Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehemaliger Vorstand: Prof. Dr. U. Löhrs
jetziger Vorstand: Prof. Dr. Th. Kirchner

Proliferation und Apoptose im Hepatozellulären Karzinom, der hepatozellulären Dysplasie, dem Adenom und anderen pathologischen Veränderungen der menschlichen Leber.

- Eine vergleichende immunhistochemische Untersuchung -

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

vorgelegt von
Veronika Christine Ebner
aus
Mühldorf am Inn

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Udo Löhrs
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. H. M. Diepolder Priv. Doz. Dr. med. M. Schnurr
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Sibylle Haraida
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	07.12.2006

Für meine Eltern

1. Inhaltsverzeichnis

1. INHALTSVERZEICHNIS 1

2. ABKÜRZUNGEN 4

3. EINFÜHRUNG 6

3.1. HEPATOZELLULÄRES KARZINOM 7
3.1.1. Definition 7
3.1.2. Epidemiologie 7
3.1.3. Ätiologie 8
3.1.3.1. Leberzirrhose 8
3.1.3.2. HBV 9
3.1.3.3. HCV 11
3.1.3.4. Aflatoxin B1 12
3.1.3.5. Äthyltoxischer Leberschaden 13
3.1.3.6. Hämochromatose 14
3.1.3.7. Morbus Wilson 14
3.1.4. Pathologie und Stadieneinteilung 15
3.1.4.1. Makropathologie, Tumorausbreitung und TNM-Klassifikation 15
3.1.4.2. Histopathologie und Grading 17
3.1.4.3. Klinik und Prognose des HCC 18
3.1.5. Fibrolamelläres Karzinom (FLC) 18
3.1.6. Andere primäre Lebermalignome 19
3.1.6.1. Cholangiozelluläres Karzinom (CCC) 19
3.1.6.2. Kombinationstumor/Kollisionstumor aus HCC und CCC 20
3.1.6.3. Undifferenzierte Karzinome der Leber 20
3.2. BENIGNE NEOPLASIEN, TUMORARTIGE UND REPARATIVE LÄSIONEN DER LEBER 20
3.2.1. Hepatozelluläres Adenom 20
3.2.2. Fokale noduläre Hyperplasie 20
3.2.3. Regeneratknoten 21
3.2.4. Dysplastische Läsionen 21
3.3. GRUNDLAGEN DER APOPTOSE UND PROLIFERATION 22
3.3.1. Apoptose 22
3.3.2. Proliferation 23
3.3.3. Zellzyklusregulatorproteine 24
3.3.3.1. p53 24
3.3.3.2. Bcl-2-Familie 25
3.3.3.3. Fas/FasL-System 26
3.4. FRAGESTELLUNGEN 28

4. MATERIAL UND METHODEN 29

4.1. MATERIAL 29
4.1.1. Maligne Tumoren der Leber 29
4.1.2. Dysplastische Läsionen 31
4.1.3. Benigne Neoplasien, tumorartige und reparative Läsionen der Leber 32
4.1.4. Referenzgewebe 32
4.2. METHODEN 33
4.2.1. Immunhistochemie 33
4.2.1.1. Grundlagen 33
4.2.1.2. Färbemethoden 33
4.2.1.3. Blockierungen 37
4.2.2. TUNEL (=TdT-mediated d-UTP nick end labelling)-Methode 37
4.3. AUSWERTUNG, QUANTIFIZIERUNG UND STATISTISCHE DATENANALYSE 38
4.3.1. Allgemeines 38
4.3.2. Immunhistochemische Auswertung 38
4.3.2.1. Prinzip der Auswertung der immunhistochemischen Präparate 38
4.3.2.2. Ermittlung eines Gesamtwertes pro Antikörper, Patient und Entität 39
4.3.3. Auswertung nach Morphologie 40
4.3.4. Auswertung nach Differenzierungsgraden 42

4.3.5. Auswertung nach Tumorgröße ... *44*
4.3.6. Statistische Datenanalyse ... *44*

5. ERGEBNISSE ... **45**

5.1. KI-67-IMMUNHISTOCHEMIE ... 45
5.1.1. Färbeeigenschaften ... *45*
5.1.2. Quantifizierung der Ki-67-Immunhistochemie ... *45*
5.1.2.1. Hepatozelluläres Karzinom ... 45
5.1.2.2. Dysplastische Läsionen ... 47
5.1.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber ... 48
5.1.2.4. Referenzgewebe ... 48
5.1.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung ... *49*
5.2. P53-IMMUNHISTOCHEMIE ... 56
5.2.1. Färbeeigenschaften ... *56*
5.2.2. Quantifizierung der p53-Immunhistochemie ... *56*
5.2.2.1. Hepatozelluläres Karzinom ... 56
5.2.2.2. Dysplastische Läsionen ... 58
5.2.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber ... 58
5.2.2.4. Referenzgewebe ... 59
5.2.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung ... *60*
5.3. FAS-IMMUNHISTOCHEMIE ... 65
5.3.1. Färbeeigenschaften ... *65*
5.3.2. Quantifizierung der Fas-Immunhistochemie ... *65*
5.3.2.1. Hepatozelluläres Karzinom ... 65
5.3.2.2. Dysplastische Läsionen ... 67
5.3.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber ... 68
5.3.2.4. Referenzgewebe ... 68
5.3.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung ... *69*
5.4. FASLIGAND-IMMUNHISTOCHEMIE ... 77
5.4.1. Färbeeigenschaften ... *77*
5.4.2. Quantifizierung der FasLigand-Immunhistochemie ... *77*
5.4.2.1. Hepatozelluläres Karzinom ... 77
5.4.2.2. Dysplastische Läsionen ... 79
5.4.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber ... 80
5.4.2.4. Referenzgewebe ... 80
5.4.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung ... *81*
5.5. BAX-IMMUNHISTOCHEMIE ... 86
5.5.1. Färbeeigenschaften ... *86*
5.5.2. Quantifizierung der Bax-Immunhistochemie ... *86*
5.5.2.1. Hepatozelluläres Karzinom ... 86
5.5.2.2. Dysplastische Läsionen ... 89
5.5.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber ... 89
5.5.2.4. Referenzgewebe ... 89
5.5.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung ... *90*
5.6. TUNEL-HYBRIDISIERUNG ... 96
5.6.1. Färbeeigenschaften ... *96*
5.6.2. Quantifizierung der TUNEL-Methode ... *96*
5.6.2.1. Hepatozelluläres Karzinom ... 96
5.6.2.2. Dysplastische Läsionen ... 98
5.6.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber ... 99
5.6.2.4. Referenzgewebe ... 99
5.6.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung ... *100*
5.7. M30-IMMUNHISTOCHEMIE ... 104
5.7.1. Färbeeigenschaften ... *104*
5.7.2. Quantifizierung der M30-Immunhistochemie ... *104*
5.7.2.1. Hepatozelluläres Karzinom ... 104
5.7.2.2. Dysplastische Läsionen ... 106
5.7.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber ... 106
5.7.2.4. Referenzgewebe ... 106
5.7.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung ... *107*
5.8. BCL-2-IMMUNHISTOCHEMIE ... 113
5.8.1. Färbeeigenschaften ... *113*

5.8.2. Quantifizierung der bcl-2-Immunhistochemie ... *113*
5.9. KORRELATIONEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSMARKER UNTEREINANDER ... 114
5.9.1. HCC ... *114*
5.9.2. Referenzgewebe ... *114*
5.9.3. Vergleich der Fas- und FasL-Expression in tabellarischer Übersicht ... *115*

6. DISKUSSION ... 116

6.1. APOPTOSE UND PROLIFERATION IM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM (HCC) ... 116
6.2. FAS UND FASL: BEDEUTUNG IM HCC – „IMMUNEVASION" ... 117
6.3. ROLLE DES P53-PROTEINS ... 121
6.4. BCL-2 – BEDEUTUNG IM HCC? ... 123
6.5. HCC UND DIFFERENZIERUNGSGRADE ... 124
6.6. TUMORGRÖßE UND TUMORSTADIEN ... 125
6.7. ÄTIOLOGISCHE FAKTOREN DES HCC ... 127
6.8. HCC UND MORPHOLOGIE ... 133
6.9. DYSPLASIE-KARZINOM-SEQUENZ ... 135

7. ZUSAMMENFASSUNG ... 141

8. LITERATURVERZEICHNIS ... I

9. ANHANG ... XI

9.1. METHODISCHER ANHANG ... XI
9.1.1. Praktischer Ablauf der immunhistochemischen Färbungen ... *XI*
9.1.1.1. Vorbehandlung ... XI
9.1.1.2. Avidin-Biotin-Methode ... XI
9.1.1.3. APAAP-Methode ... XIII
9.1.2. Praktischer Ablauf der TUNEL-Methode ... *XIV*
9.1.2.1. Vorbehandlung ... XIV
9.1.2.2. TUNEL-Methode ... XIV
9.1.3. Reagenzien für Immunhistochemie ... *XV*
9.1.4. Reagenzien für TUNEL ... *XVIII*
9.2. TABELLEN ZUR KOLLEKTIVÜBERSICHT ... XIX

10. DANKSAGUNGEN ... XXVIII

11. LEBENSLAUF ... XXIX

2. Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC	Amino-Ethylcarbozol
AFP	Alpha-Fetoprotein
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
bax	bcl-2 associated X Protein
bcl-2	B-Cell-lymphoma line 2
CAH	Chronische aktive Hepatitis
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CK 18	Cytokeratin 18
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
DM	DAKO-Medium
DNA	Desoxyribonucleinacid
DN-LG	Dysplastischer Knoten geringer Atypie
DN-HG	Dysplastischer Knoten hoher Atypie
E&S	Edmondson & Steiner
EvG	Elastica-van-Giesson
Fe	Eisen
FasL	Fas-Ligand
FLC	Fibrolamelläres Karzinom
FNH	Fokale noduläre Hyperplasie
GG	Gallengang
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBsAg	Hepatitis-B-surface-Antigen
HBx	Hepatitis-B X (-Protein)
HCA	Hepatozelluläres Adenom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämalaun-Eosin
HH	Hereditäre Hämochromatose
HPF	high power field = 400-fache Vergrößerung

ISNEL	in situ DNA nick end labelling
K-W	Kruskal-Wallis
LLCD	Großzellige hepatozelluläre Dysplasie
LSAB	labelled streptavidin-biotin technique
LZ	Leberzirrhose
MRN	Makroregenerative/r Knoten
MWU	Mann-Whitney-U
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
RG	Referenzgewebe
RK	Regeneratknoten
RNA	Ribonucleinacid
SLCD	Kleinzellige hepatozelluläre Dyplasie
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
TUNEL	TdT-mediated d-UTP nick end labelling
UICC	International Union against Cancer
WHO	World Health Organisation
wt-p53	Wildtyp-p53 Protein

3. Einführung

Die physiologische Homöostase einer Zellpopulation wird durch eine Balance zwischen Apoptose und Proliferation aufrechterhalten.

Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie können Störungen in diesem komplexen Gefüge des Zellumbaus durch gleichsinnige oder gegenläufige Alteration eines oder beider Phänomene (Apoptose und Proliferation) zur Folge haben. Eine „Nettovermehrung“ des Gewebes, wie sie in benignen und malignen Neoplasien besteht, kann durch Erhöhung der Proliferation *und/oder* Verminderung der Apoptose bedingt sein.

Bereits in der Antike scheint das Regenerationspotential der Leber bekannt gewesen zu sein. Denn nach der griechischen Mythologie konnte die Leber des Prometheus trotz des täglich zugefügten Schadens durch einen Adler stets nachwachsen.

Die vorgelegte Untersuchung wurde durchgeführt, um einen Beitrag zur Klärung zu leisten, welche Rolle der Dysregulation von Proliferation und Apoptose in der Hepatokarzinogenese zukommt. Gegenstand unserer Untersuchungen war dabei, in welchem Verhältnis Proliferation und Apoptose bei bestimmten Lebererkrankungen, insbesondere in reparativen, benignen oder malignen neoplastischen Läsionen der Leber, zueinander stehen und die gestörte Zellhomöostase dieser Veränderungen widerspiegeln.

Das Apoptose- und Proliferationsverhalten wurde dabei über immunhistochemische Verfahren untersucht unter Heranziehen von Effektoren von früher und später Apoptose (M30 und TUNEL-Hybridisierung) und der Proliferation (Ki-67). Besonderes Augenmerk wurde auf den Beitrag bestimmter Zellzyklusregulatoren gerichtet, denen nach heutigem Kenntnisstand in Apoptoseinduktion (Fas, FasLigand, bax, p53) und –inhibition (bcl-2) eine zentrale Bedeutung zugeschrieben wird.

3.1. Hepatozelluläres Karzinom

3.1.1. Definition

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) besteht aus malignen Zellen mit variabel exprimierten hepatozellulären Eigenschaften. Unter den primären Leberneoplasien ist es die häufigste neben cholangiozellulärem Karzinom, Hepatoblastom und Angiosarkom.

Eine Sonderform des HCC stellt das eher seltene fibrolamelläre Karzinom (FLC) dar.

3.1.2. Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom zählt weltweit zu den häufigsten Neoplasien. Mit 437.000 neuen Fällen im Jahr 1990 steht das HCC hinsichtlich der Indzidenz weltweit an fünfter Stelle der malignen Tumoren bei Männern und an achter Stelle bei Frauen (9; 125).

Dabei differiert die geographische Verbreitung erheblich: Während in Nordeuropa, Australien, Nord- und Lateinamerika die jährliche Inzidenzrate mit unter 5/100.000 am niedrigsten liegt (49), beträgt sie in Endemiegebieten das 2,3-10fache. Die höchsten Inzidenzraten mit über 30/100.000 finden sich in Regionen Ostasiens (Männer 27.6-36.6/100.000), Mittelamerikas (Männer 20.8-38.1/100.000) und Süd-, Westafrikas (30-48/100.000). In Asien allein finden sich 76% aller weltweiten HCC. Mittlere Inzidenzen treten in Südeuropa und Südamerika auf.

Die geographische Häufigkeitsdifferenz scheint weniger auf ethnischen oder genetischen Ursachen in der Bevölkerung zu beruhen, als vielmehr auf einer unterschiedlichen geographischen Verteilung der Risikofaktoren. So wird die hohe Prävalenz von Hepatitis-Virus-Infektionen und das Vorkommen von Nahrungskarzinogenen wie Aflatoxinen als Ursache für die höhere Rate von HCC-Fällen in Ostasien und Afrika (high-risk-Regionen) gegenüber europäischen und nordamerikanischen Regionen angenommen (29). Zu beobachten ist derzeit eine rückläufige Inzidenz des HCC in Entwicklungsländern, möglicherweise als Folge der HBV-Impfung, bei eher steigender Inzidenz in Europa und den USA als Folge einer HBV- und HCV-Infektionswelle (125).

Männer sind mit einer Rate von 2-5:1 wesentlich häufiger betroffen als Frauen (54).

Insgesamt liegt die Inzidenz bei unter 40-jährigen eher niedriger und steigt mit zunehmendem Alter an. Im Westen liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 60,5 Jahren, in Hochinzidenzregionen ist dieses ein bis zwei Jahrzehnte niedriger anzusiedeln (9; 54; 125).

3.1.3. Ätiologie

Chronische HBV- und HCV-Infektionen sind weltweit am häufigsten mit hepatozellulären Karzinomen assoziiert. In der westlichen Bevölkerung (low-risk-Regionen) werden u.a. alkoholinduzierte chronische Leberschäden angeschuldigt. Prädisponierend für die Entwicklung eines HCC sind Stoffwechselerkrankungen, wie die hereditäre Hämochromatose, Tyrosinämie, M.Wilson oder ein α1-Antitrypsinmangel. In der Diskussion stehen Tabakkonsum, anabolische Steroide sowie orale Kontrazeptiva; für die Annahme kausaler Zusammenhänge sind die Hinweise derzeit nur ungenügend (50; 54; 66). Ein hormonell vermittelter Wachstumsstimulus könnte weiterhin in Zusammenhang mit dem häufig vom HCC exprimierten Androgenrezeptor stehen (54).

3.1.3.1. Leberzirrhose

Die Leberzirrhose gilt als gemeinsames Endstadium unabhängig von ätiologischen Faktoren als wichtigster pathogenetischer Risikofaktor für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms. Die komplette Leberzirrhose ist definiert durch knotige Untergliederung des Parenchyms infolge bindegewebiger zirkumferenter Septenbildung mit vermehrter Regeneration der Hepatozyten.

75-90% aller HCC entstehen in einer zirrhotisch umgebauten Leber. Kontrovers diskutiert wird, ob 1. die Leberzirrhose für sich eine präkanzeröse Läsion darstellt, oder ob 2. Leberzirrhose und HCC unabhängig voneinander durch die gleichen Faktoren ausgelöst werden, oder ob 3. der anhaltende Stimulus zur Regeneration in der zirrhotischen Leber das Gewebe anfälliger für Umweltkarzinogene macht (54).

Für jede der 3 Hypothesen existieren jeweils favorisierende Publikationen; jedoch reichen die Studien nicht aus, um den entscheidenden pathogenetischen Faktor abschließend zu definieren.

Die hepatische regenerative Aktivität in der Zirrhose scheint unabhängig von der Ätiologie einen wesentlichen Beitrag zur Hepatokarzinogenese zu leisten (6; 18; 22). Durch die gesteigerte Proliferation könnte die Wahrscheinlichkeit für die Akkumulation relevanter genetischer Abberationen ansteigen mit phänotypischer Manifestation in Form zytologischer und struktureller Atypien bis hin zu maligner Transformation (6); typischerweise treten Atypien in Regeneratknoten als formal-pathogenetisches Knoten-in-Knoten-Phänomen der Karzinogenese in Erscheinung. Shibata et al. (106) berichten von einer signifikant größeren Häufigkeit „irregulärer Regeneration“ in Form von Pleomorphie, Onkozyten, knotiger Untergliederung und Kompression umliegenden Gewebes in zirrhotischen Lebern. In zirrhotisch umgebauten Lebern mit schwerer irregulärer Regeneration treten dieser Studie zufolge HCC signifikant häufiger auf als in Zirrhosen mit diskreter irregulärer Regeneration (106). Ätiologisch besitzen dieselben Faktoren Bedeutung für die Entstehung einer Leberzirrhose wie auch für die Entstehung eines HCC.

Im Folgenden werden die derzeitigen Hypothesen über den direkten und indirekten Zusammenhang der Risikofaktoren mit der Hepatokarzinogenese dargelegt.

3.1.3.2. HBV

Bis zu 52% aller primären malignen Leberneoplasien werden einer chronischen Hepatitis-B-Infektion zugeschrieben (94). Unter allen bekannten Risikofaktoren ist die Hepatitis-B-Virus-Infektion am häufigsten mit HCC assoziiert (54).

Das Hepatits-B-Virus ist ein DNA-Virus und gehört der Familie der Hepadnaviren an. Es besteht aus einer äußeren Hülle (HBsAg = surface antigen), dem Kern (HBcAg = core antigen), der viralen DNA und der DNA-Polymerase.

Eine akute HBV-Infektion resultiert in 95% in einer vollständigen Ausheilung mit Viruselimination; das Risiko eines HCC ist hier kaum gegeben. In 5% (bei infizierten Neugeborenen in 40-80%) kommt es zur Chronifizierung der Hepatitis mit Viruspersistenz. Bei Fortschreiten der chronisch aktiven Hepatitis (CAH) bis zur Leberzirrhose steigt das Risiko, ein HCC zu entwickeln auf bis zu 5% pro Jahr (11; 124).

Zur Diskussion stehen verschiedene Pathomechanismen der Karzinogenese mit sowohl direkten als auch indirekten Effekten der CAH.

Indirekte Effekte:

HBV-infizierte Zellen unterliegen der Kontrolle durch das Immunsystem, indem sie durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten direkt lysiert und eliminiert oder durch Zytokine aus Abwehrzellen nachhaltig geschädigt werden. Indem diese Zytokine und oxidativen freien Radikale monozytären Ursprungs zu chemischen Modifikationen des Genoms führen können, kann auch das eigene Abwehrsystem Ursache von Mutationen sein (15; 70). Um trotz des Zellverlusts eine adäquate Leberfunktion aufrechtzuerhalten, werden angrenzende und so mitunter DNA-geschädigte Hepatozyten v.a. durch monozytäre Zytokine, wie Il-6 und TNF, zur Regeneration stimuliert (11).

Der beschleunigte Zellzyklus und die erhöhte Anzahl an Replikationen kann das Auftreten von Replikationsfehlern begünstigen, erworbene hepatozelluläre Mutationen können persistieren, falls Reparatur oder Apoptose ausbleiben. So wächst mit Dauer der persistierenden HBV-Infektion der mögliche Anteil der Zellen mit Mutationen und damit das potentielle HCC-Risiko (15). Neben der intensivierten Regeneration können virale Proteine wie HBsAg in sog. Milchglashepatozyten Detoxifikationsmechanismen, z.B. Cytochrom P450 beeinträchtigen, was auch den Metabolismus chemischer Karzinogene beeinflussen kann (11).

Direkte Effekte:

Neben den indirekten Einflüssen durch die chronische Entzündungsreaktion wird eine direkte Rolle von HBV in der Karzinogenese diskutiert.

Das HBV-Genom liegt auf einer zirkulären DNA; für die Replikation ist im Gegensatz zu Retroviren keine DNA-Integration ins Wirtsgenom notwendig. Eine Integration, die dem Virus aber eine langfristige Persistenz ermöglicht, erfolgt während der Hepatozytenproliferation, die als Reaktion auf den Zelltod benachbarter Zellen einsetzt (11). Durch die zufällige Integration kann das Virus eine mutagene Wirkung ausüben, indem eine genomische Instabilität am Wirtsgenom ausgelöst werden kann oder es zur Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, z.B. p53 kommen kann (54).

Einen weiteren Beitrag zur direkten Rolle leistet das HBx-Protein, das unmittelbar in die Zelltransformation eingreifen kann. Als Transkriptionsaktivator und Proteaseinhibitor nimmt es Einfluss auf die zellulären Signalwege. Es kann sowohl pro- als auch anti-apoptotisch auf die Wirtszelle einwirken (15). Die onkogene

Aktivität von HBx wird mit einer funktionellen Inaktivierung des p53-Proteins in Verbindung gebracht (91; 123). Experimente mit humanen Hepatomazelllinien zeigen auch, dass das HBx-Protein die Fas-Ligand-Expression im Sinne einer Induktion steuern kann; dadurch könnten die befallenen Zellen einer Elimination entgehen, indem Fas-Rezeptor-exprimierende T-Lymphozyten abgefangen und durch induzierte Apoptose inaktiviert werden (106).

Ein zusätzliche chronische Hepatitis-D-Infektion scheint das HCC-Risiko gegenüber einer alleinigen HBV-Infektion nicht zu erhöhen, jedoch das Intervall zwischen Infektion und HCC-Entstehung auf 20-40 Jahre zu verkürzen (HBV: 30-60 Jahre) (50).

3.1.3.3. HCV

25% der primären Leberkarzinome werden auf eine chronische Hepatitis-C-Infektion zurückgeführt (10).

Das Hepatitis-C-Virus, ein RNA-Virus aus der Familie der Flaviviren, gliedert sich in 6 Genotypen und 18 Subtypen. Weltweit verbreitet sind die Typen 1a, 1b, 2 und 3a. HCV-1b, der häufigste Typ Japans und der westlichen Welt, verursacht schwerere Formen der Lebererkrankung als die Genotypen 2 und 3. Bei HCV-1b besteht ein höheres Risiko für die Entstehung eines HCC, insbesondere auch ohne zugrundeliegende Zirrhose (4; 6;18).

Das Flavivirus besteht aus einer Lipidhülle, den Hüllproteinen E1 und E2, dem Nucleokapsid (core-Protein), den Nicht-Struktur-Proteinen NS1-NS5, wozu die RNA-abhängige RNA-Polymerase zählt, und dem (+)-ssRNA-Strang. Das Virus besitzt keine reverse Transkriptase und es gibt bisher auch keine Hinweise auf eine Integration ins Wirtsgenom (50; 107).

Eine akute HCV-Infektion (nur 10% symptomatisch) heilt in etwa 20% der Fälle aus, in 80% nimmt die Erkrankung einen chronischen Verlauf in Form einer chronisch-persistierenden oder chronisch-aktiven Hepatitis, wobei letztere eine ungünstigere Prognose aufweist mit Übergang in eine Zirrhose und Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms (30% bei HCV-bedingten Lebererkrankungen) (40).

Der Karzinogenesemechanismus ist weiterhin unklar; neben der Annahme einer ausschließlich indirekten Beteiligung gibt es zunehmend Hinweise auf einen direkten Einfluss des Virus auf Zellzyklusregulatoren der Wirtszelle.

Indirekter Effekt:

Die chronisch-aktive HCV-Hepatitis mit Leberzellnekrosen, Inflammation und Zytokinsynthese führt ähnlich der HBV-Infektion zur erhöhten Proliferationsaktitivät der Hepatozyten mit beschleunigter DNA-Synthese, die mit einem Reparaturdefizit einhergehen soll (11; 107). Diese akzelerierte Proliferation und das erhöhte Mutationsrisiko sollen phänotypisch in zytologischen Atypien mit Reorganisation der lobulären Architektur resultieren (106). Über eine zytokininduzierte Fibrose kann die CAH in eine Zirrhose mit makroregenerativen Knoten übergehen (6).

