-gamma-carboxy Prothrombin in Resected Hepatocellular Carcinoma. *In Vivo*, 35, 1749-1760.

48. IARC. 2020a. International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization. Cancer

*today, Fact sheet all cancers* [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf [Accessed 2022/10/19 13:52].

49. IARC. 2020b. International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization. Cancer Tomorrow, Estimated number of deaths from 2020 to 2040, Both sexes, age [0-85+]

*Liver and intrahepatic bile ducts* [Online]. Available:

https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=11&single\_unit=50000&types =1 [Accessed 2022/10/20 09:00].

50. IKAI, I., ARII, S., KOJIRO, M., ICHIDA, T., MAKUUCHI, M., MATSUYAMA, Y., NAKANUMA, Y., OKITA, K., OMATA, M., TAKAYASU, K. & YAMAOKA, Y. 2004. Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer*, 101, 796-802.

51. IMAMURA, H., MATSUYAMA, Y., TANAKA, E., OHKUBO, T., HASEGAWA, K., MIYAGAWA, S., SUGAWARA, Y., MINAGAWA, M., TAKAYAMA, T., KAWASAKI, S. & MAKUUCHI, M. 2003. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol,* 38, 200-7.

52. INAGAKI, Y., TANG, W., MAKUUCHI, M., HASEGAWA, K., SUGAWARA, Y. & KOKUDO, N. 2011. Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des-gamma-carboxyprothrombin. *Liver Int*, 31, 22-35.

53. ISHIZAWA, T., HASEGAWA, K., AOKI, T., TAKAHASHI, M., INOUE, Y., SANO, K., IMAMURA, H., SUGAWARA, Y., KOKUDO, N. & MAKUUCHI, M. 2008. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 134, 1908-16.

54. JEMAL, A., WARD, E. M., JOHNSON, C. J., CRONIN, K. A., MA, J., RYERSON, B., MARIOTTO, A., LAKE, A. J., WILSON, R., SHERMAN, R. L., ANDERSON, R. N., HENLEY, S. J., KOHLER, B. A., PENBERTHY, L., FEUER, E. J. & WEIR, H. K. 2017. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *J Natl Cancer Inst*, 109.

55. JIA, Z., WANG, L., LIU, C., YU, Z., CHAI, L. & ZHAO, M. 2014. Evaluation of alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 detection in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)*, 18, 192-6.

56. JORGENSON, J. W. & DEARMAN LUKACS, K. 1981. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. *Analytical Chemistry*, 53, 1298-1302.

57. KAGEBAYASHI, C., YAMAGUCHI, I., AKINAGA, A., KITANO, H., YOKOYAMA, K., SATOMURA, M., KUROSAWA, T., WATANABE, M., KAWABATA, T., CHANG, W., LI, C., BOUSSE, L., WADA, H. G. & SATOMURA, S. 2009. Automated immunoassay system for AFP-L3% using on-chip electrokinetic reaction and separation by affinity electrophoresis. *Anal Biochem*, 388, 306-11.

58. KAMIYAMA, T., YOKOO, H., KAKISAKA, T., ORIMO, T., WAKAYAMA, K., KAMACHI, H., TSURUGA, Y., YAMASHITA, K., SHIMAMURA, T., TODO, S. & TAKETOMI, A. 2015. Multiplication of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence-II is a powerful predictor of prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma patients after a hepatectomy. *Hepatol Res*, 45, E21-31.

59. 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, 1399-406.

60. KOBAYASHI, M., HOSAKA, T., IKEDA, K., SEKO, Y., KAWAMURA, Y., SEZAKI, H., AKUTA, N., SUZUKI, F., SUZUKI, Y., SAITOH, S., ARASE, Y. & KUMADA, H. 2011. Highly sensitive AFP-L3% assay is useful for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment pre- and postoperatively. *Hepatol Res*, 41, 1036-45.

61. KOIKE, Y., SHIRATORI, Y., SATO, S., OBI, S., TERATANI, T., IMAMURA, M., YOSHIDA, H., SHIINA, S. & OMATA, M. 2001. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer*, 91, 561-9.

62. LAI, Q., IESARI, S., LEVI SANDRI, G. B. & LERUT, J. 2017. Des-gammacarboxy prothrombin in hepatocellular cancer patients waiting for liver transplant: a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers*, 32, e370-e374.

