

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test
als prädiktiver Marker für die Fibroseprogression nach Lebertransplantation

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Alessa Josephine Kiehle
aus München

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Leberzirrhose	1
1.2 Diagnostik.....	2
1.3 Ziel der Arbeit.....	2
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Die Leberfibrose und -zirrhose	3
2.1.1 Ursachen	3
2.1.2 Pathophysiologie.....	5
2.1.3 Risikofaktoren	7
2.2 Diagnostik der Leberfibrose	9
2.2.1 Invasive Verfahren	9
2.2.2 Nicht invasive Verfahren.....	15
2.3 Therapie	19
2.3.1 Lebertransplantation	21
3 Materialien und Methoden	23
3.1 Patientenkollektiv und Studiendesign.....	23
3.2 Untersuchung der Biopsien	23
3.2.1 Histologische Untersuchung	23
3.2.2 qRT-PCR und relative mRNA Quantifizierung.....	24
3.2.3 α -SMA-Färbung.....	25
3.3 Fibrosemarker	26
3.3.1 ELF-Test.....	26
3.4 Statistische Auswertung.....	26
4 Ergebnisse	28
4.1 Patienten-Charakteristika	28
4.1.1 Ätiologien	29
4.1.2 Überlebenszeiten	30
4.2 Veränderung der Biomarker nach LT	31
4.3 Biomarker zur Fibrosemessung.....	33
4.3.1 mRNA-Expression der Fibrosemarker	34
4.3.2 Immunhistochemische Färbung.....	38
4.4 Zusammenhang zwischen Biomarker und Rezirrhose.....	40

5	Diskussion.....	45
5.1	Diagnostische Funktion des ELF-Tests.....	45
5.2	Einsatz des ELF-Test zur Fibroseprädiktion nach LT	49
5.3	Kritische Betrachtung des Studiendesigns und der Untersuchungsmethoden.....	55
6	Zusammenfassung	60
7	Literaturverzeichnis	62
	Danksagung.....	71
	Lebenslauf.....	72

Abkürzungsverzeichnis

A

α -SMA	Alpha Smooth Muscle Aktin
ACTA2	Aktin alpha 2
AIH	Autoimmunhepatitis
ALD	Alcoholic Liver Disease, alkoholische Lebererkrankung
ALEH	Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado
ALT	Alanin-Aminotransferase
APRI	AST to platlet ratio index, AST/Thrombozyten-Ratio-Index
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUROC	Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve

B

BMI	Body Mass Index
-----	-----------------

C

cdNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLD	Chronic Liver Disease, chronische Lebererkrankung
cm	Zentimeter
CRS	Cirrhosis Risk Score
CT	Cycle Threshold

D

DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DGP	Deutsche Gesellschaft für Pathologie
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DILI	Drug-induced liver injury, arzneimittelinduzierter Leberschaden
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation

E

EASL	European Association for the Study of the Liver
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELF	Enhanced Liver Fibrosis-Test

F

F	Fibrosegrad
FGF	Fibroblast growth factor
FIB-4	Fibrosis-4 Index

G

γ GT	Gamma-Glutamyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

H

HA	Hyaluronsäure
HAI/mHAI	(modifizierter) Hepatitis-Aktivitäts-Index
HBV	Hepatitis B Virus
HBVD	Hepatitis B und D Infektion
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HDAC	Histondeazetylierung
Hep.	Hepatitis
HepNet	Kompetenznetz Hepatitis
HGF	Hepatic growth factor
HSC	Hepatic stellate cells

I

ICD	International Classification of Diseases
IHC	immunhistochemisch
INR	International Normalized Ratio
IQA	Interquartilsabstand

K	
KI	Konfidenzintervall
L	
LT	Lebertransplantation
M	
M.	Morbus
MELD	Model for End-Stage Liver Disease
miRNA	Micro RNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
mTOR	molecular Target of Rapamycin
N	
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatosis hepatis
ng	Nanogramm
NICE	National Institute for Health and Care Excellence
P	
p_B	Bonferroni-adjustierte Signifikanz
PBC	primäre biliäre Cholangiopathie
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor, Wachstumsfaktor
PIIINP	N-terminales Propeptid vom Prokollagen Typ III
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
Q	
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkription mit anschließender Polymerase Kettenreaktion
R	
Re-TPx	Retransplantation
RG	Referenzgen
RNA	ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
S	
s. u.	siehe unten
T	
TE	Transiente Elastographie
TGF- β	transforming growth factor β , Wachstumsfaktor
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinase – 1, Gewebeinhibitor der Metalloproteinase 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tx	Transplantation
U	
USA	United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika
UK	United Kingdom, Vereinigtes Königreich
V	
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
W	
WHO	World Health Organisation
Z	
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Nicht-invasive Serummarker zur Evaluation der Leberfibrose (70, 71)	16
Tabelle 2 - Patientendaten - Deskriptive Statistik	29
Tabelle 3 - Konzentration der Serummarker je nach Fibrosegrad	34
Tabelle 4 - Signifikanzen der mRNA-Expression je nach Risiko-ELF (\leq / $>$ 11,07)	35
Tabelle 5 - Fibrosemarker zum Zeitpunkt T ₁	41
Tabelle 6 - Zusammenfassung ROC-Kurven	44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Ursachen der Leberzirrhose	4
Abbildung 2 - Zelluläre Mechanismen der Leberfibrogenese (nach Schuppan et al. (18))	6
Abbildung 3 - Regulation der Genexpression in HSC während der Fibrose	13
Abbildung 4 - Serummarker des ELF-Test.....	17
Abbildung 5 - Antifibrotische Therapiemöglichkeiten	20
Abbildung 6 - Indikationen für eine Lebertransplantation.....	21
Abbildung 7 - Ursachen der chronischen Lebererkrankung (CLD) je nach Zirrhosegruppe.....	30
Abbildung 8 - Organ- und Patientenüberleben	31
Abbildung 9 - Untersuchungszeitpunkte der Fibrosemarker in den Blutproben.....	31
Abbildung 10 - Veränderung der Biomarker nach Transplantation.....	32
Abbildung 11 - Korrelation der Serummarker und Fibrosegrade nach Desmet	33
Abbildung 12 - Serummarker je nach Fibrosegruppe.....	34
Abbildung 13 - mRNA Expression der Fibrosemarker	36
Abbildung 14 - Korrelation der mRNA-Expression der Fibrosemarker mit dem ELF-Wert	37
Abbildung 15 - α -SMA-Anfärbung.....	38
Abbildung 16 - Verteilung der α -SMA-Anfärbung.....	39
Abbildung 17 - ELF-Wert und ACTA2-Expression je nach α -SMA-Anreicherung	40
Abbildung 18 - ELF-Scores der frühen Serumentnahme je nach Zirrhosegruppe	40
Abbildung 19 - Rezirrhose im Zusammenhang mit der frühen Serumentnahme.....	42
Abbildung 20 - ROC-Kurve für ELF als quantitativen Prädiktor ein Jahr nach LT für Rezirrhose innerhalb des ersten Jahres versus keine fortgeschrittene Fibrose nach 5 Jahren (n = 9)	43
Abbildung 21 - ROC-Kurve für ELF als quantitativen Prädiktor 5 Jahre nach LT für Rezirrhose versus keine fortgeschrittene Fibrose (n = 28)	43

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Leberzirrhose

Chronische Lebererkrankungen machen einen großen Teil der globalen Mortalität aus. Dies spiegelt sich auch in Deutschland wider. Häufige Ursachen sind die alkoholische und nicht-alkoholische Fettlebererkrankung, Virusinfektionen, autoimmune Erkrankungen oder Erkrankungen der Gallenwege. Allen gemeinsam ist der fibrotische Umbau des Lebergewebes als Reaktion auf die Leberschädigung. Dabei geht das gesunde Gewebe durch eine Aktivierung der hepatischen Sternzellen in ein zunehmend vernarbendes, funktionsloses Gewebe über. Das Endstadium der Gewebeveränderung mit einem knotigen Umbau der Leber wird als Leberzirrhose bezeichnet. Die Inzidenz der Leberzirrhose in den Industrienationen beträgt über 250 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr. Männer erkranken mehr als doppelt so oft wie Frauen. (4, 5)

Die jährliche Mortalität der Leberzirrhose liegt bei 1,8 % (170.000 Todesfälle/Jahr) in Europa. In Deutschland gehört die Leberzirrhose mittlerweile zu den 20 häufigsten Todesursachen. (6, 7) Von 1980 an stiegen die global beobachteten Todesfälle durch die Zirrhose von ca. 676.000 auf über eine Million in 2010. Das macht ca. 2 % der weltweiten Todesursachen aus. Die Mortalitätszahlen steigen weiterhin. (7, 8) Außerdem wächst mit fortschreitender Fibrose das Risiko für die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC), welches mit ca. 780.000 Todesfällen pro Jahr weltweit die vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache ist. (WHO, 2018) (9) Da es sich bei der Zirrhose um einen irreversiblen Zustand handelt, ist die Lebertransplantation (LT) oft die letzte kurative Therapiemöglichkeit.

Glücklicherweise gibt es für viele chronische Lebererkrankungen im reversiblen, fibrotischen Zustand mittlerweile gute Therapiemöglichkeiten. Um sowohl Morbidität als auch Mortalität der chronischen Lebererkrankung zu senken, ist das frühzeitige Erkennen der fibrotischen Veränderungen wichtig, um die Dekompensation beziehungsweise Zirrhose zu verhindern. Nur dann kann rechtzeitig interveniert werden: medikamentös oder mit Anpassungen des Lebensstils, wie zum Beispiel bei der alkoholischen oder bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD).

Auch bei Patienten, die bereits eine Spender-Leber erhalten haben, besteht das Risiko der erneuten Fibrosierung der Leber.

1.2 Diagnostik

Gerade bei Patienten nach LT ist es wichtig, das Fortschreiten der Fibrose regelmäßig zu kontrollieren. Nach aktueller Praxis werden engmaschige Kontrollen durchgeführt. An unserem Zentrum in Mainz werden Protokoll-Biopsien nach 1, 5, 10 Jahren und danach alle 5 Jahre empfohlen. Zeigen die Patienten Auffälligkeiten, erfolgt zunächst eine nicht-invasive Diagnostik mittels Labor und Sonographie und im Anschluss, je nach Befund, eine Leberbiopsie zur weiteren Abklärung und zum Ausschluss einer Abstoßung, auch außerhalb der festgelegten Kontrollen. Jede Biopsie ist ein invasiver Eingriff, der mit Komplikationen einhergehen kann. Zudem ist die generelle Aussagekraft dieser Untersuchungsmethode kritisch zu betrachten. So können sich durch einen sampling Error Probleme bei der histologischen Auswertung ergeben, da nur ein kleiner Teil des Lebergewebes untersucht wird. Deshalb ist man seit einigen Jahren auf der Suche nach weniger bis nicht-invasiven Methoden, um genauer den aktuellen Zustand der Leber zu beschreiben. Dazu gehört auch die Untersuchung von Biomarkern. Als Biomarker werden Proteine und andere Bestandteile des Blutes bezeichnet, die die Funktion eines bestimmten Organs widerspiegeln. Im Rahmen der Fibrosediagnostik konnte der Serum-basierte Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test für Krankheiten wie zum Beispiel die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung validiert werden. Der ELF-Wert berechnet sich dabei aus den Fibrosemarkern PIIINP, TIMP-1 und Hyaluronsäure. Ein Vorteil des ELF-Tests gegenüber anderen Fibrosemarkern ist, dass neben der diagnostischen Aussage zum Fibrosezustand auch eine prädiktive Funktion vermutet wird.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung des nicht-invasiven ELF-Tests für die Vorhersage der Progression der Fibrose bis zur Zirrhose bei Patienten nach LT zu prüfen.

Dazu wird zunächst die diagnostische Funktion des ELF-Tests zur Einschätzung des aktuellen Fibrorestadiums untersucht. Die ELF-Werte werden hierfür mit den Ergebnissen der histologischen Auswertung verglichen. Diese schließt neben der Feststellung des Fibrosegrades nach Desmet auch eine immunhistochemische Färbung des α -SMA sowie die Messung der mRNA-Expression von an der Fibrose beteiligten Proteinen mit ein.

Die Patienten werden je nach Geschwindigkeit der Fibroseprogression bis zur Zirrhose in drei Gruppen eingeteilt. Um die prädiktive Funktion des ELF-Tests zu validieren, werden pro Gruppe drei Serumproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten betrachtet und es wird versucht, mithilfe der Werte der ersten Probe die Progression vorherzusagen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Die Leberfibrose und -zirrhose

Die Leberfibrose ist Folge eines chronischen Entzündungsprozesses, bei welchem es zu einer Vermehrung des bindegewebigen Anteils des Leberparenchyms kommt. Dabei nimmt v. a. der Kollagengehalt zu, während die Läppchenstruktur der Leber erhalten bleibt. (4) Von einer chronischen Hepatitis spricht man bei einem mehr als sechs Monate anhaltenden Entzündungsprozess. (4, 10) Ursachen der chronischen Hepatitis können

- toxisch/medikamenten-induziert,
- infektiös, meist Hepatitis B- und C-Viren (HBV bzw. HCV),
- metabolisch,
- autoimmun

sein. (11)

Die Leberfibrose kann bei ausbleibender Therapie in die Leberzirrhose übergehen und mit einem Akut auf chronischen Leberversagen enden. (5, 11) Sie ist das irreversible Endstadium der chronischen Hepatitis. Es kommt zu einem komplexen Umbau des Leberparenchyms, der mit einem Funktionsverlust einhergeht. (4) Da es sich häufig um eine irreversible Veränderung der Leber handelt, ist oft die einzige kurative Therapie die Lebertransplantation. (5) Allerdings verhindern manche Therapien den Übergang in eine dekompensierte Zirrhose und können zum Teil sogar zu einem Rückgang der Zirrhose führen. (12)

2.1.1 Ursachen

Die Entwicklung der Leberfibrose wird durch verschiedene Risikofaktoren und Grunderkrankungen beeinflusst. Diese können regional stark variieren. Nicht immer muss die Fibrose dabei in eine Zirrhose übergehen. Die folgenden Prävalenzen beziehen sich auf die Zirrhose. In den Industrieländern ist mit ca. 55 % der Alkoholkonsum am häufigsten ursächlich für eine Leberzirrhose. (7, 10) Weitere 40 % ergeben sich als Folge einer Hepatitis B, C oder D Infektion. HCV-Infektionen dominieren hierbei und bedingen weltweit ca. 30 % der zirrhotischen Leberveränderungen sowie 25 % der primären Leberzellkarzinome (HCC). (10) Die Prävalenz der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) hängt eng mit Übergewicht und metabolischem Syndrom zusammen, zwei Erkrankungen, die nicht nur in den Industrienationen zunehmen. Deshalb steigt auch die hierdurch bedingte Anzahl an

Zirrhosen. (5, 7, 13) In den USA ist die NAFLD bereits die dritthäufigste Indikation zur Lebertransplantation. (13)

Wie oben erwähnt, können weitere Ursachen autoimmuner Herkunft sein. Zu nennen sind hier die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), die primäre biliäre Cholangitis (PBC) und die Autoimmunhepatitis (AIH). Etwas seltener sind metabolische Erkrankungen mit einhergehender Fibrose. Hierzu zählen der Morbus Wilson (Kupferspeicherkrankheit), die Hämochromatose (Eisenspeicherkrankheit) und der α 1-Antitrypsin-Mangel. (5) Weitere Ursachen finden sich in Abbildung 1. Kann keine Ursache gefunden werden, wird die chronische Hepatitis als kryptogen bezeichnet. (5, 14)

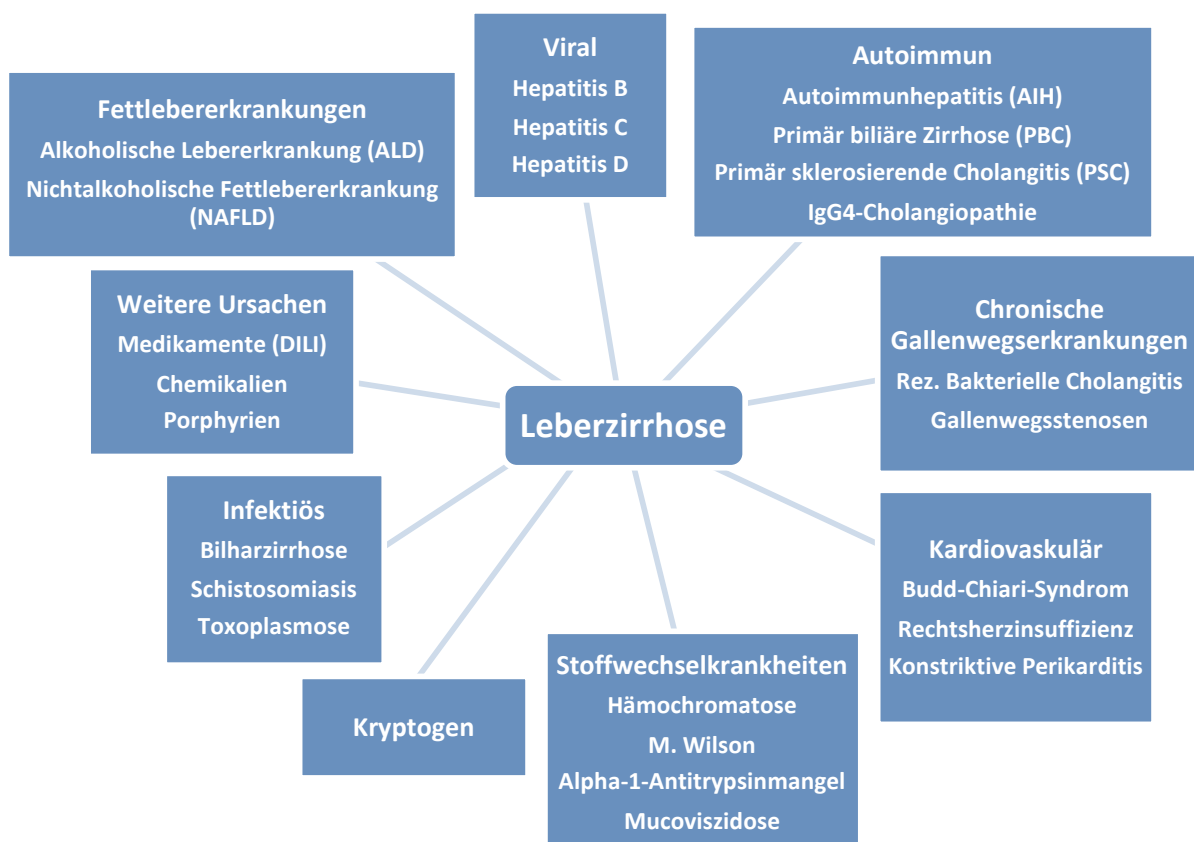


Abbildung 1 - Ursachen der Leberzirrhose

Ätiologie nach Herold (10), Wiegand (6) und Jonas (4)

Bei der Zirrhoseentstehung handelt es sich meist um einen langjährigen Prozess. Zu einer fulminanten Fibroseprogression kommt es bei neonatalen Lebererkrankungen wie beispielsweise einer Gallengangsatresie und bei Patienten, die aufgrund einer HCV- oder HBV-assoziierten Zirrhose eine Lebertransplantation erhielten und anschließend innerhalb von Monaten eine Rezirrhose entwickeln. Für die fulminante Fibroseprogression gibt es noch

keine ausreichende Erklärung, aber sie zeigt, dass Fibrose nicht immer nur ein langsam fortschreitender Prozess sein muss. (15)

2.1.2 Pathophysiologie

Die fibrotische Entwicklung des Leberparenchyms ist abhängig von drei Faktoren, die je nach Grunderkrankung variieren und sich im Verlauf der Fibroseprogression verändern können: (11, 16, 17)

1. der Position, an der es zu einer Leberparenchymschädigung kommt
2. der relativen Konzentration von profibrotischen Faktoren
3. den profibrotischen Mechanismen

Im Rahmen der Fibrogenese werden aus den Hepatischen Sternzellen (HSC) Myofibroblasten. In der gesunden Leber speichern die HSC Retinylester und Lipidtröpfchen. Sie befinden sich im Disse-Raum. Die Myofibroblasten proliferieren und produzieren vermehrt extrazelluläre Matrix (ECM). Je weiter die Leberschädigung fortschreitet, desto weniger können die fibrolytischen Vorgänge die fortschreitende Fibrogenese hemmen, sodass es zu einem Ungleichgewicht zwischen Fibrogenese und -lyse kommt. (4, 11)

Die Ursachen für chronische Lebererkrankungen wurden im letzten Kapitel bereits erwähnt. Die Stimuli der Fibrogenese (u. a. Toxine, Viren, Cholestase, Hypoxie oder Insulin-Resistenz) haben stets einen inflammatorischen Kontext. Sie wirken entweder indirekt als Induktoren von profibrotischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren oder über eine direkte Veränderung der ECM. (18) (S.

Abbildung 2) Außerdem ist bekannt, dass bei Patienten mit schneller Fibroseprogression mehrere Ereignisse (engl. „hits“) zusammenkommen. Ein Beispiel für diese Ereignisverkettung ist das Auftreten einer HCV Infektion als „first hit“ mit einer alkoholischen Lebererkrankung oder einer NAFLD („second hit“). Bei Beseitigung der „second hits“ kann die Fibroseprogression positiv beeinflusst werden. (18, 19)

Abbildung 2 zeigt außerdem, dass die Aktivitätsänderung der Zink-abhängigen Metalloproteinasen (MMP) sowie deren Inhibitoren (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP) eine entscheidende Rolle bei der Umwandlung der ECM spielt. Bei den Metalloproteinasen handelt es sich um Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Membranmetalloproteinasen. Die Veränderungen tragen maßgeblich zur Umwandlung der

ECM von einer membranähnlichen Matrix mit geringer Dichte in eine eher interstitielle Matrix mit höherer Dichte bei. (20) Durch die vermehrte Expression des Gewebeinhibitors der Metalloproteinasen TIMP-1 wird außerdem die Apoptose der HSC verhindert, da TIMP-1 zudem einen anti-apoptotischen Effekt aufweist. (19, 21, 22)

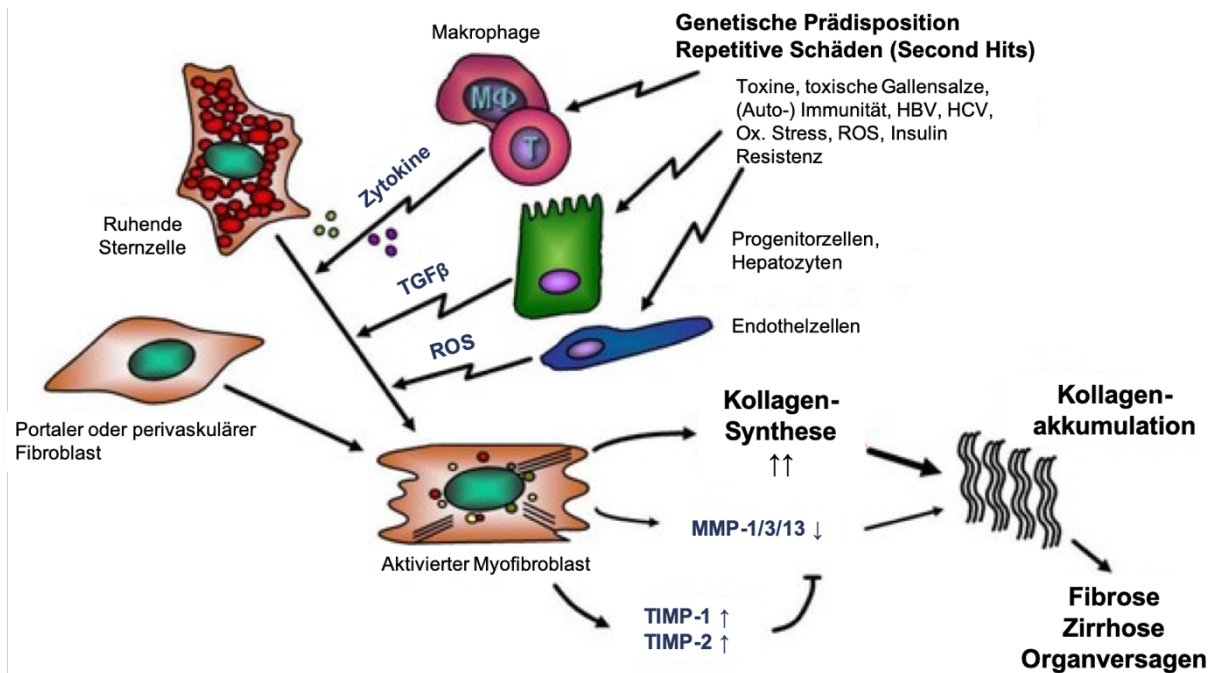


Abbildung 2 - Zelluläre Mechanismen der Leberfibrogenese (nach Schuppan et al. (18))

HBV: Hepatitis B Virus, HCV: Hepatitis C Virus, ROS: Reaktive Sauerstoff Spezies, TGFβ: Transforming growth factor beta, MMP: Matrix-Metalloproteinasen TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases

MMP 1, 3, 8, 9, 12 und 13 können dank ihrer proteolytischen Enzymtätigkeit zu Beginn die Fibrolyse und -genese im Gleichgewicht halten. Bei anhaltender Entzündung überwiegt jedoch die Aktivität der Inhibitoren der Metalloproteinasen (v. a. TIMP-1) und anderer fibrogen wirkender MMPs. Die fibrogenen Mediatoren werden hauptsächlich in aktivierten Hepatischen Sternzellen (HSC) und Myofibroblasten gebildet. Diese werden wiederum mittels der von Hepatozyten, Cholangiozyten, Endothelzellen, Makrophagen und von Myofibroblasten selbst produzierten fibrogenen Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert. (18)

Die aktivierten HSC produzieren vermehrt Kollagene und Zytokine, die den fibrotischen Umbau der Leber vorantreiben. Die Kollagen-Expression wird posttranskriptionell reguliert. Das dafür entscheidendste Zytokin ist TGF-β, welches in Hepatozyten, sinusoidalen Endothelzellen, Kupfferzellen (leberspezifische Makrophagen) und in HSC selbst produziert wird. Es wirkt demensprechend para- und autokrin auf die HSC. (21) Zudem wird die Expression von fibroseassoziierten Genen wie COL1A1, COL1A2, MCP1 und TIMP-1

hochreguliert und es kommt zu Veränderungen in der Gentranskription von Typ 1 Kollagen, α -SMA, TGF-beta-1, TGF- β -Rezeptoren, MMP2, TIMP-1 und -2. (21) Hierdurch wird der aktive Zustand der HSC aufrecht gehalten.