Direkter Effekt:

Zunehmend lassen sich Hinweise auf eine direkte Wirkung des Hepatitis-C-Virus in der Tumorentstehung finden, indem HCV-Proteine in die Apoptose- und Proliferationsregualtion der Wirtszelle eingreifen können durch Interaktion mit Rezeptoren und Regulatorproteinen (107). Die größte Bedeutung kommt nach bisherigen Erkenntnissen dem Core-Protein zu. Über eine Downregulation des Tumorsuppressors p53 soll das Core-Protein Zellzyklusarrest und Apoptose hemmen (107). Hepatozyten mit nachweisbarem Core-Protein scheinen empfindlicher gegenüber Fas-vermittelter Apoptose zu sein (101). Das Core-Protein scheint auch durch seine Interaktionen mit TNF-Rezeptoren die TNF-vermittelte Apoptose verstärken zu können (138). Andere Untersuchungen jedoch stellten eine antiapoptotische Wirkung fest, indem die Caspase-Kaskade durch Core supprimiert und die Fas-vermittelte Apoptose dadurch unterdrückt wird (107). Diese Kontroversität könnte auf den unterschiedlich verwendeten Zelllinien beruhen.

3.1.3.4. Aflatoxin B1

Aflatoxine, eine Mykotoxinfamilie produziert durch Aspergillus-Arten, sind potente Karzinogene. Ihr Vorkommen konzentriert sich vor allem auf tropische Länder mit feucht-heißem Klima. Die Ingestion größerer Mengen an Aflatoxin über kontaminierte Getreideprodukte und Nüsse stellt einen wichtigen Umweltfaktor dar, der insbesondere in Kombination mit einer chronischen HBV-Infektion das HCC-Risiko, um das 50-fache steigert (50). Aflatoxin B1, durch Cytochrom P450 metabolisiert in seine aktive Form, bindet an Guanin-Reste der DNA und bewirkt eine G-zu-T-Mutation, die in Codon 249 des p53-Tumorsuppressorgens einen wichtigen Beitrag zur Karzinogenese zu leisten scheint (54; 90).

3.1.3.5. Äthyltoxischer Leberschaden

In der westlichen Bevölkerung ist der alkoholinduzierte Leberschaden die führende Ursache der chronischen Lebererkrankung mit Leberzirrhose und bildet damit in dieser Bevölkerungsgruppe den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines HCC (50).

Eine hepatische Schädigung durch Alkohol ist seit langem bekannt. 1699 beschreibt der englische Physiker Thomas Heberden erstmalig eine Verbindung zwischen „scirrhous livers“ und „consumption of spirituous liquors“ (100). Die Pathogenese erfolgt über einen Mehrschrittprozess und setzt regelmäßigen Alkoholkonsum von etwa 80g pro Tag bei Männern (50g pro Tag bei Frauen) voraus (50). In Hepatozyten führt Alkohol zu erhöhter Fettsäuresynthese und bewirkt gleichzeitig eine verminderte β-Oxidation der Fettsäuren in Mitochondrien (100). Dadurch kommt es zur Akkumulation von Fettsäuren in den Hepatozyten, die schließlich bei 90% aller Alkoholiker in einer Steatosis hepatis resultiert. Ferner sind Fettsäuren Substrate und Induktoren von Zytochrom P 450 und tragen damit zur Entwicklung von oxidativem Stress bei. Folge ist eine chronische Lipidperoxidation mit Membranschädigung und Freisetzung von Peroxidationsprodukten, die zu Stimulation der Kollagensynthese und durch Chemotaxis zur neutrophil-granulozytären Infiltration führen. Diese alkoholische Steatohepatitis (ASH) entwickeln 20-40% der Alkoholiker. In 50% der Fälle von ASH entsteht daraus eine mikronoduläre Leberzirrhose (21).

Aber auch direkte karzinogene Effekte durch Alkoholmetabolite, nicht jedoch durch Alkohol selbst, werden diskutiert. Alkohol wird in der Leber durch die Alkoholdehydrogenase metabolisiert, das Abbauprodukt Azetaldehyd, ist hochtoxisch und bindet an Zellproteine, möglicherweise auch an DNA. Dadurch können mutagene und karzinogene Effekte entstehen (20; 21). In Mäusen, die längerfristig mit Alkohol gefüttert wurden, konnte eine inhibierte T-Helferzell- und CTL-Aktivität beobachtet werden, sowie eine reduzierte Zytokinexpression (35). Dieser immunsuppressive Effekt könnte auch Einfluss auf den Verlauf einer HBV- oder HCV-Infektion haben. Von einem erhöhten Risiko bei gleichzeitiger alkoholischer Lebererkrankung und HCV-/HBV-Infektion wurde in der Literatur bereits mehrfach berichtet (20; 132).

Der Nachweis für die *humane* Kanzerogenese steht jedoch noch aus.

3.1.3.6. Hämochromatose

Die hereditäre Hämochromatose (HH) ist eine autosomal rezessive Erkrankung, bei der eine kontinuierlich erhöhte Eisenaufnahme zu einer vermehrten Eisenablagerung mit der Folge von meist irreversibler Gewebeschädigung führt (10). Genetisch zugrunde liegen der HH, die mit einer Frequenz von 1:200 bis 1:400 die häufigste genetische Erkrankung in der kaukasischen Population darstellt, die Mutation C282Y im *hfe*-Gen und eine Mutation im *TfR2*-Gen (10; 82). Wichtige Komplikationen der HH sind Leberzirrhose und primäre Lebertumoren. Dabei wird das relative Risiko für die Entwicklung einer primären Leberneoplasie unter HH mit Leberzirrhose auf mehr als 200 geschätzt (82; 87). Beachtenswert ist das breite histologische Spektrum primärer Lebertumoren von HCC über kombinierte hepatozelluläre und cholangiozelluläre Karzinome zum CCC (82).

Dabei scheint die Genmutation selbst, die die Grundlage der HH darstellt, in der Karzinogenese keine Rolle zu spielen. Vielmehr wird die Eisenüberladung selbst dafür verantwortlich gemacht (30).

Über die hepatische Eisenablagerung gehen zunächst periportale Hepatozyten infolge der zytotoxischen Wirkung des ionisierten Eisens zugrunde. Dies hat eine reaktive Entzündung zur Folge mit zunehmender periportaler Fibrose, die ihren Endpunkt in der Zirrhose findet (10).

Ob Eisen selbst kanzerogen wirkt, ist noch nicht endgültig geklärt. Eine Studie am Tiermodell konnte keine genotoxischen und wachstumsfördernden Eigenschaften von Eisen nachweisen (112).

3.1.3.7. Morbus Wilson

Der Morbus Wilson, eine autosomal-rezessiv vererbte Kupferspeicherkrankheit, ist gekennzeichnet durch einen Leberschaden infolge pathologischer Kupfer-speicherung beruhend auf einer verminderten biliären Ausscheidung von Kupfer (40). Diese hepatische Manifestation äußert sich in einer Steatosis hepatis bis zur fulminanten Hepatitis. Das Endstadium stellt die Leberzirrhose dar.

3.1.4. Pathologie und Stadieneinteilung

3.1.4.1. Makropathologie, Tumorausbreitung und TNM-Klassifikation

Makroskopisch zeigt das HCC variabel große solitäre Herde, multifokale Knoten oder ein diffuses, die Leber durchsetzendes Wachstumsmuster. Die Knoten haben meist eine weiche Konsistenz und eine bunte Schnittfläche durch Blutungen, Nekrosen und Gallebildung. Multifokalität ist v.a. in virusbedingten Zirrhosen zu beobachten.

Die Ausbreitung des HCC erfolgt überwiegend hämatogen über Infiltration per continuitatem in Portal- und Lebervenenäste. Seltener tritt eine lymphogene Metastasierung in regionäre Lymphknoten ein. Insgesamt weisen 60% der HCC-Patienten bei Diagnosestellung bereits Metastasen auf, dabei ist die intrahepatische Tumorzellaussaat häufiger zu beobachten als die extrahepatische in Lunge (30-50%), Skelett (5-20%), Nebenniere (15%), ZNS und Peritoneum (5-10%). (29; 125)

Größe und Anzahl der Tumoren, der Befall der Leberlappen, Gefäßeinbrüche und Lymphknoten- sowie Fernmetastasen kommen in der TNM-Klassifikation zum Ausdruck (51; 52).

Als regionäre Lymphknoten werden die hilären Lymphknoten im Ligamentum hepatoduodenale bezeichnet (51). Seit 2002 werden die regionären Lymphknoten erweitert um die Lymphknoten entlang der Leberarterie, der Portalvene und entlang der Vena cava inferior oberhalb der Nierenvenen außer der subphrenischen Lymphknoten (52).

Stadium	**TNM-Klassifikation von 1997 (51)**	**Neue TNM-Klassifikation von 2002, gültig ab 1.1.2003 (52)**
T1	Solitär, ≤2cm, ohne Gefäßinvasion	Solitär, ohne Gefäßinvasion
T2	Solitär, ≤2cm, mit Gefäßinvasion Multipel, ein Lappen *, ≤2cm, ohne Gefäßinvasion Solitär, >2cm, ohne Gefäßinvasion	Solitär, mit Gefäßinvasion Multipel, ≤ 5cm
T3	Solitär, >2cm, mit Gefäßinvasion Multipel, ein Lappen*, ≤2cm, mit Gefäßinvasion Multipel, ein Lappen*, >2cm, mit oder ohne Gefäßinvasion	Multipel, > 5cm Invasion eines größeren Astes der Pfortader oder der Lebervenen
T4	Multipel, >ein Lappen* Invasion eines großen Astes der Pfortader oder der Lebervenen	Invasion angrenzender Organe oder anderer als Gallenblase Perforation des viszeralen Peritoneums

* Lappengrenze gegeben durch eine Projektionsfläche zwischen Gallenblasenbett und V. cava inf.

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (Zur Beurteilung eines Stadiums sind mindestens 3 Lymphknoten erforderlich)	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasierung	
	Hiläre LK im Lig. hepatoduodenale	Zusätzlich zu hilären LK: LK entlang Leberarterie, Portalvene und V.cava inferior bis oberhalb der Nierenvene (außer subphrenische LK)

MX	Keine Beurteilung der Fernmetastasierung möglich
M0	Keine Fernmetastasierung
M1	Fernmetastasierung

Tabelle 2: TNM-Klassifikation primärer Lebertumoren (HCC und CCC) (51; 52)

Die Einteilung erfolgt bei der TNM-Klassifikation nach klinischer Untersuchung durch Diagnosesicherung über sonographische, radiologische, endoskopische, chirurgisch explorative und bioptische Verfahren. Die pTNM-Klassifikation ist der klinischen Einteilung gleich, wird aber postoperativ anhand des histologischen Präparates gestellt.

3.1.4.2. Histopathologie und Grading

Die histopathologische Diagnose der „klassischen“ HCC beruht auf einer hepatozellulären Differenzierung des Tumors und Kriterien der Malignität bezüglich Zytologie und/oder strukturellem Wachstumsmuster mit z.T. ausgeprägter interindividueller und intratumoraler Heterogenität. Strukturell sind verschiedene Erscheinungsformen zu beobachten, z.B. trabekuläres Muster, wobei die Trabekel oft irregulär sind und sich aus mindestens zwei Zelllagen zusammensetzen (50; 53), oder pseudoglanduläres Muster mit Formation von Lumina (50). Ein solides Baumuster des Tumors kommt z.T. durch die Kompression von vorhandenen Trabekeln bei expansivem Wachstum zustande (54). Ein szirrhöses HCC ist gekennzeichnet durch eine prominente Fibrose innerhalb des Tumors mit bindegewebigen Septen zwischen den neoplastischen Zellverbänden.

Zytologisch fallen die Tumorzellen je nach Differenzierungsgrad durch ihre Pleomorphie bezüglich Struktur und Größe von Kernen und Zytoplasma auf. Ein Malignitätskriterium ist die erhöhte Kernplasmarelation mit einer mindestens zweifach erhöhten Kerndichte (53). Die Zellkerne sind meist vergrößert und entrundet mit prominenten Nukleolen, z.T. eosinophilen Einschlüsse und Mitosefiguren (29; 50; 53). Das Zytoplasma der polygonalen, anisozytotischen Zellen kann fein granulär und basophiler als die umliegenden Hepatozyten sein, aber auch klarzellig oder onkozytär (53; 54). Riesenzellen können das Bild prägen.

Je nach histologischem Erscheinungsbild kann das hepatozelluläre Karzinom graduiert werden. Gebräuchlich sind das Grading nach WHO (50) und nach Edmondson&Steiner (24) bzw. modifiziert nach Ishak (54).

E&S (modifiziert)		*WHO*	
Grad 1	Tumorzellen nur schwer von normalen oder Adenomzellen zu unterscheiden	WHO I	= Hoch differenziert, ähnlich Normalgewege z.T. pseudoglandulär schmaltrabekuläres Muster ↑ Kernplasmarelation
Grad 2	Pseudoglanduäres Muster häufig Kerne größer, hyperchromatisch, etwas entrundet prominente Nukleolen	WHO II	= Mäßig differenziert Trabekel > 3 Zelllagen Pseudoglanduläres Muster häufig ↑ Kernplasmarelation deutliche Nukleolen
Grad 3	↓ pseudoglanduläres Muster Stärkere Pleomorphie Kerne polygonal, größer	WHO III	= Gering differenziert Solides Muster ↑↑ Kernplasmarelation ↑ Pleomorphie
Grad 4	nur selten trabekuläres Muster fehlende Zellkohäsion hochgradige Pleomorphie Tumorriesenzellen Kerne intensiv hyperchromatisch		

Tabelle 3: Gradingkriterien nach Edmondson & Steiner (24) und WHO (50)

3.1.4.3. Klinik und Prognose des HCC

Bei Auftreten klinischer Symptome, wie Leistungsknick, reduziertem Allgemeinbefinden, Gewichtsverlust oder Oberbauchbeschwerden liegt meist bereits ein fortgeschrittenes Tumorleiden vor. Bei 30% der Patienten ist bei Diagnosestellung bereits Aszites und in 15-20% ein Ikterus zu beobachten (125). Die Prognose ist im Allgemeinen als ungünstig einzustufen, insbesondere bei hohen serologischen AFP-Spiegeln (>100ng/ml), Pfortaderthrombose und p53-Mutationen (50). Daneben sind Tumorstadium, Leberfunktion und therapeutisches Vorgehen von prognostischer Bedeutung. Bei unbehandelten Patienten beträgt die mediane Überlebenszeit ab Symptombeginn unter 12 Monate (125).

3.1.5. Fibrolamelläres Karzinom (FLC)

Das Fibrolamelläre Karzinom stellt eine Sonderform des HCC dar mit seltenem Vorkommen in Endemiegebieten, jüngerem Erkrankungsalter, geringer Assoziation

mit Vorerkrankungen der Leber und zeichnet sich durch eine bessere Resezierbarkeit und Prognose hinsichtlich der Überlebensrate aus (26; 29; 54; 125). Das umgebende nicht-neoplastische Gewebe ist meist unauffällig und nicht-zirrhotisch umgebaut (54). Epidemiologisch kommt das FLC in Asien und Afrika gegenüber westlichen Ländern seltener vor (50). Ätiologische Faktoren und Pathogenese sind noch unbekannt. Makroskopisch imponiert das FLC als hellbrauner bis grauer, gelegentlich auch grünlicher Tumor mit zentraler Narbe. Histopathologisch zeigt sich ein schmaltrabekuläres Wachstum mit charakteristischen lamellären Fasersepten. Die Tumorzellen sind großzellig-onkozytär mit eosinophilem grob-granulärem Zytoplasma, pleomorphen Kernen und prominenten Nukleolen. Häufig wird das FLC erst im fortgeschrittenen Stadium mit Gefäßeinbrüchen und ausgedehnter Metastasierung entdeckt. (29; 50; 54; 131)

3.1.6. Andere primäre Lebermalignome

3.1.6.1. Cholangiozelluläres Karzinom (CCC)

Das cholangiozelluläre Karzinom oder intrahepatische Cholangiokarzinom ist ein Adenokarzinom der intrahepatischen Gallenwege. Das Erscheinungsbild ist geprägt durch ein glanduläres und tubuläres Wachstumsmuster mit desmoplastischem Stroma (29; 54). Letzteres ist verantwortlich für die makroskopisch weiße Farbe und harte Konsistenz des Tumors.

Die meisten CCC sind eher gut differenziert und setzen sich zusammen aus hochprismatischen Zellen mit klarem oder wenig granuliertem, hell eosinophilem Zytoplasma. Die Kerne erscheinen relativ klein ohne prominente eosinophile Nucleolen (54). Die meisten CCC entstehen in nicht-zirrhotischem Lebergewebe.

Epidemiologisch sind wie auch beim HCC regionale Unterschiede zu beobachten. So ist das CCC in Japan 10-mal häufiger als in den Vereinigten Staaten, der Anteil von CCC an den primären Lebermalignomen liegt in Afrika bei 2,6%, während er in Japan auf 5,4% kommt. Diese geographische Verteilung beruht auf dem Vorkommen der wichtigsten bekannten Risikofaktoren. Dazu zählen Parasiteninfektionen, wie die Opisthorchiose und Clonorchiose. Weitere Risikofaktoren sind die intrahepatische Cholelithiasis, primär sklerosierende Cholangitis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (29; 54).

3.1.6.2. Kombinationstumor/Kollisionstumor aus HCC und CCC

Der Kombinationstumor weist innerhalb eines Tumors voneinander differenzierbare histomorphologische Kriterien, sowohl eines HCC als auch eines CCC auf. Sie machen 1-2% der HCC aus. Bei Kollisionstumoren sind die beiden simultan in der Leber vorkommenden Entitäten von einander getrennt zu finden.

3.1.6.3. Undifferenzierte Karzinome der Leber

Undifferenzierte Karzinome der Leber sind selten und entsprechen nur etwa 2% der primären Lebertumoren. Lokalisation und klinisches Erscheinungsbild sind dem des HCC vergleichbar. Epidemiologische Daten zur geographischen Verteilung sind nicht verfügbar. Es gibt Hinweis auf eine schlechtere Prognose im Vergleich zum HCC (50).

Histomorphologisch sind sie dadurch gekennzeichnet, dass sie weder als HCC noch als CCC einzuordnen sind.

3.2. Benigne Neoplasien, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

3.2.1. Hepatozelluläres Adenom

Beim hepatozellulären Adenom handelt es sich um eine benigne, in der Regel solide, nicht umkapselte hepatozelluläre Neoplasie ohne Portalfelder, randlich mit prominenten nichttriadalen Gefäßen in einer histopathologisch meist normalen Leber. Die trabekulär-zweilagig, selten azinär wachsenden Tumorzellen sind zytologisch ortsständigen Hepatozyten sehr ähnlich und zeigen nur selten Atypien oder Mitosen (53; 103). Ätiologisch liegt häufig eine langfristige Einnahme oraler Kontrazeptiva zugrunde, sodass meist jüngere Frauen betroffen sind, zunehmend auch Männer nach Einnahme anaboler Steroide. Selten prädisponieren genetische Veränderungen, wie z.B. das Klinefelter-Syndrom, Glykogenosen oder familiäre Anämien. Eine maligne Transformation ist in Einzelfällen beschrieben (17; 103).

3.2.2. Fokale noduläre Hyperplasie

Die FNH wird nicht als Neoplasie klassifiziert, sondern als fokale tumorartige Hyperplasie der Hepatozyten auf dem Boden einer intrahepatischen Perfusions-störung oder vaskulären Malformation in einer histopathologisch normalen Leber (53;

103). Typisch für die auch als fokale Zirrhose bezeichnete FNH ist ein umschrieben knotiges, bindegewebig septiertes hepatozelluläres Proliferat, häufig mit sternförmiger Narbe, entzündlichen Zellinfiltraten und Gallengangsproliferaten (29; 54). Epidemiologisch ist die FNH bei Frauen jüngeren Alters am häufigsten zu beobachten. Orale Kontrazeptiva scheinen dabei weder eine Rolle in der Entstehung noch in der Wachstumsförderung zu spielen (78). Eine maligne Transformation ist nicht bekannt (103).

3.2.3. Regeneratknoten

Ein Regeneratknoten beruht auf einer reaktiven Parenchymhyperplasie, z.B. nach Gewebsnekrose. Monoazinäre Regeneratknoten enthalten nur ein Portalfeld, multiazinäre Regeneratknoten hingegen mehrere Portalfelder und sind Ausdruck einer globalen Vorschädigung des Lebergewebes, v.a. bei zirrhotischem Parenchymumbau (53; 103). Als makroregenerative Knoten (MRN) bezeichnet man Regeneratknoten mit einer Größe von mindestens 0,5 cm (53). Die Hepatozyten zeigen keine nennenswerten Atypien und unterscheiden sich damit kaum vom umliegenden Parenchym (103).

3.2.4. Dysplastische Läsionen

Die präkanzeröse Bedeutung der großzelligen Dysplasie mit erhaltener Kernplasmarelation ist umstritten und wird eher in Frage gestellt. Dagegen ist die kleinzellige Dysplasie mit erhöhter Kernplasmarelation als präkanzeröse Läsion anerkannt. Unterschieden wird weiterhin zwischen geringer Dysplasie (low grade; LG) und schwerer Dysplasie (high grade; HG). Die LG-Dysplasie zeigt meist zweilagige Trabekel aus Zellen mit geringer Erhöhung der Kernplasmarelation und geringen nukleären Atypien ohne Mitosen. Bei der HG-Dysplasie treten neben stärkeren zytologischen Atypien wie einer höheren Kernplasmarelation, Zytoplasmabasophilie, irregulärer Kernkontur, auch strukturelle Atypien wie selten dreilagige Trabekel und azinäre Formationen auf.

Vom *dysplastischen Knoten* spricht man bei größeren knotigen Läsionen (>0,1cm), von *dysplastischen Foci* bei kleineren Läsionen (< 0,1cm) (53; 103).

	Multiazinärer RK	FNH	HCA	Dysplastischer Knoten	HCC
Ätiologie/ Pathogenese	Zirrhose Vaskuläre Erkrankung	Vaskuläre Malformation Perfusionsstörung	Steroide Kohlenhydrdat-Stoffwechsel-erkrankungen (z.B. Glykogenosen)	Chronische Virushepatitis Alkohol Hämochromatose u.a.	
Umgebende Leber	Zirrhose	normal	normal	meist Zirrhose chronische Hepatitis	
Histopathologie	Trabekel ≤ 2lagig Kein monomorphes Bild Portalfelder vorhanden keine Atypien	 Zentrale Narbe Duktuläre Proliferate Entzündung keine Atypien	Trabekel 2lagig keine Portalfelder randlich prominente nicht-triadale Gefäße selten Atypien	Trabekel meist 2lagig erhöhte Kernplasmarelation z.T. erhöhte Basophilie	Trabekel ≥ 2-3lagig Rarefizierung des retikulären Fasermusters zytologische Atypien wie beim dysplastischen Knoten Mitosen Invasion

Tabelle 1: Hepatische Läsionen im Überblick

3.3. Grundlagen der Apoptose und Proliferation

Die Regulation von Zellzyklus, Proliferation und Apoptose stellt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Gene und ihrer Genprodukte dar.

Die Erhaltung einer konstanten Organgröße ist v.a. Aufgabe der numerischen Zellzahlhomöostase, die je nach Schädigung, funktionellen oder reaktiven Erfordernissen durch das Gleichgewicht oder kontrollierte Ungleichgewicht von Proliferation und Apoptose gewährleistet sein muss.

Dieses Grundprinzip nimmt speziell in der Leber als Organ mit hohem Regenerierungspotential einen wichtigen Stellenwert ein (27).

3.3.1. Apoptose

Im physiologischen Ablauf der Apoptose - des programmierten Zelltods - können drei verschiedene Phasen unterschieden werden, die durch biochemische Faktoren und morphologisch sichtbare Phänomene charakterisiert sind: Initiierungsphase, Effektorphase und Degradierungsphase (117).

In der *Phase der Initiierung* wird der Apoptoseprozess ausgelöst durch zellinterne oder zellexterne Stimuli, wie Hormone, Zytokine oder chemische bzw. physikalische Komponenten.

In der *Effektorphase* ist die zelluläre Signalkaskade, die über Caspasen zur Apoptose führt, aktiviert. Der Ablauf ist bis zu dieser Phase reversibel.

Die Prozesse der nun folgenden *Phase der Degradierung* sind irreversibel. Morphologisch erfolgt zunächst eine Zellschrumpfung und -verdichtung. Das Kernchromatin kondensiert und erscheint in granulären Ansammlungen an den Kernmembranrand gedrängt (Chromatinmargination) (76; 111). Endonukleasen fragmentieren die DNA in Segmente von ca. 185 bp (34; 76). Es kommt zum Zellzerfall mit Bildung von Apoptosekörpern (=apoptotische Zelle), die u.a. Kernreste enthalten und rasch von benachbarten Makrophagen eliminiert werden (111).

Apoptosemarker: TUNEL und M30

Der gesamte Apoptoseprozess erstreckt sich über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden (111). Sichtbare morphologische Veränderungen der Zelle beschränken sich jedoch nur auf einen Zeitraum zwischen 34 Minuten (76) und 2 bis 3 Stunden (111) und stellen lediglich die Endphase dar. Eine Quantifizierung im H.E.-Präparat ist damit kritisch zu beurteilen, da frühe Stadien nicht erkannt werden und die lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen zu kurz in Erscheinung treten (128; 135).