63. LAMERZ, R. & STIEBER, P. 2004. [Tumour markers]. *Dtsch Med Wochenschr,* 129, 2722-30.

64. LEE, J. W., LEE, Y. J., PARK, K. M., HWANG, D. W., LEE, J. H. & SONG, K. B. 2016. Anatomical Resection But Not Surgical Margin Width Influence Survival Following Resection for HCC, A Propensity Score Analysis. *World J Surg*, 40, 1429-39.

65. 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-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 310, 1427-31.

66. LLEO, A., DE BOER, Y. S., LIBERAL, R. & COLOMBO, M. 2019. The risk of liver cancer in autoimmune liver diseases. *Ther Adv Med Oncol,* 11, 1758835919861914.

67. LLOVET, J. M., BRU, C. & BRUIX, J. 1999. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*, 19, 329-38.

68. MA, W. J., WANG, H. Y. & TENG, L. S. 2013. Correlation analysis of preoperative serum alpha-fetoprotein (AFP) level and prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) after hepatectomy. *World J Surg Oncol,* 11, 212.

69. MAKAROVA-RUSHER, O. V., ALTEKRUSE, S. F., MCNEEL, T. S., ULAHANNAN, S., DUFFY, A. G., GRAUBARD, B. I., GRETEN, T. F. & MCGLYNN, K. A. 2016. Population attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. *Cancer*, 122, 1757-65.

70. MARRERO, J. A., FENG, Z., WANG, Y., NGUYEN, M. H., BEFELER, A. S., ROBERTS, L. R., REDDY, K. R., HARNOIS, D., LLOVET, J. M., NORMOLLE, D., DALHGREN, J., CHIA, D., LOK, A. S., WAGNER, P. D., SRIVASTAVA, S. & SCHWARTZ, M. 2009. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 137, 110-8.

71. MATSUI, O., KOBAYASHI, S., SANADA, J., KOUDA, W., RYU, Y., KOZAKA, K., KITAO, A., NAKAMURA, K. & GABATA, T. 2011. Hepatocelluar nodules in liver cirrhosis: hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis. *Abdom Imaging*, 36, 264-72.

72. MCGLYNN, K. A. & LONDON, W. T. 2011. The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future. *Clin Liver Dis,* 15, 223-43, vii-x.

73. MCLNTIRE, K. R., VOGEL, C. L., PRINCLER, G. L. & PATEL, I. R. 1972. Serum α-Fetoprotein as a Biochemical Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 32, 1941-1946.

74. MONDAZZI, L., BOTTELLI, R., BRAMBILLA, G., RAMPOLDI, A., REZAKOVIC, I., ZAVAGLIA, C., ALBERTI, A. & IDEO, G. 1994. Transarterial oily chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors. *Hepatology*, 19, 1115-23.

75. MONTAL, R., ANDREU-OLLER, C., BASSAGANYAS, L., ESTEBAN-FABRO, R., MORAN, S., MONTIRONI, C., MOEINI, A., PINYOL, R., PEIX, J., CABELLOS, L., VILLANUEVA, A., SIA, D., MAZZAFERRO, V., ESTELLER, M. & LLOVET, J. M. 2019. Molecular portrait of high alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: implications for biomarker-driven clinical trials. *Br J Cancer*, 121, 340-343.

76. NAKAMURA, K., IMAJO, N., YAMAGATA, Y., KATOH, H., FUJIO, K., TANAKA, T., SATOMURA, S. & MATSUURA, S. 1998. Liquid-phase binding assay of alphafetoprotein using a sulfated antibody for bound/free separation. *Anal Chem*, 70, 954-7.

77. NAKAMURA, K., SATOMURA, S. & MATSUURA, S. 1993. Liquid-phase binding assay of human chorionic gonadotropin using high-performance liquid chromatography. *Anal Chem*, 65, 613-6.

78. NGUYEN, B. T. & KANG, M. J. 2019. Application of Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence to Immunoassays and Enzyme Assays. *Molecules*, 24.

79. NIELSEN, R. G., RICKARD, E. C., SANTA, P. F., SHARKNAS, D. A. & SITTAMPALAM, G. S. 1991. Separation of antibody-antigen complexes by capillary zone electrophoresis, isoelectric focusing and high-performance size-exclusion chromatography. *J Chromatogr*, 539, 177-85.

80. NISHI, S. 1970. Isolation and characterization of a human fetal-alpha-globulin from the sera of fetuses and a hepatoma patient. *Cancer Res,* 30, 2507-13.