Schließlich verändert sich auch das Zytoskelett der HSCs. Seine Kontraktilität wird durch den vermehrten Einbau von alpha-smooth muscle actin (α -SMA) erhöht. (21, 23) Die Konsequenz ist die Behinderung des portalen Blutflusses. Es kommt zu einer portalen Hypertension, welche ebenfalls zur fortschreitenden Fibrose beiträgt. Der genaue Mechanismus ist zum aktuellen Zeitpunkt allerdings noch unbekannt. (23)

Zum Umbau der ECM gehört außerdem die gesteigerte Angiogenese, die zu einem sinusoidalen Umbau und einer Perizytenvermehrung führt. (24) Außerdem produziert die ECM Zytokine, die ebenfalls auf die chronische Leberentzündung antworten. Dazu gehören unter anderem TGF- β (transforming growth factor beta), PDGF (platelet derived growth factor) und TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha). (21) PDGF bindet an einen Rezeptor, der die Funktion einer Tyrosinkinase ausübt und weitere Zytokine wie HGF (hepatic growth factor), EGF (epidermal growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) aktiviert. (20, 21)

Je nach ursächlicher Erkrankung zeigen sich unterschiedliche Fibrosierungsmuster. Die PBC ist beispielsweise durch die Co-Proliferation der Gallengänge und der periduktalen Myofibroblasten mit anschließender Bildung von porto-portalen Septen gekennzeichnet. Dafür bleibt die Zentralvene noch bis in fortgeschrittene Fibrorestadien unbeeinträchtigt. Bei der viralen Hepatitis hingegen bilden sich porto-zentrale Septen und es kommt zur Zerstörung der Gefäße im portalen System. Die Folge ist die Erhöhung des portalen Drucks. Sowohl bei der ALD als auch bei der NAFLD steht die perisinusoidale Fibrose im Vordergrund. Diese verschiedenen Fibrosierungsmuster müssen sowohl für die Verwendung verschiedener Biomarker zur Fibrosedetektion als auch für die Therapiewahl beachtet werden. (5)

2.1.3 Risikofaktoren

Die Fibroseprogression wird je nach Ätiologie der chronischen Lebererkrankung von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Dies kann wichtig für Therapieentscheidungen und Lebensstilanpassungen sein. Im Folgenden werden die Risikofaktoren der häufigsten Fibroseursachen sowie Prädiktoren für die Fibroseprogression bei Patienten nach Lebertransplantation dargestellt.

20 – 54 % der lebertransplantierten HCV-Positiven entwickeln innerhalb von 5 Jahren nach LT eine fortgeschrittene Fibrose. (25) Ein Risikofaktor für die schnelle Progression ist beispielsweise ein Spenderalter ≥ 50 Jahre. Es wird vermutet, dass ab diesem Alter auch das Spenderorgan nicht vollständig fibrosefrei ist. (26, 27) Ein weiterer Risikofaktor, der auch als Prädiktor eingesetzt wird, ist die erhöhte Aspartat-Aminotransferase (AST; ≥ 60 IU/l) ein Jahr nach LT. (27) Während bei HCV-Erkrankten sowohl die Viruslast als auch der Genotyp des Erregers bei der Therapie eine Rolle spielen, ist nicht abschließend geklärt, ob auch die Fibroseprogression nach LT vom Genotyp abhängt. Es wird allerdings vermutet, dass v. a. bei Genotyp 1b und 4 mit schwereren Rezirrrosen zu rechnen ist (28, 29). Eine hohe Viruslast führt bekanntermaßen zu Entzündungsreaktionen und damit zum profibrotischen Umbau des Leberparenchyms (28, 30). Bekannt ist zudem, dass Promotorpolymorphismen (z. B. von TGF- β) eine Rolle spielen (31). Zimmermann et al. identifizierten eine erhöhte Alkalische Phosphatase und Bilirubin-Spiegel, einen Child-Pugh Score C und eine virale Last von $> 10^6$ IU/mL 6 Monate nach LT als frühe Risikofaktoren für die Fibroseprogression nach LT bei HCV Patienten. (30)

Weitere allgemeine negative Einflussfaktoren für die Fibroseprogression bei HCV Patienten sind das Alter bei Infektion, eine gleichzeitige HBV-Infektion oder hoher Alkoholkonsum, das männliche Geschlecht, ein erhöhter BMI (Body Mass Index) in Assoziation mit Steatosis hepatis, eine Eisenüberladung oder die Immunsuppression. (15)

Für Patienten mit NAFLD gelten ebenso Geschlecht, Alter, Adipositas und Diabetes mellitus als Risikofaktoren und bei Patienten mit Alkoholischer Lebererkrankung tragen v. a. der BMI und die Serumglukose zu einer erhöhten Fibroseprogression bei. (32)

Bhat et al. zeigten, dass neben einer chronischen HCV-Infektion Hypoalbuminämie und Hyponatriämie zum Zeitpunkt der LT Prädiktoren für die Entwicklung einer starken Fibrose bei post-LT-Patienten sein können. Deshalb empfehlen sie gerade bei diesen Patienten einen frühzeitigen Therapiebeginn z. B. mit antiviralen Substanzen und regelmäßige Kontrollen. (26)

Auch genetische Faktoren können Einfluss auf die Fibroseprogression haben. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass bestimmte PNPLA3-Polymorphismen (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) mit einem erhöhten Risiko für die NAFLD einhergehen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass je nach vorliegendem Polymorphismus beim Spender auch für den Empfänger der Transplantleber im Anschluss an die LT ein erhöhtes Risiko für die

Entwicklung einer NAFLD vorliegt. (33, 34) Das Vorliegen des PNPLA3 I148M Polymorphismus, assoziiert mit anderen chronischen Lebererkrankungen (chronische virale Hepatitis, Autoimmune Lebererkrankungen), führt generell zu einem schlechteren Outcome der LT. (35)

Der Cirrhosis-Risk-Score (CRS) betrachtet Varianten von sieben Genen, die zum Teil eine Rolle in der hepatischen Fibrogenese spielen. Er kann die Fibroseprogression bei Patienten mit chronischer HCV Infektion vorhersagen. (36, 37) Neuste Erkenntnisse sind, dass der CRS auch im Rahmen der LT prädiktiv zum Einsatz kommen kann. Je nach CRS des Spenders schreitet die Fibrose nach LT unterschiedlich schnell fort. Dabei kann der CRS als Prognosefaktor für Patienten sowohl mit als auch ohne HCV Infektion eingesetzt werden. (38)

Es lässt sich also zusammenfassen, dass die Risikofaktoren für die Fibroseprogression ganz unterschiedliche Felder umfassen können. Darunter finden sich der Lebensstil, die Komorbiditäten und Patientencharakteristika, die Therapien und die Spendereigenschaften, die auch die genetische Vorbelastung mit einbeziehen. Einige Risikofaktoren können dabei als Prädiktoren für die Fibroseprogression eingesetzt werden und diese sogar für die Transplantatempfänger vorhersagen.

2.2 Diagnostik der Leberfibrose

Die diagnostische Fibrosemessung ist essenzieller Bestandteil der Einschätzung der Morbidität und Mortalität der Patienten. Mit ihrer Hilfe können Therapieerfolge gemessen und Aussagen zur Prognose gemacht werden. Man unterscheidet invasive und nicht invasive Verfahren. Viele der unter Pathophysiologie erwähnten Enzyme und Entzündungsmediatoren lassen sich mittlerweile im Rahmen der nicht invasiven Diagnostik im Blut messen. Aktuell gilt die Leberbiopsie allerdings noch als Standard zur Detektion der Leberfibrose.

2.2.1 Invasive Verfahren

2.2.1.1 Leberbiopsie

Zurzeit ist die Leberbiopsie der "Gold-Standard" zur Evaluation der Leberfibrose. (2) Mit ihrer Hilfe können die Diagnose einer Hepatitis gestellt, deren Charakter (akut vs. chronisch) bestimmt, die Aktivität der Entzündung beschrieben (Grading), das Fibroseausmaß (Staging) festgestellt und Aussagen über die Ätiologie gemacht werden. (39)

Die meistverwendete Biopsiemethode ist die sonographisch gesteuerte perkutane Aspirationsbiopsie. Sie ist einfach, schnell, kostengünstig und relativ sicher mit nur 1 % Komplikationsrate und weniger als 0,1 % Mortalität. (40) Bei diffusen hepatischen

Erkrankungen wird bevorzugt die Menghini Nadel zur Biopsie verwendet, mit der man Biopsiezylinder von bis zu 5 cm Länge erhält. Bei fokalen Läsionen oder festerem Lebergewebe wird die Tru-Cut Nadel eingesetzt. Neben der Aspirationsbiopsie gibt es die mini-laparoskopische Leberbiopsie, die eine makroskopische Inspektion der Leberoberfläche, eine gezielte Punktion auffälliger Areale unter Sicht und die direkte Koagulation bei Blutungen oder Gallenlecks ermöglicht. Dementsprechend wird sie v. a. bei Patienten mit erhöhtem Blutungsrisiko angewendet. Eine weitere Methode ist die transjuguläre Leberbiopsie, die ebenfalls bei hämorrhagisch gefährdeten Patienten möglich ist. Sie birgt allerdings dieselben Risiken, die auch mit der Anlage eines jugularen zentralvenösen Katheters einhergehen. (40)

Bereits kleinere Komplikationen wie Schmerzen und Hypotension führen bei 1 – 3 % zur Hospitalisierung. Bis zu ein Viertel aller Patienten gibt dumpfe Schmerzen im rechten Oberbauch oder der rechten Schulter an. (41)

Schwerwiegendere Komplikationen wie Intraperitonealblutungen, Perforationen (z. B. Darm-, Gallenblasenperforation oder Pneumothorax), Hämobilie (Blutungen in die Gallgänge) oder Bakteriämie sind sehr selten. (40-42) Die Mortalität nach perkutaner Leberbiopsie liegt bei etwa 1/10.000 – 1/12.000. (41, 43) Es finden sich in der Literatur unterschiedliche Aussagen zur Komplikationsrate. Es wird eine Rate zwischen 0,1 – 3,6 % beschrieben. Diese ist u. a. abhängig von der angewandten Methode und den individuellen Umständen. (41, 44) Nach einer Studie von Alten et al. kam es bei lebertransplantierten Patienten nur in 1,4 % der 703 Fälle zu geringfügigen bis moderaten Komplikationen, von denen keine mit Bluttransfusionen oder operativ versorgt werden musste. (45) Bei Gunneson et al. war die Gesamtkomplikationsrate, die eine Hospitalisierung erforderte, 0,6 %. Schwerwiegende Komplikationen traten bei 4 der 1086 Patienten auf (0,4 %). (46)

Neben den Komplikationen infolge des Biopsie-Eingriffs besteht auch eine Fehlerquote bei der Auswertung der Biopsien. Bei der Nadelbiopsie wird nur etwa 1/50.000 der Lebermasse entnommen. Diese geringe Menge führt bei einfacher Biopsie in 10 – 30 % zu einer zu niedrigen Einstufung des Fibrosegrades. (41, 47). Durch Erhöhung der Biopsiemenge und -anzahl könnte die Genauigkeit verbessert werden (48). Dadurch wächst nicht nur die Komplikationsrate, sondern auch die Belastung der Patienten durch die wiederholten Biopsien.

Da sich die Fibrose nicht immer homogen in der Leber ausbreitet, spielt zudem der Ort der Biopsieentnahme eine Rolle. So zeigte sich, dass selbst bei ein und demselben Patienten die entnommenen Biopsate aus linkem und rechtem Leberlappen bei 33 % der Patienten um mindestens ein Fibrorestadium variieren können. (49, 50)

Auch bezüglich der empfohlenen Biopsiegröße, die mit der Anzahl der für die Analyse wichtigen portalen Felder korreliert, gibt es in der Literatur Differenzen. (51) In der Studie von Colloredo et al. wird für Patienten mit chronischer Hepatitis empfohlen, Proben von mindestens 2 cm Länge und 1,4 mm Durchmesser zu entnehmen. (52) Bei Bravo et al. variierten die Biopsien zwischen 1 – 3 cm in der Länge und 1,2 – 2 mm im Durchmesser. Für die Evaluation der diffusen Leberparenchymerkrankungen wird von ihnen eine Länge von 15 mm empfohlen. (41) Die evidenzbasierte Konsensuskonferenz 2004 der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und des Kompetenznetzes Hepatitis (HepNet) spricht sich für eine Mindestlänge von 1,5 cm bei einem Nadeldurchmesser von 1,2 – 1,8 mm aus. (39)

Gerade bei lebertransplantierten Patienten kann die Probenentnahme per Biopsie durch Narbengewebe und durch die aufgrund der Transplantation zunehmender Lebersteifheit beeinträchtigt werden. (45)

Eine weitere Fehlerquelle zeigte sich beim Wechsel der Pathologen innerhalb einer Probenanalyse beziehungsweise beim Wechsel zwischen den einzelnen Analysen bei Patienten mit chronischer Hepatitis. Trotz gut validierter Systeme können Fehler nicht vermieden werden. (47, 53, 54)

Wie weiter oben erwähnt, werden die Biopsate auf verschiedene Aspekte untersucht: Chronizität, Ätiologie mit Zuhilfenahme weiterer klinischer, serologischer und morphologischer Befunde, Grad der entzündlichen Aktivität (Grading) und Fibrose-Stadium (Staging). (10) Das Ausmaß der Fibrose wird mithilfe verschiedener Klassifikationssysteme Fibrorestadien zugeordnet. In den vergangenen Jahrzehnten haben sich verschiedene krankheitsübergreifende und krankheitsspezifische Systeme entwickelt. Die meist verwendeten Scoring-Systeme sind v. a. der Desmet/Scheuer-Score, der nach Ishak modifizierte Hepatitis-Aktivitäts-Index (mHAI) und Metavir. Da die Scores zum Teil unterschiedliche Fibrose-Zustände beschreiben, ist es essenziell, den gewählten Score zu nennen. (55)

Der in Deutschland zur Routinediagnostik verwendete und von der Konsensuskonferenz 2004 empfohlene Staging-Score ist der Desmet/Scheuer-Score (14, 39, 56). Dieser ist fünfstufig, wurde 1991 von Scheuer entwickelt und 1994 von Desmet überarbeitet. Die fünf Stufen sind: keine Fibrose (F0, F=Fibrosegrad), rein portale Fibrose (F1), septenbildende Fibrose ohne Architekturstörung (F2), septale Fibrose mit Architekturstörung (F3) und Zirrhose (F4). Dabei handelt es sich bei F1 um eine milde, bei F2 um eine mäßige und F3 um eine schwere Fibrose. (14, 39, 49) Als Alternative gilt auch der Metavir-Fibrosescore, der allerdings nur für Patienten mit Hepatitis C validiert ist. (49) Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein 5-stufiges System, welches weitgehend analog zum Desmet-Score ist.

Zudem gibt es auch einen Grading Desmet/Scheuer-Score. Er unterscheidet vier Aktivitätsgrade: minimal (geringe portale entzündliche Infiltration), mild (portale und periportale entzündliche Destruktion, Mottenfraßnekrosen), mäßig (zahlreiche Mottenfraßnekrosen, Nekroinflammation, einzelnen Gruppennekrosen) und schwer (ausgeprägte Mottenfraßnekrosen, Brückennekrosen). (10, 39) Ein alternativer Score ist der mHAI, der auf dem Knodell-Score aufbaut. (57) Der Knodell-Score selbst ist aufgrund seines Umfangs mit einer Scorepunktbreite von 0 – 18 klinisch weniger praktikabel. Der mHAI unterscheidet deshalb nur 7 Stufen von 0 – 6: 0 = keine Fibrose, 1 = Faservermehrung einiger Portalfelder, 2 = Faservermehrung der meisten Portalfelder, 3 = Portale Faservermehrung mit portoportalen Septen, 4 = Portale Faservermehrung mit ausgeprägten Septen, 5 = Ausgeprägte Septenbildung mit einzelnen Knoten (inkomplette Zirrhose), 6 = Wahrscheinliche/definitive Zirrhose. (58)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Leberbiopsie aktuell noch ein nicht ersetzbares Diagnoseinstrument der Hepatologie ist. Auch wenn die Komplikationsrate der Leberbiopsie überschaubar ist, bleibt sie ein invasives Verfahren. Gerade bei transplantierten Patienten muss der erwartete Informationsgewinn stets gegenüber den Risiken durch regelmäßige Biopsien abgewogen werden. Deshalb ist es unter anderem mit Blick auf diese Patientengruppe wichtig, alternative Screening-Verfahren zu entwickeln und zu validieren. Und wie die aktuellsten Forschungsergebnisse zeigen, könnte die Leberbiopsie durch neue nicht-invasive Verfahren in Zukunft immer mehr vom „Gold-Standard“ zum „Old-Standard“ werden. (59)

2.2.1.2 Gen-Expression

Bereits im Kapitel 2.1.2 Pathophysiologie wurde beschrieben, wie die unterschiedlichen Enzyme und Botenstoffe zur Veränderung des Lebergewebes beitragen. Ihre Expression ist bei den Umbauprozessen erhöht und lässt sich mithilfe von quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) oder Micro-Array-Analyse über eine quantitative mRNA-Messung feststellen. Dazu werden Proben des Lebergewebes untersucht. Das genaue Analyseverfahren wird im Kapitel Methodik erläutert. Hier findet sich auch eine Auflistung der untersuchten Gene.

Die Messung der Gen-Expression wird im klinischen Alltag selten zu diagnostischen Zwecken angewandt, da meist die histologische Auswertung der Leberbiopsie zur Einschätzung der Fibrose genügt. Allerdings trägt sie dazu bei, die Fibrose auch auf molekularer Ebene besser zu verstehen und zu untersuchen. Je nach Ätiologie der chronischen Lebererkrankung finden sich zum Teil unterschiedliche Aktivatoren der Gen-Expression.

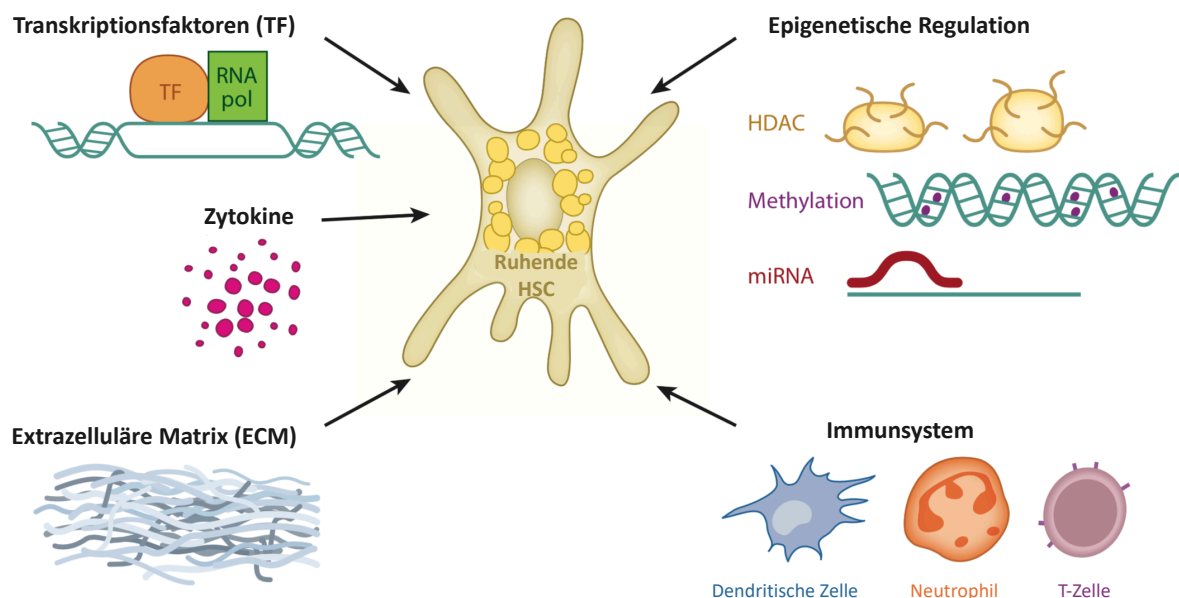


Abbildung 3 - Regulation der Genexpression in HSC während der Fibrose

Nach Hernandez-Gea et al. (60). Transkriptionsfaktoren (TF) können die Bereitschaft der RNA Polymerase (RNA pol) an spezifische DNA-Sequenzen zu binden, fördern oder behindern. Damit haben sie Einfluss auf die Genexpressionsrate. Aber auch durch epigenetische Regulation wird sie beeinflusst: durch Histondeazetylierung (HDAC), DNA-Methylierung und die Stilllegung von nichtkodierenden microRNAs (miRNA). Ein weiterer Stimulus für die HSC-Aktivierung folgt auf die Verletzung des Lebergewebes durch die Aktivierung von Immunzellen wie dendritischen Zellen, Neutrophilen und T-Zellen. Sie sezernieren proinflammatorische und fibrogenetische Moleküle. Auch Zytokine und Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) spielen eine wichtige Rolle beim Aufrechterhalten der HSC-Aktivierung.

Die erhöhten Expressionsraten in den HSC durch Transkriptionsfaktoren betreffen unter anderem Typ 1 Kollagen, α -SMA, TGF- β 1 und TGF- β -Rezeptoren, MMP-2, TIMP-1 und -2. (21, 61). Die einzelnen Fibrosefaktoren beeinflussen sich zum Teil gegenseitig, wie auch im Kapitel 2.1.2 Pathophysiologie nachzulesen ist. Die Genexpression kann aber auch indirekt

durch epigenetische Regulationen wie Promotormethylation, mRNA-Stabilisation, microRNA Interaktionen oder reaktive Sauerstoffspezies beeinflusst werden. (62, 63) Auch das Immunsystem spielt eine Rolle (s. Abbildung 3).

Einen alternativen Aktivator der Genexpression für Typ 1 Kollagen stellt das vor allem bei Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung anfallende Acetaldehyd dar. Der hierdurch entstehende oxidative Stress erhöht nicht nur die Kollagensynthese, sondern aktiviert auch Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Genexpression des Kollagens fördern. (60, 64)

Das bessere Verständnis der verschiedenen Wege, die zur Genaktivierung führen, bereitet die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapien zur Fibroseregression. (62) Zudem besteht durch die Messung der Genexpression der Fibrosemarker die Möglichkeit, Korrelationen zu im Blut gemessenen Fibrosemarkern wie beispielsweise dem im ELF-Score enthaltenen Metalloproteinaseinhibitor TIMP-1 herzustellen.

2.2.1.3 α -SMA-Ablagerung

Eine zweite Möglichkeit, die Expression von Fibroseindikatoren darzustellen, ist die immunhistochemische Färbung der Biopsate. Wie in 2.1.2 Pathophysiologie beschrieben, bilden die aktivierten HSC vermehrt alpha smooth muscle Aktin (α -SMA), welches die Zellen deutlich kontraktiler macht und zu einer Erhöhung des portalen Drucks führen kann. (23) Diese Aktin-Isoform lässt sich mithilfe von Antikörpern immunhistochemisch darstellen. In der anschließenden mikroskopischen Betrachtung wird beurteilt, wie stark die Anfärbung ausfällt. Die erhöhte α -SMA-Produktion spricht für eine vermehrte HSC-Aktivierung und damit für die hepatische Fibrose. (65) Einzelne Studien konnten eine Korrelation zwischen dem Grad der α -SMA-Anfärbung und dem Fibrorestadium nachweisen. Elzamy et al. ermittelten in ihrer Studie mithilfe von 60 Leberbiopsien von HCV-positiven Patienten Cutoff-Werte ($> 27,5\%$ α -SMA-Anfärbung), um zwischen F1/F2 und F3/F4 (mHAI) zu differenzieren (78,8 % Sensitivität; 85,2 % Spezifität) und die Fibroseprogression vorherzusagen. (66)

Laut Carpino et al. machen die α -SMA-positiven HSC in gesundem Lebergewebe nur ca. 3 % aus, während in chronisch entzündetem Gewebe bis zu $36,1 \pm 15,2\%$ der HSC eine positive α -SMA-Färbung aufweisen. Bei Patienten nach LT zeigten sich α -SMA positive Areale laut ihrer Studie zum Teil bevor fibrotisch verändertes Gewebe in der Biopsie entdeckt werden konnte. Die positiv gefärbten HSC ließen sich vermehrt in Entzündungsarealen und Mottenfraßnekrosen, aber auch in Regeneratknoten der inaktiv zirrhotischen Patienten darstellen.

(65) Auch die durch die chronische Lebererkrankung vergrößerten Portalfelder zeigten eine erhöhte α -SMA-Anreicherung. (67) Dieses Verteilungsmuster des α -SMA wurde ebenfalls von Akpolat et al. beschrieben. Ihnen fiel zusätzlich auf, dass sich in fibrotischem Gewebe mehr α -SMA-Positivität periportal und perizentral als in perisinusoidalen Arealen zeigte. (68) Ein charakteristisches Anfärbungsmuster oder unterschiedliche Intensitäten je nach Grundätiologie konnten bisher nicht nachgewiesen werden. (65)

Die IHC-Färbung (immunhistochemische Färbung) mittels Anti- α -SMA-Antikörpern kann demnach als Marker für aktivierte HSC eingesetzt werden. Sie spiegelt dann zum einen den aktuellen Fibrosegrad wider und ist zum anderen auch ein guter früher Indikator für die Entwicklung einer Fibrose. (65, 66, 68)

2.2.2 Nicht invasive Verfahren

2.2.2.1 Biomarker

In den letzten Jahrzehnten wurden als Alternative zur Leberbiopsie verschiedene nicht-invasive Verfahren zur Fibrosebestimmung entwickelt. Dazu gehört auch die Analyse von Biomarkern, objektiv gemessenen Markern, die als Indikatoren für normale oder pathologische Prozesse gelten. Zudem können sie die Veränderungen einer therapeutischen Intervention widerspiegeln. (69) Die im Rahmen der Fibroseprogression auftretenden Veränderung der Sekretion bzw. die bei der Zersetzung der Bestandteile der ECM entstehenden Fragmente werden mehr und mehr zu diagnostischen Zwecken genutzt. (59)

Biomarker sollten leberspezifisch, unabhängig von metabolischen Veränderungen und ihre Ausscheidung möglichst wenig von hepatischer und renaler Funktion beeinflusst sein. Es ist wichtig, dass sie die Leberfibrose in jedem Fibrorestadium reflektieren können und dementsprechend sensitiv auf Veränderungen des Leberparenchyms reagieren. Auch ein eventuelles Anschlagen der Therapie muss wiedergespiegelt werden. (15)

Es werden im Rahmen der Fibrosebestimmung direkte und indirekte Biomarker differenziert. Direkte Marker beschreiben meist Bestandteile, Vorläufer- oder Abbauprodukte der ECM und an ihrem Auf-/Abbau beteiligte Proteine. Indirekte Marker zeigen v. a. (pathologische) Veränderungen der hepatischen Funktion an. Zu den indirekten Markern gehören die Lebertransaminasen (ALT und AST), die γ GT, das Bilirubin und Albumin im Blut. Sie dienen zu diagnostischen Zwecken, zur Evaluation des Schweregrades und zu ersten prognostischen Vorhersagen. (70)

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die gemessene Veränderung eines einzelnen Biomarkers eher selten signifikant klinische Endpunkte widerspiegeln oder voraussagen kann. Deshalb kombiniert man sie z. B. mit Hilfe eines Algorithmus. (22)

Der Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test, welcher im klinischen Bereich bereits zum Fibrose-Staging angewandt wird, stellt einen solchen Algorithmus dar. (2) Weitere Beispiele und ein Überblick über die verschiedenen Serummarker finden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1 - Nicht-invasive Serummarker zur Evaluation der Leberfibrose (70, 71)

Direkte Serummarker	
Glykoproteine und Polysaccharide	Hyaluronsäure, Laminin, YKL-40
Kollagene	PICP, PIIINP
Kollagenasen	MMPs, TIMPs
Zytokine	TGF-β1, Mikrofibrillen-assoziiertes Protein 4
Indirekte Serummarker	
Albumin, Bilirubin, AST, ALT, γGT, Prothrombinzeit	
Kombinierte Marker	
APRI, AST/ALT, ELF®, FIB-4, Fibroindex®, FibroMeter®, FIBROspect II®, Forns index, Hepascore®, Lok index	

PICP: Propeptid des Prokollagen Typ 1, PIIINP: N-terminales Propeptid des Prokollagen Typ III, MMP: Matrix-Metalloproteinase, TIMP: Gewebeinhibitor der Metalloproteinase, TGF-β1: Wachstumsfaktor, AST: Aspartat-Aminotransferase, ALT: Alanin-Aminotransferase, γGT: Gamma-Glutamyltransferase, APRI: AST to platlet ratio index (AST/Thrombozyten-Ratio-Index), FIB-4: Fibrosis-4 Index

2.2.2.2 Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test

Der ELF-Test wurde in den vergangenen Jahren für verschiedene Leberfibrose-Ätiologien validiert, darunter NAFLD (72-74), virale Hepatitis (75-77) und alkoholische Lebererkrankungen (53, 75) sowie PBC (78) und PSC (79). Für die NAFLD wurde der ELF-Wert sogar als Diagnosekriterium in die NICE-Guideline (National Institute for Health and Care Excellence) aufgenommen (80). Eine Metaanalyse von Xie et al. ermittelte eine 83-prozentige Sensitivität sowie eine Spezifität von 73 % für die Erkennung signifikanter Fibrose bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. (47) Damit weist er eine relativ hohe diagnostische Genauigkeit auf, auch im Vergleich zum „Gold-Standard“ – der Leberbiopsie. (81)

Neben der diagnostischen Funktion wird dem ELF-Wert, bzw. auch den in ihm enthaltenen Serummarkern (s. weiter unten), eine prognostische Funktion zugesprochen. Diese prognostische Relevanz konnten Mayo et al. 2008 für die Langzeitprognose bei Patienten mit PBC nachweisen. (78) Parkes et al. ermittelten sogar, dass die prädiktive Funktion des ELF-Tests bei Patienten mit chronisch entzündlichen Lebererkrankungen besser sei als die der Leberbiopsie. (81) Auch für Patienten mit Hepatitis C oder NAFLD erlaubt der ELF-Test prognostische Aussagen. (72, 76, 82)

Der einheitslose ELF-Wert berechnet sich aus den folgenden Markern der extrazellulären Matrix, deren Konzentration im Serum gemessen werden kann:

- dem Gewebeinhibitor der Metalloproteinase 1, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)
- dem N-terminalen Propeptid vom Prokollagen Typ III, amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP)
- und der Hyaluronsäure, hyaluronic acid (HA).¹

In den Vorgängeralgorithmus der ELF-Tests, den OELF (Original European Liver Fibrosis panel), floss noch das Alter als weiterer Parameter mit ein. Guha et al. zeigten allerdings 2007, dass durch das Weglassen des Alters kein Verlust der diagnostischen Genauigkeit entsteht. (72) Das Alter wird stattdessen als eigenständiger prognostischer Faktor betrachtet und Transkriptionsfehler werden reduziert. (83) Abbildung 4 zeigt schematisch den Weg der Biomarker aus der Leber ins Blut.