Eine objektive Quantifizierung von apoptotischen Zellen ist durch die TUNEL-Technik (*T*dT-mediated d*U*TP-*n*ick-*e*nd-*l*abelling-method) nach Gavrieli et al. (34) möglich. Mit dieser Methode werden die freien 3'-OH-Enden der fragmentierten DNA markiert, wodurch apoptotische Zellen sicher identifiziert werden können. Allerdings werden auch durch Autolyse oder Nekrose bedingte DNA-Fragmente erfasst.

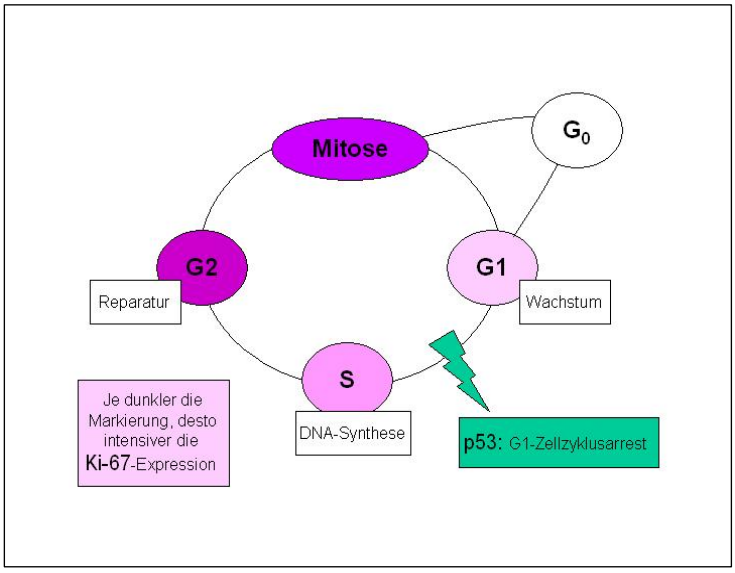
Eine weitere Methode zur Detektion apoptotischer Zellen ist die immunhistochemische Markierung mit dem Antikörper M30. Dieser erkennt Neo-Epitope im CK18-Molekül, die durch Caspasenspaltung entstanden sind. Diese Epitope sind in der vitalen epithelialen Zelle nicht und bei bereits weit fortgeschrittenem Apoptoseprozess nicht mehr nachweisbar (73). Somit markiert M30 Zellen in einer früheren Apoptosephase als die TUNEL-Methode.

3.3.2. Proliferation

Proliferation umfaßt den Zellzyklus mit seinen aktiven Phasen G_1-, S-, G_2-Phase und der Mitose. In der G_0-Phase befinden sich ruhende, nicht-proliferierende Zellen.

Proliferationsmarker Ki-67

Im H.E.-Präparat sind histomorphologisch nur Zellen als proliferierend erkennbar, die sich in der Mitose befinden, nicht jedoch Zellen in Vorbereitung auf die Mitose. Um die Quantifizierung der gesamten proliferierenden Zellpopulation zu erreichen, ist die immunhistochemische Markierung des Ki-67-Kernantigens eine geeignete Methode. Ki-67 erfüllt die Kriterien eines Proliferationsmarkers, indem es in allen aktiven Phasen des Zellzyklus mit zunehmender Intensität zur Mitose hin nachweisbar ist und zudem in der Ruhephase G_0 nicht exprimiert wird (105).



Graphik 1:

Ki-67-Expression im Zellzyklusverlauf

3.3.3. Zellzyklusregulatorproteine

3.3.3.1. p53

Eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation spielt nach heutigen Kenntnissen das Gen p53 und sein Protein wt(Wildtyp)p53. P53 ist involviert in die Transkription von Genen, in die DNA-Synthese, DNA-Reparatur und in die Apoptoseregulation. Diese komplexen biochemischen Prozesse bedienen sich einer Regulationsmaschinerie, in der viele verschiedene Zellproteine zusammenwirken und v.a. p53 mit anderen zellulären Proteinen Komplexe bildet (39). Unter physiologischen Umständen wird die zelluläre Konzentration des p53-Proteins durch seine relativ kurze Halbwertszeit ($t_{½}$ = 20 Minuten) niedrig gehalten. Erst das Einwirken verschiedener Stimuli auf die Zelle, wie Hypoxie, veränderte Stoffwechsel-bedingungen oder ein DNA-Schaden, führt zum Anstieg des p53-Levels mit erhöhter Aktivität des Regulatorproteins. Dies

geschieht v.a. durch Verlängerung der Halbwertszeit, möglicherweise durch die Komplexbindung mit anderen zellulären Proteinen, sowie einer erhöhten Translationsrate von p53mRNA (39; 74). P53 übernimmt in dieser Situation die Rolle als "Wächter des Genoms" (68), indem es durch einen G_1 –Zellzyklusarrest die geschädigte Zelle an weiterer Proliferation hindert und so einer Akkumulation transformierter Zellen vorbeugt. Die Zelle erhält durch den Zyklusarrest zudem die Chance zur Reparatur eines DNA-Schadens. Bei irreparablem Schaden initiiert p53 die Elimination der transformierten Zelle durch Apoptose (68; 74). Als Transkriptionsfaktor wirkt p53 insbesondere an Genen, deren Produkte an DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind. Dazu gehören Mitglieder der bcl-2-Familie und Fas/CD95 (74; 89). P53 kann zusätzlich in der G_2 -Phase eingreifen und einer Polyploidie vorbeugen, indem es ein Zurückfallen der Zelle in die S-Phase verhindert (19).

P53 ist auch in der Lage, Apoptose auf direktem Weg auszulösen, wichtiger scheint jedoch die Funktion als Transkriptionsaktivator anderer Kontrollproteine (74).

Da das wt-p53-Genprodukt die Zellproliferation hemmt und durch Apoptoseinitiation als „Wächter des Genoms“ fungiert, gilt die Inaktivierung dieser Tumorsuppressor-Eigenschaften als ein universaler Schritt in der Kanzerogenese (68; 75). Mutationen im p53-Gen können zum Verlust dieser Funktionen führen, was zu genetischer Instabilität und neoplastischer Transformation führen kann (68). P53-Mutationen können bei 38% der malignen Tumoren gefunden werden, im HCC wird – bei starker geographischer Variation - von einer Häufigkeit von 25-50% berichtet (39). Die häufigste Mutationsart in endemischen Gebieten für HBV und Aflatoxin ist eine Punktmutation am Codon 249 (46). Genprodukt dieses mutierten Gens ist ein abnormes funktionsloses Protein, das im Zellkern der neoplastischen Zellen akkumuliert und so erst immunhistochemisch quantitativ relevant nachweisbar wird (75).

3.3.3.2. Bcl-2-Familie

Zu den potentesten Apoptoseregulatoren zählen auch die Proteine der Bcl (B-cell-lymphoma)-2-Familie. Dazu gehören sowohl apoptosefördernde Proteine (Bax, Bak, Bcl-x_S) als auch Apoptoseinhibitoren (Bcl-2, Bcl-x_L) (93; 111). Viele dieser Proteine sind in Zellorganellmembranen lokalisiert. In den Mitochondrien kann Bax (Bcl-2 associated X protein) große Poren in der inneren Mitochondrienmembran bilden und

dadurch einen Cytochrom-C-Ausstrom bewirken, der über Caspaseaktivierung zur Apoptoseinitiation führt (38; 128).

Bcl-2 wirkt antiapoptotisch, indem es einen Cytochrom-C-Ausstrom durch Blockade von Bax verhindert (98; 133).

Andererseits wird über eine Dimerisation mit Bax die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 gehemmt, und eine proapoptotische Wirkung rückt in den Vordergrund. Der Tumorsuppressor p53 greift in diesen Mechanismus ein, indem die Expression des proapoptotischen Bax gefördert und die Expression des Apoptoseinhibitors Bcl-2 gehemmt wird. (32)

3.3.3.3. Fas/FasL-System

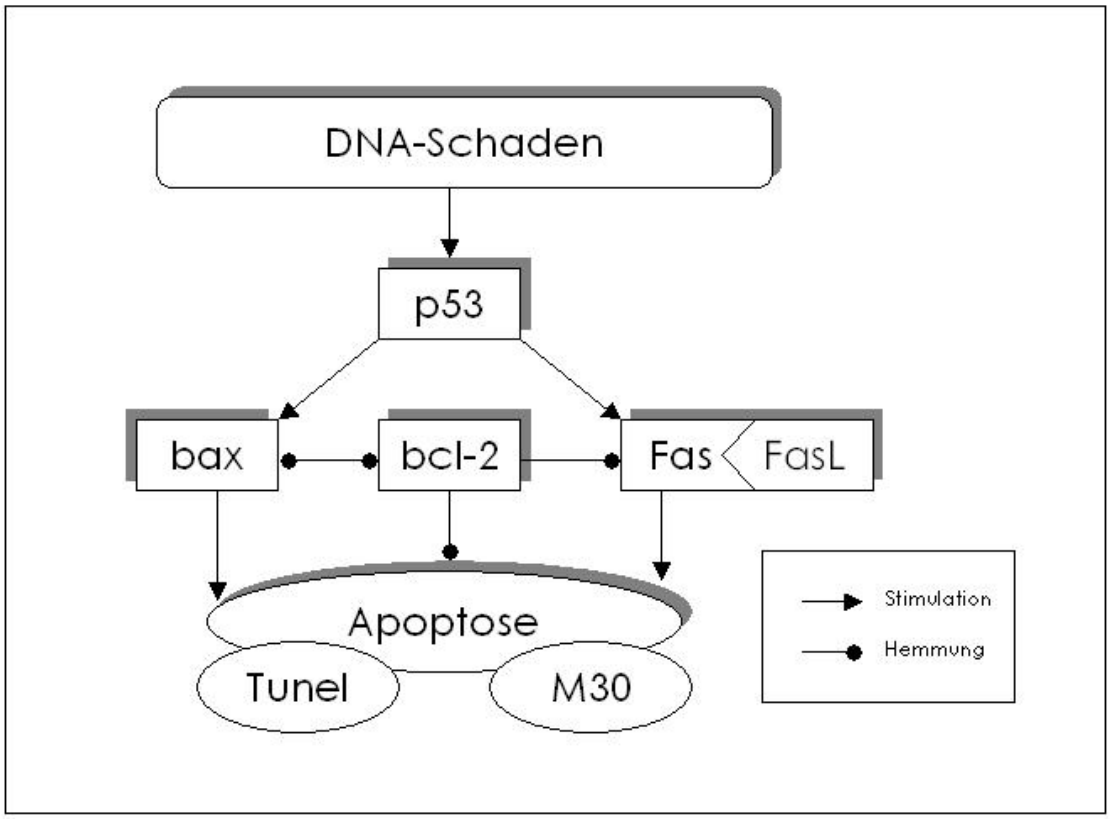
Von entscheidender Bedeutung in der Apoptoseregulation der Leber ist v.a. die TNF-/NGF-(tumor necrosis factor/ nerve growth factor) Rezeptor-Familie, zu der neben TNF-R und TGF-β auch Fas/CD95 gehört (32; 122). Das 45kD-Typ-I-Transmembranglykoprotein Fas als Rezeptor wird v.a. von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert, aber auch von vielen nicht-lymphatischen Zellen wie dem Leberepithel (33). Die physiologische Funktion liegt in der Aufrechterhaltung der Zellzahlhomöostase, indem durch Binden von FasL/CD95L (Fas-Ligand) oder eines anderen, mit Fas-Rezeptor reagierenden Proteinäquivalents Apoptose initiiert wird (61). FasL ist ein 40kD-Typ-II-Transmembran- und lösliches Protein aus der TNF-Familie, wird v.a. von aktivierten T-Lymphozyten gebildet und dient primär der peripheren T- und B-Zellhomöostase. Indem teilweise Rezeptor und Ligand von Zellen einer Population (z.B. Lymphozyten und auch Hepatozyten) simultan exprimiert und sezerniert werden, kann Apoptose einer benachbarten Zelle in Form eines sog. „Brudermordes“ ausgelöst werden (33). In löslicher Form ermöglicht sFasL parakrine und autokrine Signalvermittlung, jedoch ist die Effektivität der Apoptoseauslösung gegenüber der membrangebundenen Form deutlich herabgesetzt (33; 61; 104).

Die Bindung von FasL an Fas löst eine rezeptorvermittelte Signalkaskade aus. Über die Formation eines Multiproteinkomplexes aus Fas-Rezeptor, zytosolischem Adapterprotein FADD (*F*as-*a*ssociated protein with *d*eath *d*omain) und FLICE (*F*ADD-*l*ike *i*nterleukin-1β-*c*onverting-*e*nzyme = Caspase 8) wird eine Kaskade von

Caspasen aktiviert, die in mitochondrialer Dysfunktion mit Cytochrom-C-Ausstrom und dadurch in Apoptose resultieren (32; 93).

Das zytoprotektive Bcl-2-Protein kann auch diesen von Fas/FasL induzierten Cytochrom-C-Ausstrom und damit Apoptose verhindern (133).

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor für Fas/CD95; p53 kann damit als Reaktion auf einen DNA-Schaden über erhöhte Transkription von Fas die Apoptose induzieren (89).



Graphik 2: Interaktionen der untersuchten Zellzyklusregulatorproteine

3.4. Fragestellungen

Die vorgelegte Arbeit wurde unter folgenden Fragestellungen durchgeführt:

Welche Störungen der Regulation von Zellproliferation und Apoptose liegen bei der hepatozellulären Hepatokarzinogenese vor?

- Sind derartige Störungen durch immunhistochemische Untersuchungen von wichtigen Regulationsgenen bzw. ihren Proteinen nachweisbar?
- Lassen sich dabei Unterschiede innerhalb eines hepatozellulären Karzinoms und/oder zwischen den Karzinomen unterschiedlicher Patienten (intra- oder interindividuelle Heterogenität) nachweisen?
- Bestehen Unterschiede zwischen unterschiedlichen Tumorgrößen bzw. –stadien und bei unterschiedlichen Differenzierungsgraden, lassen sich daraus Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen molekularen und phänotypischen Alterationen ziehen?
- Welche Unterschiede lassen sich zwischen den hepatozellulären Karzinomen und dem umgebenden Gewebe feststellen?
- Ergeben sich Hinweise auf eine formale Karzinogenese-Sequenz, z.B. Dysplasie-Karzinom- oder Adenom-Karzinom-Sequenz?
- Lassen sich aus den Ergebnissen Hinweise auf ein unterschiedliches tumorbiologisches Verhalten oder für Diagnostik und Therapie relevante Schlussfolgerungen ableiten?

Die Untersuchungen erfolgten an menschlichem Lebergewebe mit immunhistochemischen Methoden. Damit wird erstmals eine Untersuchung an ex-vivo-Gewebeproben mit einem komplexen Untersuchungsansatz durchgeführt. Die Analyse von bioptisch gewonnenen Gewebeproben bietet z.B. gegenüber zellkulturellen Studien den Vorteil, dass das Untersuchungssubstrat der in vivo-Situation wesentlich näher kommt.

4. Material und Methoden

4.1. Material

Das untersuchte Material entstammte dem makro-/histopathologischen Untersuchungsgut des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München aus dem Zeitraum zwischen 1995 und 2000.

Dabei handelte es sich um Probeexzisionen (PE), Teilresektate oder explantierte Lebern von insgesamt 65 Patienten. Nach Standardfixation für 24 Stunden in 4%-igem gepuffertem Formalin erfolgte die Paraffineinbettung (Paraplast, Fa. Vogel, Giessen, Deutschland). Zur Routinediagnostik waren Standardfärbungen in HE, EvG und Fe angefertigt worden.

Das Kollektiv umfaßte 51 Patienten mit hepatozellulären Karzinomen, darunter ein Fibrolamelläres Karzinom. Weiterhin im Kollektiv enthalten waren ein Kollisionstumor aus einem HCC und einem CCC, zwei Fälle mit undifferenzierten Karzinomen, ein hepatozelluläres Adenom, drei Fälle von FNH, und 7 Fälle von Leberzirrhose (n=6) oder Dysplasie (n=1) ohne weiteres Vorkommen einer der oben genannten Entitäten. Jeweils angrenzendes, nichtneoplastisches Leberparechym (phänotypisch normales Lebergewebe oder zirrhotisch transformiertes Leberparenchym) ging als Referenzgewebe in die Auswertung ein.

4.1.1. Maligne Tumoren der Leber

Im untersuchten Kollektiv fanden sich 54 Patienten mit malignen neoplastischen Läsionen der Leber.

Dabei wurde bei 51 Patienten (8 Frauen und 43 Männer im Alter zwischen 1,5 und 78,2 Jahren (Median 60,0 Jahre)) ein hepatozelluläres Karzinom diagnostiziert. Bei einem Patienten (10 Jahre, männlich) lag dabei ein HCC vom Fibrolamellären Typ vor.

In einem Fall (männlicher Patient, 60,6 Jahre) zeigte sich das Bild eines synchronen, voneinander getrennten hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinoms (Kollisionstumor). In der Auswertung erwies sich dabei das HCC vergleichbar mit den übrigen hepatozellulären Karzinomen, so dass es in der Gesamtauswertung in die Gruppe der hepatozellulären Karzinome mit aufgenommen wurde. Das CCC wurde gesondert betrachtet.

Bei zwei Patienten (ein Mann, 63,4 Jahre und eine Frau, 64,4 Jahre) lagen nach derzeit geltender Definition undifferenzierte Karzinome vor, die nicht eindeutig als HCC oder CCC zu klassifizieren waren.

Bei 32 Patienten war eine Teil- bzw. Segmentresektion, in 30 Fällen eine Hepatektomie vorgenommen worden, und in 2 Fällen lag Material in Form von Keilexzisionen, in einem Fall eine Stanzbiopsie vor.

Makro- und histopathologisch gesichert wiesen 28 Patienten unifokale, 23 Patienten mehrere Karzinomherde auf. Bei 3 Patienten konnte die Anzahl der Karzinomherde weder aufgrund der klinischen Materialbezeichnung noch anhand zusätzlicher klinischer Angaben abschließend geklärt werden.

Die Tumorgröße lag zwischen 0,5 cm und 17,0 cm (Median 3,5 cm).

Da das Untersuchungsgut dem Zeitraum 1995 bis 2000 entstammte und die vorgelegte qualitative, quantitative und statistische Datenauswertung 2001 bis Anfang 2003 erfolgte, wurde die zu dieser Zeit geltende und angewandte *postoperative histopathologische p*TNM-Klassifikation nach UICC von 1997 (51) für die Auswertung der erhobenen Daten zugrunde gelegt. Die ab dem 01.01.2003 geltende Auflage (52) der UICC fand keine Berücksichtigung.

Gemäß den allgemeinen Kriterien der histopathologischen pTNM-Klassfikation (51) wurden die HCC in 8 Fällen dem Stadium pT1 zugeordnet, je 14 Fälle den Stadien pT2 und pT3 und 12 Fälle dem Stadium pT4. Die Zuteilung zu pT4 beruhte bei 9 Patienten auf Befall beider Lappen, bei 3 auf der Invasion eines größeren Gefäßastes. Nicht klassifiziert wurden eine Stanzbiopsie (PE) und 2 weitere Fälle mangels exakter klinischer Angaben zur Lokalisation. Der Kollisionstumor zeigte beide Herde im linken Leberlappen (pT3). Bei den undifferenzierten Karzinomen wies das eine einen multiplen Befall beider Leberlappen auf (pT4), das andere einen Befall des rechten Leberlappens mit 2 Herden, die jeweils kleiner als 2cm waren (pT2).

Das Stadium pN0 wurde bei 6 HCC, das Stadium pN1 bei 2 Karzinomen (FLC und undifferenziertes Karzinom) diagnostiziert; die anderen Karzinome konnten keinem pN-Stadium zugeteilt werden, weil höchstens zwei Lymphknoten vorhanden waren, nach damals geltender Empfehlung der UICC zur Nodalklassifikation aber mindestens drei Lymphknoten als erforderlich erachtet wurden. Ein Fall (HCC) wurde als pM1 (großes Netz) klassifiziert.

Histopathologisch graduiert wurde modifiziert nach Edmondson & Steiner (24) sowie nach WHO (50). Dabei wurde nach Modifikation von Edmondson & Steiner ein HCC mit Grad 1, 5 HCC mit Grad 1-2, 16 HCC mit Grad 2, 13 HCC mit Grad 2-3, 12 HCC mit Grad 3 und 3 HCC mit Grad 3-4 und ein HCC mit Grad 4 klassifiziert. Bei der Graduierung nach WHO resultierten 11 HCC mit Grad I, 9 HCC mit Grad I-II, 20 HCC mit Grad II, 7 HCC mit Grad II-III, 4 HCC mit Grad III**.** Das HCC, das mittels einer Stanzbiopsie (PE) diagnostiziert wurde, wurde nicht in eine Differenzierungsstufe aufgenommen.

Folgende, mögliche prädisponierenden Faktoren für die Karzinogenese lagen vor: bei 4 Patienten eine chronische HBV-Infektion, bei 17 Patienten eine chronische HCV-Infektion, und bei 4 Patienten mit HCC ein erhöhter Alkoholkonsum. Bei 4 Patienten bestand aufgrund typischer histopathologischer Veränderungen im nicht-neoplastischen Lebergewebe der Verdacht auf eine hereditäre Hämochromatose. Unter diesen Fällen war ein Fall mit kombinierter HBV- und HDV-Infektion und ein Fall simultaner Hämochromatose und HBV-Infektion. Die Diagnosen wurden klinischen Angaben entnommen, eine zusätzliche systematische Verifizierung der Infektionen erfolgte nicht.

In einem undifferenzierten Karzinom lag ätiologisch eine simultane HCV- und HBV-Infektion vor.

In 10 Fällen von 51 HCC (19,6%) war das angrenzende Lebergewebe nicht zirrhotisch umgewandelt (incl. Kollisionstumor und FLC), in 41 Fällen von 51 HCC (80,4%) lag ein zirrhotischer Umbau der Leber vor.

4.1.2. Dysplastische Läsionen

Im untersuchten Patientenkollektiv waren 9 männliche Patienten im Alter zwischen 18 Monaten und 72 Jahren mit fokaler, kleinherdig verteilter hepatozellulärer Dysplasie enthalten. Bei 8 Patienten mit Dysplasie fanden sich gleichzeitig in der zirrhotisch umgebauten Leber HCC-Herde. Bei einem Patienten (Pat. „HG-DN“, Tab. 40, S. XXIII) mit dysplastischen Veränderungen waren weder eine zugrundeliegende Leberzirrhose noch ein Karzinom zu beobachten. In den insgesamt 9 Fällen dysplastischer Knoten lag bei 3 eine geringe (low-grade) Dysplasie und bei 6 eine schwere (high-grade) Dysplasie vor. Klinischerseits war in 1 Fall von geringer

Dysplasie und in 2 Fällen von schwerer Dysplasie pathogenetisch eine chronische Infektion mit HCV angegeben worden.

4.1.3. Benigne Neoplasien, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

Im Kollektiv befand sich eine 36-jährige Patientin mit 2 *hepatozellulären Adenomen* in unterschiedlichen Segmenten beider Leberlappen ohne Leberzirrhose (maximale Größe: 3,7 cm). Die beiden Adenome wurden bei gleichem immunhistochemischen Verhalten in der Auswertung zu einem Gesamtwert zusammengefasst.

Bei den drei Patientinnen mit *fokaler nodulärer Hyperplasie* im Alter zwischen 19 und 36 Jahren war eine Segmentresektion durchgeführt worden. In zwei Fällen war der rechte Leberlappen, in einem Fall waren beide Lappen betroffen.

Die Herdgröße lag bei maximal 2,3 cm. In einem Fall wurde die Knotengröße makropathologisch nicht erfasst. Es bestand keine Leberzirrhose.

Von 5 Patienten des Kollektivs (eine Frau und 4 Männer im Alter zwischen 36 und 56 Jahren) wurden Makroregenerative Knoten (MRN) in einer Größe von 0,5cm bis 2,0cm untersucht. Es fanden sich 3 MRN in HCC-angrenzendem zirrhotisch umgebauten Leberparenchym und 2 MRN bei Patienten mit der Diagnose einer kompletten Leberzirrhose ohne Karzinom. In allen 5 Fällen war klinisch eine chronische HCV-Infektion bekannt, in einem Fall war die Kombination mit Alkoholabusus von klinischer Seite angegeben worden.

4.1.4. Referenzgewebe

Als Referenzgewebe dienten 61 Proben nicht-neoplastischen Leberparenchyms. Dabei stammten 50 Proben aus Lebern mit synchron vorhandenem HCC (FLC ohne Referenzgewebe). 4 Proben entstammten Lebern mit synchronem Kollisionstumor aus HCC und CCC (n=1), undifferenzierten Karzinomen (n=2) oder HCA (n=1).

Die übrigen 7 Proben (3 Frauen und 3 Männer im Alter zwischen 15 und 58 Jahren) entstammten Lebern ohne tumorartige oder neoplastische Läsion, jedoch mit der Diagnose einer kompletten Leberzirrhose (n=6) oder einer Leber mit Dysplasie ohne Leberzirrhose (n=1). Ätiologisch lag in den 6 Fällen von Leberzirrhose in 4 Fällen eine HCV-Infektion vor, in einem Fall eine Kombination aus HCV-Infektion und Alkoholabusus und in einem Fall ein M. Wilson.

Insgesamt waren die 61 Referenzgewebsproben in 48 Fällen zirrhotisch umgebaut, in 12 Fällen lag keine Leberzirrhose vor. Beim Referenzgewebe der Stanzbiopsie konnte keine Aussage bezüglich eines zirrhotischen Umbaus getroffen werden.