81. OKA, H., SAITO, A., ITO, K., KUMADA, T., SATOMURA, S., KASUGAI, H., OSAKI, Y., SEKI, T., KUDO, M., TANAKA, M. & COLLABORATIVE HEPATO-ONCOLOGY STUDY GROUP OF, J. 2001. Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. *J Gastroenterol Hepatol*, 16, 1378-83.

82. OKEN, M. M., CREECH, R. H., TORMEY, D. C., HORTON, J., DAVIS, T. E., MCFADDEN, E. T. & CARBONE, P. P. 1982. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol,* 5, 649-55.

83. OREMEK, G. M., OERTL, A., BERTSCH, T., BEWARDER, N., BURGER, V., DANNENBERG, R., DIBBELT, L., GERSTMEYER, A., GRUNOW, G., IRMER-VORPEIL, A., KLAPDOR, R., KLEMM, M., KRENGEL, G., LERAHN, A., MARIVOET, S., MISIANIK, J., ORTIN, V., PEETERS, V., RODER, B., SCHAUER, I., SCHNEIDER, A., SCHWEIGER, A. M., SEEFRIED, D., STRAETMANS, D., TROMMER, A. & WEINHOLD, A. 2011. Alpha-1-Fetoprotein (AFP): international proficiency study with different test systems. *Clin Lab*, 57, 669-75. 84. PASSING, H. & BABLOK 1983. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem*, 21, 709-20.

85. PASSING, H. & BABLOK, W. 1984. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part II. *J Clin Chem Clin Biochem*, 22, 431-45.

86. PEDUZZI, P., CONCATO, J., FEINSTEIN, A. R. & HOLFORD, T. R. 1995. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates. *J Clin Epidemiol,* 48, 1503-10.

87. PINATO, D. J., SHARMA, R., ALLARA, E., YEN, C., ARIZUMI, T., KUBOTA, K., BETTINGER, D., JANG, J. W., SMIRNE, C., KIM, Y. W., KUDO, M., HOWELL, J., RAMASWAMI, R., BURLONE, M. E., GUERRA, V., THIMME, R., ISHIZUKA, M., STEBBING, J., PIRISI, M. & CARR, B. I. 2017. The ALBI grade provides objective hepatic reserve estimation across each BCLC stage of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol,* 66, 338-346.

88. PINYOL, R., MONTAL, R., BASSAGANYAS, L., SIA, D., TAKAYAMA, T., CHAU, G. Y., MAZZAFERRO, V., ROAYAIE, S., LEE, H. C., KOKUDO, N., ZHANG, Z., TORRECILLA, S., MOEINI, A., RODRIGUEZ-CARUNCHIO, L., GANE, E., VERSLYPE, C., CROITORU, A. E., CILLO, U., DE LA MATA, M., LUPO, L., STRASSER, S., PARK, J. W., CAMPS, J., SOLE, M., THUNG, S. N., VILLANUEVA, A., PENA, C., MEINHARDT, G., BRUIX, J. & LLOVET, J. M. 2019. Molecular predictors of prevention of recurrence in HCC with sorafenib as adjuvant treatment and prognostic factors in the phase 3 STORM trial. *Gut*, 68, 1065-1075.

89. PUGH, R. N., MURRAY-LYON, I. M., DAWSON, J. L., PIETRONI, M. C. & WILLIAMS, R. 1973. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 60, 646-9.

90. QI, F., ZHOU, A., YAN, L., YUAN, X., WANG, D., CHANG, R., ZHANG, Y., SHI, F., HAN, X., HOU, J., WEI, L. & ZHANG, X. 2020. The diagnostic value of PIVKA-II, AFP, AFP-L3, CEA, and their combinations in primary and metastatic hepatocellular carcinoma. *J Clin Lab Anal*, 34, e23158.

91. QIN, S., CHEN, M., CHENG, A. L., KASEB, A. O., KUDO, M., LEE, H. C., YOPP, A. C., ZHOU, J., WANG, L., WEN, X., HEO, J., TAK, W. Y., NAKAMURA, S., NUMATA, K., UGUEN, T., HSIEHCHEN, D., CHA, E., HACK, S. P., LIAN, Q., MA, N., SPAHN, J. H., WANG, Y., WU, C., CHOW, P. K. H. & INVESTIGATORS, I. M. 2023. Atezolizumab plus bevacizumab versus active surveillance in patients with resected or ablated high-risk hepatocellular carcinoma (IMbrave050): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*, 402, 1835-1847.