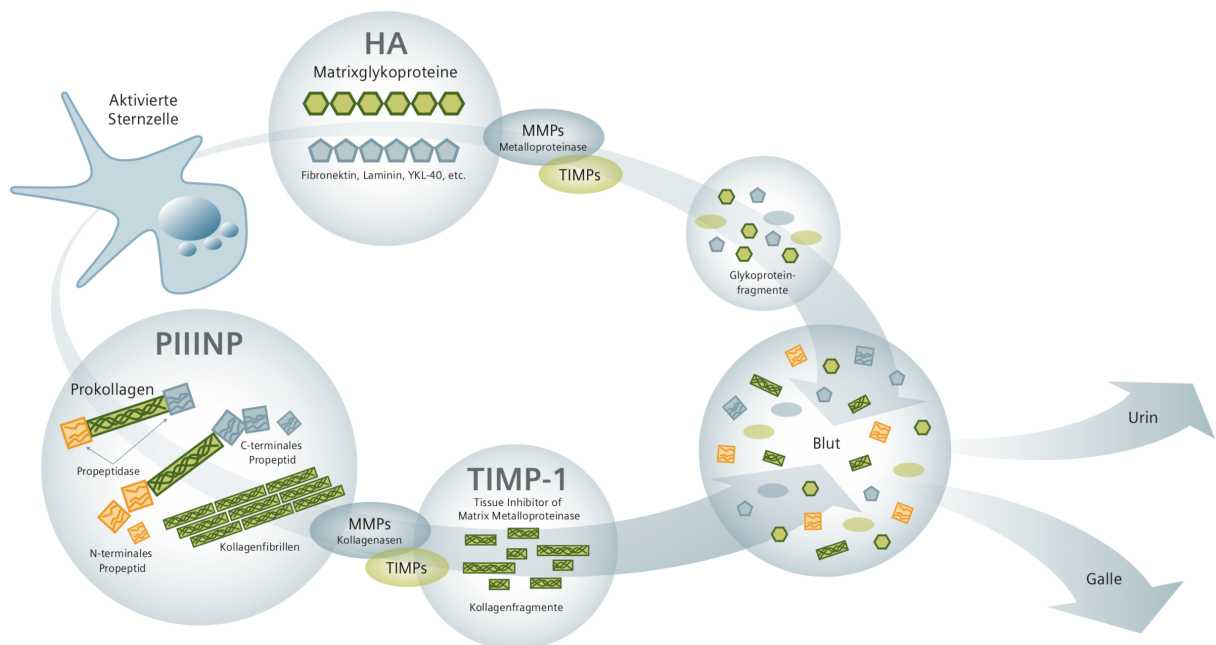


Abbildung 4 - Serummarker des ELF-Test

Aus: Setting a New Standard in Liver Fibrosis Assessment – Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test, Siemens Healthcare (3)

Im Folgenden werden die drei Serummarker genauer beschrieben.

¹ Die Formel zur Berechnung des ELF-Wert findet sich in Kapitel 3.3.1.

Gewebeinhibitor der Metalloproteinase 1 (TIMP-1)

Wie unter 2.1.2 Pathophysiologie der Leberfibrose erwähnt, handelt es sich bei dem Gewebeinhibitor der Metalloproteinase 1 um den Hauptinhibitor der Metalloproteinasen, welcher bei dem fibrotischem Umbau der Leber deutlich erhöht ist. Er wird hauptsächlich von aktivierten Sternzellen und Myofibroblasten produziert. (18) Vor allem in der Differenzierung zwischen keiner/milder und schwerer Fibrose bei der NAFLD eignet sich TIMP-1 auch alleine betrachtet als signifikanter Marker. (84) TIMP-1 ist außerdem ein guter Biomarker für die Evaluation von signifikanter Fibrose bei Hepatitis B Patienten und wird zur Fibrosemessung bei HCV-Patienten eingesetzt. (85, 86)

N-terminales Propeptid des Prokollagens Typ III (PIIINP)

Das N-terminale Propeptid des Prokollagens Typ III entsteht bei der proteolytischen Abspaltung vom Prokollagen-Typ-III Molekül durch die N-Propeptidase. Dies ermöglicht das weitere Wachstum der Kollagenfibrillen in der ECM (s. auch Abbildung 4). Da der Prozess extrazellulär stattfindet, eignet sich PIIINP als Serummarker. Dementsprechend korreliert die Freisetzung des PIIINP mit der Synthese und Ablagerung des fibrillären Kollagens und somit mit der Fibrogenese. (87) Etwas verfälscht wird der Wert dadurch, dass auch bei der Fibrolyse geringe Mengen an PIIINP freigesetzt werden. Physiologischer Weise wird ein Teil des freigesetzten PIIINP vom Sinusendothel extrahiert, was bei der chronisch entzündeten Leber in geringerem Ausmaß stattfindet und somit auch zu gering höheren Serumwerten führen kann. Außerdem ist PIIINP als Marker der Fibrogenese insofern limitiert, als dass er auch bei akuten Entzündungen des Lebergewebes erhöht vorliegt. Deshalb muss er immer in Bezug zu Markern gesetzt werden, die die Fibrolyse reflektieren, da nur das Ungleichgewicht aus diesen beiden Prozessen die Progression der Fibrogenese bestimmen kann. (87)

Hyaluronsäure (HA)

Bei der Hyaluronsäure handelt es sich um ein hochmolekulares Glukosaminoglykan, welches Bestandteil fast aller Bindegewebe ist. Im Blut zirkulierende Hyaluronsäure wird durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Sinusendothelien aufgenommen und in deren Lysosomen abgebaut. Deshalb hat sie nur eine Serumhalbwertszeit von 3 – 5 min. Der HA-Spiegel reflektiert somit die Leberperfusion und die sinusoidale Endothelzellularfunktion. Ist der Spiegel erhöht, spricht dies für eine verminderte Endozytose der HA bei gestörter Endothelzellularfunktion. (22, 87) Der HA-Spiegel kann allerdings auch aufgrund von nicht-

hepatisch entzündlichen Prozessen wie beispielsweise bei der rheumatischen Arthritis erhöht sein. (22) In einer Studie mit 486 Patienten mit chronischer Hepatitis C konnte für einen HA-Serumspiegel $< 60 \mu\text{g/L}$ mit einer Sensitivität von 98 % eine Zirrhose ausgeschlossen werden, während mit 78 % Spezifität ein Spiegel $> 110 \mu\text{g/L}$ eine Zirrhose diagnostizierte. (88)

Folgende Cut-off-Werte des ELF-Algorithmus je nach Schweregrad der Fibrose/Zirrhose wurden definiert (1, 89):

- Keine bis milde Fibrose ($< 7,7$)
- Moderate Fibrose ($\geq 7,7$ bis $< 9,8$)
- Schwere Fibrose ($\geq 9,8$)

Zu beachten ist laut Lichtinghaten et al. allerdings, dass ELF-Werte zwischen 9,8 und 11,3 keinem exakten Fibroestadium zugeordnet werden könnten. In diesem Bereich ist keine sichere Aussage bezüglich des Vorliegens einer Zirrhose möglich. Zur Absicherung wird deshalb eine Biopsie empfohlen. Bei Werten über 11,3 kann allerdings mit hoher Spezifität von einer Zirrhose ausgegangen werden, sodass zur Diagnose keine Biopsie notwendig ist. Gleiches gilt für Werte unter 7,7, die mit einer hohen Sensitivität (89,5 %) eine relevante Fibrose ausschließen. (2)

2.3 Therapie

Die Entwicklung antifibrotischer Therapien für Patienten mit chronischen Lebererkrankungen ist in den letzten Jahren Dank des größeren Verständnisses der Fibrose-Pathogenese und neueren nicht-invasiven Surrogat-Endpunkten der Studien enorm fortgeschritten. (18, 90) Die Therapieziele werden anhand der Veränderung der portalen Hypertension, der Leberfunktion und der gesenkten Morbidität bzw. Mortalität ermittelt. Da die Veränderungen neuer medikamentöser Therapien auf histologischer Ebene meist erst mit Verzögerung auftreten, sind regelmäßige Kontrollen notwendig. Deshalb wird auch im Rahmen der Therapiekontrolle die Rolle der Biomarker und der nicht invasiven Diagnosemethoden immer wichtiger.

Vier verschiedene Ansatzpunkte sind in Abbildung 5 dargestellt. Der Effektivste ist nach wie vor die Therapie der zugrunde liegenden Lebererkrankung.

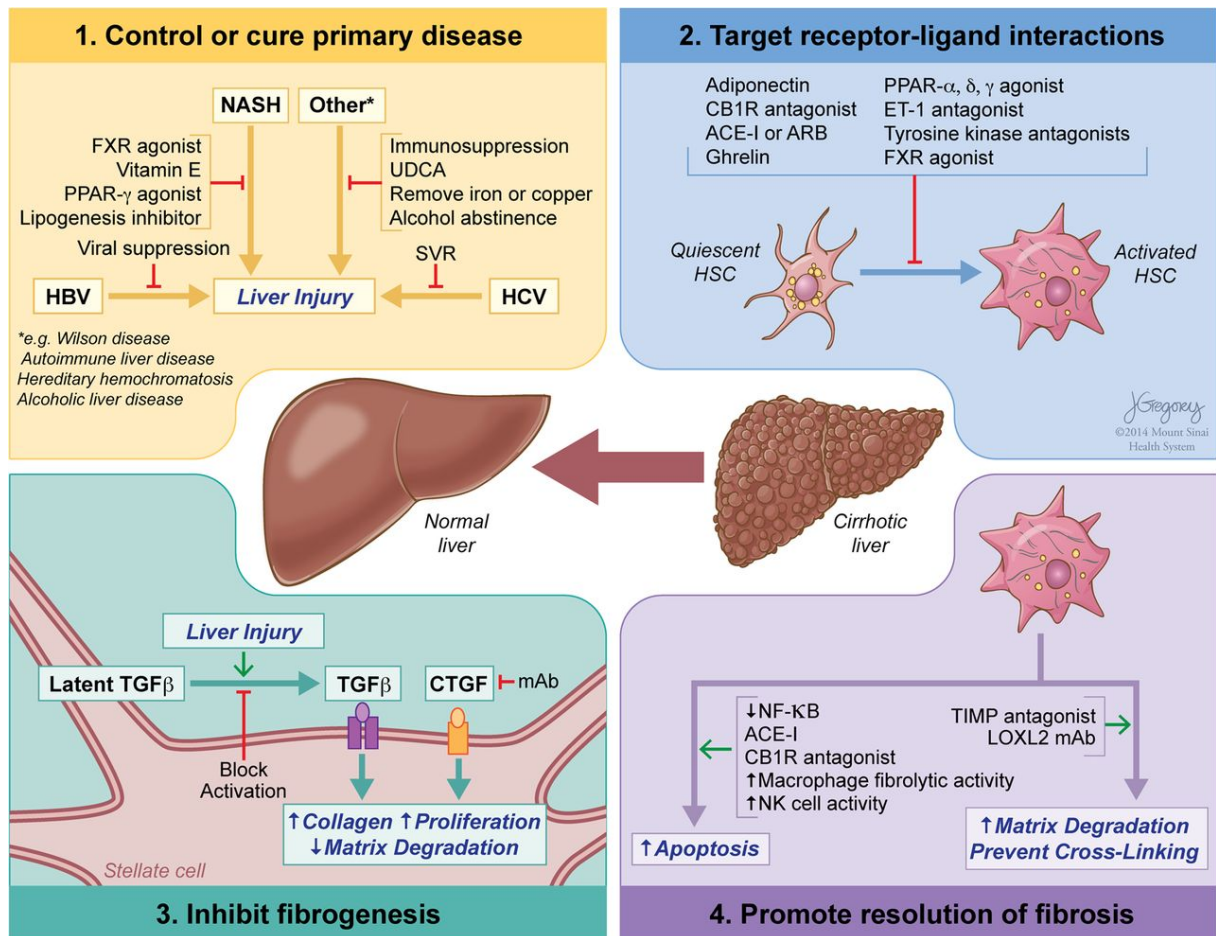


Abbildung 5 - Antifibrotische Therapiemöglichkeiten

Aus Yoon et al. (91) - (1) Krankheitsspezifische Therapien, die die Grundkrankheit behandeln, sind immer noch der effektivste antifibrotische Ansatz. (2) Der gezielte Angriff von Rezeptor-Ligand-Interaktion kann zur Hemmung der HSC-Aktivierung und der Fibroseentwicklung führen. (3) Die Inhibition der potentesten profibrotischen Aktivierungswege, wie beispielsweise die Aktivierung von TGFβ, gehört zu den vielversprechenderen antifibrotischen Therapiestrategien. (4) Die Fibrolyse kann gefördert werden, indem die Apoptose der aktivierten HSC durch Medikamente oder durch die gesteigerte Aktivität von NK-Zellen induziert wird. Zudem kann der Abbau der ECM durch fibrolytische Makrophagen gefördert werden. FXR: Farnesoid-X-Rezeptor, PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, UDCA: Ursodesoxycholsäure, SVR: sustained virological response; CB1: Cannabinoid Rezeptor Typ 1, ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker, ET-1: Endothelin 1, TGFβ: transforming growth factor β, CTGF: connective tissue growth factor, mAb: Monoklonale Antikörper, NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NK: Natürliche Killerzellen, TIMP: Gewebsinhibitor der Metalloproteinasen, LOXL2: Lysyloxidase 2.

Trotz besserer Therapien v. a. für viral induzierte Hepatitiden ist noch immer nicht sicher nachgewiesen, dass die histologischen Veränderungen bei Patienten mit fortgeschrittener Fibrose und Zirrhose vollkommen reversibel sind. (92, 93) Nur für Patienten mit Hepatitis B wurde gezeigt, dass auch eine beginnende Zirrhose unter einer antiviralen Therapie reversibel sein kann. (94) Für viele andere ist die Lebertransplantation häufig die einzig kurative Therapiemöglichkeit.

2.3.1 Lebertransplantation

Die Zirrhose ist die häufigste Indikation zur Lebertransplantation in Deutschland. In den vergangenen Jahren war die Alkoholische Leberkrankheit an erster Stelle der insgesamt 19 Hauptdiagnosen, die bei Eurotransplant gelistet sind (s. Abbildung 6 - Indikationen für eine Lebertransplantation). Die Diagnosen sind allgemein gefasst und lassen sich in weitere Unterdiagnosen aufteilen.

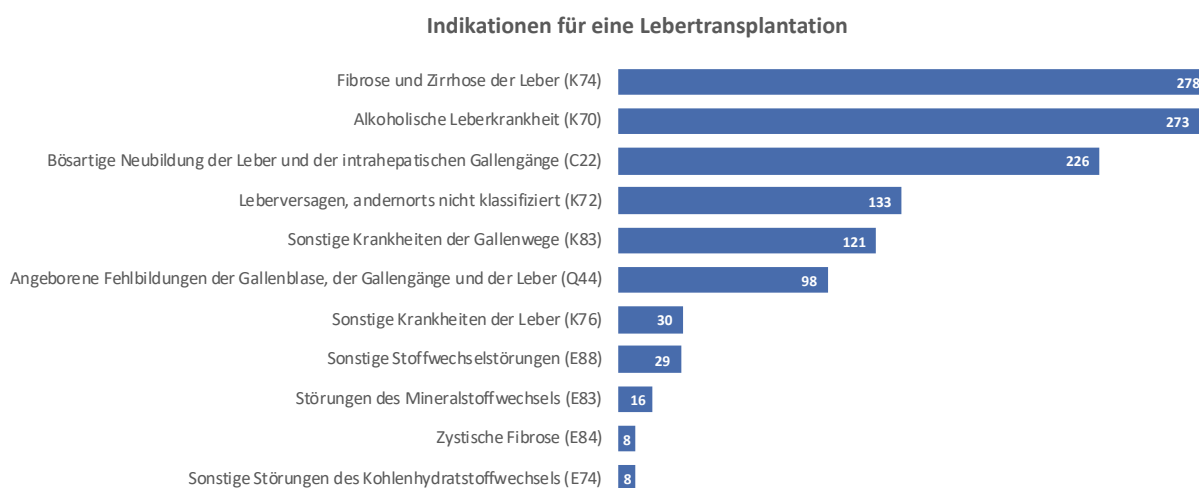


Abbildung 6 - Indikationen für eine Lebertransplantation

Deutschland 2019 – Anzahl der häufigsten ICD-Hauptdiagnosen für LT (aus dem DSO Bericht 2019, Eurotransplant) (95) Es werden die 19 Hauptdiagnosen der insgesamt 1.246 Fälle im Jahr 2019 aufgelistet. Pro Patienten sind mehrere Diagnosen möglich.

Die Dringlichkeit der LT wird in Deutschland seit 2006 mithilfe des MELD-Scores (model for end-stage liver disease) evaluiert. (96) Er schätzt die 3-Monatsmortalität und wird aus den Serumwerten von Kreatinin, Bilirubin sowie dem INR-Wert berechnet. (10) Prinzipiell wird die Leber orthotrop nach vorheriger Hepatektomie transplantiert. Man unterscheidet die Verstorbenen-Organ spende und die Leberteil-Lebendspende. (10) Im Jahr 2019 wurden laut DSO in Deutschland 831 Lebertransplantationen durchgeführt, 46 weniger als im Vorjahr. Davon waren 776 postmortale Organ spenden und 54 Lebendspenden. Außerdem erfolgte eine Dominospende. (95)

Im Anschluss an die LT ist stets eine immunsuppressive Therapie notwendig. Oft handelt es sich dabei um Kombinationstherapien folgender Substanzklassen: Calcineurininhibitoren (Tacrolimus oder Ciclosporin), Glukokortikoide (zum Beispiel Prednisolon), Antimetabolite (wie zum Beispiel Mycophenolat-Mofetil oder Azathioprin) und mTOR-Inhibitoren (wie Sirolimus oder Everolimus). (10, 97) Es gibt keine standardisierte Therapie. Vielmehr wird je

nach Grunderkrankung vor LT, Komorbiditäten sowie dem individuellen Risikoprofil der Patienten versucht, die optimale Therapie bei minimalen Nebenwirkungen zu finden.

Die Überlebensrate wird von der unmittelbaren postoperativen Mortalität sowie der Langzeitmortalität (über 20 Jahre) durch De-novo Tumore (30 %), Rezidive der Grunderkrankung (20 %, vor allem HCV, HCC, ALD), Infektionen (20 %), kardiovaskuläre (10 %) oder andere (20 %) Ursachen beeinflusst. (98) Dabei gilt die Einjahresüberlebensrate zur Evaluation der früh-postoperativen Ergebnisqualität, da fast alle durch perioperative Komplikationen bedingten Todesfälle innerhalb des ersten Jahres auftreten. (99)

Seehofer et al. stellten beim Vergleich der Einjahresüberlebensrate der USA mit 88 %, der UK mit 89 – 92 % und Deutschland mit nur 75 % fest, dass die in Deutschland deutlich niedriger ausfiel. Im zweiten Jahr nach LT betrug die Mortalitätsrate in allen genannten Ländern nur noch ca. 3 %. (96, 98) Bedingt ist die Einjahresmortalität vor allem durch die Risikoprofile der Spender und Empfänger. Deshalb ist neben regelmäßigen Kontrollen auch die Beobachtung möglicher Prädiktoren wichtig.

Die Patienten werden deshalb auf Rezidive der Grunderkrankung und ein Fortschreiten der Fibrose kontrolliert. Wie unter 2.1.2 (Pathophysiologie) erwähnt, kann gerade bei Patienten nach LT die Fibroseprogression deutlich schneller als bei nicht-transplantierten Patienten sein. (25) Die hohe Frequenz, mit der es zu einer Rezirrrose bei HCV positiven Patienten kommt, bzw. das (Wieder-)Auftreten einer NAFLD nach LT, führten zur Einführung von jährlichen Protokollbiopsien. (100)

Die Invasivität dieser Eingriffe wurde bereits ausführlich erläutert. Deshalb wird nach nicht-invasiven Alternativen gesucht. Für Patienten mit HCV ist beispielsweise die Transiente Elastographie eine verlässliche Alternative zur Fibrosedetektion. (101)

3 Materialien und Methoden

3.1 Patientenkollektiv und Studiendesign

In der Zeit von 1997 bis 2010 wurden an der Universitätsmedizin Mainz 644 Lebertransplantationen bei 569 Patienten (davon 75 Retransplantationen) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Patienten im Zeitraum von 1997 bis 2018 beobachtet und die Nachsorge sowie der Krankheitsverlauf in einer Microsoft ACCESS Datenbank der Universitätsmedizin Mainz gemäß den gesetzlichen Vorgaben zur Qualitätssicherung im Bereich Lebertransplantation dokumentiert. Alle Untersuchungen erfolgten nach Zustimmung durch die zuständige Ethikkommission und gemäß der Deklaration von Helsinki (1975). Neben 553 Kaukasiern gehörten 9 Afrikaner und 7 Asiaten zu den transplantierten Patienten. Histologien der Spenderlebern und Serumproben der Empfänger wurden prospektiv asserviert. Je nach Fibroseprogression nach LT wurden die Patienten in drei Gruppen aufgeteilt: Rezirrhose nach einem Jahr (F3/F4), Rezirrhose nach 3 - 5 Jahren und keine signifikante Fibrose (F0-F2) nach 5 Jahren (Nonprogressor). Bei ihnen wurden im Rahmen der Nachsorge entnommene Serumproben zu definierten Zeitpunkten auf Fibrosemarker untersucht. Insgesamt konnten 138 Serumproben an drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Der limitierende Faktor der Kohortengröße waren die Patienten mit sehr früher Rezirrhose, da sie generell ein sehr kleines Kollektiv bilden. Eine weitere Einschränkung ergab sich aus technischen Gründen, da nicht bei allen Patienten die Fibrosemarker bestimmt werden konnten.

Zusätzlich wurden bei 32 der transplantierten Patienten die Biopsien mittels qPCR und Immunhistochemie (IHC) auf die Expression von am Umbau der Leber beteiligten Proteine untersucht. Da zum Teil verschiedene Biopsien eines Patienten ausgewertet werden konnten, wurden insgesamt 54 Biopsien untersucht (18 Biopsien pro Gruppe).

Bei Abnahme der Serumproben wurden die Patienten angewiesen, nüchtern zu erscheinen, um Einflüsse auf die Stoffwechselfparameter zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines ADVIA Centaur (Siemens Healthcare). (s. u.)

3.2 Untersuchung der Biopsien

3.2.1 Histologische Untersuchung

Die Nachsorge der in der Universitätsmedizin Mainz lebertransplantierten Patienten sieht Kontrollbiopsien nach 1 und 5 Jahren post-LT vor. Fallen in den regelmäßig durchgeführten Laborkontrollen unklare Veränderungen auf oder zeigen sich klinische Symptome, kann eine

zusätzliche histologische Untersuchung der transplantierten Leber notwendig werden. Die entnommenen Proben wurden von zwei erfahrenen Pathologen ausgewertet, die gegenüber der Auswertung des jeweils anderen verblindet waren. Die Fibrosestadien wurden mithilfe des semiquantitativen histologischen Scores (F0 - 4) nach Desmet et al. (14) klassifiziert. Die Stadienaufteilung ist unter 2.2.1.1 Leberbiopsie beschrieben. Mithilfe der histologischen Auswertung konnten die Patienten einer der drei Fibrose-/Zirrhose-Gruppen zugeordnet werden.

3.2.2 qRT-PCR und relative mRNA Quantifizierung

Insgesamt konnten aus 48 Biopsien (von 31 Patienten) die mRNA der am fibrotischen Umbau der Leber beteiligten Gene zur quantitativen Analyse gewonnen werden.

Zunächst wurde mithilfe des Quant-iT™ RiboGreen® RNA-Reagenz von Invitrogen die Menge der gelösten RNA ermittelt. Mit diesem fluoreszierenden Reagenz können bereits kleine Mengen RNA detektiert werden. (102)

Nach der Umschreibung der RNA durch reverse Transkription (RT) in cDNA wurde die quantitative PCR (Polymerasekettenreaktion) mit dem TaqMan™ Gene Expression Assay von Applied Biosystems durchgeführt. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR wird bei der quantitativen oder auch real time PCR die PCR-Amplifikation bereits während ihres Ablaufs gemessen. (103)

Die Auswertung der qPCR erfolgte anhand einer relativen Quantifizierung. Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde das Housekeeping Gen GAPDH als Referenz-Gen verwendet. Es zählt zu den gebräuchlichsten Referenzgenen. (104)

Die analysierten mRNAs stammten zur Hälfte von HCV-positiven und zur anderen Hälfte von HCV-negativen Patienten. Zur Berechnung der relativen Genexpression konnte dementsprechend die Delta-Delta-CT-Methode angewendet werden. Sie kann Schwankungen der PCR-Effizienz ausgleichen (theoretisch: Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus, Effizienz = 2, in der Praxis eher 1,7 - 1,9) (105, 106). Die Expression der einzelnen Gene wird als n-fache Expression des Delta-Delta-CT-Wertes angegeben. CT steht hierbei für cycle threshold und bezeichnet den Zyklus der PCR, in dem ein Signal gemessen wird, welches erstmals größer als das allgemeine Hintergrundrauschen der Fluoreszenz ist. (107) Er markiert den Anfang der exponentiellen Phase der PCR des jeweiligen Gens.