4.2. Methoden

Von den routinemäßig formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebsstücken wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen ca. 1µm dicke Schnitte, für die TUNEL-Methode ca. 6µm dicke Schnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger (SuperFrost*/Plus, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte bei einer Temperatur von 37°C 15-18 Stunden getrocknet.

Die Entparaffinierung erfolgte in Xylol für 30 Minuten, die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%,70%) für jeweils 5 Minuten und in Aqua dest. für 2x5 Minuten.

4.2.1. Immunhistochemie

4.2.1.1. Grundlagen

Ziel der immunhistochemischen Untersuchung ist es, eine definierte Gewebe- bzw. Zelldeterminante mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen.

Dazu bedarf es spezifischer Primärantikörper, die idealerweise monoklonaler Genese sind, d.h. ein gegen ein bestimmtes Antigen gerichteter Antikörper detektiert spezifisch dieses Epitop.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerziell erhältliche monoklonale Primärantikörper, generiert in der Maus, verwendet.

4.2.1.2. Färbemethoden

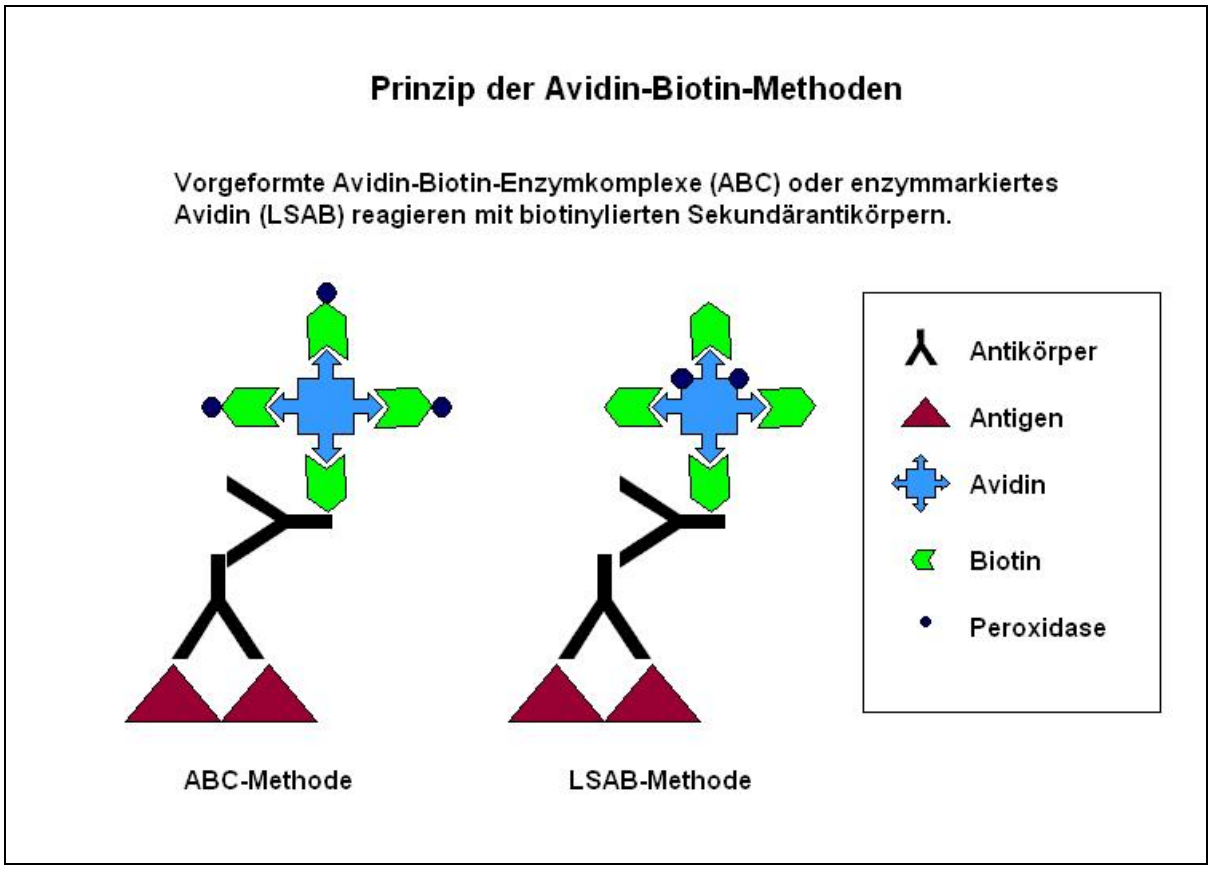
Zur Detektion des sog. Primärantikörpers wurden in dieser Untersuchung indirekte enzymatische Methoden angewandt. Im Gegensatz zur direkten Methode, bei der der Primärantikörper selbst mit einem Enzym gekoppelt ist und so *direkt* nachgewiesen werden kann, greift bei der indirekten Technik ein zweiter sog. Sekundär- oder Brückenantikörper den ersten am F_c-Teil an. Dieser Sekundärantikörper verbindet den Primärantikörper mit einem Enzymkomlex.

4.2.1.2.1. Avidin-Biotin-Methode

Bei der Avidin-Biotin-Methode ist der Sekundärantikörper mit dem Vitamin Biotin konjugiert. Ein Komplex aus Avidin – ein Eiweißmolekül mit vier Bindungsstellen für Biotin – verknüpft mit dem Enzym Peroxidase ist über Biotin an den Sekundärantikörper gekoppelt.

Mit einem geeigneten Chromogen kann das Enzym Peroxidase und damit das gesuchte Antigen nachgewiesen werden.

Diesem Verfahren gehören die „Avidin-Biotin-Komplexmethode“ (ABC) sowie die „markierte Streptavidin-Biotintechnik“ (= labelled streptavidin-biotin technique = LSAB) an. Bei der ABC-Methode ist die Peroxidase mit Biotinmolekülen konjugiert, die an Avidin gebunden sind. Bei der LSAB-Technik dagegen ist das Enzym mit Avidin selbst verknüpft.



Graphik 3: Prinzip der Avidin-Biotin-Methode in schematischer Darstellung

Verwendete Primärantikörper in der Avidin-Biotin-Methode:

p53

Der DO-7- Antikörper reagiert sowohl mit dem Wildtyp als auch mit der mutierten Form des humanen Proteins p53. Er erkennt ein Epitop zwischen den Aminosäuren 19 bis 26 am N-terminalen Anteil von p53. (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark)

Fas/CD95

Der Dx2-Antikörper bindet an ein funktionelles Epitop des Fas-Moleküls.

(Fa. DAKO Corporation, Carpinteria, USA)

Fas Ligand/CD95L

Der dem Klon 33 entstammende Antikörper ist gegen ein Epitop gerichtet, das zwischen den Aminosäuren 116 und 277 des Proteins Fas Ligand liegt. (Fa. Transduction Laboratories, Lexington, USA)

Bax

Der 2D2-Antikörper greift an einer N-terminalen Peptidsequenz des humanen Bax-Proteins (Isoformen Bax-α,–β,–δ,–ω) an. (Fa. Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA)

Bcl-2

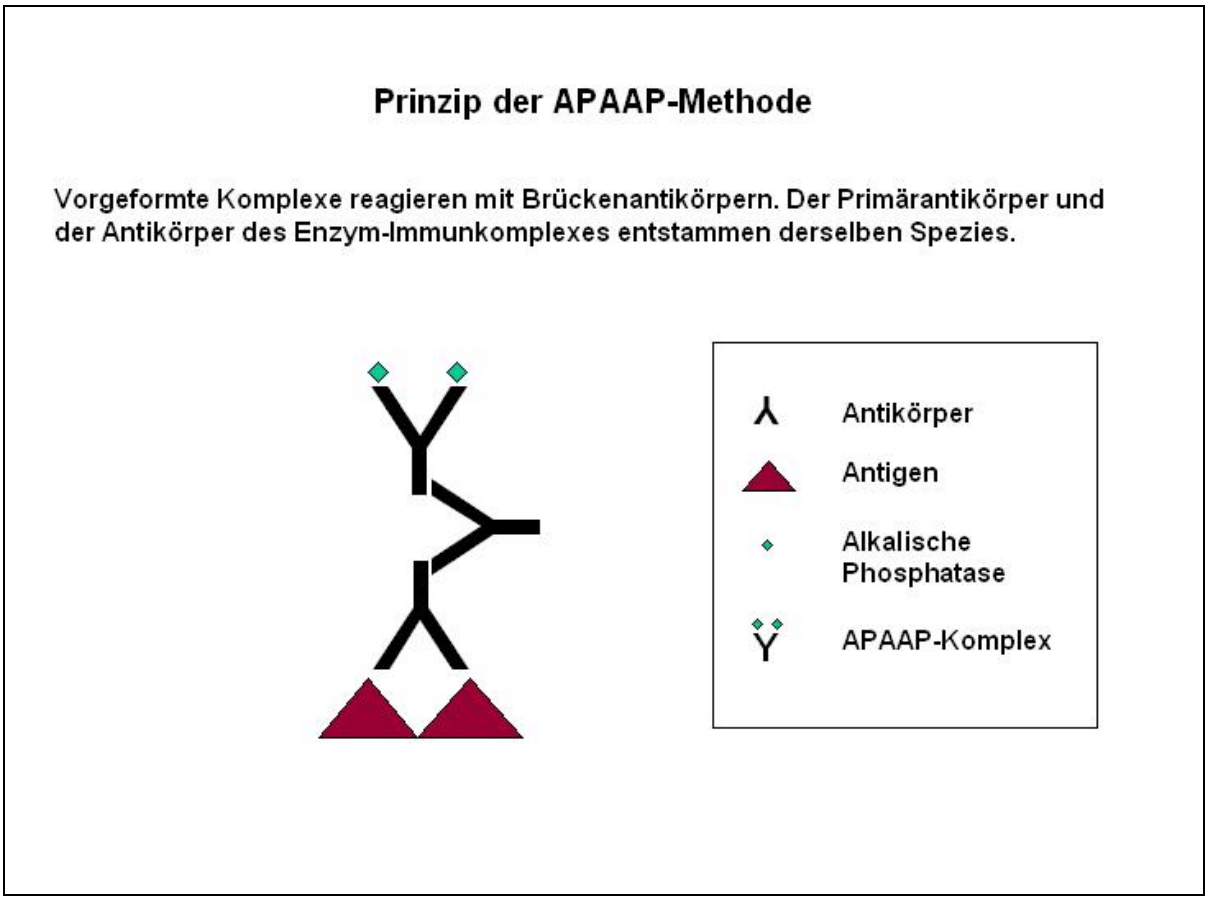
Der Antikörper des Klons 124 reagiert mit einem Epitop zwischen der 41. und 54. Aminosäure des bcl-2-Proteins. (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark)

M30/CytoDEATH

Der M30-Antikörper bindet an ein Epitop des durch Caspase gespaltenen Cytokeratin -18-Proteins. (Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland)

4.2.1.2.2. APAAP-Methode

Der Brückenantikörper bei der APAAP- (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-) Methode verbindet über seine beiden F_{ab}-Fragmente den Primärantikörper mit einem Komplex aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Antikörper. Das Enzym Alkalische Phosphatase und damit das markierte Antigen wird mit einem kompatiblen Chromogen sichtbar gemacht.



Graphik 4: Prinzip der APAAP-Methode in schematischer Darstellung

Verwendeter Primärantikörper in der APAAP-Methode:

Ki-67

Der Antikörper MIB1 weist das humane nukleäre Antigen Ki67 nach, dessen Bindungsepitop nicht näher bezeichnet ist. (Fa. dianova, Hamburg, Deutschland)

Antikörper	**Firma (Klon)**	**Verdünnung**		**Vorbehandlung**	**Detektions-system**	**Peroxidase-/ Biotinblock**
p53	DAKO (DO-7)	1:20	in RM	3x10' Citrat MW	LSAB-Kit	+
Fas/CD95	DAKO (Dx2)	1:40	in DM	3x10' TRS6 MW	LSAB-Kit	+
FasL/CD95L	Transduction (33)	1:1000	in DM	3x10' Glyca MW	ABC-Elite-Kit	+
Bax	Zytomed (2D2)	1:150	in DM	3x10' TRS9 MW	ABC-Elite-Kit	+
Bcl-2	DAKO (124)	1:30	in DM	3x10' TRS6 MW	ABC-Elite-Kit	+
M30 CytoDeath	Boehringer (M30)	1:30	in DM	15' Citrat MW	ABC-Elite-Kit	+
Ki67	dianova (MIB 1)	1:50	in DM	3x10' TRS6 MW	APAAP-M	-

Tabelle 4: Übersicht aller verwendeten Antikörper

4.2.1.3. Blockierungen

Proteine und damit insbesondere auch Immunglobuline lagern sich an stark geladene Kollagen- und Bindegewebselemente an. Man umgeht unspezifische Bindungen von Primär- und Sekundärantikörpern, indem durch eine neutrale Proteinlösung die elektrisch geladenen Stellen vorher abdeckt werden. Dabei handelt es sich im Allgemeinen um Normalserum der Spezies, aus der der Brückenantikörper stammt.

Bei den aufgeführten immunhistochemischen Verfahren kommen Substanzen zum Einsatz, die auch physiologisch im Gewebe vorhanden sind; um unspezifische Reaktionen des Chromogens mit endogener Peroxidase zu vermeiden, wird die Enzymaktivität mit einer 7.5%-igen wässrigen Wasserstoffperoxidlösung blockiert.

Im Leberparenchym kann endogen vorkommendes Biotin zu falsch-positiven Ergebnissen führen; deshalb wird bei diesen Methoden zusätzlich eine Blockierung mit einem Avidin-Biotin-System durchgeführt.

4.2.2. TUNEL (=TdT-mediated d-UTP nick end labelling)-Methode

Während des Apoptoseprozesses kommt es zu charakteristischen Veränderungen von Zellmorphologie und -struktur, wie Zellschrumpfung, Kernchromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und schließlich Bildung von Apoptosekörpern (34; 42; 95; 135).

Die von Gavrieli et al. (34) entwickelte TUNEL-Methode erlaubt die in-situ-Markierung von DNA-Brüchen in histologischen Gewebeproben. Die Methode basiert auf einer enzymatischen Reaktion, in der die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) gekoppelte Nukleotide (dUTP) an das 3‘-OH-Ende der fragmentierten DNA bindet.

Im verwendeten ApopTag Peroxidase-Kit (Fa. Intergen Company, New York, USA) sind die Nukleotide mit Digoxigenin gekoppelt. Daran bindet ein gegen Digoxigenin gerichteter Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert ist. In einer peroxidaseabhängigen Färbereaktion werden so indirekt die apoptotischen Kerne sichtbar gemacht. (48)

4.3. Auswertung, Quantifizierung und statistische Datenanalyse

4.3.1. Allgemeines

Pro Fall des 65 Patienten umfassenden Kollektivs wurden zwischen 1 und 6 Blöcke ausgewählt, von denen jeweils ein H.E.-Schnitt, 7 immunhistochemisch gefärbte Schnittpräparate mit den oben aufgeführten Antikörpern und eine TUNEL-Färbung angefertigt wurden.

Bei der Auswertung wurden allgemein qualitative und „semiquantitative“ oder „quantitative“ Unterschiede jeweils innerhalb einer Läsion in den einzelnen Färbungen für sich gesondert registriert. Es wurde dabei versucht, die Unterschiede für eine einzelne Färbung und zwischen den Färbungen jeweils mit der gegebenenfalls variablen Histopathologie innerhalb einer Läsion eines Patienten zu korrelieren (intratumorale Heterogenität). Darüberhinaus wurden die Resultate für die jeweiligen Färbungen mit denen anderer Läsionen derselben Entität verglichen (individuelle Heterogenität). Schließlich wurden die Ergebnisse der Färbungen für unterschiedliche Entitäten untereinander in Beziehung gesetzt.

4.3.2. Immunhistochemische Auswertung

4.3.2.1. Prinzip der Auswertung der immunhistochemischen Präparate einschließlich der TUNEL-Hybridisierung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate wurden je nach verwendetem Antikörper unterschiedlich ausgewertet.

Die Quantifizierung bei den immunhistochemischen Färbungen für p53, Ki67, M30 und bei der TUNEL-Methode erfolgte durch Auszählen der positiv reagierenden Hepatozyten (unabhängig von der Färbeintesität). Daraus wurde der Anteil im Schnittpräparat in % ermittelt. Als *positiv* wurden Zellen gewertet, die eindeutig eine stärkere, kräftigere Färbung aufwiesen als unspezifisch angefärbtes umgebendes Gewebe und Bindegewebe

Bei Färbungen mit bax, Fas und FasL wurde eine „semiquantitative“ Bewertung gewählt, indem der Anteil positiver Zellen im Gewebe geschätzt und als Score wiedergegeben wurde.

Dabei wurde folgende Scoreverteilung verwendet:

0-0,1%	0
0,1%<x≤10%	1
10%<x≤20%	2
20%<x≤30%	3
30%<x≤40%	4
40%<x≤50%	5

50%<x≤60%	6
60%<x≤70%	7
70%<x≤80%	8
80%<x≤90%	9
90%<x≤100%	10

Tabelle 5: Scoreverteilung der immunhistochemischen Untersuchungen von bax, Fas und FasL

Bei Präparaten der bcl-2-Immunhistochemie wurde die Anwesenheit von gefärbten Zellen mit „positiver Immunhistochemie“, das Fehlen mit „negativer Immunhistochemie“ bezeichnet.

Darüberhinaus wurden qualitative Charakteristika der Färbereaktionen, wie diffuse oder granuläre, membranständige-zirkuläre oder polare Färbereaktion und die Färbeintensität berücksichtigt und dokumentiert.

4.3.2.2. Ermittlung eines Gesamtwertes pro Antikörper, Patient und Entität

Pro Patient und Antikörper wurde jeweils ein Wert für die unterschiedlichen histomorphologischen Entitäten ermittelt (z.B. ein Wert für HCC und ein Wert für angrenzendes Gewebe).

Bei homogenem Färberesultat innerhalb einer Läsion wurden 5 „*h*igh *p*ower *f*ields“ (HPF), d.h. 5 lichtmikroskopische Blickfelder in 400-facher Vergrößerung (Objektiv 40, Sehfeldzahl 20), zufällig ausgewählt, bewertet wie oben beschrieben und ein Mittelwert aus den 5 ermittelten Werten der einzelnen HPF gebildet.

Bei heterogenem Färberesultat innerhalb einer Läsion (insbesondere HCC-Fälle) wurden in jedem einzelnen der heterogenen Areale 5 HPF zufällig ausgewählt, bewertet und durch Mittelung aus den 5 Werten der HPF ein Wert gebildet. Aus allen Werten der unterschiedlichen Areale einer Läsion wurde ein Gesamtwert berechnet. Damit kleinere Areale in dem Gesamtwert der Läsion nicht relativ überrepräsentiert werden als größere Areale, wurden die Flächenverhältnisse bei der Ermittlung des Gesamtwertes abgeschätzt und verrechnet.

Bei mehreren Läsionen pro Patient wurde der Mittelwert der einzelnen Gesamtwerte der Läsionen bestimmt, so dass pro Patient ein Wert pro Entität resultierte.

4.3.3. Auswertung nach Morphologie

Die meisten der 52 HCC (incl. HCC des Kollisionstumors) zeigten intratumoral ein abschnittsweise strukturell und/oder zytologisch heterogenes Erscheinungsbild. Um gezielt mögliche Korrelationen mit histomorphologischen Eigenschaften zu untersuchen, wurden für eine gesonderte Untersuchung einzelne Fälle aus dem Kollektiv selektiert.

Bei 23 Patienten mit HCC ließ sich in 28 Karzinomarealen nach zytologischen und strukturellen Kriterien ein dominantes histomorphologisches Erscheinungsbild charakterisieren. 11 Areale zeigten eosinophile Tumorzellen in meist trabekulärer, teils pseudoglandulärer Struktur, 10 Areale wiesen einen klarzelligen Aspekt und eine häufig solide oder makrotrabekuläre Struktur auf, und 7 Areale zeigten Tumorzellen mit eher basophilem Zytoplasma, dabei auch hochprismatischer Zellform mit pseudoglandulärem Baumuster. Mituntersucht wurden in dieser Kategorie auch die 2 undifferenzierten Karzinome und das CCC des Kollisionstumors.

Areale, die einem Patienten entstammten, aber verschiedenen Kategorien zugeteilt wurden, wurden aufgrund des histomorphologischen Unterschieds in der Statistik als voneinander unabhängig berücksichtigt.

Pro Areal wurden 5 HPF zufällig bestimmt, ausgewertet und ein Mittelwert für dieses morphologisch charakteristische Areal gebildet.

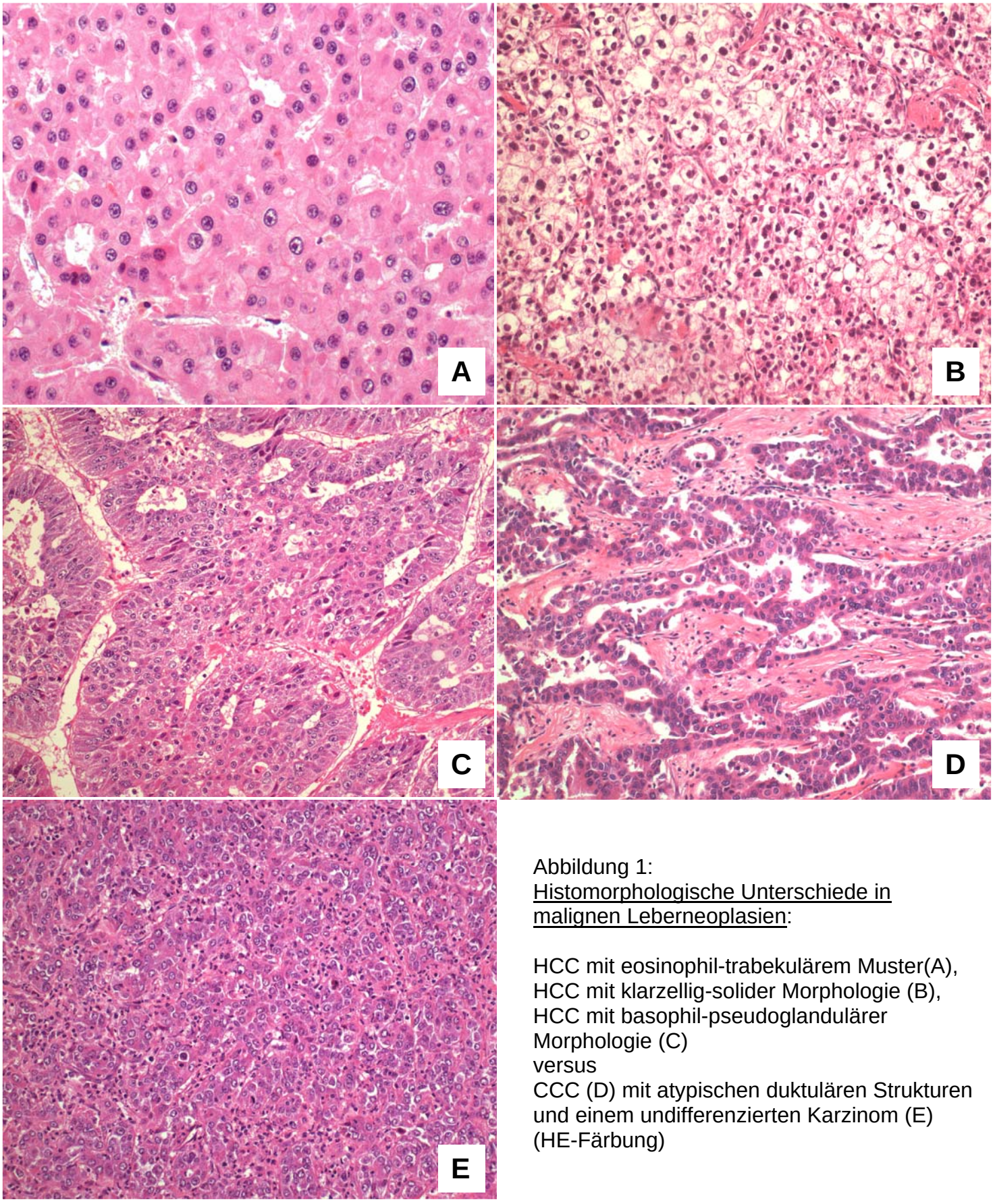


Abbildung 1:
Histomorphologische Unterschiede in malignen Leberneoplasien:

HCC mit eosinophil-trabekulärem Muster(A),
HCC mit klarzellig-solider Morphologie (B),
HCC mit basophil-pseudoglandulärer Morphologie (C)
versus
CCC (D) mit atypischen duktulären Strukturen und einem undifferenzierten Karzinom (E)
(HE-Färbung)

4.3.4. Auswertung nach Differenzierungsgraden

Weil die Hepatozellulären Karzinome abschnittsweise einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad aufwiesen, wurden für eine gesonderte Auswertung 32 Areale aus dem Kollektiv der HCC selektiert, die eindeutig einem Differenzierungsgrad modifiziert nach E&S (24; 54) zuzuordnen waren. Dabei wurden 2 Areale mit Grad 1, 3 Areale mit Grad 1-2, 12 Areale mit Grad 2, 5 Areale mit Grad 2-3, 7 Areale mit Grad 3, 2 Areale mit Grad 3-4 und 1 Areal mit Grad 4 klassifiziert. Für die statistische Erhebung wurden Grad 1 mit Grad 1-2, Grad 2 mit Grad 2-3 und Grad 3 mit Grad 3-4 zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst. Die Zusammenfassung in dieser Kombination war sinnvoll, weil sich diese Gruppen jeweils am ähnlichsten in ihrem immunhistochemischen Verhalten waren.