92. REIG, M., FORNER, A., RIMOLA, J., FERRER-FABREGA, J., BURREL, M., GARCIA-CRIADO, A., KELLEY, R. K., GALLE, P. R., MAZZAFERRO, V., SALEM, R., SANGRO, B., SINGAL, A. G., VOGEL, A., FUSTER, J., AYUSO, C. & BRUIX, J. 2022. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol*, 76, 681-693.

93. RIETHDORF, S., FRITSCHE, H., MULLER, V., RAU, T., SCHINDLBECK, C., RACK, B., JANNI, W., COITH, C., BECK, K., JANICKE, F., JACKSON, S., GORNET, T., CRISTOFANILLI, M. & PANTEL, K. 2007. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*, 13, 920-8.

94. ROAYAIE, S., BLUME, I. N., THUNG, S. N., GUIDO, M., FIEL, M. I., HIOTIS, S., LABOW, D. M., LLOVET, J. M. & SCHWARTZ, M. E. 2009. A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 137, 850-5.

95. RYERSON, A. B., EHEMAN, C. R., ALTEKRUSE, S. F., WARD, J. W., JEMAL, A., SHERMAN, R. L., HENLEY, S. J., HOLTZMAN, D., LAKE, A., NOONE, A. M., ANDERSON, R. N., MA, J., LY, K. N., CRONIN, K. A., PENBERTHY, L. & KOHLER, B. A. 2016. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer*, 122, 1312-37.

96. SANDERS, B. D., SLOTCAVAGE, R. L., SCHEERBAUM, D. L., KOCHANSKY, C. J. & STREIN, T. G. 2005. Increasing the efficiency of in-capillary electrophoretically mediated microanalysis reactions via rapid polarity switching. *Anal Chem*, 77, 2332-7.

97. SATO, Y., NAKATA, K., KATO, Y., SHIMA, M., ISHII, N., KOJI, T., TAKETA, K., ENDO, Y. & NAGATAKI, S. 1993. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *N Engl J Med*, 328, 1802-6.

98. SATO, Y., SEKINE, T. & OHWADA, S. 1994. Alpha-fetoprotein-producing rectal cancer: calculated tumor marker doubling time. *J Surg Oncol,* 55, 265-8.

99. SCHULZE, K., GASCH, C., STAUFER, K., NASHAN, B., LOHSE, A. W., PANTEL, K., RIETHDORF, S. & WEGE, H. 2013. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 133, 2165-71.

100. SMITH, B. D., BECKETT, G. A., YARTEL, A., HOLTZMAN, D., PATEL, N. & WARD, J. W. 2014. Previous exposure to HCV among persons born during 1945-1965: prevalence and predictors, United States, 1999-2008. *Am J Public Health*, 104, 474-81.

101. SMITH, B. D., MORGAN, R. L., BECKETT, G. A., FALCK-YTTER, Y., HOLTZMAN, D., TEO, C. G., JEWETT, A., BAACK, B., REIN, D. B., PATEL, N., ALTER, M., YARTEL, A., WARD, J. W., CENTERS FOR DISEASE, C. & PREVENTION 2012. Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. *MMWR Recomm Rep*, 61, 1-32. 102. SORENSEN, H. T., MELLEMKJAER, L., JEPSEN, P., THULSTRUP, A. M., BARON, J., OLSEN, J. H. & VILSTRUP, H. 2003. Risk of cancer in patients hospitalized with fatty liver: a Danish cohort study. *J Clin Gastroenterol*, 36, 356-9.

103. STERLING, R. K., JEFFERS, L., GORDON, F., VENOOK, A. P., REDDY, K. R., SATOMURA, S., KANKE, F., SCHWARTZ, M. E. & SHERMAN, M. 2009. Utility of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin, alone or in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *7*, 104-13.

104. STURGEON, C. M., DUFFY, M. J., HOFMANN, B. R., LAMERZ, R., FRITSCHE, H. A., GAARENSTROOM, K., BONFRER, J., ECKE, T. H., GROSSMAN, H. B., HAYES, P., HOFFMANN, R. T., LERNER, S. P., LOHE, F., LOUHIMO, J., SAWCZUK, I., TAKETA, K., DIAMANDIS, E. P. & NATIONAL ACADEMY OF CLINICAL, B. 2010. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers. *Clin Chem*, 56, e1-48.