Mit folgenden Formeln wird der Delta-Delta-CT-Wert berechnet (106):

1. Normierung	$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$
2. Vergleich Behandlung/Kontrolle	$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Behandlung} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$
3. Relativer Expressionsunterschied Behandlung/Kontrolle	$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$

In unserem Fall wurden die Ratio für HCV positiv/HCV negativ und damit die relative Expression der einzelnen Gene in den verschiedenen Biopsien ermittelt.

3.2.3 α -SMA-Färbung

Vor der immunhistochemischen Färbung des α -SMA wurden die Gewebeproben mit Xylol und Ethanol entparaffiniert und anschließend mit deionisiertem Wasser rehydratisiert. Damit die Antikörper besser an die Zielstruktur – das α -SMA – in dem fixierten Gewebe binden konnten, mussten zum Teil Aminosäurebindungen innerhalb des Zielantigens und Proteinbindungen um das Zielantigen herum gespalten werden. Dafür wurden die Gewebeproben in 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6,0) zum Sieden gebracht.

Anschließend erfolgten die Permeabilisierung und die Blockierung der nicht spezifischen Bindungen. Dafür wurde zuerst die endogene Peroxidaseaktivität mit 3 %-igem Wasserstoffperoxid blockiert. Es folgte die Permeabilisierung mit dem Permeabilisierungspuffer Saponin (1,5 % von Sigma) und danach die Blockierung der unspezifischen Bindungen durch die Inkubation in Phosphat-gepufferter Salzlösung mit Tween-20 (PBS-T) mit 5 % Tierserum.

Über Nacht wurden die Gewebeschnitte dann bei 4 °C in einer angefeuchteten Kammer mit den α -SMA-Antikörpern, die 1:1000 mit einem Blockierungspuffer verdünnt wurden, inkubiert. Nach zweimaliger Waschung mit PBS-T (1 %) wurden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, dem Avidin-Biotin Komplex von Vectastain, inkubiert. Die Visualisierung der α -SMA-Epitope erfolgte schließlich mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin). DAB lässt die α -SMA-Epitope in den Präparaten dunkelbraun erscheinen.

Die Intensität der IHC-Färbung wurde von zwei unabhängigen Personen (einem Pathologen und einem Hepatologen der Universitätsmedizin Mainz) ausgewertet.

Die Aufnahmen in Kapitel 4.3.2 Immunhistochemische Färbung wurden mit dem universellen Forschungsmikroskop BX5 1 von Olympus gemacht.

3.3 Fibrosemarker

3.3.1 ELF-Test

Der Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test wird angewandt, um weniger invasiv im Vergleich zur Leberbiopsie den Fibrosegrad einzuschätzen. Dazu werden die drei direkten Serumbiomarker Hyaluronsäure, N-terminales Propeptid des Prokollagen Typ III (PIIINP) und Gewebeinhibitor der Metalloproteinase 1 (TIMP-1) gemessen. Ein Algorithmus mit der Formel

$$\text{ELF} = 2.494 + 0.846 \ln(C_{\text{HA}}) + 0.735 \ln(C_{\text{PIIINP}}) + 0.391 \ln(C_{\text{TIMP-1}}) \quad (1, 2)$$

berechnet aus den Konzentrationen C (in ng/ml) der Biomarker einen dimensionslosen Punktwert, der mit dem Grad der Fibrose beziehungsweise der Zirrhose korreliert. Dabei entsprechen ELF-Werte < 7,7 keiner bis milder Fibrose (F0/1 nach Desmet/Scheuer), ≥ 7,7 - < 9,8 moderater Fibrose (F2) und > 9,8 schwerer Fibrose/Zirrhose (F3/4). (2)

Die Berechnung der Konzentrationen von HA, PIIINP und TIMP-1 erfolgte aus Serumproben mit dem ADVIA Centaur® CP System (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland).

Da die Hyaluronsäure auch aufgrund von nicht-hepatischen, entzündlichen Prozessen wie beispielsweise bei der rheumatischen Arthritis erhöht sein kann (22), wird der ELF-Wert nur für HA-Konzentrationen < 1000 ng/ml berechnet. Für 7 der insgesamt 141 Serumproben zu den verschiedenen Zeitpunkten (T₁ - T₃) konnte deshalb kein ELF-Wert berechnet werden. Dies bedingt Schwankungen in der Fallzahl der statistischen Berechnungen.

3.4 Statistische Auswertung

Alle quantitativen Daten werden als Median mit dazugehörigem Interquartilsabstand (IQA) angegeben. Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die Signifikanzen auf die Unterschiede zwischen der schnellen Rezirrhosegruppe und der Nonprogressor-Gruppe, die nach 5 Jahren keine fortgeschrittene Fibrose (F0-F2) entwickelt hat. Die Signifikanzen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % (p < 0,05) festgelegt.

Für die prognostische und diagnostische Funktion des ELF-Werts wurde vor Durchführung des Mann-Whitney U-Tests der Kruskal Wallis Test (nicht-parametrischer Test für k Stichproben) durchgeführt. Zudem erfolgte im Anschluss eine Bonferroni-Adjustierung für multiples Testen. Hierbei wurde die berechnete Signifikanz mit der Anzahl der durchgeführten Tests

multipliziert. Die Bonferroni-adjustierten Signifikanzen sind entsprechend markiert (p_B). In unserem Fall gilt: $p_B = p \times 3$

Für Korrelationen (z. B. zwischen dem Fibrosegrad nach Desmet und dem ELF-Wert) wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient (r_s) ermittelt. Er ist im Vergleich zum Pearsons Korrelationskoeffizient robuster gegenüber Ausreißern.

Die Überlebens-Kurven, die die Zeit bis zu einem kritischen Ereignis (Organversagen, Tod des Patienten) nach der LT schätzen, wurden mit der Kaplan-Meier-Methode ermittelt. Unterschiede zwischen den Kurven wurden mit Hilfe des logrank-Tests auf Signifikanz geprüft. Zensiert wurde am Ende des Beobachtungszeitraums (12. Oktober 2018).

Zur Veranschaulichung der prädiktiven Wertigkeiten des ELF-Tests wurden ROC-Kurven erstellt und die zugehörigen AUROCs mit ihren Konfidenzintervallen berechnet. Außerdem wurden der negativ und positiv prädiktive Wert berechnet. Dabei wurden fehlende ELF-Werte wie falsche Testergebnisse betrachtet.

Alle statistischen Analysen erfolgten mit IBM SPSS Statistics Version 23.0.0.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Patienten-Charakteristika

Es handelt sich um ein retrospektives Studiendesign, bei welchem Patienten im Zeitraum von 1997 bis 2018 betrachtet wurden. Das Patientenkollektiv ergibt sich aus den im Zeitraum von 1997 bis 2010 in der Universitätsmedizin in Mainz Leber-transplantierten Patienten. Es wurden insgesamt 644 Transplantationen bei 569 Patienten (569 Transplantationen und 75 Retransplantationen) durchgeführt. Die 553 Kaukasier, die neben 9 Afrikanern und 7 Asiaten eine Transplantation erhielten, wurden beobachtet und ihre Krankheitsentwicklung im Rahmen der Nachsorge der Transplantation dokumentiert. Hierbei lag der Fokus unter anderem auf dem Wiederauftreten einer Fibrose beziehungsweise Zirrhose. Bei 47 Kaukasiern konnten im Nachhinein auch Serumproben auf die im Rahmen dieser Promotion betrachteten Fibrosemarker untersucht werden. So wurden parallel zu den Biopsien die zur Berechnung des ELF-Wertes notwendigen Serummarker bestimmt.

Die Patienten konnten dabei je nach Wiederauftreten der Fibrose in der Biopsie drei Gruppen zugeordnet werden.

1. Früh: Rezirrhose (F3/F4) innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation
2. Mittel: Rezirrhose innerhalb von drei bis fünf Jahren nach Transplantation
3. Keine: Fünf Jahre nach Transplantation keine fortgeschrittene Fibrose (F0-F2)

Elf Patienten (23,4 %) entwickelten bereits im ersten Jahr nach der Transplantation eine Rezirrhose (definiert als Desmet/Scheuer \geq F3). Neunzehn Patienten (40,4 %) wiesen nach 3 – 5 Jahren eine Rezirrhose in der Biopsie auf und bei siebzehn Patienten (36,1 %) zeigte sich auch nach 5 Jahren noch ein Fibrorestadium \leq F1 nach Desmet/Scheuer.

Um Unterschiede aufweisen zu können, wurde die folgende Tabelle (Tabelle 2) mit den Patientencharakteristika in die drei Gruppen aufgeteilt. Die Daten wurden zum Zeitpunkt der Transplantation erhoben, die Einteilung auf die Gruppen erfolgte retrospektiv (in 2014).

Tabelle 2 - Patientendaten - Deskriptive Statistik

Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Transplantation [quantitative Daten als Median mit Interquartilsabstand (IQA) in Klammern]

Post-LT Zirrhose	Früh (n = 11)	Mittel (n = 19)	Keine (n = 17)
Männlich n (%)	8 (73 %)	12 (63 %)	13 (76 %)
Alter (Jahre)	54,9 (52,2 - 60,8)	56,0 (47,2 - 61,3)	52,2 (45,5 - 56,9)
Größe (cm)	180 (170 - 182)	170 (165 - 178)	172 (162 - 181,5)
Gewicht (kg)	83 (65 - 92)	76 (62 - 85)	73 (61 - 81,5)
BMI (kg/m²)	27,8 (22,5 - 30,4)	25,7 (22,0 - 28,7)	23,3 (20,6 - 27,0)
Re-TPx n (%)			
nein	11 (100 %)	19 (100 %)	14 (82,4 %)
1.	0	0	2 (11,8 %)
2.	0	0	1 (5,9 %)
Spenderalter (Jahre)	60 (48 - 65)	61 (43 - 69)	45 (35,5 - 56)
Spender männlich n (%)	10 (91 %)	11 (58 %)	6 (35 %)
HCV positiv n (%)	4 (36 %)	9 (47 %)	8 (47 %)
HCC n (%)	3 (27 %)	5 (26 %)	5 (29 %)

BMI: Body-Mass-Index, Re-TPx: Retransplantation, HCV: Hepatitis C-Virus, HCC: Hepatozelluläres Karzinom

Wie auch in mehreren Studien nachgewiesen, zeigte sich eine schnellere Zirrhoseprogression bei Patienten, die die Leber eines älteren Spenders erhielten (27, 108, 109). Tatsächlich war auch in diesem Patientenkollektiv der Altersmedian der Spender in der Nichtprogressor-Gruppe (45 Jahre) niedriger als in den anderen beiden Gruppen (früh: 60 Jahre, mittel: 61 Jahre). Im Mittelwertvergleich (Mann-Whitney-U) zeigte sich dabei ein auffälliger Unterschied zwischen der frühen und der Nonprogressor-Gruppe ($p = 0,045$) und zwischen der mittleren und der Nonprogressor-Gruppe ($p = 0,042$). In der frühen Progressor-Gruppe waren die Spender in 91 % der Fälle männlich, in der Nonprogressor-Gruppe zu 65 % weiblich. Die Mehrheit der Transplantierten in allen Gruppen war männlich. Der Gesamt-Altersmedian lag bei 54 (47,5 - 60,4) Jahren und nur in der Nonprogressor-Gruppe befanden sich unter den Transplantationen auch Retransplantationen (von 17 Transplantationen zwei erste und eine zweite Retransplantation).

4.1.1 Ätiologien

In Abbildung 7 sind die Ursachen der chronischen Lebererkrankungen der Patienten und ihre Häufigkeiten dargestellt. Insgesamt überwogen virale (Hepatitis B oder C) und toxische Ursachen (Alkohol, Medikamente). Diese gehören generell zu den häufigsten Ursachen der CLD. (10) (s. auch in 2.1.1 Ursachen der Leberfibrose und -zirrhose)

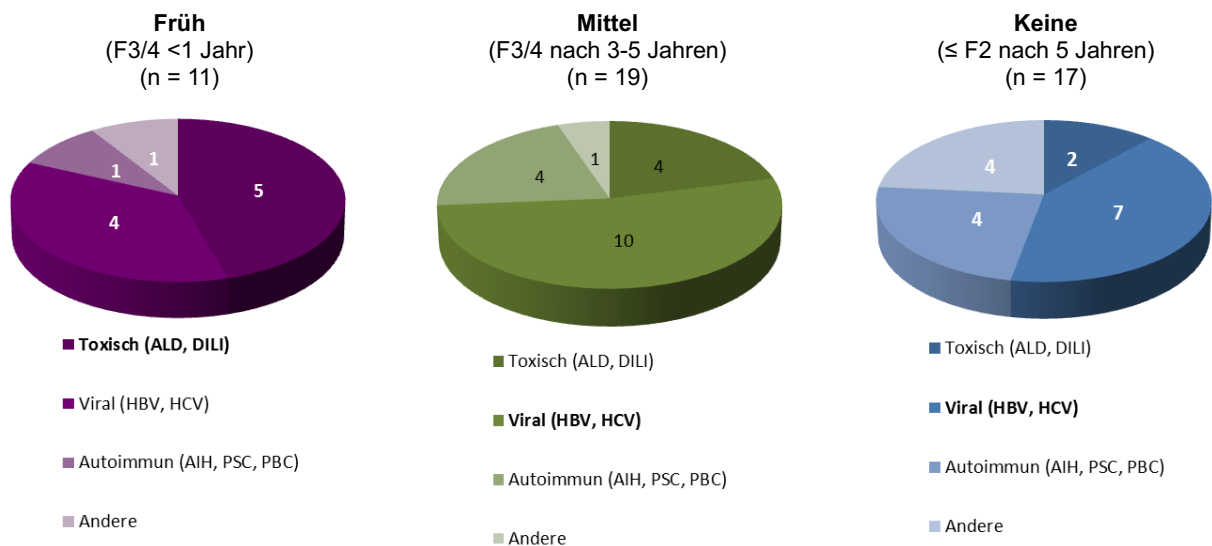


Abbildung 7 - Ursachen der chronischen Lebererkrankung (CLD) je nach Zirrhosegruppe

ALD: Alkoholische Lebererkrankung; DILI: arzneimittelinduzierter Leberschaden, HBV: Hepatitis B Virus; HCV: Hepatitis C Virus, AIH: Autoimmunhepatitis, PSC: primär sklerosierende Cholangitis, PBC: primär-biliäre Zirrhose

Neben den dargestellten, zur Transplantation führenden Ursachen fanden sich in unserem Patientenkollektiv (in Abbildung 7 unter „Andere“ zusammengefasst) weiterhin: Familiäre Amyloidose (n = 1), andere Cholestatische Erkrankungen (n = 1), Kryptogene Zirrhose (n = 3) sowie akute Abstoßung der Transplantleber (bei Z.n. LT bei HCV-Zirrhose; n = 1). Des Weiteren lagen in vielen Fällen Kombinationen mehrerer Erkrankungen vor, wie beispielsweise Leberzirrhose durch HCV-Infektion und Alkoholabusus. In diesen Fällen wurde als Hauptursache die länger bestehende Krankheit angegeben.

4.1.2 Überlebenszeiten

Abbildung 8 stellt die Überlebenszeiten der transplantierten Organe und der Patienten im Allgemeinen mithilfe einer Kaplan-Meier-Kurve dar. Die mediane Überlebenszeit sowohl für die Organe als auch für die Patienten ließ sich nur für die schnelle und die mittlere Progressor-Gruppe berechnen. Bei der Nonprogressor-Gruppe wurde der Median im Beobachtungszeitraum nicht erreicht, weshalb in Abbildung 8 alternativ das 75 %-Quartil angegeben wurde.

Das 10-Jahres-Überleben der Patienten, die auch in der 5-Jahres-Biopsie noch keine fortgeschrittene Fibrose zeigten, war 94,1 %. Bei der mittleren Progressor-Gruppe respektive 47,4 % und bei den Patienten, die im ersten Jahr nach der Transplantation eine Rezirrhose erlitten nur 18,2 %. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den drei Zirrhosegruppen ($p < 0,00001$). Gleiches galt für das 10-Jahres-Organüberleben. In Gruppe früh/mittel/keine waren es hier 18,2 %/31,6 %/94,1 %, ebenfalls mit hochsignifikantem Unterschied ($p < 0,00001$).

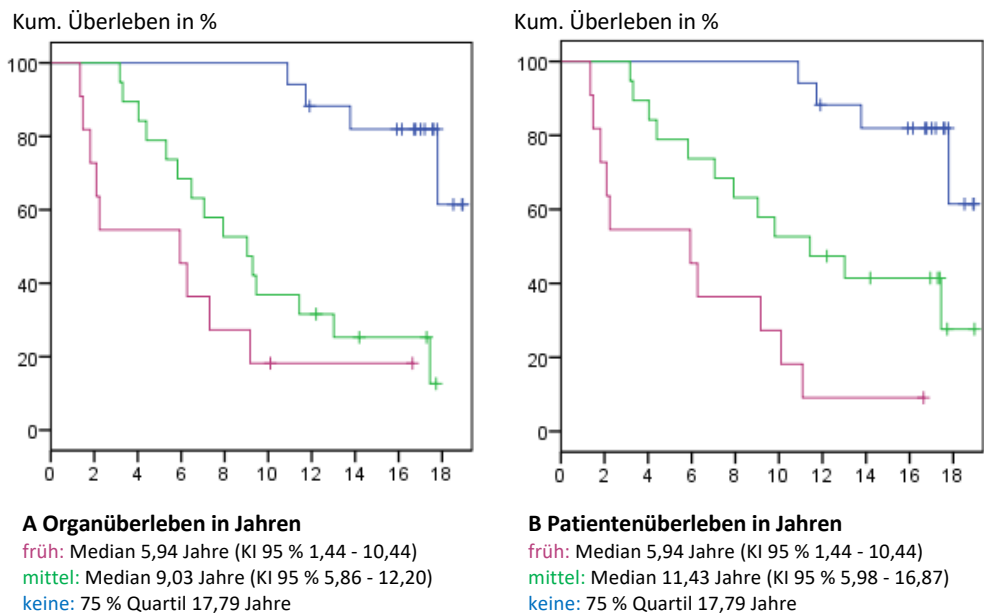


Abbildung 8 - Organ- und Patientenüberleben

Kum. Überleben: Kumuliertes Überleben, KI: Konfidenzintervall, Log Rank: $p < 0,00001$

Es ließ sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen früher Rezirrhose und der Überlebenszeit sowohl für die Leber an sich als auch für den Patienten darstellen. Je früher die Rezirrhose auftrat, desto kürzer war die Überlebenszeit des Organs und des Patienten.

4.2 Veränderung der Biomarker nach LT

Innerhalb der einzelnen Gruppen wurden die Serumproben zu drei verschiedenen Zeitpunkten (T_1 - T_3) nach folgendem Schema ausgewertet.

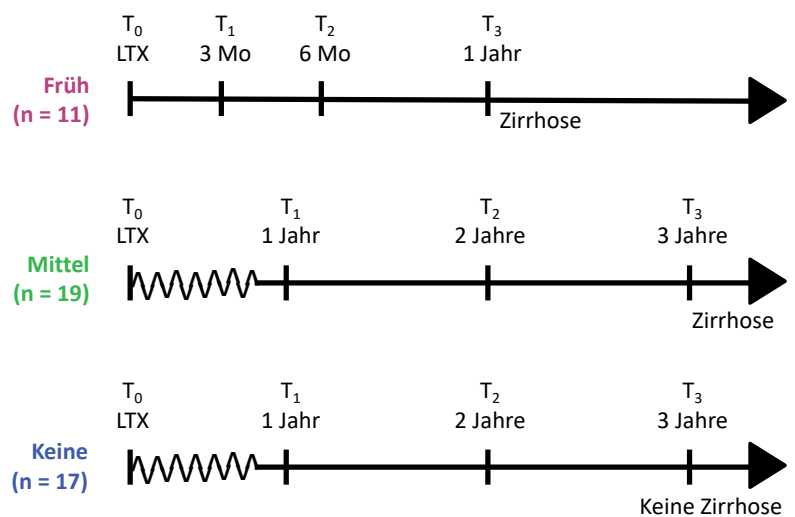


Abbildung 9 - Untersuchungszeitpunkte der Fibrosemarker in den Blutproben

T₀ Zeitpunkt der Lebertransplantation, T₁ erste Serumentnahme nach LT, T₂ zweite, T₃ dritte.

Blutproben waren in der frühen Gruppe nach 3, 6 und 12 Monaten posttransplant verfügbar, nach 1, 2 und 3 Jahren bei den Patienten, die nach 3 - 5 Jahren eine Rezirrhose zeigten und

bei denen, die auch nach 5 Jahren noch keine fortgeschrittene Fibrose in der Biopsie aufwiesen.

Bei den protokollarisch festgelegten Nachuntersuchungen erfolgten in zeitlich definierten Abständen Serumkontrollen und in etwas größeren Abständen auch Leberbiopsien. Bei klinischen Auffälligkeiten erfolgten zusätzliche Untersuchungen. Da die Patienten, die bereits im ersten Jahr nach LT eine Zirrhose entwickelten, auch schneller klinisch auffällig wurden, lagen hier vermehrt frühere Serumproben vor.

Die Entwicklung des ELF-Wertes und seiner Einzelparameter ist in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

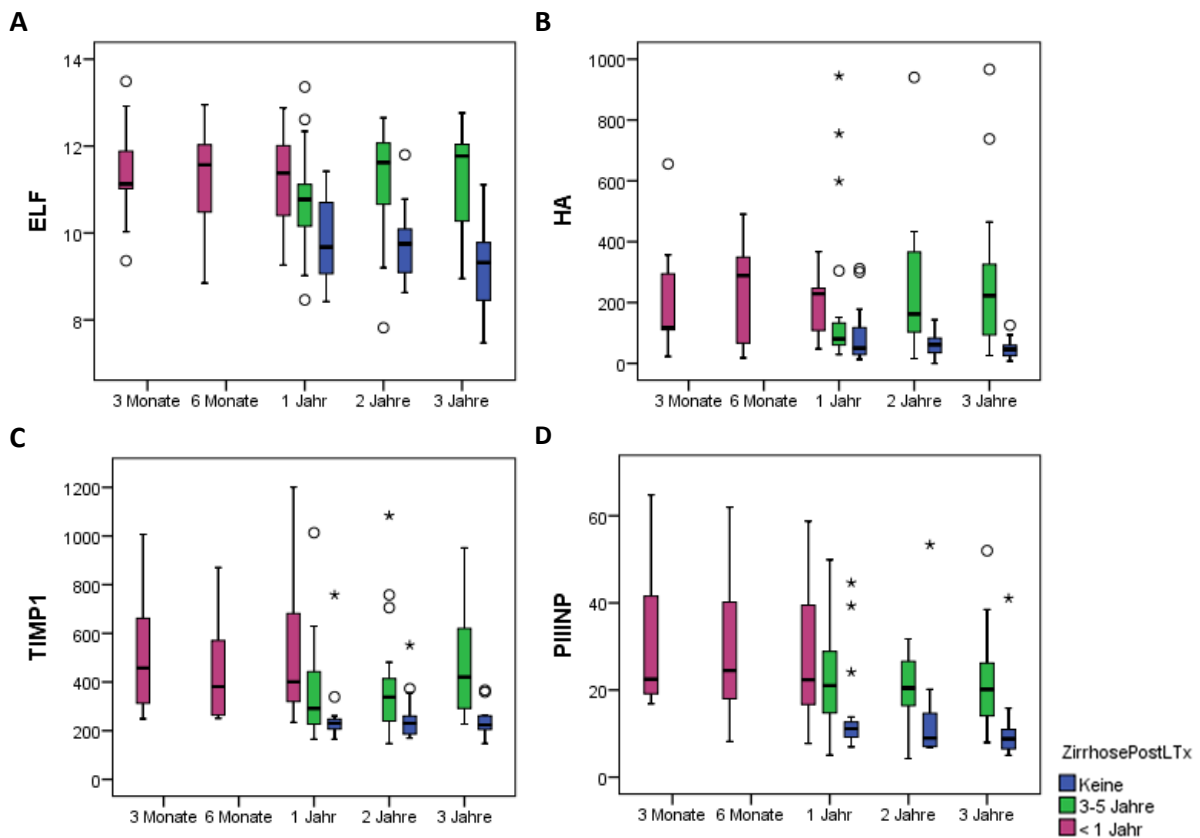


Abbildung 10 - Veränderung der Biomarker nach Transplantation

ELF-Score (A), HA (B), PIIINP (C) und TIMP-1 (D) in den Serumproben nach 3 und 6 Monaten sowie nach 1, 2 und 3 Jahren. HA, PIIINP und TIMP-1 in ng/ml.

Vor allem an den Werten der Ein-Jahres-Blutentnahme ist deutlich zu erkennen, dass die Mediane des ELF und der Einzelparameter in der Nonprogressor-Gruppe unterhalb der anderen beiden Zirrhosegruppen liegen. Im Verlauf der Jahre nahmen die Werte der Nonprogressor-Gruppe kontinuierlich ab, während sie in der mittleren Rezirrhosegruppe zunahmen.

4.3 Biomarker zur Fibrosemessung

Ein weiterer Schritt war die Untersuchung der diagnostischen Funktion des ELF-Wertes in unserem Kollektiv. Dazu wurden alle maximal 90 Tage vor oder nach einer Leberbiopsie entnommenen Serumproben betrachtet.

Die durch die histologische Auswertung der Leberbiopsien festgestellten Fibrosegrade nach Desmet (14) wurden einem ELF-Wert beziehungsweise seinen Bestandteilen zugeordnet. Für die Korrelation der Marker und der Fibrosegrade (s. Abbildung 11) wurde zusätzlich der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Dieser war für ELF ($r_s = 0,639$), HA ($r_s = 0,578$) und TIMP-1 ($r_s = 0,515$) auf dem 0,01 Niveau sowie für PIIINP ($r_s = 0,368$) auf dem 0,05 Niveau signifikant.