Pro Fall wurden wiederum 5 HPF zufällig im selektierten Areal bestimmt, ausgewertet und ein Mittelwert gebildet.

Für die statistische Untersuchung, insbesondere zur Untersuchung von Korrelationen wurden die 5 Gruppen ordinalskaliert. Dabei wurde folgende nach Differenzierungsgrad sinnvolle Reihenfolge gebildet:

Rang in Ordinalskala	Entität bzw. Differenzierungsgrade	Fallzahl
0	Regeneratknoten	n=5
1	Dysplastischer Knoten	n=9
2	HCC: E&S 1 und E&S 1-2	n=5
3	HCC: E&S 2 und E&S 2-3	n=17
4	HCC: E&S 3, E&S 3-4 und E&S 4	n=10

Tabelle 6: Ordinalskalierung von MRN, Dysplastischen Knoten und HCC unterschiedlicher Differenzierungsgrade

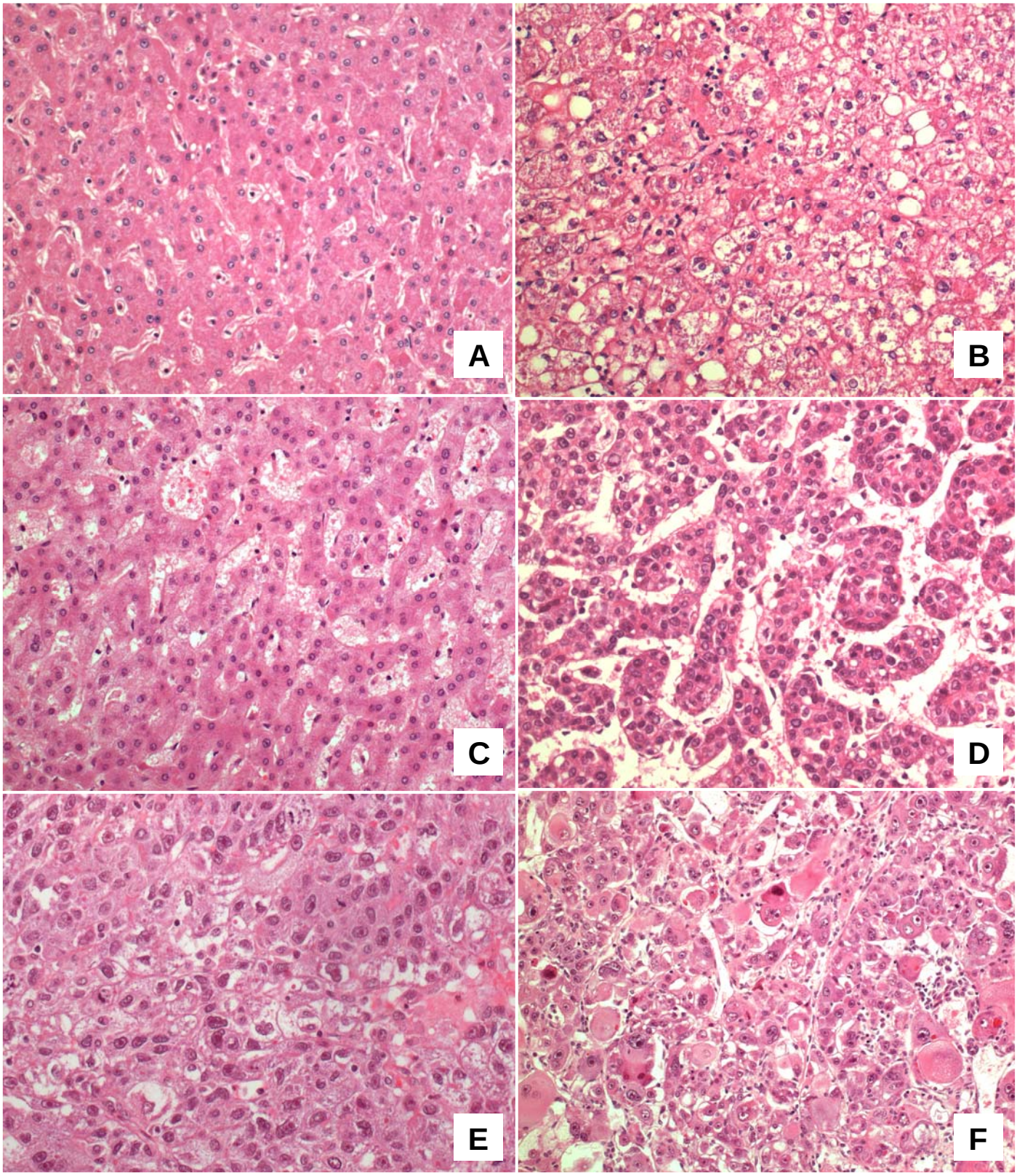


Abbildung 2: MRN (A) und klarzelliger HG-DN (B) versus HCC der Differenzierungsgrade 1 (C), 2 (D), 3 (E) und 4 (F) (Differenzierungsgrade modifiziert nach E&S).

4.3.5. Auswertung nach Tumorgröße

Zur Auswertung der Tumorgröße wurden nur HCC herangezogen. In Fällen mehrerer Knoten ging nur der Durchmesser des größten HCC-Knotens eines Falles in die Auswertung ein.

In der statistischen Auswertung erfolgte zunächst eine direkte Korrelation der maximalen Tumorgrößen mit der jeweiligen Antigenexpression bzw. TUNEL-Positivität (nach Spearman-Rho).

Weiterhin wurden jeweils 2 Gruppen, die durch einen Grenzwert bzw. cut-off gebildet wurden, über den Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. So wurde beispielsweise überprüft, ob sich HCC, die kleiner oder gleich 2cm maßen, von HCC, die größer als 2cm waren, in den jeweiligen Antigenexpressionen unterschieden. Dabei wurden die Grenzwerte 2cm, 3cm, 4cm, 5cm, 6cm, 7cm und 8cm gewählt.

4.3.6. Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des Programms „SPSS Version 11.0“ (Fa. SPSS Inc., USA).

Die untersuchten Variablen folgten nicht einer Normalverteilung. Zur Deskription der Ergebnisse wurde daher der Median verwendet, da der Mittelwert nur bei normalverteilten Daten zulässig ist. Zusätzlich sind Minima und Maxima für die einzelnen getrennt untersuchten Gruppen angegeben. In der statistischen Auswertung wurden aufgrund der nicht vorliegenden Normalverteilung nichtparametrische Tests verwendet:

Vergleich von 2 unabhängigen Stichproben	Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test)
Vergleich von 2 abhängigen Stichproben	Wilcoxon-Test
Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben	H-Test nach Kruskal und Wallis
Korrelationen	Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho

Tabelle 7: Überblick statistischer Testverfahren in der Datenanalyse

Zur graphischen Darstellung von Ergebnissen wurden sog. Boxplots herangezogen. Boxplots sind besonders anschaulich, weil sie neben dem Median auch erstes und drittes Quartil, sowie kleinste und größte Werte darstellen (12).

5. Ergebnisse

5.1. Ki-67-Immunhistochemie

5.1.1. Färbeeigenschaften

Die immunhistochemische Untersuchung mit Ki-67-Antikörper führte bei Positivität zu einer mittleren bis starken nukleären Färbung.

Innerhalb der untersuchten HCC waren teilweise Areale mit unterschiedlicher Dichte Ki-67-positiver Zellkerne zu beobachten. Die fokalen Unterschiede beruhten zumeist auf strukturell oder zytologisch heterogenen Arealen innerhalb eines Karzinomherdes. Generelle regionale Unterschiede zugunsten Zentrum oder -rand eines HCC-Herdes konnten nicht festgestellt werden.

5.1.2. Quantifizierung der Ki-67-Immunhistochemie

5.1.2.1. Hepatozelluläres Karzinom

Unter den 52 untersuchten HCC waren 51 Fälle (98,1%) positiv. Der Anteil Ki-67-positiver Kernfärbung lag zwischen 0,20% und 62,2% (Median 3,10%).

Das Fibrolamelläre Karzinom zeigte in der Ki-67-Färbung einen Anteil von 4,40% positiven Zellen.

Im CCC des Kollisionstumors war eine Ki-67-Positivität von 9,40% zu beobachten, während im HCC die Ki-67-Positivität bei 0,20% lag.

In den 2 undifferenzierten Karzinomen des Kollektivs wurden in der Ki-67-Immunhistochemie Werte von 3,67% und 30,80% erreicht (Median 17,24%).

Die 3 Metastasen des Kollektivs wiesen Ki-67-Werte zwischen 2,85% und 41,66% auf (Median 16,5%).

HCC und Ätiologie:

In 16 von 17 HCC (94,1%) mit klinisch bekannter chronischer HCV-Infektion waren Ki-67-Werte zwischen 0,30% und 24,0% (Median 2,40%) nachzuweisen.

Alle 4 Fälle von HCC mit bekannter HBV-Infektion zeigten Ki-67-positive Zellkerne in einem Anteil von 1,15% bis 25,3% (Median 4,98%).

In den 4 Fällen von HCC, in denen laut klinischen Angaben ein chronischer Alkoholabusus vorlag, wurden in der Ki-67-Immunhistochemie nur positive Werte zwischen 0,20% und 6,89% erreicht (Median 4,93%).

Alle 4 Fälle von - gemäß klinischen Angaben - Hämochromatose-assoziierten HCC wiesen Ki-67-Werte zwischen 0,96% und 6,60% auf (Median 2,47%).

In einem der beiden undifferenzierten Karzinome mit simultaner HCV- und HBV-Infektion wurde in der Ki-67-Färbung der Maximalwert von 30,80% beobachtet.

Ki-67	HCC_{gesamt} n=52	HCV n=17	HBV n=4	Alkohol n=4	Hämochromatose n=4
Positive Fälle	51(98,08%)	16 (94,1%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)
Median (in %)	3,10	2,40	4,98	4,93	2,47
Minimum (in %)	0,00	0,00	1,15	0,20	0,96
Maximum (in %)	62,2	24,0	25,3	6,89	6,50

Tabelle 8: Ki-67-Expression in HCC bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

HCC und Differenzierungsgrade (modifiziert nach E&S):

In den 5 Karzinomarealen mit Grad 1 oder 1-2 lag in 4 Fällen (80%) der Anteil Ki-67-positiver Zellkerne zwischen 0,50% und 6,70% (Median 1,40%).

In den 17 Arealen, die als Grad 2 oder 2-3 eingestuft worden waren, lag die Ki-67-Positivität im Bereich zwischen 0,50% und 46,6%(Median 2,00%).

Bei den 10 Arealen mit Grad 3, 3-4 oder 4 waren zwischen 2,30% und 49,1% der Zellkerne positiv in der Ki-67-Immunhistochemie (Median 11,2%).

HCC und intratumorale Morphologie:

In den 11 eosinophil-trabekulären Arealen lag die Ki-67-Positivität zwischen 0,50% und 46,60% (Median 1,70%).

Unter den 10 klarzellig-soliden Arealen wurden in 9 Fällen (90,0%) positive Zellkerne zwischen 0,60% und 15,6% nachgewiesen (Median 1,65%).

Bei den 7 basophil-pseudoglandulären Arealen lag der Anteil Ki-67-positiver Zellkerne zwischen 3,53% und 21,1% (Median 9,40%).

HCC und Tumorgröße:

Von den 52 HCC war bei 50 Tumoren die Größe bekannt.

12 von 13 HCC (92,3%), die kleiner oder gleich 2,0 cm waren, zeigten eine Ki-67-Positivität zwischen 0,30% und 24,0% (Median 2,30%), während sich in allen 37 HCC (100%), die größer als 2,0cm waren, Ki-67-Werte zwischen 0,20% und 62,2% ergaben (Median 3,50%).

In 38 von 39 HCC (97,4%), die kleiner oder gleich 5,0 cm waren, konnten zwischen 0,20% und 24,7% Ki-67-positive Zellen nachgewiesen werden (Median 2,50%), während alle 11 HCC (100%), die größer als 5,0cm waren, eine Ki-67-Positivität von 2,00% bis 62,2% beobachten ließen (Median 6,89%).

In 40 von 41 Karzinomen (97,6%), die kleiner oder gleich 6,0cm waren, lag der Anteil Ki-67-positiver Zellen zwischen 0,20% und 24,7% (Median 2,50%), in allen 9 HCC, die größer als 6,0cm waren, wurden Ki-67-Werte zwischen 2,00% und 62,2% nachgewiesen (Median 8,55%).

Ki-67	Tumorgröße (in cm)					
	HCC_{gesamt} n=52	≤ 2,00 n=13	2,01 – 4,00 n=20	4,01 – 6,00 n=8	6,01 – 8,00 n=5	> 8,00 n=4
Positive Fälle	51(98,08%)	12 (92,3%)	20 (100%)	8 (100%)	5 (100%)	4 (100%)
Median (in %)	3,10	2,30	2,54	3,89	10,8	7,72
Minimum (in %)	0,00	0,00	0,57	0,20	2,67	2,00
Maximum (in %)	62,2	24,0	24,7	20,5	34,9	62,2

Tabelle 9: Ki-67-Expression in HCC in Abhängigkeit der Tumorgröße

5.1.2.2. Dysplastische Läsionen

In allen 9 dysplastischen Knoten zeigte sich eine nukleäre Färbung mit Ki-67 in einem Anteil zwischen 0,10% und 8,20% (Median 0,40%). Dabei wiesen die 3 LG-DN ein Spektrum von 0,40% bis 0,55% (Median 0,50%) Ki-67-positiver Zellen auf und die 6 HG-DN ein Spektrum von 0,10% bis 8,20% (Median 0,35%).

5.1.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

Im Hepatozellulären Adenom waren die Zellkerne zu einem Anteil von 1,13% Ki-67-positiv.

In den 3 Fällen von FNH konnte eine Ki-67-Positivität zwischen 0,10% und 0,40% festgestellt werden (Median 0,40%).

Von den 5 Regeneratknoten zeigten in der Ki-67-Immunhistochemie 4 Fälle (80,0%) eine nukleäre Positivität zwischen 0,10% und 2,00% (Median 0,10%).

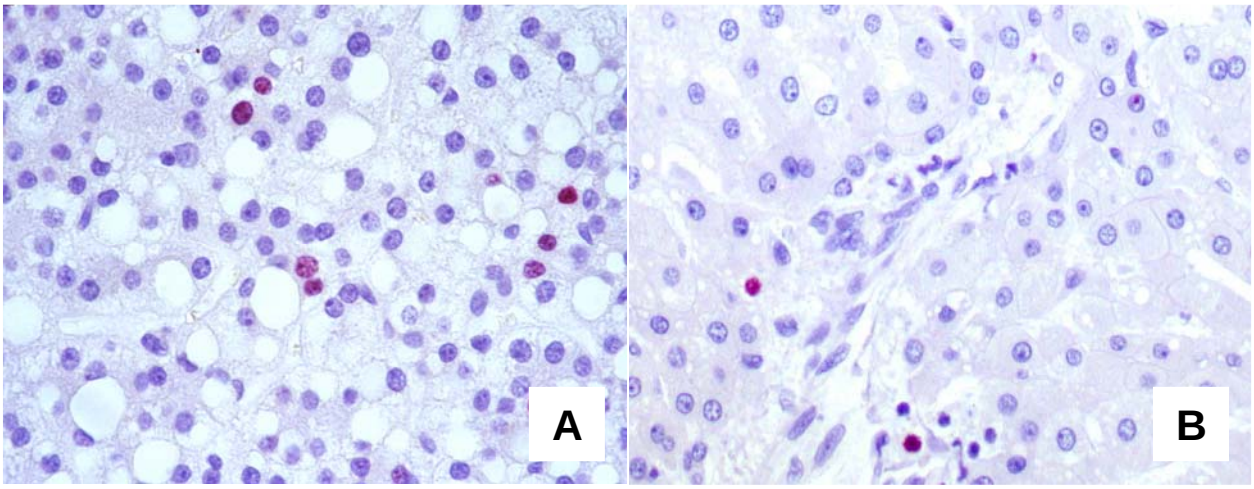


Abbildung 3: Immunhistochemische Färbungen von Ki-67 in HCA (Abb. A) und MRN (Abb. B).

5.1.2.4. Referenzgewebe

53 von 61 Proben des nicht-neoplastischen Referenzgewebes fielen Ki-67-positiv aus (86,9%) und zeigten eine Positivität zwischen 0,03% und 4,00% (Median 0,20%). 42 von 48 zirrhotisch umgebauten Lebern (87,5%) wiesen Ki-67-Werte zwischen 0,03% und 4,00% auf (Median 0,20%), 11 von 12 nicht zirrhotisch umgebauten Lebern (91,7%) ließen Ki-67-Werte zwischen 0,05% und 2,10% beobachten (Median 0,25%). Das Referenzgewebe der Stanzbiopsie konnte in keine der beiden Gruppen eingeordnet werden.

In der an das HCA angrenzenden Leber waren 0,60% Ki-67-positive Zellkerne zu beobachten.

In 45 von 51 (88,7%) nicht-neoplastischen Gewebeproben aus HCC-Lebern (incl. Kollisionstumor, FLC ohne Referenzgewebe) waren zwischen 0,03% und 4,00% der Zellkerne Ki-67-positiv (Median 0,20%).

Bei 4 von 6 Patienten (66,7%), bei denen die Diagnose einer kompletten Leberzirrhose ohne Malignitätsnachweis gestellt worden war, wurde eine Ki-67-Positivität zwischen 0,15% und 0,47% (Median 0,23%) nachgewiesen, wobei der Maximalwert bei der Patientin mit klinischerseits bekanntem M. Wilson beobachtet wurde. Bei dem Patienten mit Dysplasie ohne zirrhotischen Umbau fanden sich im nicht-dysplastischen Parenchym 2,10% Ki-67-positive Zellen.

Referenzgewebe und Ätiologie:

Ki-67	Referenz n=61	HCV n=23	HBV n=5	Alkohol n=5	Hämochromatose n=4	M. Wilson n=1
Positive Fälle	53 (86,9%)	19 (82,6%)	5 (100%)	5 (100%)	3 (75%)	
Median (in %)	0,20	0,20	0,45	0,20	0,15	0,47
Minimum (in %)	0,00	0,00	0,10	0,07	0,00	
Maximum (in %)	4,00	1,10	4,00	0,30	0,93	

Tabelle 10: Ki-67-Expression in Referenzgewebe bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

5.1.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung

1. Entitäten

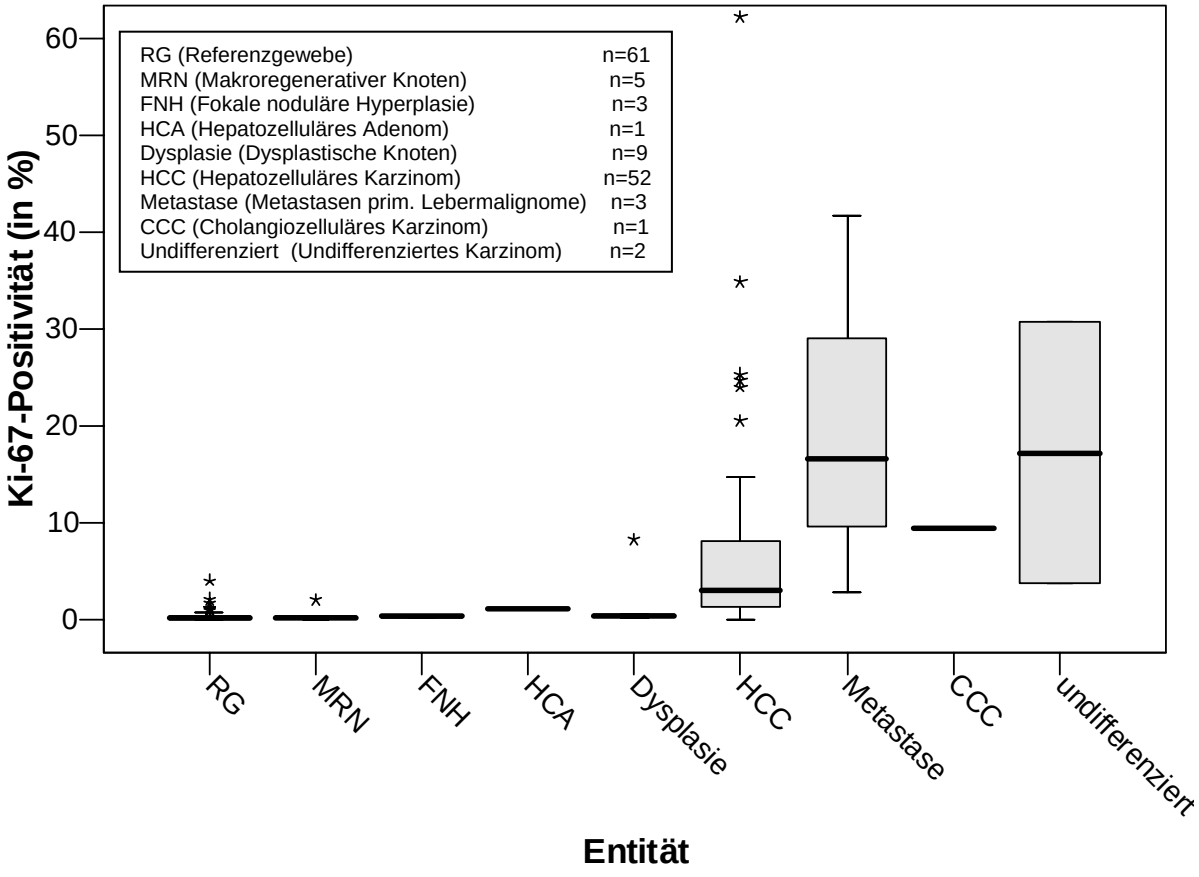
In den untersuchten primären Leberzellkarzinomen zeigten sich höchst signifikant mehr Ki-67-positive Zellkerne als im angrenzenden Leberparenchym ($p<0,001$; Wilcoxon-Test).

Die Dichte Ki-67-positiver Zellkerne im HCC korrelierte dabei positiv mit der im angrenzenden Lebergewebe ($p<0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho $r=0,28$), d.h. je mehr Ki-67-positive Zellen im HCC, desto mehr Ki67-positive Zellen auch im angrenzenden Gewebe bzw. umgekehrt.

Auch das HCA wies einen höheren Prozentsatz Ki-67-positiver Zellen auf als der Median des gesamten Referenzgewebekollektivs und als das im Fall angrenzende Normalgewebe.

In den MRN lag der Anteil Ki-67-positiver Zellen etwas niedriger als im Referenzgewebe. In den FNH fanden sich mehr positive Zellen als im Referenzgewebe.

Alle 3 Metastasen hepatischer Karzinome ließen eine Ki-67-Positivität (Median 16,5%) beobachten und waren häufiger positiv mit vielfach höheren Ki-67-Werten als primäre HCC (Median 3,10%).



Graphik 5: Ki-67-Expression der untersuchten Entitäten im Überblick: Darstellung in Boxplots. Ausreißer sind mit * markiert.

2. Ätiologie

In der Untersuchung von Referenzgewebe und HCC ergaben sich im Vergleich unterschiedlicher Ätiologie keine signifikanten Unterschiede.

In HBV-assoziierten Fällen waren im Referenzgewebe tendenziell mehr Ki-67-positive Zellen (Median 0,45%) zu beobachten. Die Referenzgewebsproben der

übrigen ätiologischen Gruppen unterschieden sich in der Ki-67-Immunhistochemie nicht wesentlich.

HBV-assoziierte HCC (Median 4,98%) wiesen den höchsten Ki-67-Median im Ätiologievergleich auf, gefolgt von den HCC-Fälle äthyltoxischer Genese (Median 4,93%). HCC mit Hämochromatoseverdacht (Median 2,47%) und HCV-Infektion (Median 2,40%) zeigten im Vergleich eher niedrigere Ki-67-Werte, ein Unterschied zur HCC-Gesamtgruppe ist nicht anzunehmen.

3. Differenzierungsgrade

Insgesamt wurden in den Karzinomarealen unabhängig vom Differenzierungsgrad hoch signifikant mehr Ki-67-positive Zellkerne nachgewiesen als in Regeneratknoten ($p<0,01$; MWU-Test) bzw. in dysplastischen Knoten ($p<0,001$; MWU-Test).

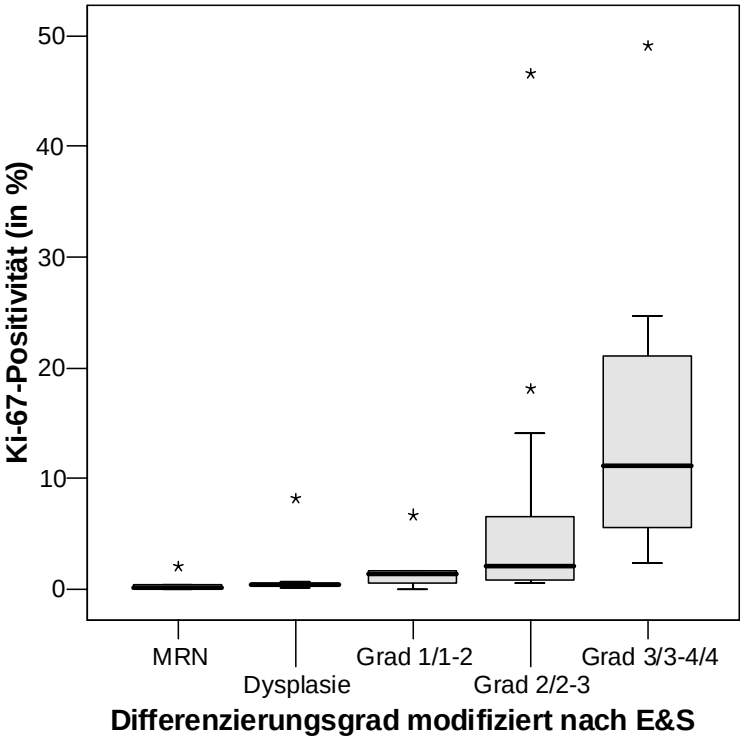
Weiterhin zeigte sich eine hohe Korrelation in der Zunahme der Ki-67-Positivität zwischen MRN, dysplastischen Knoten und ansteigendem Differenzierungsgrad der HCC ($p<0,001$; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho $r=0,74$). Im Kruskal-Wallis-Test spiegelt sich dies als höchst signifikanter Zusammenhang wieder ($p<0,001$).