105. STURGEON, C. M., HOFFMAN, B. R., CHAN, D. W., CH'NG, S. L., HAMMOND, E., HAYES, D. F., LIOTTA, L. A., PETRICOIN, E. F., SCHMITT, M., SEMMES, O. J., SOLETORMOS, G., VAN DER MERWE, E., DIAMANDIS, E. P. & NATIONAL ACADEMY OF CLINICAL, B. 2008. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in clinical practice: quality requirements. *Clin Chem*, 54, e1-e10.

106. STURGEON, C. M. & SETH, J. 1996. Why do immunoassays for tumour markers give differing results?--a view from the UK National External Quality Assessment Schemes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 34, 755-9.

107. SUMIE, S., NAKASHIMA, O., OKUDA, K., KUROMATSU, R., KAWAGUCHI, A., NAKANO, M., SATANI, M., YAMADA, S., OKAMURA, S., HORI, M., KAKUMA, T., TORIMURA, T. & SATA, M. 2014. The significance of classifying microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 21, 1002-9.

108. SUN, Y. F., XU, Y., YANG, X. R., GUO, W., ZHANG, X., QIU, S. J., SHI, R. Y., HU, B., ZHOU, J. & FAN, J. 2013. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology*, 57, 1458-68.

109. TAKETA, K., ENDO, Y., SEKIYA, C., TANIKAWA, K., KOJI, T., TAGA, H., SATOMURA, S., MATSUURA, S., KAWAI, T. & HIRAI, H. 1993. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res,* 53, 5419-23.

110. TAKETA, K., SEKIYA, C., NAMIKI, M., AKAMATSU, K., OHTA, Y., ENDO, Y. & KOSAKA, K. 1990. Lectin-reactive profiles of alpha-fetoprotein characterizing hepatocellular carcinoma and related conditions. *Gastroenterology*, 99, 508-18.

111. TANGKIJVANICH, P., ANUKULKARNKUSOL, N., SUWANGOOL, P., LERTMAHARIT, S., HANVIVATVONG, O., KULLAVANIJAYA, P. & POOVORAWAN, Y. 2000. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol*, 31, 302-8.

112. TATE, J. & WARD, G. 2004. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev,* 25, 105-20.

113. TEUFEL, A., WEINMANN, A., CENTNER, C., PIENDL, A., LOHSE, A. W., GALLE, P. R. & KANZLER, S. 2009. Hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol,* 15, 578-82.

114. THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, I. 2005 (01/11/1994 (part I); 01/12/1996 (part II)). *ICH Guideline, Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* [Online]. European Medicines Agency (EMEA). Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\_en.pdf [Accessed 2022/10/19 14:02].

115. TOYODA, H., KUMADA, T., TADA, T., KANEOKA, Y., MAEDA, A., KANKE, F. & SATOMURA, S. 2011. Clinical utility of highly sensitive Lens culinaris agglutininreactive alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with alpha-fetoprotein <20 ng/mL. *Cancer Sci*, 102, 1025-31.

116. TREVISANI, F., D'INTINO, P. E., MORSELLI-LABATE, A. M., MAZZELLA, G., ACCOGLI, E., CARACENI, P., DOMENICALI, M., DE NOTARIIS, S., RODA, E. & BERNARDI, M. 2001. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol*, 34, 570-5.

117. TSILIMIGRAS, D. I., BAGANTE, F., MORIS, D., HYER, J. M., SAHARA, K., PAREDES, A. Z., MEHTA, R., RATTI, F., MARQUES, H. P., SOUBRANE, O., LAM, V., POULTSIDES, G. A., POPESCU, I., ALEXANDRESCU, S., MARTEL, G., WORKNEH, A., GUGLIELMI, A., HUGH, T., ALDRIGHETTI, L., ENDO, I. & PAWLIK, T. M. 2020. Recurrence Patterns and Outcomes after Resection of Hepatocellular Carcinoma within and beyond the Barcelona Clinic Liver Cancer Criteria. *Ann Surg Oncol,* 27, 2321-2331.

118. TZARTZEVA, K., OBI, J., RICH, N. E., PARIKH, N. D., MARRERO, J. A., YOPP, A., WALJEE, A. K. & SINGAL, A. G. 2018. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*, 154, 1706-1718 e1.

119. VILLANUEVA, A. 2019. Hepatocellular Carcinoma. Reply. *N Engl J Med*, 381, e2.

120. VOGEL, A., MEYER, T., SAPISOCHIN, G., SALEM, R. & SABOROWSKI, A. 2022. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*.