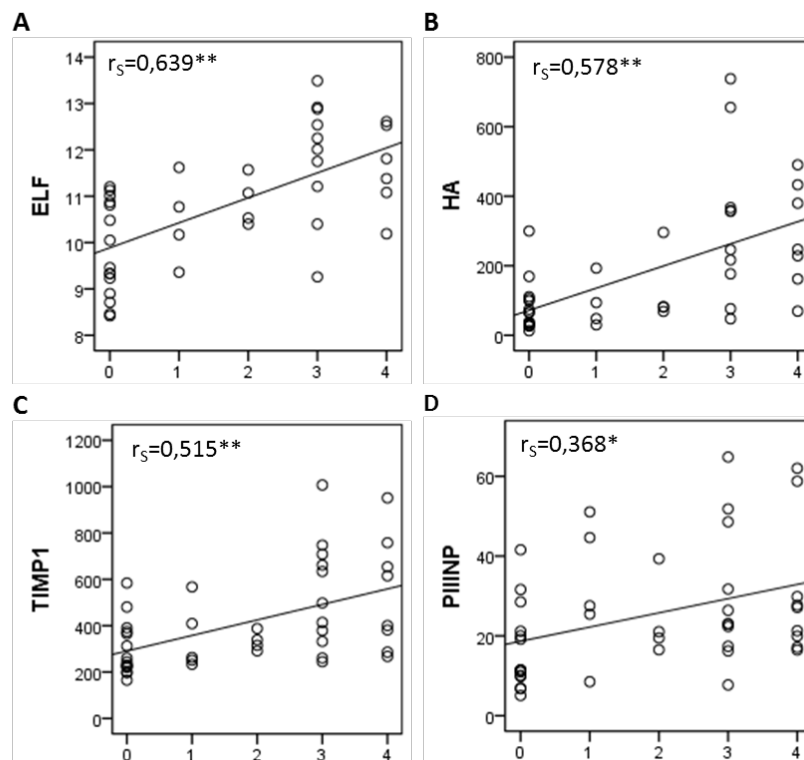


Abbildung 11 - Korrelation der Serummarker und Fibrosegrade nach Desmet

Fibrosegrad 0 - 4 nach Desmet, r_s : Korrelationskoeffizient nach Spearman

** auf 0,01 Niveau (2-seitig) signifikant, * auf 0,05 Niveau (2-seitig) signifikant

Zur besseren graphischen Übersicht wurden die Fibrosegrade 0/1 (keine, wenig Fibrose) und 3/4 (starke Fibrose, Zirrhose) zusammengefasst, sodass in Abbildung 12 drei Fibrosegruppen unterschieden werden. Die genauen Werte finden sich in Tabelle 3. Es zeigte sich ein sehr deutlicher Unterschied ($p_B = 0,0003$) für die Differenzierung des ELF-Wertes zwischen keiner/wenig Fibrose (Desmet 0/1) und starker Fibrose/Zirrhose (Desmet 3/4). Auch für TIMP-1 ($p_B = 0,001$) und HA ($p_B = 0,0002$) ergaben sich eindeutige Werte.

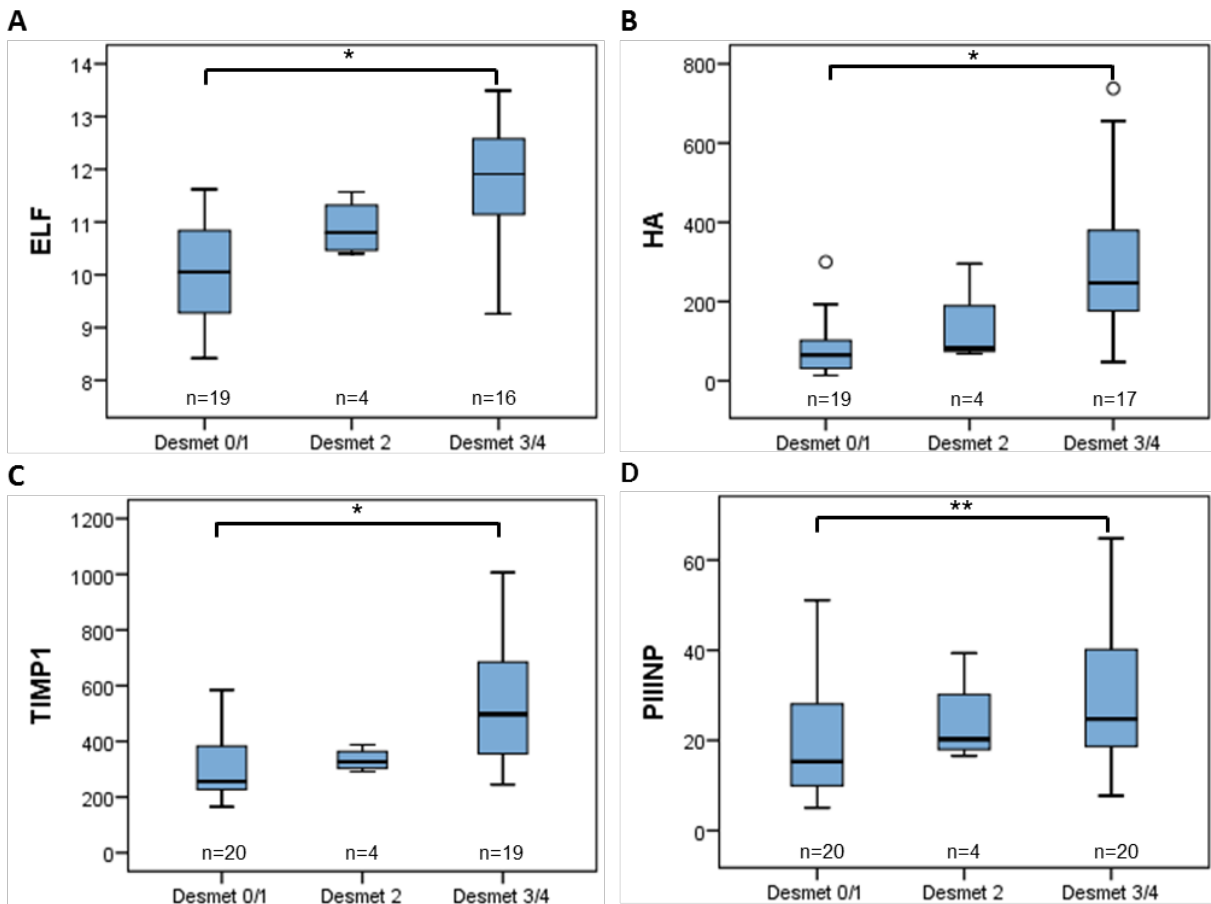


Abbildung 12 - Serummarker je nach Fibrosegruppe

* $p_B \leq 0,001$; ** nicht signifikant $p_B = 0,084$

Tabelle 3 - Konzentration der Serummarker je nach Fibrosegrad

Fibrosegrad	Desmet 0	Desmet 1	Desmet 2	Desmet 3	Desmet 4
ELF	9,46 (8,90-10,87)	10,47 (9,56-11,41)	10,80 (10,43-11,45)	12,13 (11,01-12,89)	11,60 (10,86-12,55)
HA [ng/ml]	65,13 (29,34-104,60)	71,11 (34,49-168,15)	81,66 (71,75-242,40)	301,28 (151,28-439,24)	246,89 (162,10-432,88)
TIMP1 [ng/ml]	243,80 (220,00-374,60)	263,30 (242,30-488,25)	326,90 (297,10-375,53)	498,00 (332,20-708,50)	507,85 (309,00-731,98)
PIIINP [ng/ml]	11,46 (9,83-21,18)	27,56 (16,98-47,85)	20,26 (17,27-34,77)	23,09 (17,38-48,58)	27,12 (18,54-44,31)

4.3.1 mRNA-Expression der Fibrosemarker

Einige der Biopsien konnten zusätzlich auf die Expression der mRNA verschiedener Fibrosemarker untersucht werden. Darunter fanden sich der aus dem ELF-Wert bekannte Gewebeinhibitor der Metalloproteinase 1 (als Gen: TIMP1 abgekürzt), Kollagen Typ I alpha 1 (COL1A1), der Wachstumsfaktor TGF- β 1 (TGF β 1), die Metalloproteinasen 1 und 9 (MMP1 und MMP9), das Zytokin PDGF β sowie das alpha smooth muscle actin (ACTA2). Die Rolle dieser Proteine bei der Entstehung der Fibrose wird in Kapitel 2.1.2 genauer erläutert.

Die Expression wurde durch eine quantitative PCR ermittelt. Die graphische Auswertung ist in Abbildung 13 zu sehen. Auch hier erfolgte eine Differenzierung abhängig vom Auftreten einer Rezirrhose in den bekannten Gruppen (schnell, mittel, keine). Außer für ACTA2 und MMP1 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der schnellen und der Nonprogressor-Gruppe.

In einem weiteren Schritt wurde die Korrelation zwischen der mRNA-Expression der Fibrosemarker und der im Blut gemessenen Serummarker überprüft (s. Abbildung 14). Um eine aussagekräftige Statistik zu erhalten, wurde wie bei dem Vergleich zwischen Serummarker und histologischer Auswertung darauf geachtet, dass die Biopsien zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie die Serumentnahme untersucht wurden. Vor allem die Expression von COL1A1 (Kollagen Typ I) zeigte eine positive Korrelation mit dem ELF-Wert (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman 0,617 ($p < 0,01$)). Aber auch für die Expression von PDGFb, TMP1, TGFb1, MMP9 und ACTA2 konnten Korrelationen nachgewiesen werden.

Um das Auftreten signifikanter Unterschiede in der mRNA-Expression zu berechnen, wurde das Kollektiv je nach ELF-Wert in zwei Hälften geteilt. Hierfür wurde der Median des ELF-Wertes bestimmt. Innerhalb dieses Kollektivs betrug er 11,07. ELF-Werte größer oder gleich 11,07 wurden als Risiko-ELF-Werte bezeichnet. Beim Vergleich der Gruppen fiel auf, dass mit Ausnahme der mRNA-Expression von MMP1 für alle untersuchten Gene signifikante Unterschiede bestanden. Die genauen p-Werte finden sich in Tabelle 4.

Tabelle 4 - Signifikanzen der mRNA-Expression je nach Risiko-ELF (\leq / $>$ 11,07)

Gen	COL1A1	PDGFb	TMP1	TGFb1	MMP1	MMP9	ACTA2
p-Wert	0,011	0,020	0,030	0,022	0,930	0,016	0,050

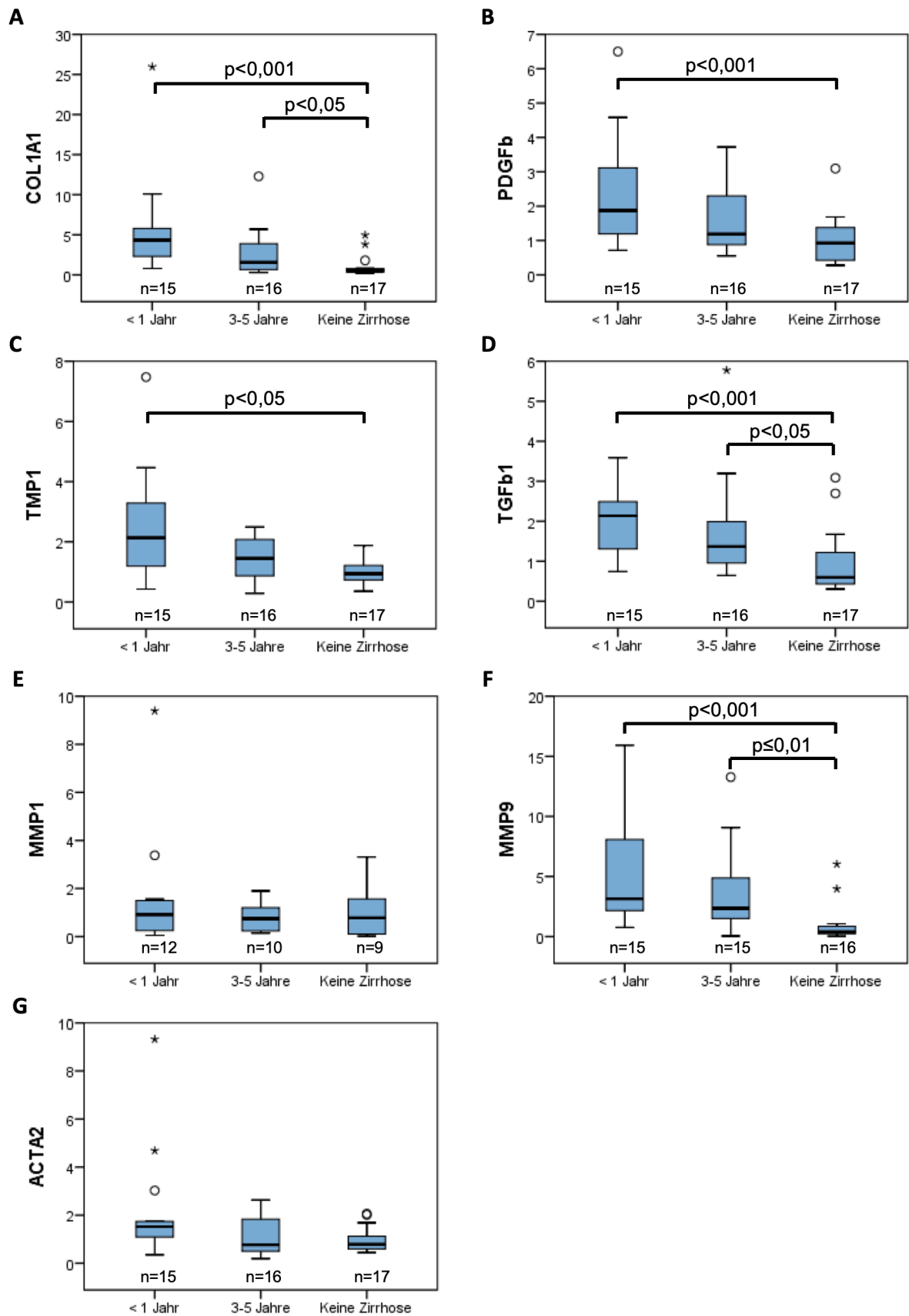


Abbildung 13 - mRNA Expression der Fibrosemarker

y-Achse: x-fache Expression der einzelnen Gene je nach Risikogruppe

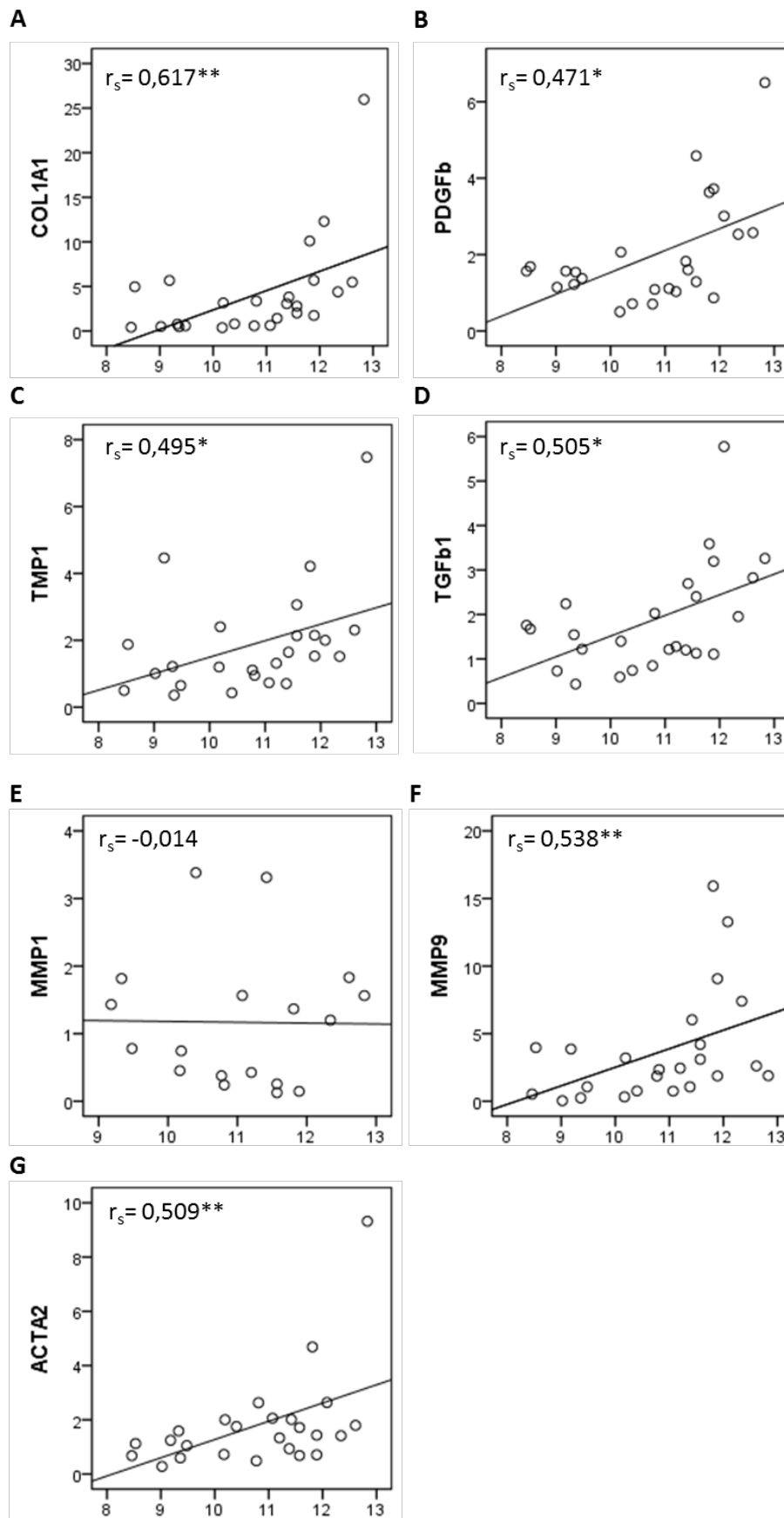


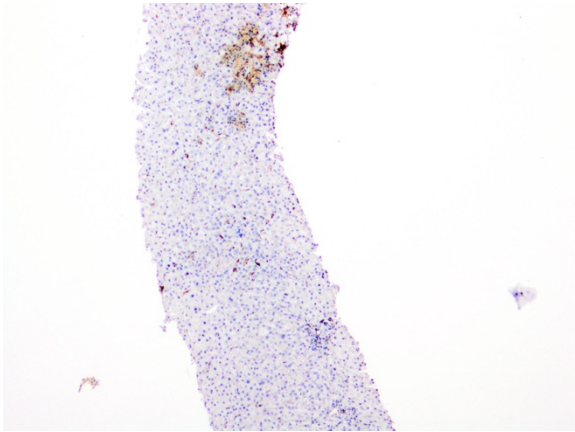
Abbildung 14 - Korrelation der mRNA-Expression der Fibrosemarker mit dem ELF-Wert

y-Achse: x-fache der einzelnen Gene je nach ELF-Wert; r_s : Korrelationskoeffizient nach Spearman; $^*p \leq 0,05$; $^{**}p \leq 0,01$

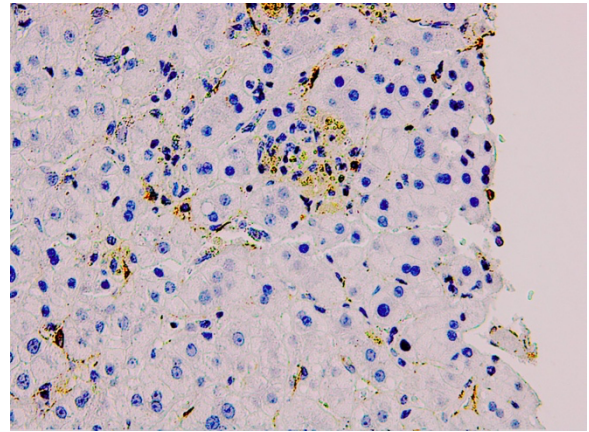
4.3.2 Immunhistochemische Färbung

In einem weiteren Schritt erfolgte für die Biopsien, die auf die mRNA-Expression der Fibrosemarker untersucht worden waren, eine immunhistochemische Färbung des alpha smooth muscle actin (α -SMA).

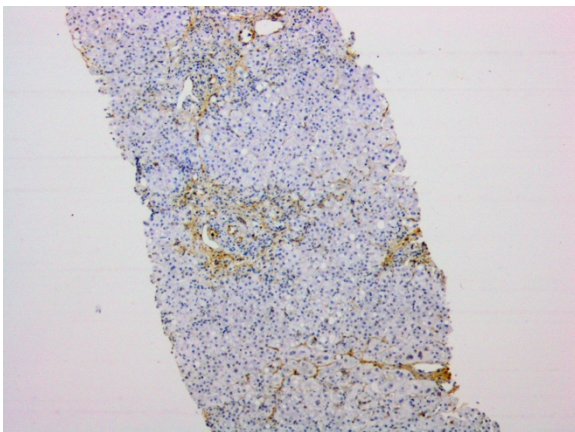
A1



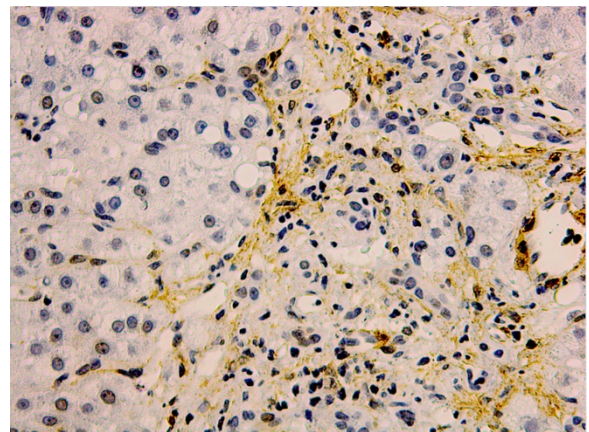
A2



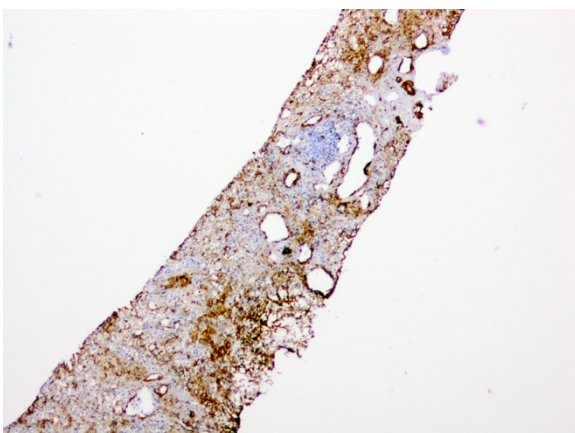
B1



B2



C1



C2

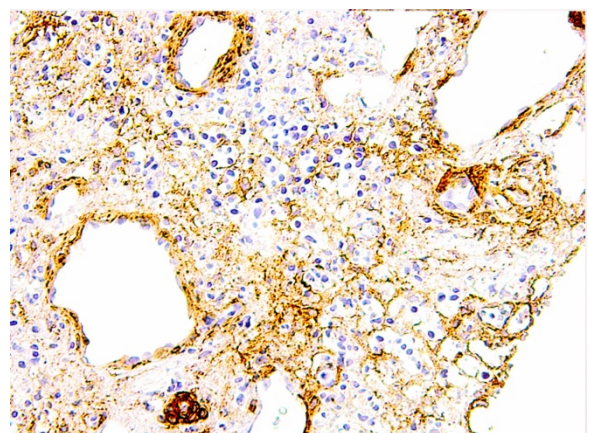


Abbildung 15 - α -SMA-Anfärbung

α -SMA wird braun dargestellt; A: wenig, B: mittel, C: viel Anfärbung; 1: Originalvergrößerung 4x, 2: Originalvergrößerung 20x

Die Präparate wurden histologisch ausgewertet und die Stärke der Färbungsintensität in wenig, mittel oder viel eingeteilt. Ein Beispiel für jede der drei Stufen zeigt Abbildung 15. Die Bilder A1 und A2 zeigen zwei verschiedene Vergrößerungen einer nur leicht fibrotischen Leber (F0/1), während B1 und B2 Ausschnitte einer stärker fibrosierten Leber darstellen (F2). Es fällt auf, dass in C1 und C2 die Zellkerne deutlich kleiner sind und das Gewebe viel dichter erscheint. Neben stärker ausgeprägten Septen ist entzündungszelliges Infiltrat zu sehen. Dies hängt zusammen mit der zirrhotischen Veränderung (F3/4) dieser Gewebeprobe.

Die Anfärbungsverteilung ist in Abbildung 16 visualisiert. Die Ergebnisse wurden je nach Zirrhosegruppe ausgewertet. Es fiel auf, dass nur in wenigen Präparaten (n = 7) eine besonders starke Anfärbung detektiert werden konnte. Den größten Anteil machten hier allerdings mit 57 % die Patienten der frühen Rezirrhosegruppe aus.

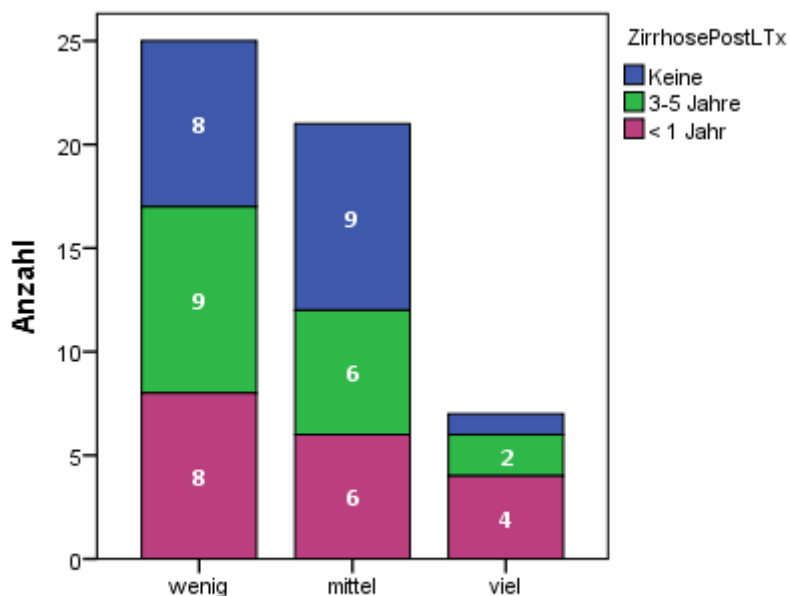


Abbildung 16 - Verteilung der α -SMA-Anfärbung

Anzahl der Präparate je nach Anfärbungsverhalten und Risikogruppe

Wie bei dem Vergleich zwischen Serummarker und histologischer Auswertung (s. Kapitel 4.3) wurde auch hier die Korrelation mit dem ELF-Wert untersucht. Es stellte sich heraus, dass Patienten, die initial einen hohen ELF-Wert aufwiesen (in der Serumprobe zum Zeitpunkt T₁), auch eine stärkere Anreicherung von α -SMA im Biopsat zeigten (s. Abbildung 17). Patienten, bei denen sich wenig α -SMA im Präparat nachweisen ließ, hatten einen signifikant niedrigeren ELF-Wert (Median 10,3; IQA 9,3 - 11,0) als Patienten, bei denen sich viel α -SMA darstellte (Median 11,4; IQA 11,0 - 12,2; p_B = 0,01).

Mithilfe der qPCR konnte, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, die mRNA-Expression des α -SMA (ACTA2) untersucht werden. Teil B der Abbildung 17 zeigt das Übereinstimmen zwischen immunhistochemischer Färbung und ACTA2-Expression des Biopsates. Eine geringe α -SMA-Anreicherung ging mit signifikant weniger ACTA2-Expression einher als bei hoher α -SMA-Anreicherung ($p = 0,01$).