Im Vergleich der MRN, der dysplastischen Knoten und der Differenzierungsgrade zeigte sich ein höchst signifikanter Zusammenhang in ansteigender Folge.

Zwischen den Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede im MWU-Test:

1. Gruppe	2. Gruppe	Signifikanzniveau	Expressionsvergleich 1. Gruppe (1) vs. 2. Gruppe (2)
Regeneratknoten	E&S 2/2-3	** p<0,01	1<2
Regeneratknoten	E&S 3/3-4/4	** p<0,01	1<2
Dysplasie	E&S 2/2-3	** p<0,01	1<2
Dysplasie	E&S 3/3-4/4	*** p<0,001	1<2
Dysplasie	HCC gesamt	*** p<0,001	1<2
E&S 1/1-2	E&S 3/3-4/4	** p<0,01	1<2
E&S 2/2-3	E&S 3/3-4/4	** p<0,01	1<2

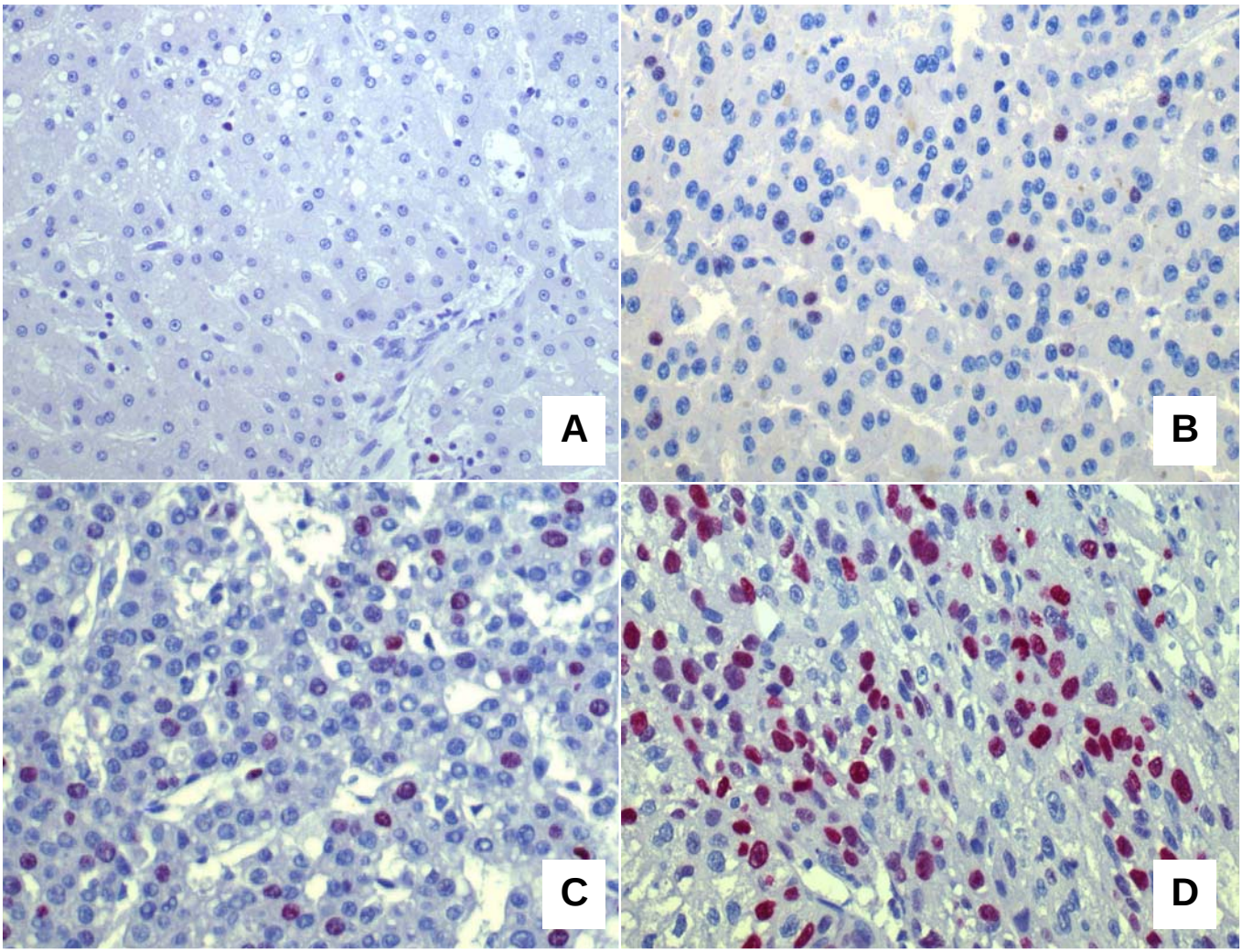
Tabelle 11: Signifikante Unterschiede zwischen Regeneratknoten, dysplastischen Läsionen und Differenzierungsgraden bezüglich der Ki-67-Expression



Graphik 6:
Ki-67-Expression in MRN, dysplastischen Knoten und HCC unterschiedlicher Differenzierungsgrade: Darstellung in Boxplots

MRN (Makroregenerative Knoten)	n=5
Dysplasie (Dysplastische Knoten)	n=9
Grad 1/1-2 (HCC E&S 1 und 1-2)	n=5
Grad 2/2-3 (HCC E&S 2 und 2-3)	n=17
Grad 3/3-4/4 (HCC E&S 3, 3-4 und 4)	n=10

Abbildung 4: Immunhistochemische Färbungen von Ki-67 in MRN (Abb. A), HCC Grad 1 (Abb. B), HCC Grad 2 (Abb. C) und HCC Grad 3 (Abb. D)



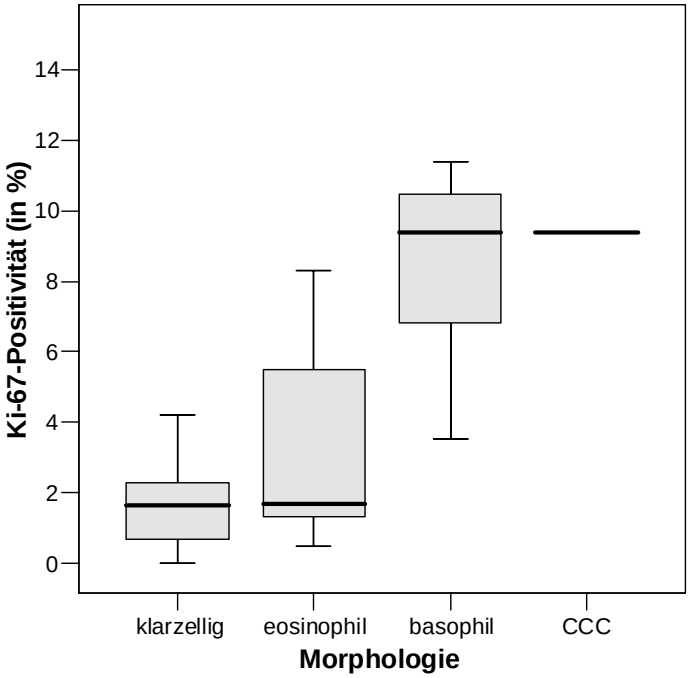
4. Morphologie

Im Vergleich der histomorphologisch verschiedenen HCC-Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede (MWU-Test):

Basophil-pseudoglanduläre Areale wiesen signifikant mehr Ki-67-positive Zellen auf als eosinophil-trabekuläre ($p<0,05$) und klarzellig-solide Areale ($p<0,01$).

Der CCC-Herd wies mit einer Ki-67-Positivität von 9,40% in der Tendenz eine höhere Proliferationsrate auf als eosinophil-trabekuläre oder klarzellig-solide Areale und war damit eher mit basophil-pseudoglandulären Arealen vergleichbar.

Die beiden Fälle undifferenzierter Karzinome waren in ihrer Divergenz nicht als eine Gruppe beurteilbar und damit nicht in das Gesamtbild zu integrieren.



Graphik 7: Ki-67-Expression in HCC mit unterschiedlicher Morphologie und im CCC.
(Ausreißer sind nicht dargestellt)

Basophil vs. Klarzellig $p<0,01$
Basophil vs. Eosinophil $p<0,05$

Klarzellig-solide HCC-Areale	n=10
Eosinophil-trabekuläre HCC-Areale	n=11
Basophil-pseudoglanduläre HCC-Areale	n=7
CCC-Areal	n=1

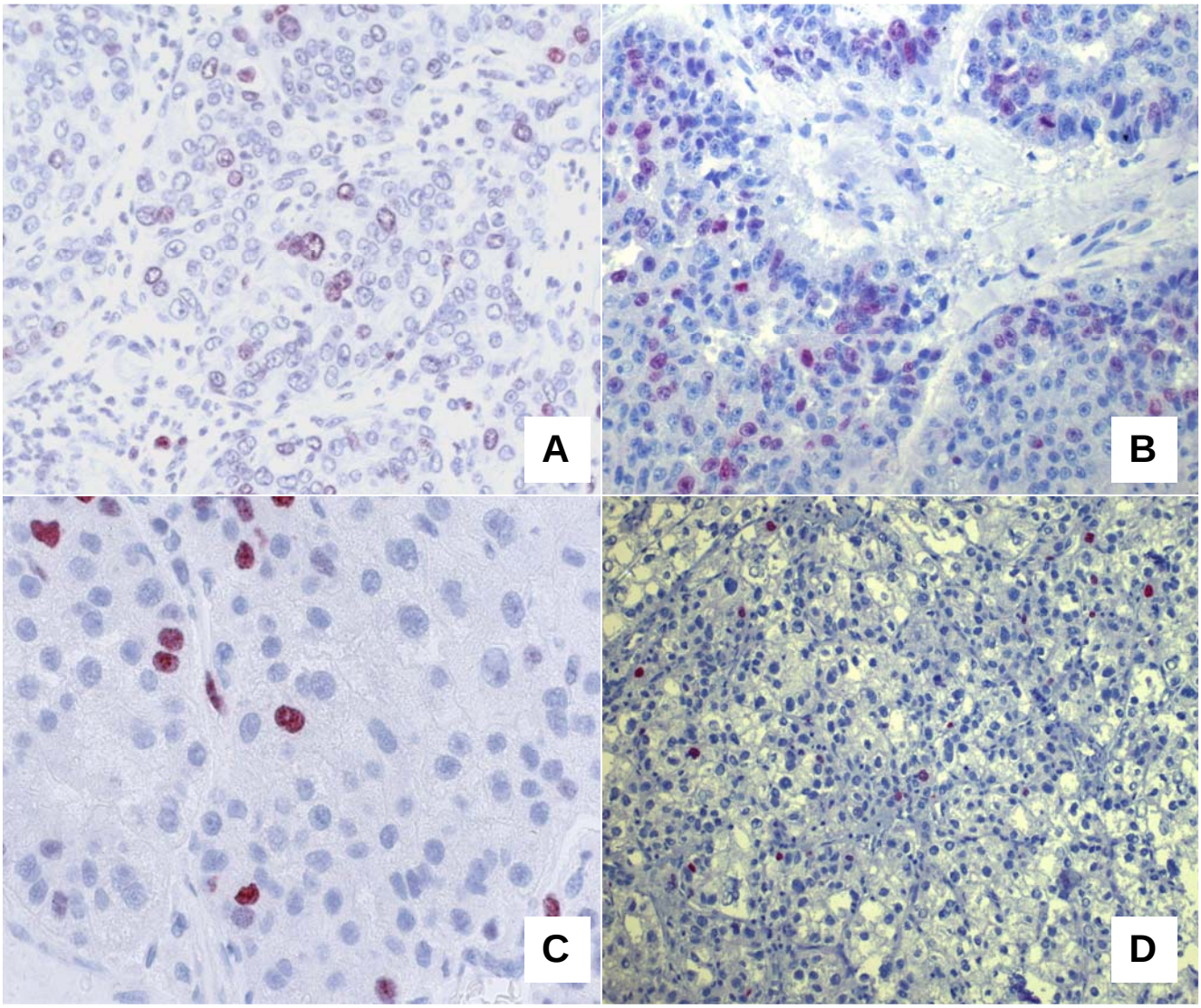


Abbildung 5:
Immunhistochemische Färbungen von Ki-67 in CCC (A), HCC mit basophil-pseudoglandulärer Morphologie (B) versus HCC mit eosinophil-trabekulärer (C) und klarzellig-solider (D) Morphologie.

5. pT-Stadien

Im Vergleich der pT-Stadien wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ki-67-Expression festgestellt.

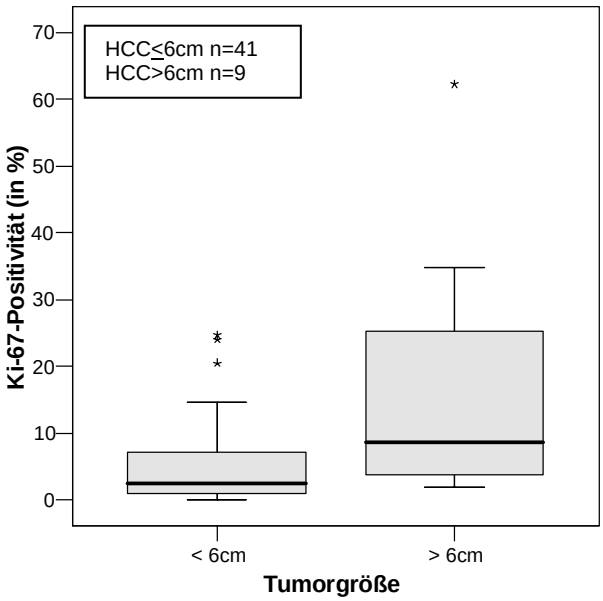
6. Tumorgröße

Im Vergleich der HCC unterschiedlicher Tumorgrößen an verschiedenen Grenzwerten zeigten sich in der Ki-67-Immunhistochemie folgende signifikanten Unterschiede im MWU-Test:

1. Gruppe	2. Gruppe	Signifikanzniveau	Expressionsvergleich 1. Gruppe (1) vs. 2. Gruppe (2)
HCC ≤ 5,00 cm	HCC > 5,00 cm	* p<0,05	1 < 2
HCC ≤ 6,00 cm	HCC > 6,00 cm	** p<0,01	1 < 2

Tabelle 12: Signifikante Unterschiede in der Ki-67-Expression bei unterschiedlicher Tumorgröße

Bei Betrachtung der Tumorgröße zeigten damit Karzinome mit einer Größe von mehr 5,0cm bzw. mehr als 6,0cm signifikant bzw. hoch signifikant höhere Ki-67-Werte als Karzinome, die kleiner als 5,0cm bzw. 6,0cm waren (p<0,05 bzw. p<0,01; MWU-Test).



Graphik 8:

Ki-67-Expression in HCC
(Ausreißer sind mit * markiert)

HCC > 6cm vs. HCC ≤ 6cm: p<0,01

7. Leberzirrhose

Hinsichtlich des immunhistochemischen Ki-67-Index bestand kein Unterschied zwischen HCC in zirrhotischen Lebern und HCC in nicht zirrhotischen Lebern.

Innerhalb der nicht-neoplastischen Gewebeproben (ohne FNH, Adenom, Dysplasie) gab es keine Unterschiede in der Ki-67-Expression zwischen zirrhotisch und nicht-zirrhotisch umgebautem Parenchym.

8. Angrenzendes HCC

Innerhalb der nicht-neoplastischen Gewebeproben (ohne FNH, Adenom, Dysplasie) gab es in der Ki-67-Immunhistochemie keine Unterschiede zwischen Proben in HCC-Lebern und Proben ohne Malignome.

5.2. P53-Immunhistochemie

5.2.1. Färbeeigenschaften

Die immunhistochemische Untersuchung mit p53-Antikörper führt bei Positivität zu einer kompakten granulären Anfärbung des Zellkerns. In normalen Zellen bleibt die Konzentration des Wildtyp-p53-Proteins im allgemeinen unterhalb der Nachweisgrenze, was bedeutet, dass maximal nur einzelne nukleäre Granula visuell fassbar sind, und die Zelle als p53-negativ betrachtet wird.

Es zeigte sich kein spezifisches Verteilungsmuster der p53-positiven Zellen in den als positiv gewerteten Arealen der unterschiedlichen Entitäten. Die p53-markierten Zellkerne waren disseminiert verteilt.

5.2.2. Quantifizierung der p53-Immunhistochemie

5.2.2.1. Hepatozelluläres Karzinom

Von den 52 untersuchten HCC waren 31 (59,6%) p53-positiv mit einem Anteil positiver Zellen zwischen 0,01% und 75,6% (Median 0,59%).

Das Fibrolamelläre Karzinom als HCC-Variante wies einen Anteil von 2,10% positiven Zellen auf.

Das CCC des Kollisionstumors zeigte eine p53-Positivität von 43,8%, während im HCC keine p53-positiven Zellen nachzuweisen waren.

Die 2 undifferenzierten Karzinome wiesen p53-Werte von 3,27% und 99,0% (Median 51,1%) auf.

Von den 3 untersuchten Metastasen war ein Fall (33,3%) negativ (HCC), die beiden anderen Metastasen wiesen Werte von 1,00% (FLC) und 27,1% (undifferenziertes Karzinom) auf (Median 1,00%).

HCC und Ätiologie:

In den 17 Fällen von HCC mit klinischerseits bekannter HCV-Infektion waren 12 Fälle (70,6%) positiv für p53 und es zeigten sich Werte zwischen 0,01% und 75,6% (Median 0,50%).

Alle 4 Fälle von HCC mit klinischerseits angegebener HBV-Infektion wiesen eine p53-Positivität auf, die Werte bewegten sich dabei im Bereich zwischen 0,40% und 14,54% (Median 5,35%).

Von den 4 Fällen, in denen klinisch ein Alkoholabusus als Prädisposition für die Karzinogenese angegeben wurde, zeigte nur ein Fall (25,0%) einen p53-Anteil von 9,40% (Median 0,00%).

3 von 4 HCC (75,0%) mit klinischerseits angegebener Hämochromatose zeigten p53-positive Zellkerne zwischen 0,40% und 29,0% (Median 1,94%).

In einem der undifferenzierten Karzinome, in dem eine gleichzeitige HCV- und HBV-Infektion laut klinischen Angaben vorlag, wurde der p53-Maximalwert von 99,0% ermittelt.

p53	HCC_{gesamt} n=52	HCV n=17	HBV n=4	Alkohol n=4	Hämochromatose n=4
Positive Fälle	31 (59,6%)	12 (70,6%)	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)
Median (in %)	0,59	0,50	5,35	0,00	1,94
Minimum (in %)	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00
Maximum (in %)	75,6	75,6	14,5	9,40	29,0

Tabelle 13: p53-Expression in HCC bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

HCC und Differenzierungsgrade (modifiziert nach E&S):

In den 5 Karzinomarealen mit Grad 1 oder 1-2 war nur in einem Fall (20,0%) ein p53-positiver Anteil von 0,20% zu beobachten.

Von 17 Arealen, die als Grad 2 oder 2-3 eingestuft worden waren, lag bei 9 (52,9%) die p53-Positivität im Bereich zwischen 0,30% und 20,8% (Median 0,30%).

Unter den 10 Arealen mit Grad 3, 3-4 oder 4 waren nur 4 Fälle positiv (40,0%) mit einer p53-Kernfärbung zwischen 0,08% und 30,0% (Median 0%).

HCC und intratumorale Morphologie:

In den 11 eosinophil-trabekulären Arealen war in 4 Fällen (36,4%) eine nukleäre p53-Positivität zwischen 1,40% und 5,60% zu beobachten, in 7 Fällen (63,6%) waren keine p53-positiven Zellen nachweisbar (Median 0,00%).

Unter den 10 klarzellig-soliden Arealen wurden in 3 Fällen (30,0%) p53-positive Zellkerne zwischen 0,08% und 9,90% nachgewiesen (Median 0,00%).

Von den 7 basophil-pseudoglandulären Arealen lag in 3 Fällen (42,9%) der Anteil p53-positiver Zellkerne zwischen 3,47% und 93,8% (Median 0,00%).

HCC und Tumorgröße:

In 7 von 13 HCC (53,8%), die kleiner oder gleich 2,0cm waren, konnte eine p53-Positivität zwischen 0,01% und 12,7% erhoben werden (Median 0,01%). 22 von 37 HCC (59,5%), die größer als 2,0cm waren, zeigten zwischen 0,16% und 75,6% p53-positive Zellen (Median 1,30%).

22 von 39 HCC (56,4%) mit einem Durchmesser bis zu 5,0cm waren in einem Anteil zwischen 0,01% und 12,7% p53-positiv (Median 0,16%), während 7 von 11 HCC (63,6%), die größer als 5,0cm waren, zwischen 1,85% und 75,6% p53-positive Zellen zeigten (Median 5,65%).

p53	Tumorgröße (in cm)					
	HCC_{gesamt} n=52	≤ 2,00 n=13	2,01 – 4,00 n=20	4,01 – 6,00 n=8	6,01 – 8,00 n=5	> 8,00 n=4
Positive Fälle	31 (59,6%)	7 (53,8%)	14 (70%)	2 (25%)	3 (60%)	4 (100%)
Median (in %)	0,59	0,01	1,60	0,00	1,85	9,15
Minimum (in %)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,65
Maximum (in %)	75,6	12,7	7,33	21,9	75,6	20,5

Tabelle 14: p53-Expression in HCC in Abhängigkeit der Tumorgröße

5.2.2.2. Dysplastische Läsionen

In den 9 untersuchten dysplastischen Knoten wurde nur in 2 Fällen von HG-Dysplasie (22,2%) eine nukleäre Färbung mit p53 mit einem Anteil von 0,30% und 0,60% beobachtet (Median 0,00%).

5.2.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

Weder im HCA, in den 3 FNH, noch in den 5 MRN konnten jeweils p53-positive Zellkerne nachgewiesen werden.

5.2.2.4. Referenzgewebe

In den 61 Proben des nicht-neoplastischen Referenzgewebes schwankte die p53-Positivität in den 3 p53-positiven Fälle (4,9%), die zirrhotisch umgebauten Lebern entstammten, zwischen 0,1% und 2,70% (Median 0,00%). Die 12 nicht-zirrhotisch umgebauten Lebern waren alle p53-negativ.

In 51 Referenzgewebsproben aus Lebern mit HCC (incl. Kollisionstumor, FLC ohne Referenzgewebe) wurde in nur einer Probe (2,0%) - die Leber war in diesem Fall zirrhotisch umgebaut - eine Positivität von 0,1% beobachtet.

Im HCA-angrenzenden Leberparenchym konnten keine p53-positiven Zellen nachgewiesen werden.

Bei den 6 Patienten mit kompletter Leberzirrhose ohne Karzinom wurde in 2 Fällen (33,3%) eine p53-Positivität zwischen 0,10% und 2,70% (Median 0,00%) nachgewiesen, wobei der Maximalwert bei der Patientin mit klinischerseits bekanntem M. Wilson beobachtet wurde. Bei dem Patienten mit Dysplasie ohne zirrhotischen Umbau fanden sich im nicht-dysplastischen Parenchym keine p53-positiven Zellen.