121. VON FELDEN, J., SCHULZE, K., KRECH, T., EWALD, F., NASHAN, B., PANTEL, K., LOHSE, A. W., RIETHDORF, S. & WEGE, H. 2017. Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection. *Oncotarget*, *8*, 89978-89987.

122. VON FELDEN, J. & VILLANUEVA, A. 2020. Role of Molecular Biomarkers in Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Liver Transpl,* 26, 823-831.

123. WHO. 2020. *World Health Organization. Health topics/cancer/overview/prevention/management.* [Online]. Available: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\_1 [Accessed 2022/10/19 14:12].

124. YAMAGATA, Y., KATOH, H., NAKAMURA, K., TANAKA, T., SATOMURA, S. & MATSUURA, S. 1998. Determination of alpha-fetoprotein concentration based on liquid-phase binding assay using anion exchange chromatography and sulfated peptide introduced antibody. *J Immunol Methods*, 212, 161-8.

125. YAMASHITA, T., FORGUES, M., WANG, W., KIM, J. W., YE, Q., JIA, H., BUDHU, A., ZANETTI, K. A., CHEN, Y., QIN, L. X., TANG, Z. Y. & WANG, X. W. 2008. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res,* 68, 1451-61.

126. YOUNOSSI, Z., STEPANOVA, M., ONG, J. P., JACOBSON, I. M., BUGIANESI, E., DUSEJA, A., EGUCHI, Y., WONG, V. W., NEGRO, F., YILMAZ, Y., ROMERO-GOMEZ, M., GEORGE, J., AHMED, A., WONG, R., YOUNOSSI, I., ZIAYEE, M., AFENDY, A. & GLOBAL NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS, C. 2019. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clin Gastroenterol Hepatol,* 17, 748-755 e3.

127. ZHU, R., YANG, J., XU, L., DAI, W., WANG, F., SHEN, M., ZHANG, Y., ZHANG, H., CHEN, K., CHENG, P., WANG, C., ZHENG, Y., LI, J., LU, J., ZHOU, Y., WU, D. & GUO, C. 2014. Diagnostic Performance of Des-gamma-carboxy Prothrombin for Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 529314.

128. ZIEGLER, A., LANGE, S. & BENDER, R. 2007a. [Survival analysis: Cox regression]. *Dtsch Med Wochenschr*, 132 Suppl 1, e42-4.

129. ZIEGLER, A., LANGE, S. & BENDER, R. 2007b. [Survival analysis: log rank test]. *Dtsch Med Wochenschr,* 132 Suppl 1, e39-41.

130. ZIEGLER, A., LANGE, S. & BENDER, R. 2007c. [Survival analysis: properties and Kaplan-Meier method]. *Dtsch Med Wochenschr*, 132 Suppl 1, e36-8.

#### Danksagung

Die Durchführung dieser Arbeit war nur durch die Unterstützung einiger Personen möglich, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

An erster Stelle möchte ich Herrn PD Dr. von Felden für die freundliche und kompetente Begleitung danken, der mich bei der Konzeption und Erarbeitung meiner Dissertation unterstützt hat und mir neben dem klinischen Alltag stets als Ansprechpartner zur Seite stand. Mein besonderer Dank gilt außerdem meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wege und Herrn Dr. Schulze, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben. Auch für die mühevolle Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Für die Unterstützung dieser Doktorarbeit möchte ich zudem den Direktoren der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Herrn Prof. Dr. Lohse und Herrn Prof. Dr. Huber danken.

So gilt mein Dank auch dem Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Herrn Prof. Dr. Dr. Renné für die Unterstützung dieser Arbeit und die Bereitstellung des Labors.

Die Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Nofer, Herrn Dr. Haddad, Frau Dr. Peschka, Herrn Dr. Nordholt und Herrn Dr. Stahl habe ich sehr geschätzt und ich bedanke mich für das Wohlwollen und die Unterstützung. Besonders danken möchte ich den Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistent:innen des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin und insbesondere dem Team des Hormonlabors für die Begleitung des Laborteils dieser Arbeit, die Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

Zuletzt gilt mein ausgesprochener Dank meinem Ehemann Herrn Dr. Stephan Görden, sowie meinen Freunden und meiner Familie, die mich für die Doktorarbeit motiviert und mir die Zeit für die Durchführung eingeräumt haben.

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen
## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....