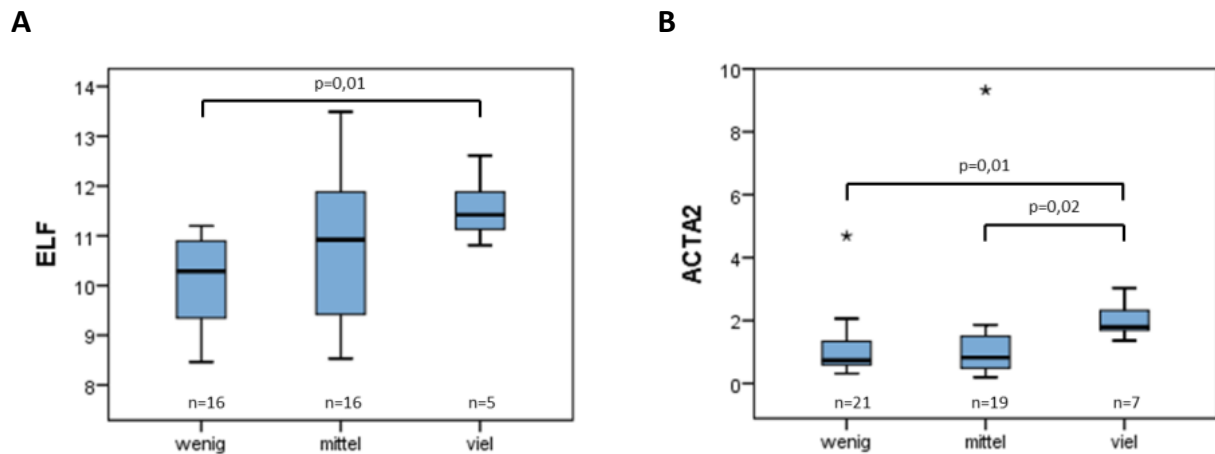
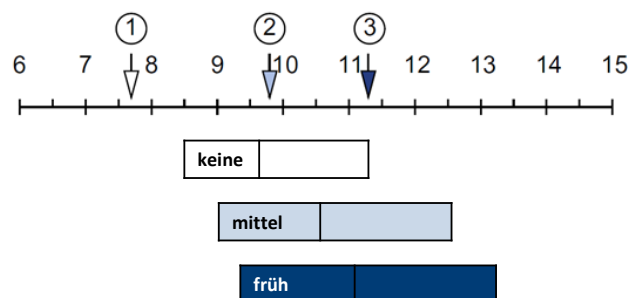


Abbildung 17 - ELF-Wert und ACTA2-Expression je nach α -SMA-Anreicherung

4.4 Zusammenhang zwischen Biomarker und Rezirrrose

Um den ELF-Wert als potenziell prädiktiven Marker für die Fibroseprogression nach LT zu identifizieren, wurden die Serumproben untersucht, die frühestmöglich nach der Transplantation zur Verfügung standen. Sie wurden je nach Zirrhosegruppe nach drei Monaten bzw. einem Jahr entnommen (entspricht T_1 in Abbildung 9 - Untersuchungszeitpunkte der Fibrosemarker in den Blutproben, S. 31).



- ① Hohe Sensitivität für Fibroseausschluss, ELF = 7,7
- ② Hohe Spezifität für Fibrosedetektion, ELF = 9,8
- ③ Hohe Spezifität für Zirrhosediskrimination, ELF = 11,3

Abbildung 18 - ELF-Scores der frühen Serumentnahme je nach Zirrhosegruppe

Die Boxen repräsentieren die 10. – 90. Perzentile, die horizontale Linie in der Mitte der Boxen den Median. Die Pfeile zeigen die cut-off Werte des ELF für Fibroseausschluss/-detektion bzw. Zirrhosediskrimination nach Lichtinghagen et al. (110)

Die Patienten, die innerhalb des ersten Jahres eine Zirrhose entwickelten, hatten im Median einen initialen ELF-Wert von 10,59 (9,39 - 11,14). Patienten, die keine fortgeschrittene Fibrose entwickelten, lagen mit 9,68 (8,98 - 10,86) deutlich unterhalb, erreichten aber nicht den von Lichtinghagen et al. festgelegten Ausschlusspunkt für Zirrhose (ELF = 7,7; s. Abbildung 18). Oberhalb des von Lichtinghagen et al. als mit hoher Spezifität festgelegten Wertes zur sicheren Zirrhosediskrimination (ELF = 11,3) liegen zum frühen Messzeitpunkt nur 8 Patienten. Hierunter befindet sich ein Drittel der Patienten mit Rezirrhose im ersten Jahr.

Es fiel auf, dass innerhalb der Zirrhosegruppen nicht nur die ELF-Werte, sondern auch die der TIMP-1, PIIINP und HA unterschiedlich waren. Die Mediane und IQA können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5 - Fibrosemarker zum Zeitpunkt T₁

Für alle Marker sind je nach Zirrhosegruppe der Median und der Interquartilsabstand angegeben

Fibrosemarker	Früh	Mittel	Keine
ELF	11,13 (10,53 - 12,40)	10,77 (9,91 - 11,14)	9,68 (8,98 - 10,86)
TIMP1 [ng/ml]	397,00 (303,30 - 687,00)	291,10 (217,20 - 453,60)	229,90 (201,93 - 249,28)
PIIINP [ng/ml]	20,31 (18,88 - 40,10)	21,05 (13,16 - 29,25)	11,12 (8,84 - 13,25)
HA [ng/ml]	117,56 (82,41 - 325,19)	80,26 (58,32 - 151,20)	49,88 (28,50 - 123,84)

Nach Bonferroni-Adjustierung ergaben sich folgende Signifikanzen für die Unterscheidung der Serumwerte zwischen der frühen Rezirrhose- und der Nonprogressor-Gruppe: $p_{\text{ELF}} = 0,024$; $p_{\text{TIMP1}} = 0,003$ und $p_{\text{PIIINP}} = 0,006$. Lediglich für HA zeigte sich mit $p_{\text{HA}} = 0,162$ kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen.

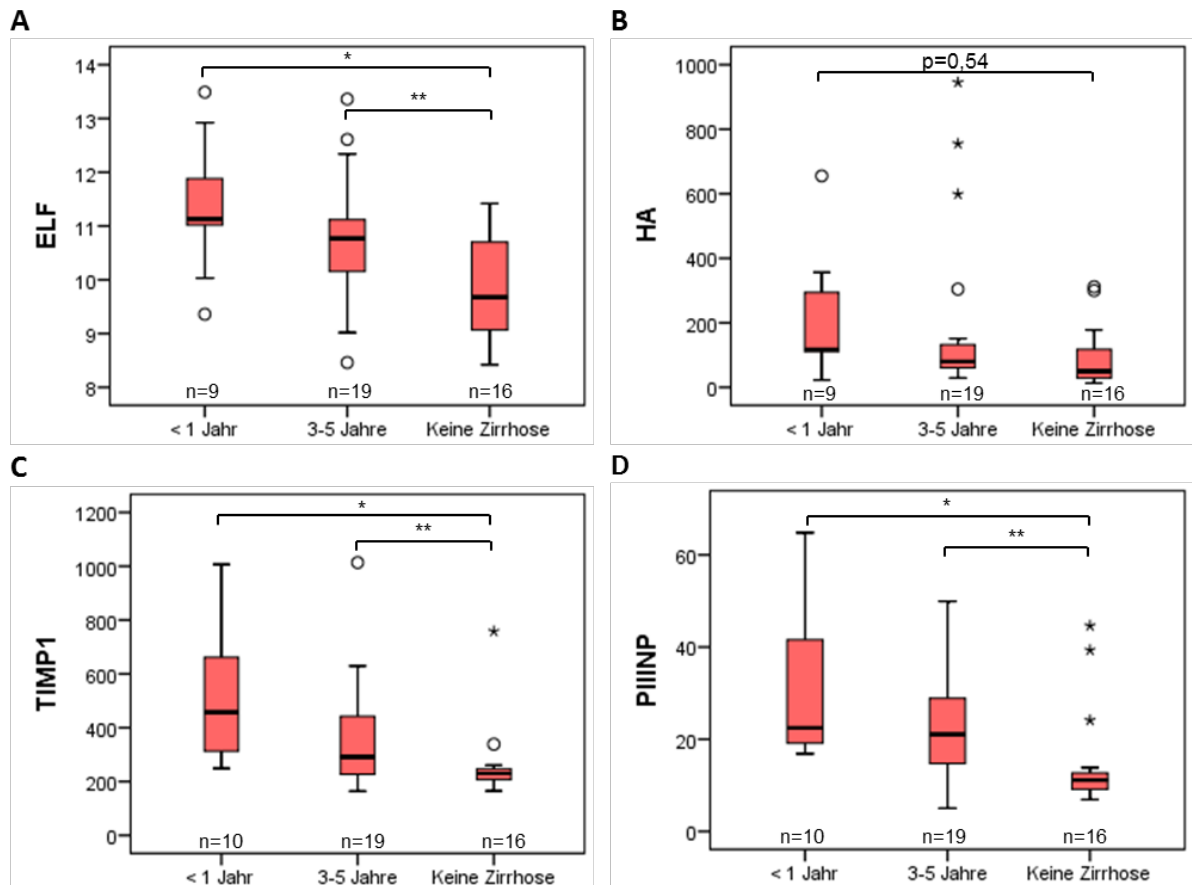


Abbildung 19 - Rezirrhose im Zusammenhang mit der frühen Serumentnahme

Vergleich der Seren zum Zeitpunkt T_1 der jeweiligen Rezirrhosegruppe, $*p_B < 0,03$, $**p < 0,05$
 ELF: Enhanced Liver Fibrosis-Wert, HA: Hyaluronsäure (ng/ml), TIMP1: Gewebehinhibitor der Metalloproteinase 1 (ng/ml), PIIINP: N-terminales Propeptid des Prokollagen Typ III (ng/ml)

Abbildung 19 stellt graphisch die Unterschiede zwischen den jeweiligen Rezirrhosegruppen zum Zeitpunkt T_1 dar. Mit Ausnahme der Hyaluronsäure zeigten sich auch zwischen der mittleren und der Nonprogressor-Gruppe deutliche Unterschiede ($p < 0,05$).

Es bestätigt sich, dass eine frühe Rezirrhose mit einem initial hohen ELF-Wert einhergeht, während ein niedrigerer ELF ein langsames oder ausbleibendes Fortschreiten der Fibrose vermuten lässt. Dies wird durch das korrelierende Verhalten der Einzelparameter TIMP-1 und PIIINP zusätzlich unterstützt.

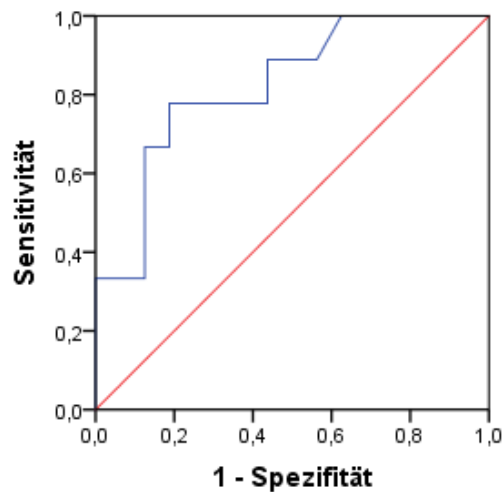


Abbildung 20 - ROC-Kurve für ELF als quantitativen Prädiktor ein Jahr nach LT für Rezirrhose innerhalb des ersten Jahres versus keine fortgeschrittene Fibrose nach 5 Jahren (n = 9)

Berechnung mit ELF-Wert der frühen Serumentnahme (T_1). Differenzierungskriterium ist das Wiederauftreten der Rezirrhose im ersten Jahr nach LT im Vergleich zum Ausbleiben der fortgeschrittenen Fibrose innerhalb der ersten 5 Jahre nach LT. Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Die ROC-Kurve in Abbildung 20 zeigt die prädiktiven Wertigkeiten des ELF-Wertes drei Monate nach LT für das Wiederauftreten der Zirrhose ein Jahr nach LT. Die AUROC beträgt 0,823 (95 % KI 0,653 - 0,993). Bei einem ELF-Wert von 11,02 liegt die Sensitivität des ELF-Tests für die Prädiktion einer Leberzirrhose innerhalb des ersten Jahres nach LT bei 77,8 % und die Spezifität bei 81,2 %. Der positiv prädiktive Wert liegt bei 0,67, der negativ prädiktive Wert bei 0,81.

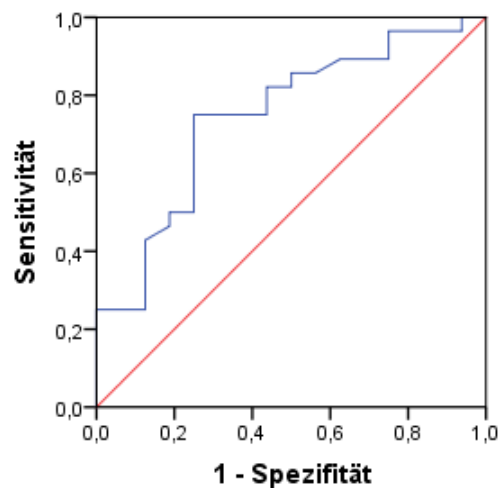


Abbildung 21 - ROC-Kurve für ELF als quantitativen Prädiktor 5 Jahre nach LT für Rezirrhose versus keine fortgeschrittene Fibrose (n = 28)

Berechnung mit ELF-Wert der frühen Serumentnahme (T_1). Differenzierungskriterium ist das Wiederauftreten der Rezirrhose überhaupt in einem Zeitraum von 5 Jahren. Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

In Abbildung 21 wird die ROC-Kurve für die prädiktiven Wertigkeiten des ELF-Werts für die Zeit 5 Jahre nach der Transplantation dargestellt. Auch hier ergibt sich eine signifikante AUROC von 0,746 (95 % KI 0,594 - 0,898). Bei dem initial durchgeführten ELF-Test wird ein Cut-Off-Wert von ELF = 10,40 empfohlen, bei dem sowohl Sensitivität als auch Spezifität 75 % betragen. Der positiv prädiktive Wert liegt bei 0,81, der negativ prädiktive Wert bei 0,57.

Tabelle 6 - Zusammenfassung ROC-Kurven

	Rezirkhose < 1 Jahr	Rezirkhose ≤ 5 Jahre
AUROC (KI 95 %)	0,823 (0,653 - 0,993)	0,746 (0,594 - 0,898)
Cut-Off ELF	11,02	10,40
Sensitivität	77,8 %	75,0 %
Spezifität	81,2 %	75,0 %
Positiv prädiktiver Wert	0,67	0,81
Negativ prädiktiver Wert	0,81	0,57

5 Diskussion

5.1 Diagnostische Funktion des ELF-Tests

Es ist bekannt, dass der ELF-Test als nicht-invasiver diagnostischer Test zur Detektion der Leberfibrose eingesetzt wird. Allerdings wurde er noch nicht für Patienten nach Lebertransplantation validiert. Deshalb wurde vor Betrachtung der prognostischen Funktion des Tests überprüft, wie genau der ELF-Test das aktuelle Fibroestadium bei Patienten nach LT beschreibt.

Bei der Korrelationsberechnung mit dem Fibrosegrad nach Desmet zeigte sich, dass der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman für den ELF-Wert am höchsten ausfiel ($r_s = 0,639$). Aber auch für die Einzelkomponenten des ELF-Tests konnte eine signifikante Korrelation mit dem Fibrosegrad nachgewiesen werden. Dass der ELF als kombinierter Test die beste Korrelation zeigt, hängt mit der geringeren Streuung der ELF-Werte zusammen. Dies wird durch die logarithmische Berechnung erzielt. Er wird dadurch robuster gegenüber Ausreißern der drei Einzelkomponenten. Eine zehnfach höhere TIMP-1 Konzentration würde beispielsweise nur zu einem ELF-Wert Anstieg von 0,9 führen. (111)

In den meisten Studien wird hervorgehoben, dass der ELF-Test vor allem geeignet ist, eine schwere Fibrose zu diagnostizieren. (2, 76) Allerdings können sich Schwierigkeiten bei der Differenzierung zwischen leichten und moderaten Fibroestadien zeigen. (112) Dies konnte auch im Rahmen der Auswertung unseres Kollektivs bestätigt werden. (s. Abbildung 12) Es zeigten sich deutliche Signifikanzen für die Differenzierung des ELF-Wertes zwischen F0/1 und F3/4. Kein signifikanter Unterschied, weder bei dem ELF-Wert noch bei dessen Einzelkomponenten, war zwischen der mittleren Fibrosegruppe (F2) und der jeweils höheren bzw. niedrigeren Gruppe nachweisbar. Diese Aussage ist allerdings vor dem Hintergrund zu betrachten, dass die Fallzahlen für Patienten mit dem Fibrosegrad F2 sehr gering waren (n = 4 Patienten mit je 3 Zeitpunkten).

Zudem fiel auf, dass für PIIINP nach Bonferroni-Adjustierung kein signifikanter Unterschied zwischen schwerer und keiner Fibrose festgestellt werden konnte. In Abbildung 11 zeigt sich vorerst eine Korrelation von PIIINP mit dem Fibrosegrad. Bei Betrachtung der Mediane in Tabelle 3 (Konzentration der Serummarker je nach Fibrosegrad) fällt jedoch auf, dass die PIIINP-Werte keine deutliche Kontinuität mit dem ansteigenden Fibrosegrad zeigen. In den meisten Studien wird PIIINP als geeigneter Serummarker für die Fibrosediagnostik

identifiziert. (2, 75, 113) Die anderen beiden ELF-Einzelparameter HA und TIMP-1 sowie der ELF-Wert selbst erzielen allerdings sehr gute Ergebnisse. Da die generelle Korrelation von PIIINP und dem Fibrosegrad besteht, sind die Schwankungen vermutlich auf die im Literaturteil beschriebenen physiologischen Veränderungen der PIIINP Freisetzung zurückzuführen. So können auch bei der Fibrolyse geringe Mengen an PIIINP freigesetzt werden und im akut entzündeten Zustand der Leber ist die Produktion ebenfalls erhöht. (87)

Um die in unserem Kollektiv ermittelten ELF-Werte besser einordnen zu können, lohnt auch ein Blick auf die Referenzwerte, die der Hersteller Siemens für den ELF-Test angibt. Sie sind im Kapitel 2.2.2.2 Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test aufgeführt. (1) Dort wird ein ELF-Wert $\geq 9,8$ mit schwerer Fibrose gleichgesetzt. Bei den lebertransplantierten Patienten unseres Kollektivs wurde dieser Wert jedoch schon bei den histologischen Auswertungen mit Fibrosegrad F0/F1 nach Desmet erreicht. Der ELF lag hier im Median bei 10,47 mit einem IQA von 9,56 - 11,41. Für diese Patienten wird vom Hersteller ein Wert $< 7,7$ beschrieben. Ein ELF-Wert $< 7,7$ wurde nur bei einer der insgesamt 138 ausgewerteten Serumproben festgestellt.

Lichtinghagen et al. überprüften in ihrer Studie diese Werte an 400 gesunden Kontrollen und 79 Patienten mit Hepatitis C. Im Rahmen der Analyse der gesunden Kontrollen traten Werte $< 7,7$ eher selten und vor allem bei jungen Frauen < 60 Jahren auf. Sie empfehlen deshalb an Alter und Geschlecht angepasste Referenzwerte. Solche Werte liegen zum aktuellen Zeitpunkt allerdings noch nicht vor, weshalb ein an die Einflussfaktoren angepasster Vergleich der Werte nicht möglich ist. Zudem ermittelten sie auch einen besser geeigneten Grenzwert für die Unterscheidung fortgeschrittener Fibrose/Zirrhose von beginnender Fibrose. Ein Test-Ergebnis über 11,3 reicht demnach als Staging für die Leberzirrhose aus und eine Biopsie wird nicht benötigt. (2) Der Median der Fibrosegruppe mit einem Desmet 3/4 erfüllt mit 11,91 dieses Kriterium. Die Metaanalyse von Xie et al. zeigt allerdings, dass die in den neun von ihnen betrachteten Studien ermittelten Grenzwerte für die FibroseEinstufung um bis zu zwei Einheiten variieren. So ergab sich eine Spannweite von 8,5 - 10,18 für eine signifikante Fibrose, 9,33 - 10,51 für eine schwere Leberfibrose und 9,35 - 11,3 für die Zirrhose. Dem ELF-Test wird trotzdem eine hohe diagnostische Genauigkeit zugesprochen, was durch die ebenfalls durchgeführten ROC-Analysen bestätigt wird. Die Unterschiede führen Xie et al. auf die Heterogenität der Teststrukturen der Studien, wie beispielsweise zum Teil leicht unterschiedliche Algorithmen zurück. Zudem wurden fünf verschiedene histologische Staging

Systeme verwendet. (47) Die derzeitige Abhängigkeit von der histologischen Validierung neuer Tests stellt ein generelles Problem dar. Die Leberbiopsie weist, wie im Literaturteil ausführlich beschrieben, selbst viele Ungenauigkeiten auf. So kann die Heterogenität der diagnostischen Genauigkeit des ELF- und anderer nicht-invasiver Tests sekundär zu den intrinsischen Fehlern der Leberbiopsiemessungen sein. (114, 115)

Um den potenziell diagnostischen Fehlern der rein histologischen Auswertung der Leberbiopsien entgegenzuwirken, untersuchten wir die Proben auch auf molekulargenetischer und immunhistochemischer Ebene.

Bei den untersuchten Genen handelt es sich um Schlüsselgene der Leberfibroseentstehung. (116-118) Sie kodieren für Marker der Fibrogenese und Fibrolyse und helfen dabei, den ELF-Wert auch auf molekularer Ebene zu validieren und die Korrelationen zu überprüfen.

Dafür erfolgte in einem ersten Schritt der Vergleich der relativen Expressionsraten je nach Rezirrhose-Gruppe (s. Abbildung 13). Hier zeigte sich, dass die Patienten mit früher Rezirrhose auch deutlich höhere Expressionsraten der Fibrosemarker hatten. Die besten Korrelationen ergaben sich für die Gene, die für Kollagen Typ I alpha 1 ($r_s = 0,617$), die Metalloproteinase 9 ($r_s = 0,538$) und für das alpha smooth muscle actin ($r_s = 0,509$) kodieren.

Das $\alpha 1(I)$ Kollagen wird, ebenso wie das α -SMA, von aktivierten Sternzellen produziert. Die Synthese des Kollagen 1 wird von vielen verschiedenen Zytokinen, u. a. TGF- β beeinflusst. Die Messung der Expressionsrate des COL1A1 ist deshalb ein guter Parameter, um die Fibrose Ätiologie-unspezifisch zu bestimmen. (21, 61) Auch der ELF-Test wird als Diagnostikum für die verschiedenen Ursachen der Leberfibrose eingesetzt. Die positive Korrelation unterstreicht somit die diagnostische Funktion des Tests.

Die erhöhte MMP-9 Expression kann ein Indiz für die frühe Leberschädigung sein, noch vor Beginn der Fibrosierung der Leber. (119) Sie geht einher mit der Entzündungsrate des Gewebes. Hierbei erfolgt die Synthese der Metalloproteinase vor allem in aktivierten HSC, Lymphozyten und Neutrophilen. (120, 121) Da bei ihrer Erhöhung meist noch keine Fibrose vorliegt, ist keine Korrelation mit dem Fibrosegrad beschrieben. (117) Unsere Ergebnisse zeigten, dass eine erhöhte MMP-9 Expression stark mit der schnellen Rezirrhose im ersten Jahr zusammenhängt. Außerdem korrelierte die erhöhte Expressionsrate auch sehr gut mit dem ELF-Wert, was dessen früh-diagnostischen Einsatz zur Fibrosedetektion unterstreicht.

Wie schon beschrieben, kodiert das Gen ACTA2 für α -SMA, welches ein fibrosetypischer Bestandteil des Zytoskeletts der HSC ist. Dementsprechend ist die Genexpression bei fortschreitender Fibrose erhöht. (65, 122) Wie das COL1A1 ist es eines der Schlüsseltene, die die Fibroseprogression anzeigen. Es überrascht also nicht, dass sich eine Korrelation der Genexpression mit dem ELF-Wert zeigte.

Die fibrosetypischen Vorgänge auf histologisch-molekularbiologischer Ebene werden vom serumspezifischen ELF-Test gut widerspiegelt. Dies wird durch die Korrelationen mit weiteren fibrosespezifischen Markern wie dem TGF β 1, dem TMP1 und dem PDGF β bestätigt.

Lediglich eine Korrelation des ELF-Wertes mit der Expression der Metalloproteinase 1 konnte nicht nachgewiesen werden. Auch konnte die erhöhte Expression die Fibroseprogression nicht vorhersagen. Die Aussagen der Literatur zur MMP-1 Produktion in der Fibrogenese bzw. Fibrolyse sind unterschiedlich. (21, 110, 117, 123) Zwar findet man ihre mRNA in HSC, Makrophagen und Hepatozyten, allerdings bleibt die Expression während der Fibrose meist konstant. (119, 124) Die Korrelation mit dem Fibrosegrad ist deshalb oft insignifikant. (125)

Die zweite studieninterne Validierung der ELF-Werte erfolgte mittels der immunhistochemischen Färbung der Lebergewebeproben zur Darstellung der α -SMA-positiven HSC. Das bereits im Literaturteil beschriebene Aktin wird, wie das Kollagen I, von aktivierten HSC produziert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur eine kleine Anzahl von Proben untersucht werden. Deshalb erfolgte die Auswertung der α -SMA-Anfärbung in drei Stufen: wenig, mittel und viel Anfärbung, anders als beispielsweise bei Elzamy et al. wo in fünf Stufen unterschieden wurde. (66)

Es konnte nachgewiesen werden, dass die α -SMA-Produktion die Aktivierung der HSC und damit einen entscheidenden Teil der Fibrogenese widerspiegelt. (62, 126) Somit ließ sich vermuten, dass eine stärkere Anfärbung mit einer gesteigerten Fibrogenese einhergeht. Abbildung 16 zeigt die Verteilung der Proben je nach Rezirrhosegruppe. Es ist eine schwache Tendenz zu erkennen, auch wenn nur etwas mehr als die Hälfte der IHC-Färbungen mit viel α -SMA von Patienten stammen, die innerhalb des ersten Jahres eine Rezirrhose entwickelten. Eine größere Fallzahl hätte vermutlich zu statistisch eindeutigeren Ergebnissen geführt. Gegebenenfalls hätte dann auch eine Korrelation mit dem Fibrosegrad nach Desmet nachgewiesen werden können.

Laut Varma et al. kommt es schon zu Beginn der fibrotischen Veränderungen im Leberparenchym zur vermehrten α -SMA-Produktion. Es lässt sich also annehmen, dass auch das α -SMA als prädiktiver, wenn auch invasiver Marker für die Fibroseprogression eingesetzt werden kann. (66, 127) Deshalb untersuchten wir den Zusammenhang des initialen ELF-Wertes mit der Färbungsintensität der zugehörigen Biopsien. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Färbungsintensitäten. Dies unterstreicht erneut die diagnostische und prognostische Funktion des ELF-Tests im Rahmen der Fibrogenese. Ein medianer ELF-Wert von 11,4 korrelierte mit einer hohen α -SMA-Produktion und -Anfärbung im Biopsat und damit mit einer schnellen Rezirrhose post LT. Auch der Abgleich der Färbungsintensität mit der ACTA2-Genexpression bestätigte den positiven Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression in der qPCR und der immunhistochemischen Protein-Färbung.

Somit spricht nicht nur die klassische histologische Auswertung für die diagnostische Präzision des ELF-Tests für Fibrose, sondern sie wird auch auf molekulargenetischer und immunhistochemischer Ebene bestätigt. Zudem lässt die gute Korrelation mit den zu Beginn der Fibrose vermehrt produzierten Markern bereits die prädiktive Funktion des ELF-Tests vermuten, die im nächsten Kapitel diskutiert wird.

5.2 Einsatz des ELF-Test zur Fibroseprädiktion nach LT

Patienten nach LT sind nicht vor einer Rezirrhose geschützt. Die Geschwindigkeit der Fibrosierung im ersten Jahr nach LT ist entscheidend für die Überlebenszeit des Transplantats. Die Identifizierung gefährdeter Patienten ist von großer Bedeutung, da sie den frühzeitigen Beginn einer Therapie ermöglicht und damit das Transplantat vor der Entwicklung signifikanter Schäden schützen kann. (128)

Der Fokus der aktuellen Forschung liegt dabei auf der Untersuchung nicht-invasiver Methoden, die zum einen den aktuellen Fibrosegrad widerspiegeln können und zum anderen eine mögliche Fibroseprogression vorhersagen.

Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit Rezirrhose innerhalb des ersten Jahres lag bei 5,94 (KI 95 % 1,44 - 10,44) Jahren und nur 18,2 % dieser Gruppe überlebten 10 Jahre. Dies ist im Vergleich zu den aktuellen 10-Jahresüberlebensraten, die im Falle der meisten LT-Indikationen sogar die 70 % übersteigen, ein erschütterndes Ergebnis. (129)

Die Untersuchung der Serumwerte im Verlauf der Zeit (T_1 - T_3 , s. Abbildung 10 - Veränderung der Biomarker nach Transplantation) lässt erkennen, dass die Patienten, die eine frühe Rezirrhose erlitten, deutlich höhere ELF-Werte beziehungsweise Fibrosemarker-Konzentrationen zeigen. Bei Betrachtung der Werte der frühen Rezirrhosegruppe, die nach 3, 6 und 12 Monaten verfügbar waren, fällt auf, dass mit Ausnahme des TIMP-1 sowohl der ELF-Wert als auch die Serumkonzentrationen von HA und PIIINP zum Zeitpunkt T_2 am höchsten waren. Dies entspricht in dieser Gruppe einem Zeitpunkt etwa 6 Monate nach LT. Normalerweise wird für lebertransplantierte Patienten erst ein Jahr nach der Operation eine Biopsie empfohlen. Hierdurch sollen Risikopatienten rechtzeitig detektiert werden. (130) Die Patienten der schnellen Progressor-Gruppe wiesen allerdings bereits in der Einjahresbiopsie zirrhotische Veränderungen (F3/4) auf. Auch Zimmermann et al. zeigten in ihrer Studie, dass für rezirrhatische HCV-Patienten nach LT oftmals die Einjahresbiopsie zu spät kommt. Deshalb empfehlen sie eine vollständige Evaluation nach 6 Monaten einschließlich einer Leberbiopsie. (30)

Auch Crespo et al. empfehlen die frühere Untersuchung der Lebertransplantierten. Ein halbes Jahr nach LT hat sich die gesundheitliche Situation der meisten Patienten stabilisiert und der Verletzungsgrad des Transplantats ist in der Regel gering. (128) Die Studie von Crespo et al. untersuchte nicht-invasive Tests auf die prädiktive Aussagekraft in einem Kollektiv HCV positiver Patienten mit hohem Rezidivrisiko. Es zeigte sich, dass APRI, FIB-4 und ELF bereits 6 Monate nach LT Risiko-HCV-Patienten identifizieren konnten.

Für die Abgrenzung der Risiko-Patienten berechneten Crespo et al. Grenzwerte der jeweiligen Tests. Auch wir berechneten mittels ROC-Analyse einen Grenzwert für den ELF-Test, der die Patienten, die bereits im ersten Jahr nach LT eine Rezirrhose entwickeln, von den anderen Patienten unterscheiden kann. Bei Patienten mit einem ELF-Wert von 11,02 drei Monate nach LT kann mit 77,8 % Sensitivität und 81,2 % Spezifität die Rezirrhose innerhalb des ersten Jahres nach LT vorhergesagt werden. Zur besseren Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Studien wurde auch die prädiktive Funktion des ELF-Werts bei der Abnahme 6 Monate nach LT überprüft. Obwohl sich zu diesem Zeitpunkt die höchsten ELF-Werte messen ließen, zeigten sich hier eine etwas geringere Sensitivität (66,7 %) und Spezifität (93,7 %) für einen ELF-Wert von 11,32 als Grenzwert.

Crespo et al. ermittelten einen ELF von $\geq 10,5$ als Cut-Off-Wert für die Identifikation für Risiko-HCV-Patienten nach LT. Dieser ist etwas niedriger als die 11,02 beziehungsweise 11,32, die sich bei unserer Analyse der ELF-Werte drei/sechs Monate post-LT ergaben. Der Vergleich der AUROC (Crespo: 0,827; 3 Monate: 0,823; 6 Monate: 0,792) führt ebenfalls zu dem Schluss, dass in unserem Kollektiv die besten prädiktiven Werte für die Rezirrhose innerhalb des ersten Jahres schon mithilfe der Seren zum Zeitpunkt T_1 erreicht werden. Pungpapong et al. untersuchten in ihrer Studie die Serum- und Gewebeproben drei bis acht Monate post-LT. Sie geben zu bedenken, dass in der unmittelbar postoperativen Periode die Leber noch stark durch mögliche Infektionen, eine eingeschränkte Durchblutung, die Wiederaufnahme der Gallenfunktion und immunologische Effekte belastet sein kann. Die frühen Serumwerte können deshalb auch Parenchymverletzungen und Wundreaktionen widerspiegeln. (131) Allerdings zeigten sowohl bei ihnen die frühe HA-Konzentration als auch bei uns die Serummarker, dass sie eine hohe Vorhersagekraft für das Fortschreiten der Fibrose haben. Dennoch kann dies eine Erklärung für den Unterschied zum ELF-Schwellenwert der Studie von Crespo sein.

Betrachtet man diese Ergebnisse, lässt sich vermuten, dass für die Prädiktion der Rezirrhose nach LT früh entnommene Serumwerte eine sehr gute Aussage über die Fibroseprogression zulassen. Zu welchem Zeitpunkt genau der ELF-Wert die besten prädiktiven Aussagen macht, müsste allerdings in einer prospektiv angelegten Studie mit einer großen Patientenzahl überprüft werden. Sicher ist jedoch, dass dieser Messzeitpunkt nicht erst ein Jahr nach LT liegen sollte.

Eine weitere wichtige Erkenntnis konnten wir durch die lange Beobachtungszeit der Patienten gewinnen. Für Patienten, die im ersten Jahr noch keine Auffälligkeiten bezüglich einer Rezirrhose aufwiesen, zeigte sich in der Serumentnahme ein Jahr nach LT bereits ein deutlicher Unterschied zwischen den Patienten, die nach 3 - 5 Jahren eine Rezirrhose entwickelten und zwischen denen, die auch nach 5 Jahren noch ohne fortgeschrittene Fibrose waren. Betrachtet man hier den Verlauf der Werte innerhalb der ersten drei Jahre, fällt auf, dass die Serumwerte der Fibrosemarker für die Nonprogressor deutlich sanken, während sie in der mittleren Rezirrhosegruppe kontinuierlich stiegen, beziehungsweise im Falle von PIIINP konstant erhöht blieben (Abbildung 10). Auch die ROC-Analyse zur Schwellenwert Ermittlung des ELF zeigte, dass bei einem ELF von 10,40 das Wiederauftreten einer Zirrhose innerhalb

von 5 Jahren nach LT mit 75 % Sensitivität und Spezifität vorhergesagt werden kann (AUROC: 0,746 (95 % KI 0,594 - 0,898)).

Parkes et al. zeigten, dass der ELF-Test als prädiktiver Marker zur Langzeitprognose für Patienten mit CLD eingesetzt werden kann. (81) Ihre Analyse ergab für einen ELF-Wert von 9,49, dass das Auftreten eines Leber-assoziierten Ereignisses innerhalb eines 6-Jahre langen Zeitraums mit einer Sensitivität von 84 % und einer Spezifität von 81 % vorhergesagt werden kann (AUROC: 0,87). Im Gegensatz zu Crespo et al. wurden hier deutlich mehr Ätiologien mit einbezogen (u. a. HCV, ALD, NASH, PBC, AIH), wodurch sich eine größere Relevanz im Vergleich mit unseren Ergebnissen ergibt.

Ein Nachteil der Studie von Parkes war, dass die Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme nicht dasselbe Ausmaß der chronischen Lebererkrankung zeigten. Es bleibt auch unklar, welche Therapien vor Aufnahme in die Studie eingesetzt wurden und eventuell zu einer temporären Verbesserung der CLD und damit auch einer Senkung der ELF-Werte geführt haben könnten. Die Spenderlebern, die unsere Patienten erhielten, waren durch unterschiedliche Spenderkriterien (unterschiedliches Alter etc.) ebenfalls nicht auf dem exakt gleichen gesundheitlichen Ausgangsniveau. Sie erfüllten jedoch die Spenderkriterien und stellen damit ein homogeneres Ausgangskollektiv dar als das von Parkes et al. Dies kann ein Grund dafür sein, warum der Schwellenwert bei Parkes etwas weniger als eine Einheit unter unserem liegt. Auch die unterschiedlichen Zeiträume, die betrachtet wurden, können ausschlaggebend sein. In unserem Kollektiv war dieser ein Jahr kürzer. Zudem setzt sich unsere Rezirrhosegruppe aus zwei selektierten Untergruppen zusammen. Hier werden nur die Patienten betrachtet, die innerhalb von einem Jahr oder nach 3 - 5 Jahren eine Rezirrhose entwickelten. Patienten, die dazwischen rezirrhosisch wurden, bleiben unbeachtet.

Eine weitere Möglichkeit, die Vorhersagekraft des ELF zu beurteilen, ergab sich durch den Vergleich der Mediane der frühestmöglich verfügbaren Fibrosemarker. Die Abbildung 19 - Rezirrhose im Zusammenhang mit der frühen Serumentnahme - zeigt die Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Für die Differenzierung zwischen mittlerer und keiner Rezirrhosegruppe zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei den ELF, PIIINP und TIMP-1 Werten ($p < 0,05$). Noch eindrücklicher zeigt sich hier, dass die Fibrosemarker der frühen Serumentnahme sehr genau zwischen den Patienten differenzieren können, die innerhalb eines Jahres rezirrhosisch werden und denen, die keine Rezirrhose entwickeln ($p < 0,03$). Zu

beachten ist allerdings, dass die frühe Serumentnahme je nach Rezirrhosegruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfand. Bei den Patienten mit Rezirrhose innerhalb des ersten Jahres fand sie nach drei Monaten und nicht nach 12 Monaten statt, wie bei den anderen beiden Gruppen. Für die vorerst unauffälligen Patienten waren die Kontrollseren zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar. Durch diese zeitliche Differenz wird die Vergleichbarkeit der Werte in Frage gestellt. Innerhalb eines Jahres kann es zu einer deutlichen Beeinflussung des ELF-Wertes durch Therapieanpassungen, Lebensstilveränderungen etc. gekommen sein. Wie vorangehend erwähnt, nimmt der Heilungsprozess nach Transplantation einen gewissen Zeitraum in Anspruch. Dieser war vermutlich bei den 3-Monatsproben noch nicht vollständig abgeschlossen. Die Ergebnisse sind dementsprechend mit Vorsicht zu betrachten. Zur Validierung wäre eine prospektiv angelegte Studie wünschenswert, da so einerseits der bestmögliche Zeitpunkt zur Serumentnahme mit prädiktivem Vorhersagewert ermittelt und andererseits noch bessere Ergebnisse zur Langzeitprognosefunktion des ELF bei Patienten nach LT gemacht werden könnten.

Wie oben beschrieben, zeigt die Hyaluronsäure als einzige keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zirrhosegruppen an. Auch bei Betrachtung der Veränderung der Biomarker über die Zeit (Abbildung 10) fällt ein etwas unregelmäßiger Verlauf der HA mit einem deutlichen Anstieg nach 6 Monaten in der frühen Rezirrhosegruppe auf. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die Hyaluronsäure Spiegel auch in gesunden Individuen die größte Varianz der drei Serummarker zeigen. Dennoch werden diese Varianzen durch den zur Berechnung des ELF-Wertes verwendeten natürlichen Logarithmus ausgeglichen, sodass der ELF-Wert selbst ausreichend genau zu analytischen Zwecken verwendet werden kann. (111) Schwankungen des HA-Spiegels zwischen Männern und Frauen, Jungen und Alten, je nach Abnahmezeit, vorheriger Mahlzeit und Entzündung bzw. Infektion sind bekannt. (2, 132, 133) Deshalb ist die HA zur Unterscheidung von frühen fibrotischen Veränderungen zu nicht-fibrotischen Lebererkrankungen oder normalen Kontrollen etwas unterlegen im Vergleich zu den anderen Serummarkern des ELF und des ELF-Scores selbst.

Weitere Einflussfaktoren, die speziell auf unser Kollektiv zutreffen, können in der angewandten Therapie zu finden sein. 27 % der früh rezirrhatischen Patienten (75% der HCV-Positiven dieser Gruppe) erhielten post-LT eine Interferon-Therapie. Diese blieb allerdings

ohne dauerhaften Therapieerfolg und könnte für den Anstieg der HA 6 Monate nach LT mitverantwortlich sein (Abbildung 10). (132, 134)

Die Vorteile der nicht-invasiven Tests sind jedoch nach wie vor eindeutig. Sie sind fast immer anwendbar (> 95 %), gut reproduzierbar und weit verbreitet. (135) Mögliche Störfaktoren, wie sie zum Beispiel bei der Hyaluronsäure vorhanden sind, gibt es bei fast jedem Test. Deshalb ist es sinnvoll, neben der Untersuchung der Serummarker auch auf eine andere Form der nicht-invasiven Tests zurückzugreifen. Hierbei handelt es sich um bildgebende Verfahren, wie beispielsweise die Transient Elastography (TE, FibroScan®). Sie messen sonographisch die Lebersteifigkeit (136, 137). Im klinischen Alltag wird diese Methode ergänzend bis Biopsie-ersetzend zur Diagnostik der Fibrose bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen angewandt. (137, 138) An seine Grenzen kommt die TE vor allem bei übergewichtigen Patienten, Aszites und mangelnder Erfahrung des Untersuchers. (139) In der EASL-ALEH-Leitlinie (European Association for the Study of the Liver, Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado) wird deshalb eine Kombination von Serummarkern und TE zur Fibrosedetektion bei HCV Patienten empfohlen. Je nach Grundätiologie werden unterschiedliche Reihenfolgen und Kombinationen der nicht-invasiven Tests empfohlen. Denn dadurch verbessert sich nicht nur die diagnostische Genauigkeit, sondern auch die prädiktive Vorhersagekraft.

Mit Blick auf unser Kollektiv wäre deshalb die Überprüfung der diagnostischen und prognostischen Funktion des ELF mithilfe der TE und der Messung der Lebersteifigkeit interessant gewesen. Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns war dies allerdings nicht möglich. Ähnliches gilt mit Blick auf weitere bekannte Prädiktoren für die Fibroseprogression nach LT. Hierzu gehören, wie im Kapitel 2.1.3 Risikofaktoren beschrieben, auch genetische Eigenschaften wie PNPLA3 oder der CRS.

Auch die Kombination verschiedener Serummarker, wie beispielsweise die gemeinsame Betrachtung von ELF und APRI, hat in der Vergangenheit gute prädiktive Ergebnisse erzielt. (140) Für manche Kombinationen von Serummarkern scheint die prognostische Funktion zum Teil sogar der diagnostischen überlegen. (18) Sicher ist, dass der ELF-Test ein validierter diagnostischer Test ist - sowohl einzeln als auch in Kombination mit anderen nicht-invasiven Tests. Zukünftige Studien sollten deshalb zusätzlich untersuchen, welche optimalen Test-Kombinationen die beste Vorhersage der Fibroseprogression erzielen. (139)

5.3 Kritische Betrachtung des Studiendesigns und der Untersuchungsmethoden

Dank der langen Beobachtungszeiten der Patienten, die in Mainz seit 1997 lebertransplantiert wurden, konnte retrospektiv untersucht werden, wann eine Vorhersage des Fortschreitens der Fibrose nach Transplantation möglich gewesen wäre. Daraus lassen sich Rückschlüsse ziehen, welches Vorgehen in Zukunft für die frühzeitige Erkennung einer Fibroseprogression hilfreich sein könnte.

Die geringe Anzahl der Patienten mildert die statistische Aussagekraft der Ergebnisse. Obwohl insgesamt 644 Lebertransplantationen im Zeitraum von 1997 bis 2010 in Mainz durchgeführt wurden, umfasst das im Rahmen dieser Promotion ausgewertete Kollektiv nur 47 Patienten. Dass nicht mehr der Patienten für die durchgeführten Untersuchungen in Frage kamen, hat verschiedene Gründe. Wie unter 3.1 im Kapitel Methodik erwähnt, wurde die Kollektivgröße vor allem durch die Patientenzahl der schnellen Rezirrhosegruppe limitiert. Bei den Patienten mit Rezirrhose im ersten Jahr nach LT handelt es sich um eine kleine und zum Glück auch immer kleiner werdende Gruppe. Einen großen Anteil machen hier die Patienten mit HCV Infektion und cholestatischem Verlauf aus. Dank neuer Therapiemöglichkeiten, die auch nach der Transplantation frühzeitig eingesetzt werden können, ist es möglich HCV Rezidive und die damit einhergehende Fibrosierung der Leber zu vermeiden. Dies gelingt aber nur, wenn es rechtzeitig Hinweise auf ein Wiederauftreten der Grunderkrankung gibt. Kontrollbiopsien, die in der Regel erst ein Jahr post-LT durchgeführt werden, sind manchmal schon zu spät.

Ein weiterer Grund für die beschränkte Größe des Kollektivs ist durch technische Grenzen bedingt. Die Konzentrationen der Biomarker wurden aus eingefrorenen Proben bestimmt. Nicht für alle Patienten waren diese zu den festgelegten Zeitpunkten T_1 - T_3 verfügbar.

Bei den Blutentnahmezeitpunkten T_1 - T_3 werden enge Zeiträume beschrieben, in denen die Blutentnahmen erfolgten. Aus logistischen Gründen ist es nicht möglich, die Patienten immer genau zu einem gewissen Stichtag einzubestellen. Viele der Blutentnahmen wurden zudem je nach individuellen Symptomen angeordnet. Es wurde versucht, die Schwankungen um die Zeitpunkte möglichst gering zu halten.

Der ELF-Test ist für verschiedene Ätiologien validiert worden. Zu ihnen gehören die NAFLD, Hepatitis B und C, PBC, PSC und ALD (72, 76-79, 141). Fast alle dieser Studien konzentrieren sich dabei auf die Validation einer Ätiologie, während im Rahmen dieser Arbeit viele verschiedene Ätiologien zusammen ausgewertet wurden. Die Referenzwerte, die der

Hersteller des ELF-Tests (Siemens Healthcare) angibt, wurden von Lichtinghagen et al. überprüft, die neben gesunden Blutspendern nur Patienten mit chronischer Hepatitis C (2) betrachteten. Parkes et al. untersuchten den ELF-Wert bei 457 Patienten mit CLD über einen Zeitraum von im Median 7 Jahren (81). Ob die ELF-Wert-Grenzen für die Detektion der Fibrose für alle Ätiologien der CLD immer gleich sind, ist jedoch nicht final geklärt. (142) Dies mag auch der Grund dafür sein, weshalb der ELF-Test zwar für viele Ätiologien validiert ist, außerhalb der Hepatologie aber nicht weit verbreitet eingesetzt wird. (139) Die Anwendung des ELF-Tests zur Kontrolle einer möglichen Rezirrhose nach LT, wie in unserem Fall, fand bisher kaum Anwendung. Nur Crespo et al. untersuchten an HCV positiven Patienten diverse nicht-invasive Methoden zur Detektion der frühen Fibroseprogression nach LT. (128) Darunter fanden sich neben dem FIB-4 und APRI auch der ELF-Test. Zur Diagnose der Fibroseprogression nach LT bei Patienten mit CLD anderer Ätiologien wurde er noch nicht eingesetzt. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist jedoch gerade die Detektion der frühen Fibroseprogression sehr wichtig. Deshalb wird auch dringend empfohlen, eine prospektive Untersuchung bei Patienten nach LT durchzuführen.

Die CLD, die bei unseren Patienten zur LT führten, finden sich in der Liste der elf häufigsten Indikationen zur LT (s. Abbildung 6). In allen drei Zirrhosegruppen waren die häufigsten zur LT führenden Ursachen alkoholinduzierte Schäden und virale Infektionen (s. Abbildung 7). Die drei Gruppen stehen also repräsentativ, wenn auch in kleiner Fallzahl, für die Patienten nach Lebertransplantation.

Unsere Transplantatempfänger waren vor allem männlich und im Median 54 (47,5 - 60,4) Jahre alt. Im Vergleich mit den Auswertungen des OPTN (Organ Procurement and Transplantation) und dem SRTR (U.S. Scientific Registry of Transplant Recipients) fällt auf, dass die Mainzer Transplantatempfänger etwas jünger waren. In den USA waren die Patienten auf der Warteliste im Jahr 2017 überwiegend zwischen 50 - 64 Jahre alt, männlich und weiß. (99) Unterschiede ergeben sich durch die unterschiedlichen Transplantationszeiträume. Der Anteil der über 65-Jährigen ist in den letzten 10 Jahren kontinuierlich angestiegen und macht nun 22,9 % aus, während der Anteil der 50 – 64-Jährigen über die letzten 5 Jahre gesunken ist. (99)

Nicht nur das Empfängeralter hat sich in den vergangenen Jahren verändert. Im Zeitraum von 1997 bis 2010 – dem Zeitraum der betrachteten Transplantationen – haben sich auch

OP-Techniken, die immunsuppressive Therapie, die Infektionsprävention und die Prävention nicht-infektiöser Komplikationen sowie die Kriterien der Organverteilung verändert. (129)

Bis 1999 wurde in Deutschland zur Einschätzung der Patienten auf der Warteliste der Child-Torcette-Pugh Score verwendet, welcher die Patienten mithilfe von drei objektiven (Serumalbumin, Serumbilirubin und Prothrombinzeit) sowie zwei subjektiven Parametern (Aszites und Enzephalopathie) beurteilt. (143) Im Anschluss galt das ELAS (Eurotransplant Liver Allocation System), welches die Dringlichkeit, die Wartezeit und einen Regionalfaktor berücksichtigte. Ab 2006 übernahm man auch in Deutschland den in den USA bereits seit 2002 angewandten MELD-Score (Model for End-stage Liver Disease), der das Überleben innerhalb der nächsten 3 Monate ohne LT schätzt. Es zeigt sich eine Verschiebung von einer individuellen zu einer dringlichkeitsbasierten Organzuteilung, welche mit einem kontinuierlichen Anstieg der Einjahresmortalität einhergeht. Diese ist laut Seehofer et al. zum einen der Allokationsänderung geschuldet, zum anderen aber auch dem zunehmenden Spenderalter und anderen negativen Spenderfaktoren. (98) Die Veränderungen sind bei Betrachtung des Kollektivs dieser Arbeit zu beachten. Eine zusätzliche Unterteilung der Patienten in die drei verschiedenen Allokationsabschnitte, wie sie auch in anderen Studien erfolgte (144), wäre gegebenenfalls sinnvoll gewesen. Die Operationsdaten der schnellen Progressor-Gruppe beispielsweise erstrecken sich von März 1998 bis Dezember 2010. Eine Alternative wäre auch die Beschränkung des Beobachtungszeitraums auf einen der Abschnitte gewesen. Allerdings hätte ein komprimierterer Zeitraum, ebenso wie eine Unterteilung in weitere Subgruppen, zu noch kleineren Patientenkollektiven geführt, welche die Aussagekraft der Daten deutlich gemindert hätten.

Wie im Literaturteil beschrieben, ist die Leberbiopsie immer noch der Goldstandard zur Evaluation des aktuellen Fibrorestadiums. Die Auswertung erfolgte auch in Mainz durch zwei voneinander unabhängig arbeitende Pathologen. Aufgrund des langen Zeitraums konnten die Auswertungen nicht konsequent durch dieselben Pathologen gemacht werden, sodass dies zu unterschiedlichen Einschätzungen der Fibrorestadien geführt haben kann. (47) Auch ein sampling Error kann im Rahmen der Leberblindpunktion des rechten Leberlappens post LT auftreten. (145-148) Die histologische Auswertung bildet jedoch die Basis für die anschließende Zuordnung der Patienten zu den Rezirrhosegruppen und wird als Referenz für die Ergebnisse des ELF-Tests verwendet. Dabei erfolgte die Zuordnung zu den

Rezirrrosegruppen nach dem erstmaligen Auftreten einer Rezirrrose in der Biopsie. Die Schwankungen der Fibrosegrade können zum einen durch die Wechsel zwischen den Pathologen, zum anderen aber auch durch eine positive Reaktion auf die Therapie, den Wechsel des Lebensstils, etc. bedingt sein.

Obwohl 138 Serumproben ausgewertet wurden, korrelierten nur 54 Biopsien zeitlich direkt mit den Serumproben. Nicht bei jeder Blutentnahme erfolgte eine Kontrollbiopsie. Nur wenn die Blutwerte tatsächlich Auffälligkeiten zeigten und ausreichend Abstand zur vorherigen Biopsie eine weitere Kontrolle rechtfertigte, bestand die Indikation für eine zusätzliche Biopsie zur weiteren Abklärung und zum Ausschluss einer akuten Abstoßung. Ansonsten sind zusätzliche Biopsien ethisch nicht vertretbar.

Der von uns verwendete ELF-Test gehört zu den am besten validierten nicht-invasiven Tests der Leberfibrosediagnostik. Er zeichnet sich aus durch sein breites Einsatzspektrum und die Reproduzierbarkeit. (139) Dabei ist er sehr robust: Verfälschungen der Werte durch Einfrieren und Auftauen konnten nicht nachgewiesen werden. Auch zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen frischen und eingefrorenen Seren. (149) Eine Limitation ist allerdings, dass nicht bei allen Patienten der ELF-Wert mithilfe der Fibrosemarkerkonzentrationen berechnet werden konnte. Für Konzentrationen der Fibrosemarker außerhalb der von Siemens definierten Testbereiche kann der ELF-Wert nicht berechnet werden. Diese liegen bei 3,5 - 1300 ng/ml für TIMP1, 0,5 - 150 ng/ml für PIIINP und 1,6 - 1000 ng/ml für HA. (1) Zudem ist der ELF nicht unabhängig von Einflussfaktoren. Zu ihnen zählt zunächst das Geschlecht. Die Auswertung der Blutproben von Blutspendern zeigte, dass Männer signifikant höhere Werte als Frauen zeigen. (2, 149) Auch das Alter spielt eine Rolle. Ein höheres Alter gilt als leichter Entzündungsstand und ist mit Fibroseprogression assoziiert, vermutlich aufgrund der erhöhten Vulnerabilität durch Umweltbedingungen, wie beispielsweise oxidativen Stress. (150-152) Lichtinghagen et al. sehen einen deutlichen Unterschied zwischen unter und über 30-jährigen. Auch Dellavance et al. wiesen nach, dass es zu einem Anstieg des ELF-Werts mit steigendem Alter kommt. In ihrem Kollektiv stellte sich außerdem heraus, dass Patienten mit einem höheren BMI auch einen höheren Wert im ELF-Test erzielten. Dabei wiesen sie darauf hin, dass die oftmals mit fortschreitendem Alter beobachtete Gewichtszunahme beachtet wurde, sich aber keine Korrelationen zwischen Alter und BMI zeigten. Beide Parameter konnten als eigenständige Einflussfaktoren identifiziert werden. (149) Auch der Zeitpunkt der

Blutentnahme beeinflusst den ELF-Wert. Dieser war bei Entnahmen am Nachmittag bei Lichtinghagen et al. deutlich höher als der am Morgen ermittelte ELF-Wert. Es wurde ein Zusammenhang mit der Essensaufnahme vermutet. (2) Diese wirkt sich vor allem auf die Hyaluronsäurespiegel aus. (133) Deshalb erfolgte die Blutentnahme bei unseren Patienten morgens im nüchternen Zustand.