Referenzgewebe und Ätiologie

In nicht-neoplastischem Leberparenchym der Fälle mit bekannter Ätiologie zeigte ein Fall mit gleichzeitiger alkoholischer Lebererkrankung und chronischer HCV-Infektion p53-positive Zellen (0,10%).

p53	Referenz n=61	HCV n=23	HBV n=5	Alkohol n=5	Hämochromatose n=4	M. Wilson n=1
Positive Fälle	3 (4,9%)	1 (4,3%) (HCV+C2)	0 (0%)	1(20%) (HCV+C2)	0 (0%)	100%
Median (in %)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70
Minimum(in %)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Maximum (in %)	2,70	0,10	0,00	0,10	0,00	

Tabelle 15: p53-Expression in Referenzgewebe bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

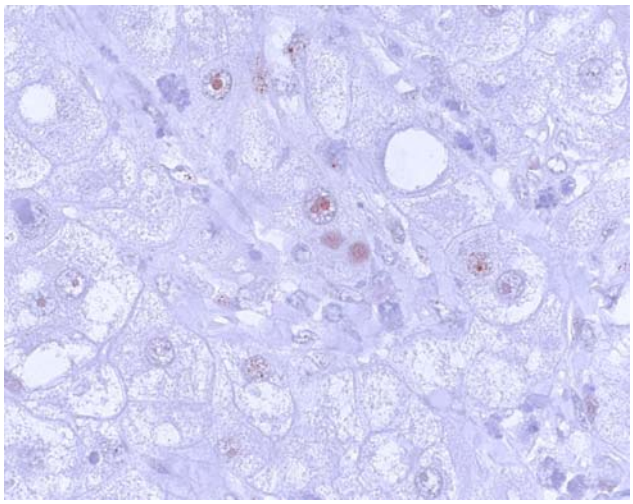


Abbildung 6: p53-Expression in Referenzgewebe bei Morbus Wilson

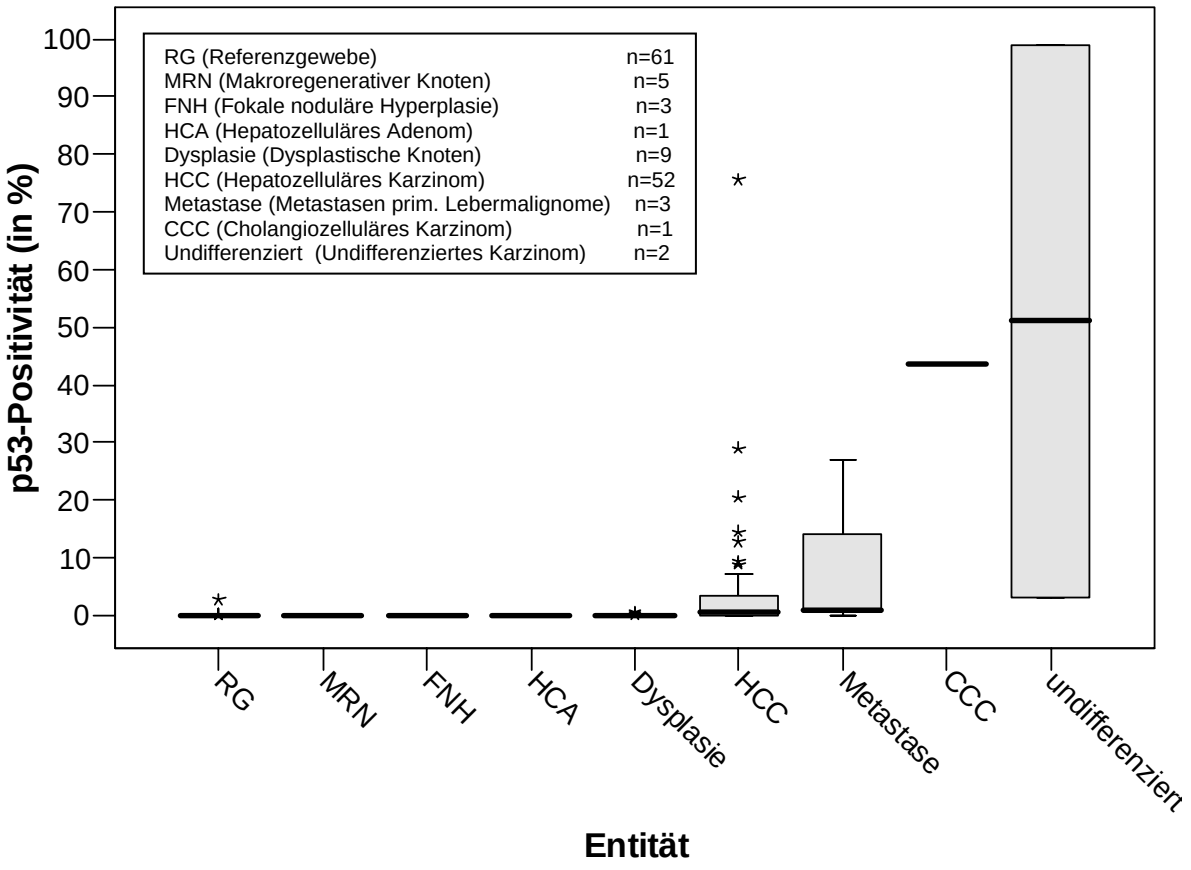
5.2.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung

1. Entitäten

Trotz der Unterschiede der immunhistochemischen Reaktionsergebnisse zwischen Karzinomen und angrenzendem Leberparenchym (Referenzgewebe) ergab sich keine statistische Signifikanz. Dies lässt sich durch die Häufung negativer Fälle in beiden Gruppen, die einen statistischen Vergleich nicht zulassen, erklären.

Aufgrund der überwiegend negativen Fälle und der geringen Fallzahlen konnten auch HCA, FNH, MRN und dysplastische Knoten nur tendenziell und nicht statistisch zulässig mit den beiden Gruppen „Referenzgewebe“ und „HCC“ verglichen werden.

2 von 3 Metastasen (66,7%) hepatischer Neoplasien zeigten eine p53-Positivität und damit häufiger und höhere p53-positive Werte als die primären Karzinome. Ein Signifikanztest war aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht zulässig.



Graphik 9: p53-Expression der untersuchten Entitäten im Überblick: Darstellung in Boxplots. Ausreißer sind mit * markiert.

2. Ätiologie

Im Referenzgewebe war im Fall von M. Wilson die höchste prozentuale p53-Positivität (2,70%) nicht-neoplastischer Leber zu beobachten. Auffallend war weiterhin der Nachweis p53-positiver Zellen (0,10%) in nicht-neoplastischem Leberparenchym im Fall von gleichzeitiger alkoholischer Lebererkrankung mit chronischer HCV-Infektion, während in Fällen von alleiniger HCV-Infektion und alleiniger Alkoholätiologie keine p53-Protein-Expression vorlag.

HBV-assoziiertes HCC-Gewebe wies die höchsten prozentualen p53-Werte (Median 5,35%) im Vergleich mit den anderen ätiologischen Gruppen auf. Relativ hohe p53-Expression im HCC zeigte auch die Hämochromatose-Gruppe (Median 1,94%). Eine statistische Signifikanz der Unterschiede wurde nicht beobachtet. Keine Auffälligkeiten hinsichtlich der p53-Immunhistochemie zeigten die HCV- und die Alkoholgruppe.

3. Differenzierungsgrade

Im Vergleich von MRN, dysplastischen Knoten und HCC-Differenzierungsstufen bezüglich der p53-Immunhistochemie konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Es war eine geringe Tendenz zu häufigerer p53-Exposition in mäßig und gering differenzierten HCC zu beobachten.

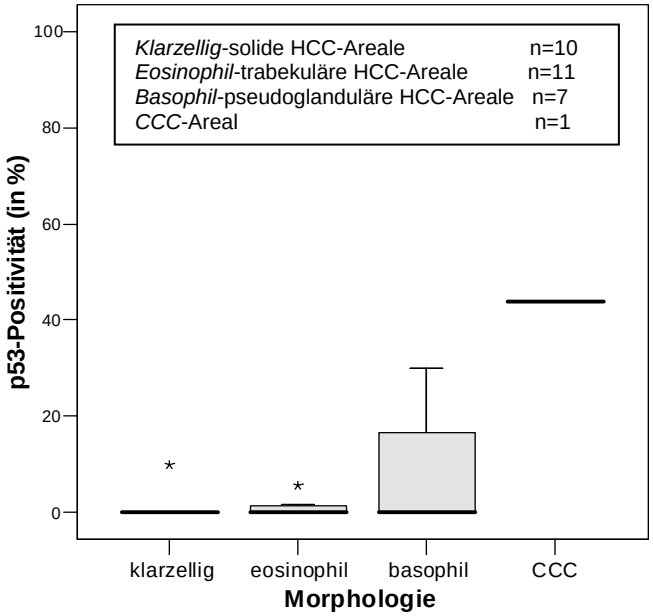
4. Morphologie

Im Vergleich der Gruppen untereinander konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der p53-Immunhistochemie beobachtet werden.

Tendenziell waren aber in sog. basophil-pseudoglandulären Areale häufiger und höhere positive prozentuale p53-Werte nachzuweisen als in eosinophil-trabekulären oder klarzellig-soliden Arealen.

Der CCC-Herd zeigte dabei eine gegenüber den basophil-pseudoglandulären Arealen noch höhere p53-Positivität.

Die beiden Fälle undifferenzierter Karzinom differierten stark voneinander und waren damit nicht mit anderen Gruppen oder Fällen vergleichbar.



Graphik 10:
p53-Expression in HCC mit unterschiedlicher Morphologie und im CCC. Darstellung in Boxplots.
Ausreißer sind mit * markiert.

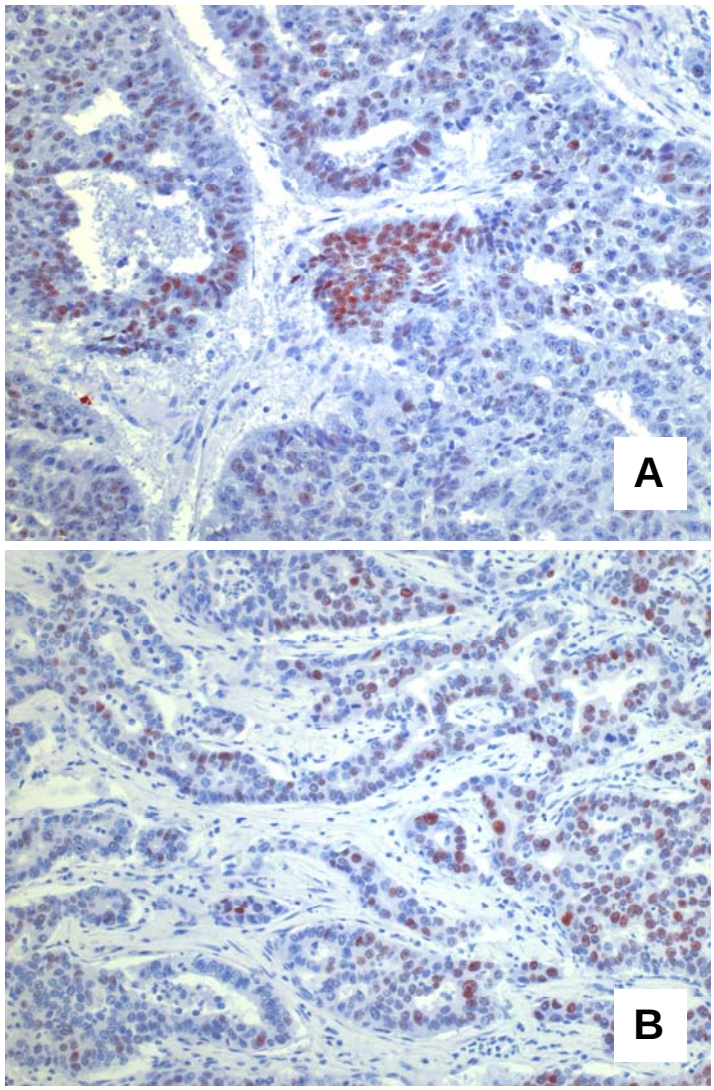


Abbildung 7:
Immunhistochemische Färbungen von p53 in HCC basophil-pseudoglanulärer Morphologie (A) und CCC (B).

5. pT-Stadien

Im Vergleich der pT-Stadien wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

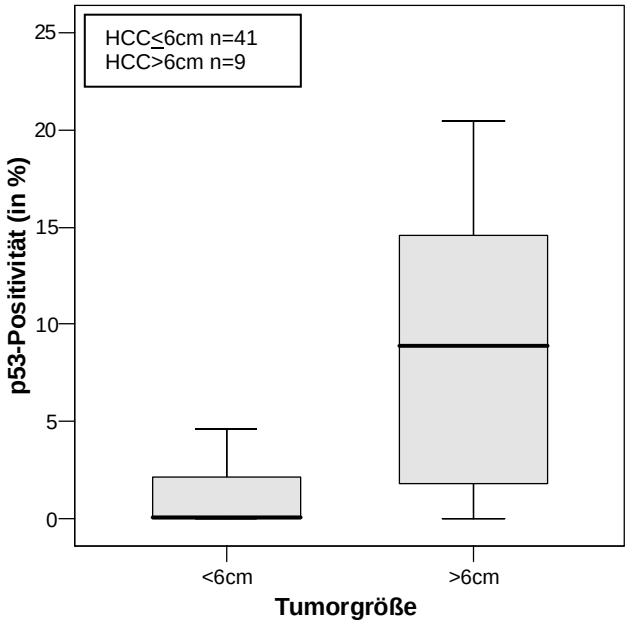
6. Tumorgröße

Im Vergleich der HCC unterschiedlicher Tumorgrößen an verschiedenen Grenzwerten zeigten sich in der p53-Immunhistochemie folgende signifikanten Unterschiede im MWU-Test:

1. Gruppe	2. Gruppe	Signifikanzniveau	Expressionsvergleich 1. Gruppe (1) vs. 2. Gruppe (2)
HCC ≤ 6,00 cm	HCC > 6,00 cm	** p<0,01	1 < 2
HCC ≤ 7,00 cm	HCC > 7,00 cm	** p<0,01	1 < 2
HCC ≤ 8,00 cm	HCC > 8,00 cm	** p<0,01	1 < 2

Tabelle 16: Signifikante Unterschiede in der p53-Expression bei unterschiedlicher Tumorgröße

Größere Karzinome zeigten hoch signifikant höhere prozentuale p53-Werte, wenn ein cut-off bei 6 cm gewählt wurde (p<0,01; MWU-Test).



Graphik 11:

p53-Expression in HCC > 6cm fällt hoch signifikant höher aus als in HCC ≤ 6cm (p<0,01).

7. Leberzirrhose

Bei HCC in zirrhotisch umgebauter Leber konnte kein Unterschied in der p53-Expression im Vergleich zu HCC in nicht zirrhotisch umgebauter Leber festgestellt werden.

In der Gruppe der Referenzgewebeproben wurden keine Unterschiede zwischen zirrhotischem und nicht-zirrhotischem Lebergewebe festgestellt.

8. Angrenzendes HCC

Innerhalb der Referenzgewebeproben wurden keine Unterschiede zwischen Proben angrenzend an ein HCC und Proben ohne Karzinom in der Nachbarschaft festgestellt.

5.3. Fas-Immunhistochemie

5.3.1. Färbeeigenschaften

Die immunhistochemische Fas-Positivität manifestiert sich als membranöse, nur vereinzelt zytoplasmatische Färbung der Zelle mit Aussparung des Zellkerns. Als *positiv* gewertet wurden Zellen, die sich eindeutig und mit einer kräftigeren Färbung von umgebendem Gewebe mit eventuell unspezifischer Reaktion abhoben.

Im HCC waren intraindiviuell teilweise fokal starke qualitative und quantitative Unterschiede im Färbeverhalten zu beobachten. Zumeist war die Färbung nur inkomplett zirkulär um die Zellen ausgeprägt und von gröberer Struktur. Betont Fas-positiv schienen insbesondere Zellen, die an pseudoglandulären Formationen beteiligt waren. Eine erhöhte Expression war teilweise in den an nicht neoplastisches Parenchym angrenzenden HCC-Rändern zu beobachten.

Im Referenzgewebe zeigte sich ein innerhalb der Läppchen zirkuläres, homogenes membranöses Färbemuster. In zirrhotischen Knoten war eine weitgehend zentrale Intensitätsabschwächung der Fas-Reaktion zugunsten einer Randbetonung angrenzend an Portalfelder bzw. Bindegewebssepten mit variabel dichten Lymphozytenaggregaten zu beobachten. Auch Fälle mit Intensitätszunahme in Grenzbereichen des Normalgewebes zur Invasionsfront des Karzinoms waren zu beobachten.

5.3.2. Quantifizierung der Fas-Immunhistochemie

5.3.2.1. Hepatozelluläres Karzinom

In der Fas-Immunhistochemie erreichten 43 von 52 HCC (82,7%) Score-Werte zwischen 0,20 und 10,0 (Median 2,00).

Der Fas-Score-Wert im Fibrolamellären Karzinom war 1,00.

Im CCC des Kollisionstumors war keine Fas-Positivität zu nachzuweisen, während im HCC die Fas-Positivität dem Score-Wert 1,00 entsprach.

Von den 2 undifferenzierten Karzinomen des Kollektivs erreichte nur ein Fall (50,0%) den positiven Score-Werte von 0,67 (Median 0,34).

Von den 3 Metastasen waren 2 Fälle (66,7%) Fas-positiv mit Werten von 1,00 (FLC) und 4,00 (undifferenziertes Karzinom), die HCC-Metastase zeigte keine Fas-Expression (Median 1,00).

HCC und Ätiologie:

In 16 von 17 HCC (94,1%) mit klinischerseits bekannter HCV-Infektion zeigten sich Score-Werte in der Fas-Immunhistochemie zwischen 0,67 und 10,0 (Median 2,33).

3 von 4 HCC (75,0%) mit klinischerseits angegebener HBV-Infektion wiesen eine Fas-Positivität auf mit Score-Werten zwischen 2,00 und 10,0 (Median 4,31).

2 von 4 Fällen (50,0%), in denen klinisch ein Alkoholabusus angegeben wurde, zeigten Fas-Werte im Bereich von 1,00 bis 1,59 (Median 0,50).

In allen 4 Fällen von HCC mit Hämochromatose bewegten sich die Fas-Score-Werte zwischen 2,00 und 10,00 (Median 7,43).

Im undifferenzierten Karzinom mit simultaner HCV- und HBV-Infektion zeigte sich in der Auswertung ein Fas-Score-Wert von 1,50.

Fas	HCC_{gesamt} n=52	HCV n=17	HBV n=4	Alkohol n=4	Hämochromatose n=4
Positive Fälle	43 (82,7%)	16 (94,1%)	3 (75,0%)	2 (50,0%)	4 (100%)
Median (Scorewert)	2,00	2,33	4,31	0,50	7,43
Minimum (Scorewert)	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
Maximum (Scorewert)	10,0	10,0	10,0	1,59	10,0

Tabelle 17: Fas-Expression in HCC bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

HCC und Differenzierungsgrade (modifiziert nach E&S):

In den 5 Karzinomarealen mit den Differenzierungsgraden 1 oder 1-2 lag in 3 Fällen (60,0%) der Wert Fas-positiver Zellen bei 4,00 und 10,0 (Median 4,00).

In 15 von17 Arealen (88,2%), die als Grad 2 oder 2-3 graduiert worden waren, lag die Fas-Positivität im Bereich zwischen 1,00 und 10,0 (Median 4,00).

Von 10 Arealen, die als E&S 3, 3-4 oder 4 eingestuft worden waren, zeigten nur 4 Areale (40,0%) eine Fas-Expression mit Werten zwischen 1,00 und 4,00 (Median 0,00).

HCC und intratumorale Morphologie

Von den 11 eosinophil-trabekulären Arealen war in 9 Fällen (81,8%) eine Fas-Positivität zwischen 1,00 und 10,00 zu beobachten (Median 2,00).

Unter den 10 klarzellig-soliden Arealen wurden in 9 Fällen (90,0%) positive Fas-Werte zwischen 1,00 und 10,0 erreicht (Median 3,00).

Bei 4 von 7 basophil-pseudoglandulären Arealen (57,1%) waren Fas-Score-Punkte zwischen 2,00 und 10,0 zu vergeben (Median 2,00).

HCC und Tumorgröße

10 von 13 HCC (76,9%), die kleiner oder gleich 2,0cm waren, zeigten Fas-Score-Werte zwischen 0,67 und 10,0 (Median 2,00), während 31 von 37 HCC (83,8%) mit einem Durchmesser von mehr als 2,0cm eine Fas-Expression zwischen 0,20 und 10,0 (Median 2,00) aufwiesen.

36 von 39 HCC (92,3%), die bis zu 5,0cm groß waren, zeigten eine Fas-Positivität zwischen 0,40 und 10,0 (Median 2,33). 6 von11 HCC(45,5%), die größer als 5,0cm waren, ließen Fas-Score-Werte zwischen 0,20 und 6,61 beobachten (Median 0,00).

Fas	Tumorgröße (in cm)					
	HCC_{gesamt} n=52	≤ 2,00 n=13	2,01 – 4,00 n=20	4,01 – 6,00 n=8	6,01 – 8,00 n=5	> 8,00 n=4
Positive Fälle	43 (82,7%)	10 (76,9%)	20 (100%)	7 (87,5%)	4 (80%)	0 (0%)
Median (Scorewert)	2,00	2,00	2,88	1,30	0,48	0,00
Minimum (Scorewert)	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00
Maximum (Scorewert)	10,0	10,0	10,0	10,0	6,61	0,00

Tabelle 18: Fas-Expression in HCC in Abhängigkeit der Tumorgröße

5.3.2.2. Dysplastische Läsionen

In 7 von 9 dysplastischen Knoten (77,8%) zeigte sich eine Fas-Färbung in einem Anteil zwischen 1,00 und 9,00 Score-Punkten (Median 2,00). In 2 der 3 LG-DN (66,7%) wurden die Werte 2,00 und 8,00 (Median 2,00) nachgewiesen; die Fas-Expression von 5 aus 6 HG-DN (83,3%) lag zwischen 1,00 und 9,00 (Median 3,50).

5.3.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

Im Hepatozellulären Adenom wurde für die Fas-Expression ein Score-Wert von 1,33 vergeben.

In allen 3 Fällen von FNH lag der Wert für die Fas-Untersuchung bei 10,0 (Median 10,0).

Alle 5 Regeneratknoten zeigten in der Fas-Immunhistochemie Score-Werte zwischen 7,00 und 10,0 (Median 9,00).

5.3.2.4. Referenzgewebe

In allen 61 nicht-neoplastischen Referenzgewebsproben lagen die Score-Werte in der Fas-Immunhistochemie zwischen 1,25 und 10,0 (Median 10,0). Alle 48 Proben aus zirrhotisch umgebauten Lebern wiesen Fas-Score-Werten von 1,25 bis 10 auf (Median 10,0). Alle 12 Proben aus nicht-zirrhotisch veränderten Lebern zeigten Fas-Score-Werte von 2,00 bis 10,0 (Median 9,00).

In der an das HCA angrenzenden Leber war ein Fas-Scorewert von 10,0 zu beobachten.

In allen 51 Referenzgewebsproben mit gleichzeitig vorliegendem HCC war eine Fas-Expression zu beobachten, die Werte lagen dabei im Bereich zwischen 1,25 und 10,0 (Median 10,0). In allen 41 Gewebeproben aus zirrhotisch umgebauten Lebern mit HCC zeigten sich Fas-Werte zwischen 1,25 und 10,0 (Median 10,0). In allen 10 Proben aus Lebern, in denen kein zirrhotischer Umbau vorlag, waren Fas-Werte zwischen 3,0 und 10,0 nachzuweisen (Median 9,00).

Bei allen 6 Patienten, bei denen eine komplette Leberzirrhose ohne Malignom vorlag, wurde eine Fas-Positivität zwischen 7,00 und 10,0 (Median 10,0) nachgewiesen. Im Fall von M. Wilson lag ein Fas-Score von 10,0 vor. Bei dem Patienten mit Dysplasie ohne zirrhotischen Umbau lag der Fas-Score-Wert im nicht-dysplastischen Parenchym bei 2,00.

Referenzgewebe und Ätiologie:

Fas	Referenz n=61	HCV n=23	HBV n=5	Alkohol n=5	Hämochromatose n=4	M. Wilson n=1
Positive Fälle	61 (100%)	23 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (100%)	
Median (Scorewert)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Minimum (Scorewert)	1,25	7,00	9,50	7,00	9,50	
Maximum (Scorewert)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	

Tabelle 19: Fas-Expression in Referenzgewebe bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

5.3.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung

1. Entitäten

Im Karzinom wurde höchst signifikant weniger Fas exprimiert als im angrenzenden nicht-neoplastischen Leberparenchym ($p<0,001$; Wilcoxon-Test).

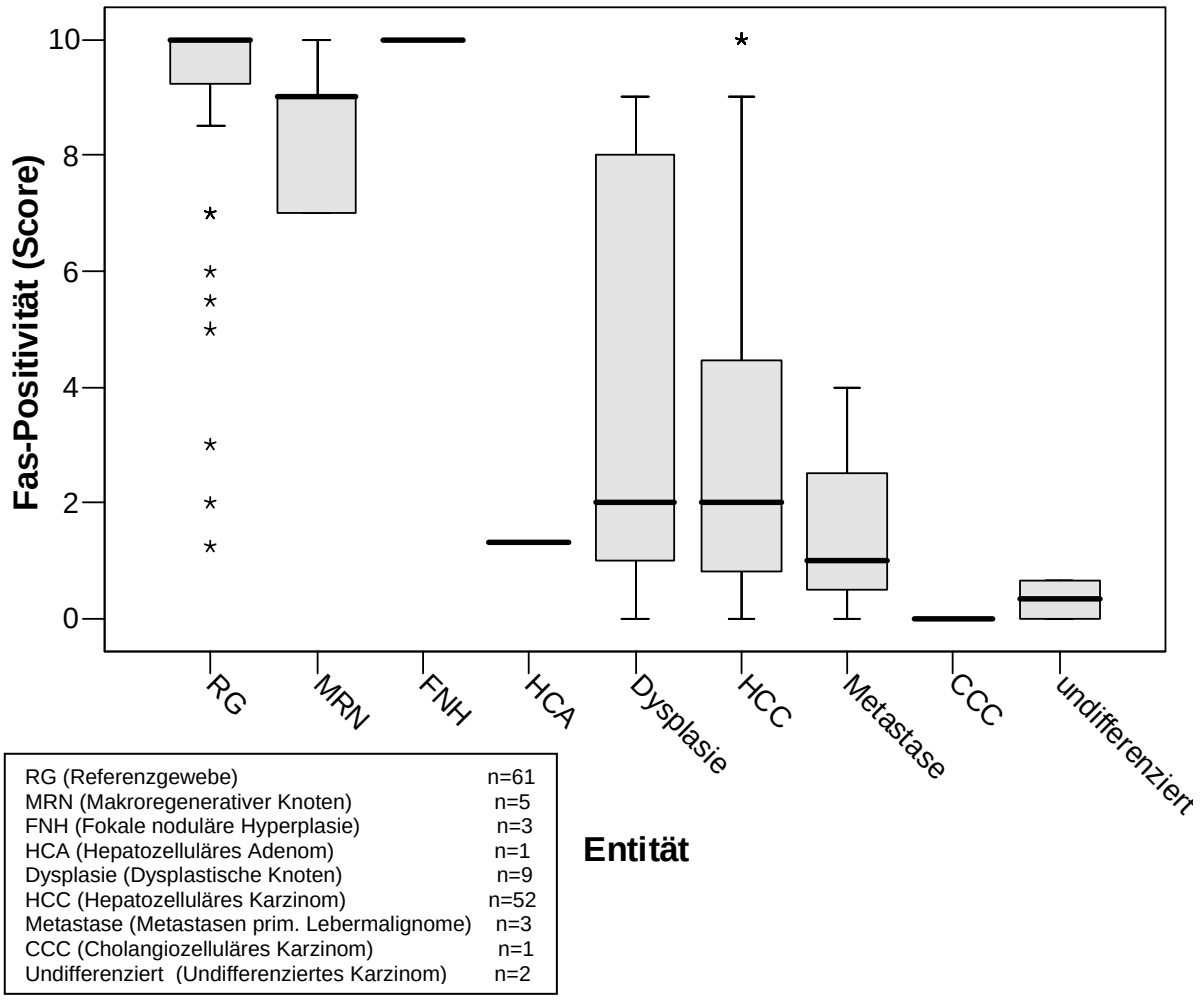
Der Anteil Fas-positiver Zellen in den HCC korrelierte gering in gleichläufiger Richtung mit dem Anteil Fas-positiver Zellen im HCC-angrenzenden Lebergewebe ($p<0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho $r=0,29$).