Wir nutzten die qPCR zur Bestimmung der relativen Gen-Expression. Diese ist aktuell die genaueste Methode zur Darstellung kleinster Veränderungen der Genexpression und deutlich effizienter, sensitiver und weniger arbeitsaufwändig als beispielsweise der Northern Blot. Allerdings ist bei der qPCR die Wahl der Referenzgene (RG) zur Normalisierung der Werte zu beachten. Die Auswertung der Gewebeproben unserer Patienten erfolgte mithilfe des Referenzgens GAPDH, welches zu den meist verwendeten RGs gehört. Es ist, wie viele der anderen RGs auch, anfällig für den Einfluss verschiedener biologischer Faktoren. (153) Je nach Studiendesign können die verwendeten Gene zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. (154) Chapman et al. empfehlen deshalb mindestens zwei Referenzgene zur Normalisierung zu verwenden. Allerdings wird dies in der aktuellen Forschung selten umgesetzt. Da das am besten validierte Gen die GAPDH ist, wurde es auch in unserem Kollektiv als Referenzgen verwendet. (153) Eine Alternative stellte die Messung der absoluten Gen-Expression dar. Diese ist zwar unabhängig von der Variation der RGs, es kann aber zu Fehlern bei der Erstellung einer Standardkurve kommen.

Um die Fibrose auf einer weiteren Ebene zu sichern, erfolgte eine immunhistochemische Färbung der Lebergewebeproben zur Darstellung der α -SMA-positiven HSC. Aufgrund der beschränkten Probenanzahl konnte bei der Auswertung nur in drei unterschiedliche Anfärbungsstufen unterteilt werden. Grund dafür war die Verhinderung einer zu kleinen Gruppengröße, die eine statistische Auswertung unmöglich gemacht hätte. Es ließ sich zudem keine Korrelation zum Fibrosegrad nachweisen, wie es bei Elzamy et al. der Fall war. Dort wurde zum einen eine größere Stichprobe untersucht, zum anderen erfolgte die Diskriminierung mithilfe der Anzahl der gefärbten mesenchymalen Zellen in 5 Stufen. (66)

6 Zusammenfassung

Bei Patienten, die eine Lebertransplantation (LT) erhalten haben, sind regelmäßige Kontrollen notwendig, um das Wiederauftreten einer Fibrose frühzeitig zu erkennen. Bis dato ist der Goldstandard zur Diagnostik der Fibrose bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen die Leberbiopsie. Dieses Verfahren ist invasiv und kann mit Komplikationen wie beispielsweise Blutungen einhergehen. Deshalb ist es wichtig, nicht-invasive prädiktive Serum-Marker zu finden, die eine Progression der Fibrose bis zur Zirrhose vorhersagen können.

Der Serum-basierte Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Wert berechnet sich aus den Fibrose-markern PIIINP, TIMP-1 und Hyaluronsäure. Ziel dieser Arbeit war es, die Fibroseprogression nach LT mithilfe des nicht-invasiven ELF-Tests vorherzusagen, um frühzeitig eine Therapie einleiten zu können.

Von den 569 Patienten, die im Zeitraum von 1997 bis 2010 an der Universitätsmedizin Mainz eine LT erhielten, erfüllten 47 Patienten die erforderlichen Kriterien und konnten je nach Fibroseprogression in der Histologie retrospektiv einer von drei Gruppen zugeordnet werden (Rezirrrose nach einem Jahr, nach drei bis fünf Jahren, keine Fibrose nach fünf Jahren). Neben der Auswertung von Leberbiopsien wurden zu drei Zeitpunkten ELF-Werte bestimmt und die mRNA-Expression sowie immunhistochemische Färbungen weiterer Fibrosemarker untersucht.

Patienten mit schneller Fibroseprogression und früher Rezirrrose zeigten im Vergleich zu Patienten ohne Fibrose fünf Jahre nach LT deutlich höhere Werte der Serum-Marker und des ELF in der frühen Serumentnahme ($p_{\text{ELF}} = 0,024$). Zur Abgrenzung der Patienten mit früher Rezirrrose ermittelten wir per ROC-Analyse einen Grenzwert. Ein ELF-Wert von 11,02 3 Monate nach LT deutet mit 78 % Sensitivität und 81 % Spezifität auf eine Rezirrrose innerhalb des ersten Jahres nach LT hin. Mithilfe einer einfachen Serumentnahme können so Hochrisikopatienten frühzeitig erkannt werden.

Zur Validierung der diagnostischen Funktion des ELF-Testes innerhalb unserer Kohorte erfolgte zudem der Nachweis der Korrelationen des ELF-Wertes mit den fibrotischen Veränderungen auf histologischer und Genexpressions-Ebene. Die bereits bestehenden Forschungsergebnisse bezüglich der hochpräzisen, nicht-invasiven Messung der Fibrose durch den ELF-Algorithmus wurden bestätigt. Aus unseren Ergebnissen geht hervor, dass der ELF-

Wert zudem genaue prognostische Informationen zur Rekurrenz der Leberfibrose und -zirrhose nach LT liefert.

Um den ELF-Test langfristig in der Hepatologie als Prognosefaktor nach Lebertransplantation zu validieren, sollte eine prospektiv angelegte, multizentrische Kohorte betrachtet werden. Zukünftig könnte außerdem die Kombination verschiedener nicht-invasiver Untersuchungsmethoden zu noch besseren Ergebnissen im Vergleich zum „Old-Standard“, der Leberbiopsie, führen.

7 Literaturverzeichnis

1. SiemensHealthcare. ADVIA Centaur Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test Specification Sheet [Internet]. Stand: 2016 [zitiert am 23.05.2019]; URL: http://www.diagnosticum.hu/upload/product/advia_centaur_elf_teszt.pdf.
2. Lichtinghagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, Bahr MJ. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol.* 2013;59(2):236-42.
3. SiemensHealthcare. Setting a New Standard in Liver Fibrosis Assessment - Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test [Internet]. Stand: 2016 [zitiert am 14.10.2018]; URL: https://static.healthcare.siemens.com/siemens_hwem-hwem_sxxa_websites-context-root/wcm/idc/groups/public/@global/documents/download/mda2/nda1/~edisp/elf_physician_brochure_a91dx-160435-xc1-4a00_final-03470658.pdf.
4. Jonas S, Erckenbrecht JF. *Viszeralmedizin: Interdisziplinäres Facharztwissen Gastroenterologie und Viszeralchirurgie*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015. 305-39.
5. Bottcher K, Pinzani M. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:3-8.
6. Wiegand J, Berg T. The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(6):85-91.
7. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology.* 2013;58(3):593-608.
8. Mokdad AA, Lopez AD, Shahrzad S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC medicine.* 2014;12:145.
9. International Agency for Research on Cancer WHO. Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages [Internet]. Stand: 2018 [zitiert am 26.04.2020]; URL: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Afalse%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=.
10. Herold G. *Innere Medizin* 2019. Berlin: De Gruyter; 2019. 514-63.
11. Pinzani M. Pathophysiology of Liver Fibrosis. *Dig Dis.* 2015;33(4):492-7.
12. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008;371(9615):838-51.
13. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S47-64.
14. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology.* 1994;19(6):1513-20.
15. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol.* 2003;38 Suppl 1:S38-53.
16. Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. 2004;36(4):231-42.
17. Karsdal MA, Detlefsen S, Daniels SJ, Nielsen MJ, Krag A, Schuppan D. Is the Total Amount as Important as Localization and Type of Collagen in Liver Fibrosis Attributable to Steatohepatitis? *Hepatology.* 2020;71(1):346-51.
18. Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology.* 2015;39:S51-S9.
19. Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Seminars in liver disease.* 2007;27(4):413-26.

20. Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 1999;14(7):618-33.
21. Elpek GO. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7260-76.
22. Das SK, Vasudevan DM. Genesis of hepatic fibrosis and its biochemical markers. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2008;68(4):260-9.
23. Iizuka M, Murata T, Hori M, Ozaki H. Increased contractility of hepatic stellate cells in cirrhosis is mediated by enhanced Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-sensitization pathways. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2011;300(6):G1010-21.
24. Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology*. 2007;45(3):817-25.
25. Berenguer M, Schuppan D. Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: mechanisms, assessment and treatment. *J Hepatol*. 2013;58(5):1028-41.
26. Bhat M, Rollet-Kurhajec KC, Bhat A, Farag A, Deschenes M, Wong P, et al. Incidence and Predictors of Advanced Liver Fibrosis by a Validated Serum Biomarker in Liver Transplant Recipients. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*. 2017;2017:4381864.
27. Gambato M, Crespo G, Torres F, L LL, Carrion J, Londono M, et al. Simple prediction of long-term clinical outcomes in patients with mild hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2016;29(6):698-706.
28. Dumortier J, Boillot O, Scoazec JY. Natural history, treatment and prevention of hepatitis C recurrence after liver transplantation: past, present and future. *World J Gastroenterol*. 2014;20(32):11069-79.
29. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Mishiro S, Maertens G, et al. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology*. 1995;108(4):1088-96.
30. Zimmermann T, Otto C, Hoppe-Lotichius M, Biesterfeld S, Lautem A, Knaak M, et al. Risk factors in patients with rapid recurrent hepatitis C virus-related cirrhosis within 1 year after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2009;41(6):2549-56.
31. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2000;31(4):828-33.
32. Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput JC, et al. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology*. 2002;35(3):635-8.
33. Kim H, Lee KW, Lee K, Seo S, Park MY, Ahn SW, et al. Effect of PNPLA3 I148M polymorphism on histologically proven non-alcoholic fatty liver disease in liver transplant recipients. *Hepatol Res*. 2018;48(3):E162-e71.
34. Liu ZT, Chen TC, Lu XX, Cheng J, Xie HY, Zhou L, et al. PNPLA3 I148M variant affects non-alcoholic fatty liver disease in liver transplant recipients. *World J Gastroenterol*. 2015;21(34):10054-6.
35. Geng N, Xin YN, Xia HH, Jiang M, Wang J, Liu Y, et al. Association of PNPLA3 I148M Variant With Chronic Viral Hepatitis, Autoimmune Liver Diseases and Outcomes of Liver Transplantation. *Hepat Mon*. 2015;15(4):e26459.
36. Huang H, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, et al. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2007;46(2):297-306.
37. Trépo E, Potthoff A, Pradat P, Bakshi R, Young B, Lagier R, et al. Role of a cirrhosis risk score for the early prediction of fibrosis progression in hepatitis C patients with minimal liver disease. *Journal of Hepatology*. 2011;55(1):38-44.

38. Zimmermann A, Darstein F, Hoppe-Lotichius M, Toenges G, Lautem A, Abel F, et al. Cirrhosis risk score of the donor organ predicts early fibrosis progression after liver transplantation. *J Gastrointest Liver Dis.* 2019;28(1):53-61.
39. Schirmacher P, Fleig WE, Tannapfel A, Langner C, Dries V, Terracciano L, et al. [Bioptic diagnosis of chronic hepatitis. Results of an evidence-based consensus conference of the German Society of Pathology, of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases and of Compensated Hepatitis (HepNet)]. *Der Pathologe.* 2004;25(5):337-48.
40. Tannapfel A, Dienes HP, Lohse AW. The indications for liver biopsy. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(27-28):477-83.
41. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med.* 2001;344(7):495-500.
42. Semmo N, Spangenberg HC, Blum HE. [Percutaneous liver biopsy]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007;132(49):2643-5.
43. Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol.* 1986;2(2):165-73.
44. Van Thiel DH, Gavaler JS, Wright H, Tzakis A. Liver biopsy. Its safety and complications as seen at a liver transplant center. *Transplantation.* 1993;55(5):1087-90.
45. Alten TA, Negm AA, Voigtlander T, Jaeckel E, Lehner F, Brauner C, et al. Safety and performance of liver biopsies in liver transplant recipients. *Clinical transplantation.* 2014;28(5):585-9.
46. Gunneson TJ, Menon KV, Wiesner RH, Daniels JA, Hay JE, Charlton MR, et al. Ultrasound-assisted percutaneous liver biopsy performed by a physician assistant. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(6):1472-5.
47. Xie Q, Zhou X, Huang P, Wei J, Wang W, Zheng S. The performance of enhanced liver fibrosis (ELF) test for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(4):e92772.
48. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(6):1160-74.
49. Lörke J, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D. Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose. *Dtsch Arztebl International.* 2007;104(24):1752-.
50. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(10):2614-8.
51. Coral GP, Antunes AD, Serafini AP, Araujo FB, Mattos AA. LIVER BIOPSY: IMPORTANCE OF SPECIMEN SIZE IN THE DIAGNOSIS AND STAGING OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 2016;58:10.
52. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol.* 2003;39(2):239-44.
53. Soto M, Sampietro-Colom L, Lasalvia L, Mira A, Jimenez W, Navasa M. Cost-effectiveness of enhanced liver fibrosis test to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C virus and alcoholic liver disease patients. *World J Gastroenterol.* 2017;23(17):3163-73.
54. Scott R, Guha IN. Non-invasive monitoring of liver fibrosis. *Br Med Bull.* 2014;112(1):97-106.
55. Ferrell L, Kakar S, Elder D. *Liver Pathology.* New York, UNITED STATES: Demos Medical Publishing; 2011.
56. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol.* 1991;13(3):372-4.
57. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology.* 1981;1(5):431-5.

58. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995;22(6):696-9.
59. Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2015;21(41):11567-83.
60. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-56.
61. Rippe RA, Brenner DA. From quiescence to activation: Gene regulation in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2004;127(4):1260-2.
62. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25(2):195-206.
63. Ghatak S, Biswas A, Dhali GK, Chowdhury A, Boyer JL, Santra A. Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice. *Toxicology and applied pharmacology.* 2011;251(1):59-69.
64. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, et al. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2001;33(5):1130-40.
65. Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, Franchitto A, Merli M, Siciliano M, et al. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig Liver Dis.* 2005;37(5):349-56.
66. Elzamy S, Agina HA, Elbalshy AE, Abubashim M, Saad E, Abd Elmageed ZY. Integration of VEGF and alpha-SMA Expression Improves the Prediction Accuracy of Fibrosis in Chronic Hepatitis C Liver Biopsy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(4):261-70.
67. Yamaoka K, Nouchi T, Marumo F, Sato C. Alpha-smooth-muscle actin expression in normal and fibrotic human livers. *Dig Dis Sci.* 1993;38(8):1473-9.
68. Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, Yalniz M, Demirbag K. The value of alpha-SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study. *Histopathology.* 2005;47(3):276-80.
69. Downing GJ. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2001;69(3):89-95.
70. Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, Chandrappa M. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future science OA.* 2018;4(1):Fso250.
71. Papastergiou V, Tsochatzis E, Burroughs AK. Non-invasive assessment of liver fibrosis. *Ann Gastroenterol.* 2012;25(3):218-31.
72. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology.* 2008;47(2):455-60.
73. Miele L, De Michele T, Marrone G, Antonietta Isgro M, Basile U, Cefalo C, et al. Enhanced liver fibrosis test as a reliable tool for assessing fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease in a clinical setting. *The International journal of biological markers.* 2017;32(4):e397-e402.
74. Polyzos SA, Slavakis A, Koumerkeridis G, Katsinelos P, Kountouras J. Noninvasive Liver Fibrosis Tests in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An External Validation Cohort. *Horm Metab Res.* 2018.
75. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology.* 2004;127(6):1704-13.
76. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Harris S, Cross R, Manos MM, et al. Enhanced Liver Fibrosis (ELF) test accurately identifies liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2011;18(1):23-31.

77. Trembling PM, Lampertico P, Parkes J, Tanwar S, Viganò M, Facchetti F, et al. Performance of Enhanced Liver Fibrosis test and comparison with transient elastography in the identification of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat.* 2014;21(6):430-8.
78. Mayo MJ, Parkes J, Adams-Huet B, Combes B, Mills AS, Markin RS, et al. Prediction of clinical outcomes in primary biliary cirrhosis by serum enhanced liver fibrosis assay. *Hepatology.* 2008;48(5):1549-57.
79. de Vries EMG, Farkkila M, Milkiewicz P, Hov JR, Eksteen B, Thorburn D, et al. Enhanced liver fibrosis test predicts transplant-free survival in primary sclerosing cholangitis, a multi-centre study. *Liver Int.* 2017;37(10):1554-61.
80. National Guideline Centre. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): assessment and management, NICE guideline [NG49] [Internet]. Stand: 2016 [zitiert am 13.06.2019]; URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng49>.
81. Parkes J, Roderick P, Harris S, Day C, Mutimer D, Collier J, et al. Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut.* 2010;59(9):1245-51.
82. Tanwar S, Trembling PM, Hogan BJ, Srivastava A, Parkes J, Harris S, et al. Noninvasive markers of liver fibrosis: on-treatment changes of serum markers predict the outcome of antifibrotic therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017;29(3):289-96.
83. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Newman D, et al. Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2009;136(1):160-7.
84. Munsterman ID, Kendall TJ, Khelil N, Popa M, Lomme R, Drenth JPH, et al. Extracellular matrix components indicate remodelling activity in different fibrosis stages of human non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology.* 2018;73(4):612-21.
85. Zhu CL, Li WT, Li Y, Gao RT. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are correlated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Journal of digestive diseases.* 2012;13(11):558-63.
86. Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(2):271-9.
87. Schuppan D, Jax C, Hahn EG. [Serum markers of liver fibrosis]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1999;124(41):1213-8.
88. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2000;15(8):945-51.
89. Fagan KJ, Pretorius CJ, Horsfall LU, Irvine KM, Wilgen U, Choi K, et al. ELF score ≥ 9.8 indicates advanced hepatic fibrosis and is influenced by age, steatosis and histological activity. *Liver Int.* 2015;35(6):1673-81.
90. Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 2018;68-69:435-51.
91. Yoon YJ, Friedman SL, Lee YA. Antifibrotic Therapies: Where Are We Now? *Seminars in liver disease.* 2016;36(1):87-98.
92. Pinzani M, Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert review of gastroenterology & hepatology.* 2010;4(4):459-72.
93. Friedman SL. Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis—is it all hype? *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology.* 2007;4:236.

94. Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet*. 2013;381(9865):468-75.
95. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2019. Frankfurt: DSO. 2020.
96. Schrem H, Focken M, Gunson B, Reichert B, Mirza D, Kreipe H-H, et al. The new liver allocation score for transplantation is validated and improved transplant survival benefit in Germany but not in the United Kingdom. *Liver Transplantation*. 2016;22(6):743-56.
97. Kroy D, Trautwein C. Immunsuppression nach Lebertransplantation. *Der Gastroenterologe*. 2018;13(3):195-8.
98. Seehofer D, Schöning W, Neuhaus P. Lebertransplantation mit postmortalen Organen. 2013;84(5):391-7.
99. Kim WR, Lake JR, Smith JM, Schladt DP, Skeans MA, Noreen SM, et al. OPTN/SRTR 2017 Annual Data Report: Liver. *American Journal of Transplantation*. 2019;19:184-283.
100. Berenguer M, Rayón JM, Prieto M, Aguilera V, Nicolás D, Ortiz V, et al. Are posttransplantation protocol liver biopsies useful in the long term? *Liver Transplantation*. 2001;7(9):790-6.
101. J.S. Cross T, Jothimani D, Heneghan MA, Harrison PM. Non-invasive assessment of fibrosis in liver grafts due to hepatitis C virus recurrence. *Clinical transplantation*. 2011;25(3):345-51.
102. Kuhlman P, Duff HL, Galant A. A fluorescence-based assay for multisubunit DNA-dependent RNA polymerases. *Analytical biochemistry*. 2004;324(2):183-90.
103. ThermoFisher. Real-Time, digitale und herkömmliche PCR im Vergleich | Thermo Fisher Scientific - DE [Internet]. Stand: 2019 [zitiert am 09.06.2019]; URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>.
104. Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Analytical biochemistry*. 2001;295(1):17-21.
105. Rutledge RG, Cote C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(16):e93.
106. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*. 2004;1(04):92-5.
107. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*. 2007;37(2):120-6.
108. Neumann UP, Berg T, Bahra M, Seehofer D, Langrehr JM, Neuhaus R, et al. Fibrosis progression after liver transplantation in patients with recurrent hepatitis C. *J Hepatol*. 2004;41(5):830-6.
109. Rayhill SC, Wu YM, Katz DA, Voigt MD, Labrecque DR, Kirby PA, et al. Older donor livers show early severe histological activity, fibrosis, and graft failure after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation*. 2007;84(3):331-9.
110. Lichtinghagen R, Bahr MJ, Wehmeier M, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, et al. Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2003;105(3):373-82.
111. Jabor A, Kubicek Z, Frankova S, Senkerikova R, Franekova J. Enhanced liver fibrosis (ELF) score: Reference ranges, biological variation in healthy subjects, and analytical considerations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2018;483:291-5.
112. Wahl K, Rosenberg W, Vaske B, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bahr MJ, et al. Biopsy-controlled liver fibrosis staging using the enhanced liver fibrosis (ELF) score compared to transient elastography. *PLoS One*. 2012;7(12):e51906.

113. Gudowska M, Gruszewska E, Panasiuk A, Cylwik B, Swiderska M, Flisiak R, et al. High serum N-terminal propeptide of procollagen type III concentration is associated with liver diseases. *Gastroenterology Review*. 2017;3:203-7.
114. Mehta SH, Lau B, Afdhal NH, Thomas DL. Exceeding the limits of liver histology markers. *J Hepatol*. 2009;50(1):36-41.
115. Cholongitas E, Quaglia A, Samonakis D, Senzolo M, Triantos C, Patch D, et al. Transjugular liver biopsy: how good is it for accurate histological interpretation? *Gut*. 2006;55(12):1789-94.
116. Takahara Y, Takahashi M, Wagatsuma H, Yokoya F, Zhang Q-W, Yamaguchi M, et al. Gene expression profiles of hepatic cell-type specific marker genes in progression of liver fibrosis. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(40):6473-99.
117. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*. 2007;46(5):955-75.
118. Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(5):1887-901.
119. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2018;68-69:452-62.
120. Han YP, Zhou L, Wang J, Xiong S, Garner WL, French SW, et al. Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4820-8.
121. Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol*. 2000;113(6):443-53.
122. Martinelli AL, Ramalho LN, Zucoloto S. Hepatic stellate cells in hepatitis C patients: relationship with liver iron deposits and severity of liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2004;19(1):91-8.
123. Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2007;46(1):124-33.
124. Prystupa A, Szpetnar M, Boguszewska-Czubara A, Grzybowski A, Sak J, Zaluska W. Activity of MMP1 and MMP13 and amino acid metabolism in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Med Sci Monit*. 2015;21:1008-14.
125. Attallah AM, El-Far M, Ghaly MF, Omran MM, Albannan MS, Attallah AA, et al. Circulating levels of collagen III and MMP-1 in patients with chronic hepatitis C co-infected with hepatitis B virus. *British Journal of Biomedical Science*. 2017;74(2):95-100.
126. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*. 2015;64(5):830-41.
127. Varma S, Stephenne X, Komuta M, Bouzin C, Ambroise J, Smets F, et al. The histological quantification of alpha-smooth muscle actin predicts future graft fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2017;21(1).
128. Crespo G, Gambato M, Millan O, Casals G, Ruiz P, Londono MC, et al. Early non-invasive selection of patients at high risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2016;18(3):471-9.
129. Song AT, Avelino-Silva VI, Pecora RA, Pugliese V, D'Albuquerque LA, Abdala E. Liver transplantation: fifty years of experience. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5363-74.
130. Firpi RJ, Abdelmalek MF, Soldevila-Pico C, Cabrera R, Shuster JJ, Theriaque D, et al. One-year protocol liver biopsy can stratify fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C infection. *Liver Transplantation*. 2004;10(10):1240-7.

131. Pungpapong S, Nunes DP, Krishna M, Nakhleh R, Chambers K, Ghabril M, et al. Serum fibrosis markers can predict rapid fibrosis progression after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl.* 2008;14(9):1294-302.
132. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Hyaluronic acid as a non-invasive biomarker of liver fibrosis. *Clin Biochem.* 2016;49(3):302-15.
133. Rossi E, Adams Leon A, Ching Helena L, Bulsara M, MacQuillan Gerry C, Jeffrey Gary P. High biological variation of serum hyaluronic acid and Hepascore, a biochemical marker model for the prediction of liver fibrosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2013;51(5):1107.
134. Fontana RJ, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Sterling RK, Naishadham D, Goodman ZD, et al. Serum fibrosis markers are associated with liver disease progression in non-responder patients with chronic hepatitis C. *Gut.* 2010;59(10):1401-9.
135. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol.* 2015;63(1):237-64.
136. Castera L, Pinzani M. Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? *Gut.* 2010;59(7):861-6.
137. Castera L, Fornis X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008;48(5):835-47.
138. Geng XX, Huang RG, Lin JM, Jiang N, Yang XX. Transient elastography in clinical detection of liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association.* 2016;22(4):294-303.
139. Day JW, Rosenberg WM. The enhanced liver fibrosis (ELF) test in diagnosis and management of liver fibrosis. *Br J Hosp Med (Lond).* 2018;79(12):694-9.
140. Petersen JR, Stevenson HL, Kasturi KS, Naniwadekar A, Parkes J, Cross R, et al. Evaluation of the aspartate aminotransferase/platelet ratio index and enhanced liver fibrosis tests to detect significant fibrosis due to chronic hepatitis C. *Journal of clinical gastroenterology.* 2014;48(4):370-6.
141. Thiele M, Madsen BS, Hansen JF, Detlefsen S, Antonsen S, Krag A. Accuracy of the Enhanced Liver Fibrosis Test vs FibroTest, Elastography, and Indirect Markers in Detection of Advanced Fibrosis in Patients With Alcoholic Liver Disease. *Gastroenterology.* 2018;154(5):1369-79.
142. Pinzani M. The ELF panel: a new crystal ball in hepatology? *Gut.* 2010;59(9):1165-7.
143. Singal AK, Kamath PS. Model for End-stage Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol.* 2013;3(1):50-60.
144. Filali Bouami S, Gwiasda J, Beneke J, Kaltenborn A, Liersch S, Suero EM, et al. Prognostic factors for long-term survival after adult liver transplantation. *Langenbecks Arch Surg.* 2018;403(4):495-508.
145. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2005;128(7):1898-906.
146. Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD, Pirie D, et al. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet.* 1986;1(8480):523-5.
147. Abdi W, Millan JC, Mezey E. Sampling variability on percutaneous liver biopsy. *Arch Intern Med.* 1979;139(6):667-9.
148. Siddique I, El-Naga HA, Madda JP, Memon A, Hasan F. Sampling variability on percutaneous liver biopsy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38(4):427-32.
149. Dellavance A, Fernandes F, Shimabokuro N, Latini F, Baldo D, Barreto JA, et al. Enhanced liver fibrosis (ELF) score: Analytical performance and distribution range in a large cohort of blood donors. *Clinica Chimica Acta.* 2016;461:151-5.

150. Candore G, Caruso C, Jirillo E, Magrone T, Vasto S. Low grade inflammation as a common pathogenetic denominator in age-related diseases: novel drug targets for anti-ageing strategies and successful ageing achievement. *Curr Pharm Des.* 2010;16(6):584-96.
151. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32833-41.
152. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol.* 2001;34(5):730-9.
153. Chapman JR, Waldenstrom J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141853.
154. Bustin SA. *A-Z of Quantitative PCR: International University Line; 2004.*

Danksagung

Lebenslauf