Die Gruppe der FNH (Median 10,0) und die MRN (Median 9,00) waren in Hinblick auf ihre Fas-Expression mit dem Referenzgewebe (Median 10,0) zu vergleichen.

Dagegen zeigte das HCA eine sehr niedrige Fas-Expression (1,33), insbesondere im Kontrast zum hohen Wert im HCA-angrenzenden Gewebe (10,0).

Die Gruppe der dysplastischen Knoten (Median 2,00) wies – wie auch die HCC – eine signifikant niedrigere Fas-Positivität auf als angrenzendes Referenzgewebe ($p<0,05$; Wilcoxon-Test).

Die 3 Metastasen hepatischer Karzinome (Median 1,00) wiesen in der Tendenz eine noch niedrigere Fas-Expression auf als die primären Malignome (Median 2,00).



Graphik 12: Fas-Expression der untersuchten Entitäten im Überblick: Darstellung in Boxplots. Ausreißer sind mit * markiert.

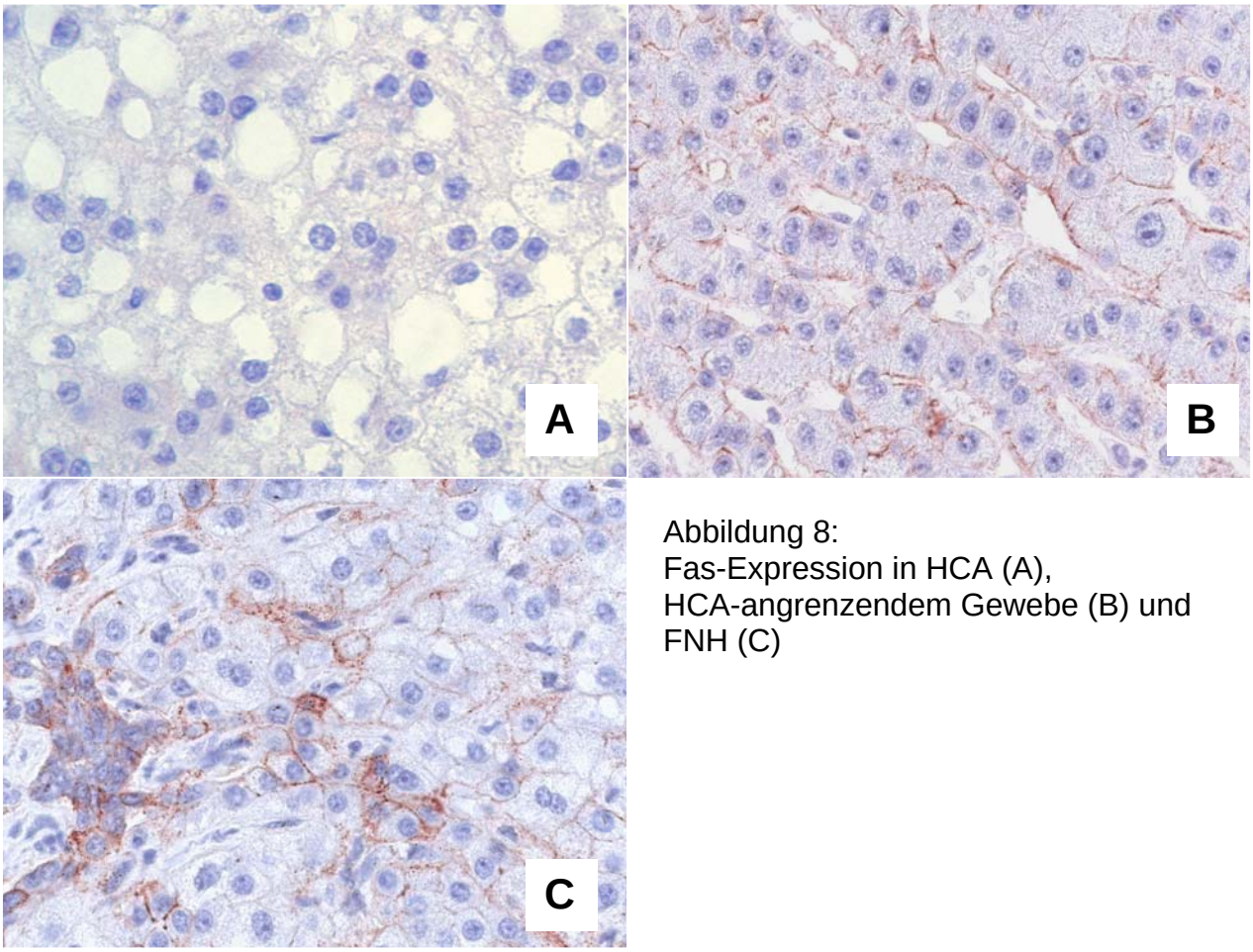


Abbildung 8:
Fas-Expression in HCA (A),
HCA-angrenzendem Gewebe (B) und
FNH (C)

2. Ätiologie

Im Referenzgewebe war in allen ätiologischen Gruppen eine relativ hohe Fas-Expression zu beobachten (Median in allen Fällen 10,0). Signifikante Unterschiede waren nicht festzustellen.

Im Vergleich der HCC unterschiedlicher Ätiologien war in äthyltoxisch bedingten HCC (Median 0,50) die niedrigste Fas-Expression zu beobachten, gefolgt von HCV-assoziierten HCC (Median 2,33). HBV-assoziierte HCC (Median 4,31) und HCC bei Hämochromatoseverdacht (Median 7,43) wiesen im Vergleich zur HCC-Gesamtgruppe (Median 2,00) höhere Fas-Expression auf, dabei war das Resultat in Fällen von Hämochromatose signifikant (MWU-Test; $p<0,05$).

3. Differenzierungsgrade

Es zeigte sich eine inverse, statistisch beinahe mittelstarke Korrelation zwischen MRN, dysplastischen Knoten und abnehmender Differenzierung der HCC sowie

Höhe der Fas-Expression ($p<0,01$; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho $r=-0,46$).

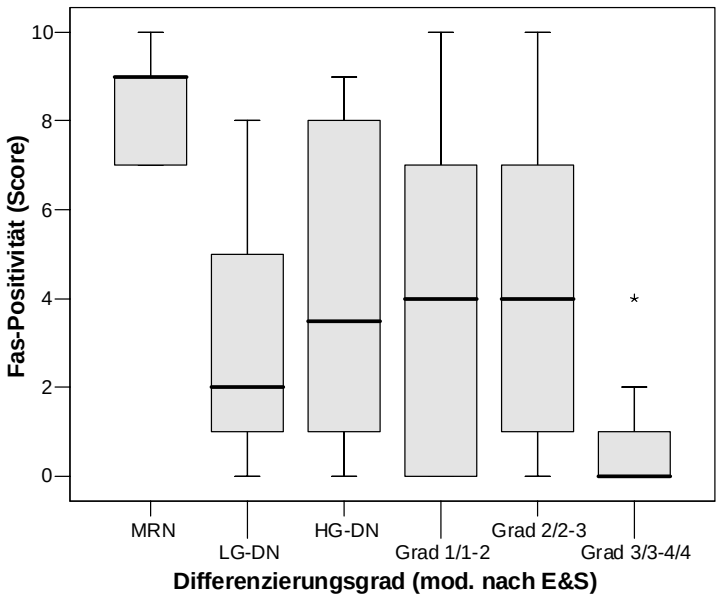
Im Vergleich der einzelnen Gruppen und Differenzierungsgrade der HCC hinsichtlich der Fas-Immunhistochemie ergaben sich signifikante Unterschiede im MWU-Test:

Regeneratknoten wiesen eine signifikant höhere Fas-Expression auf als dysplastische Knoten und die HCC-Gesamtgruppe. Im Vergleich zur HCC-Gesamtgruppe zeigten dysplastische Knoten keinen signifikanten Unterschied in der Fas-Expression, eine signifikant höhere Fas-Expression der dysplastischen Knoten ergab sich nur im Vergleich mit gering differenzierten HCC.

Innerhalb der HCC war bei Karzinomen mit Grad 3/3-4 und 4 die signifikant niedrigste Fas-Expression zu verzeichnen.

Gruppe 1	Gruppe 2	Signifikanz-Niveau	Expressionsvergleich 1. Gruppe (1) vs. 2. Gruppe (2)
Regeneratknoten	Dysplasie	* p<0,05	1>2
Regeneratknoten	E&S 2/2-3	* p<0,05	1>2
Regeneratknoten	E&S 3/3-4/4	** p<0,01	1>2
Regeneratknoten	HCC gesamt	** p<0,01	1>2
Dysplasie	E&S 3/3-4/4	* p<0,05	1>2
E&S 2/2-3	E&S 3/3-4/4	** p<0,01	1>2

Tabelle 20: Signifikante Unterschiede zwischen Regeneratknoten, dysplastischen Läsionen und Differenzierungsgraden bezüglich der Fas-Expression



Graphik 13:

Fas-Expression in MRN, dysplastischen Knoten und HCC unterschiedlicher Differenzierungsgrade: Darstellung in Boxplots
(Ausreißer sind mit * markiert)

MRN (Makroregenerative Knoten)	n=5
LG-DN (Dyspl. Knoten geringer Atypie	n=3
HG-DN (Dyspl. Knoten hoher Atypie	n=6
Grad 1/1-2 (HCC E&S 1 und 1-2)	n=5
Grad 2/2-3 (HCC E&S 2 und 2-3)	n=17
Grad 3/3-4/4 (HCC E&S 3, 3-4 und 4)	n=10

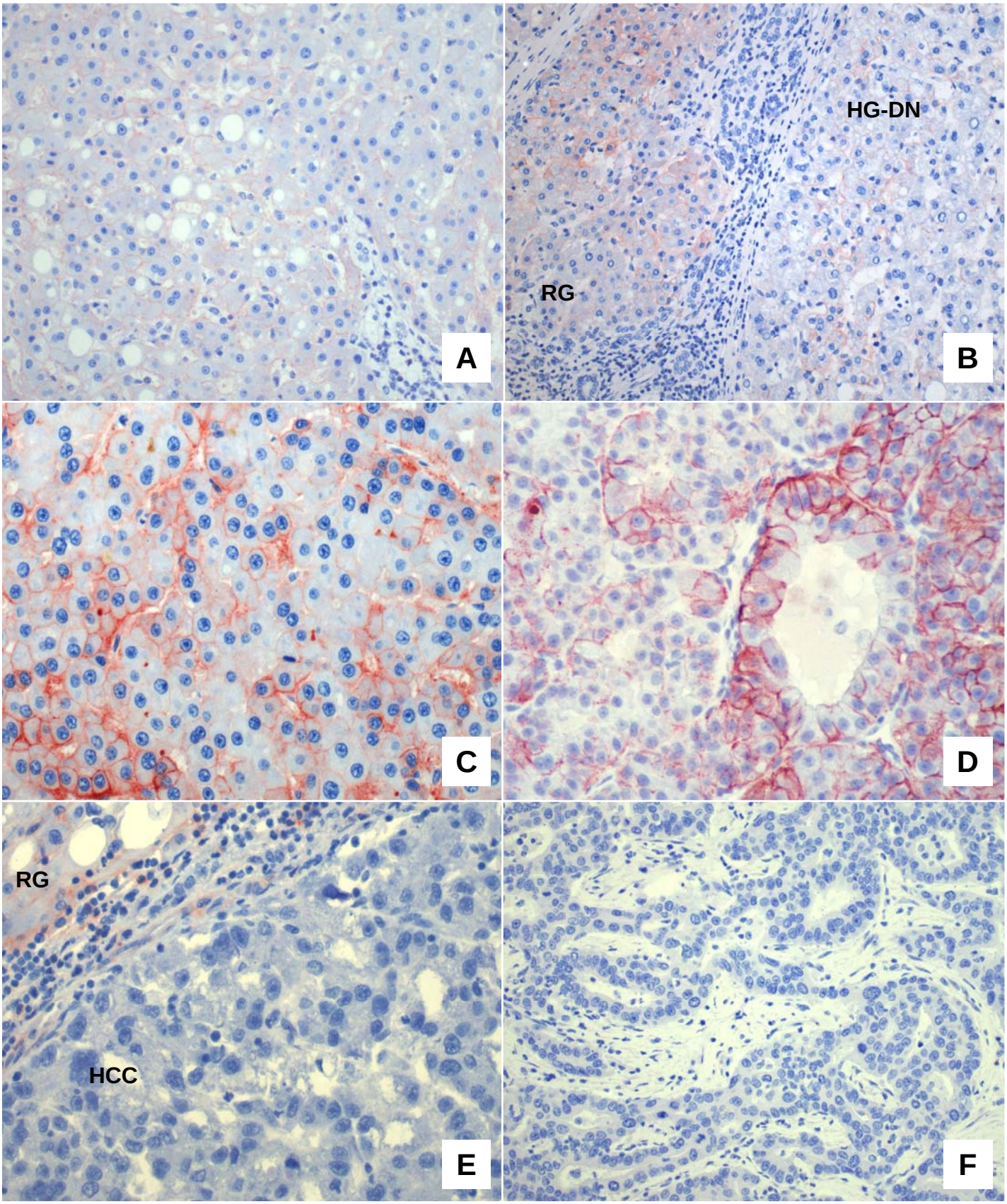
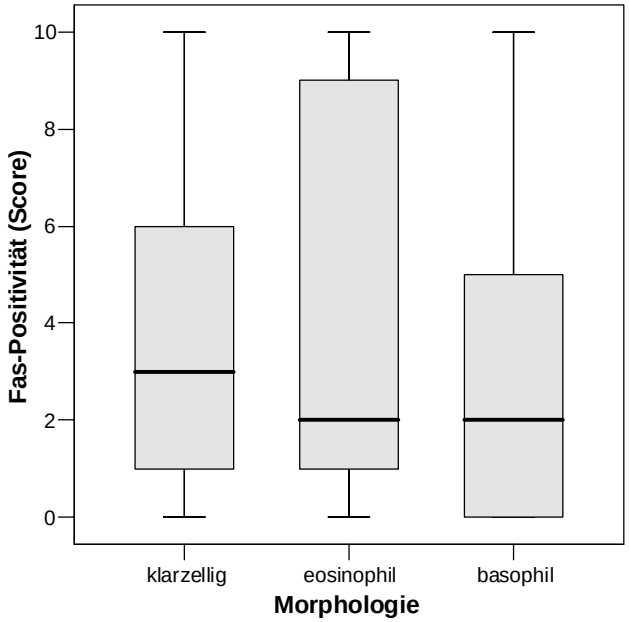


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbungen von Fas in MRN (A), HG-DN (B), HCC mit Differenzierungsgrad G1 (C), G2 (D), G3 (E) und im CCC-Areal (F).

4. Morphologie

Im Vergleich der histomorphologisch verschiedenen Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Auffallend war jedoch, dass im Vergleich zu den HCC insgesamt sowohl das CCC (Fas-Score 0,00) als auch die beiden undifferenzierten Karzinome (Median 0,34) eine noch niedrigere bzw. keine Fas-Expression zeigten.



Graphik 14:

Fas-Expression in HCC mit unterschiedlicher Morphologie: Darstellung in Boxplots

Klarzellig-solide HCC-Areale	n=10
Eosinophil-trabekuläre HCC-Areale	n=11
Basophil-pseudoglanduläre HCC-Areale	n=7

5. pT-Stadien

Im Vergleich der pT-Stadien konnten in der Fas-Immunhistochemie keine signifikanten Unterschiede erhoben werden.

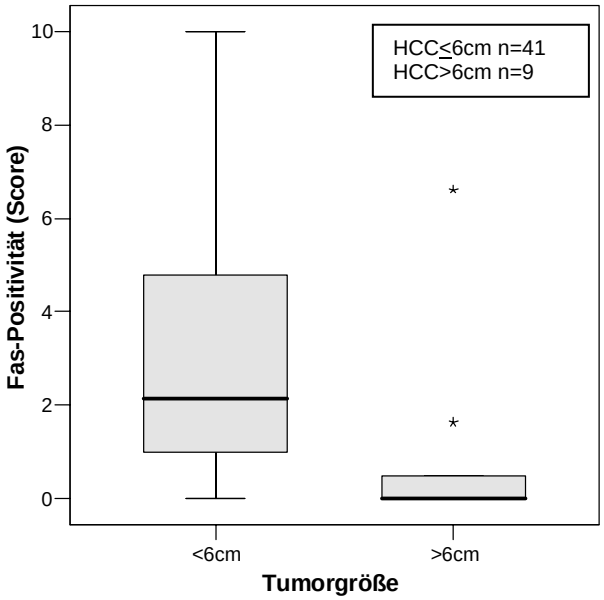
6. Tumorgröße

Im Vergleich der HCC bezüglich ihrer Tumorgrößen an verschiedenen Grenzwerten zeigten sich in der Fas-Immunhistochemie folgende signifikanten Unterschiede im MWU-Test:

1. Gruppe	2. Gruppe	Signifikanzniveau	Expressionsvergleich 1. Gruppe (1) vs. 2. Gruppe (2)
HCC ≤ 4,00 cm	HCC > 4,00 cm	** p<0,01	1 > 2
HCC ≤ 5,00 cm	HCC > 5,00 cm	** p<0,01	1 > 2
HCC ≤ 6,00 cm	HCC > 6,00 cm	** p<0,01	1 > 2
HCC ≤ 7,00 cm	HCC > 7,00 cm	** p<0,01	1 > 2
HCC ≤ 8,00 cm	HCC > 8,00 cm	** p<0,01	1 > 2

Tabelle 21: Signifikante Unterschiede in der Fas-Expression bei unterschiedlicher Tumorgröße

HCC mit einer Größe von mehr als 6cm zeigten damit hoch signifikant niedrigere Fas-Werte als kleinere Karzinome (p<0,01; MWU-Test).



Graphik 15:

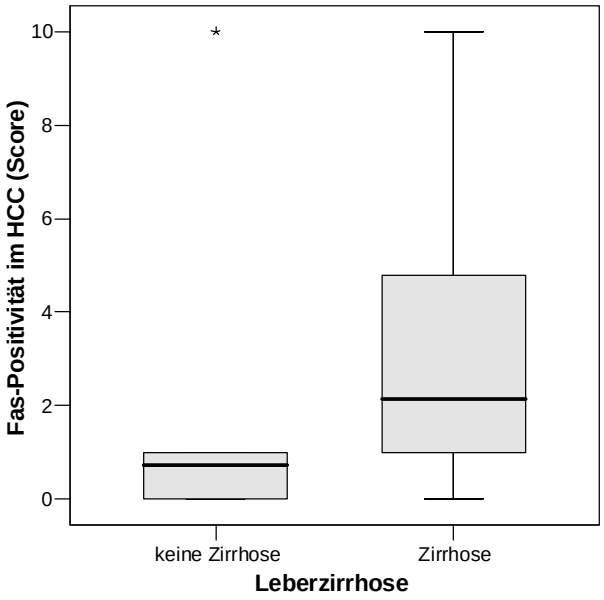
Fas-Expression in HCC abhängig von der Tumorgröße:
Darstellung in Boxplots
(Ausreißer sind mit * markiert)

HCC > 6cm vs. HCC ≤ 6cm p<0,01

7. Leberzirrhose

In HCC, bei denen das angrenzende Leberparenchym zirrhotisch umgewandelt war, zeigten sich hoch signifikant höhere Fas-Werte als in HCC in nicht-zirrhotisch umgebauter Leber (p<0,01; MWU-Test).

In den nicht-neoplastischen Referenzgewebsproben zeigte zirrhotisches Parenchym hoch signifikant mehr Fas-positive Zellen als nicht-zirrhotisches Referenzparenchym (p<0,01; MWU-Test).



Graphik 16:

Fas-Expression in HCC im angrenzenden zirrhotischen und nicht-zirrhotischen Referenzgewebe: Darstellung in Boxplots
(Ausreißer sind mit * markiert)

HCC mit Leberzirrhose vs. ohne Leberzirrhose p<0,01

HCC in nicht-zirrhotischer Leber	n=10
HCC in zirrhotischer Leber	n=41

Graphik 17:

Fas-Expression im zirrhotischen und nicht-zirrhotischen Referenzgewebe: Darstellung in Boxplots
(Ausreißer sind mit * markiert)

RG mit Leberzirrhose vs. ohne Leberzirrhose p<0,01

nicht-zirrhotisches Referenzgewebe	n=12
zirrhotisches Referenzgewebe	n=48

8. Angrenzendes HCC

Die Fas-Expression im Referenzgewebe zeigte keine signifikante Abhängigkeit von der Anwesenheit eines HCC.

5.4. FasLigand-Immunhistochemie

5.4.1. Färbeeigenschaften

Ein positives Färbeverhalten besteht in einer feingranulären, zytoplasmatisch lokalisierten Reaktion; der Zellkern und häufig auch ein feiner Saum perinukleär blieben dabei ausgespart.

Das Normalgewebe zeigte qualitativ eine meist homogene fein-granuläre zytoplasmatische Anfärbung mit angedeuteter Akzentuierung zum Gallepol hin. In der Verteilung der FasL-positiven Zellen im Gewebe war eine Zunahme der Färbeintensität zur Läppchenperipherie hin zu beobachten.

In den untersuchten HCC zeigte sich ein gröberes granuläres Färbemuster mit Verstärkung in der membrannahen Zellperipherie, auch ohne zytoplasmatische Einschlüsse oder Vakuolen.

In pseudoglandulären Formationen der HCC war eine stärkere Anfärbung des lumenwärtigen Zellpols beobachten.

FasL-positive Zellen waren intraindividuell in den HCC-Herden z.T. herdförmig sehr variabel, auch bezüglich Dichte und Zellfärbeintensität verteilt.

5.4.2. Quantifizierung der FasLigand-Immunhistochemie

5.4.2.1. Hepatozelluläres Karzinom

In der FasL-Immunhistochemie lagen die Score-Werte bei 46 von 52 (88,5%) untersuchten HCC zwischen 0,50 und 10,0 (Median 6,50).

Das Fibrolamelläre Karzinom wies einen FasL-Score-Wert von 10,0 auf.

Im CCC des Kollisionstumors wurde in der FasL-Immunhistochemie der Score-Wert 6,00 ermittelt, im HCC lag dieser Wert bei 7,00.

In den beiden undifferenzierten Karzinomen waren FasL-Werte von 1,50 und 3,17 zu beobachten (Median 2,34).

Die Score-Werte für die FasL-Immunhistochemie lagen bei den 3 Metastasen des Kollektivs im Bereich von 4,00 (undifferenziertes Karzinom) und 10,0 (FLC) (Median 7,00).

HCC und Ätiologie:

In 14 von 17 HCC (82,4%) mit bekannter HCV-Infektion zeigten sich Score-Werte in der FasL-Immunhistochemie zwischen 1,50 und 10,0 (Median 6,50).

Alle 4 HCC, in denen laut klinischen Angaben eine chronische HBV-Infektion vorlag, wiesen Score-Werten zwischen 3,00 und 7,00 auf (Median 5,89).

Alle 4 HCC mit klinischerseits angegebenem Alkoholabusus zeigten FasL-Werte im Bereich von 0,50 bis 6,77 (Median 0,50).

In 3 von 4 HCC (75,0%) mit klinischerseits angegebener Hämochromatose bewegten sich die FasL-Score-Werte zwischen 5,00 und 10,00 (Median 6,00).

Im undifferenzierten Karzinom, bei dem eine simultane HCV- und HBV-Infektion mit bekannt war, war FasL nicht nachweisbar.

FasL	HCC_{gesamt} n=52	HCV n=17	HBV n=4	Alkohol n=4	Hämochromatose n=4
Positive Fälle	46 (88,5%)	14 (82,4%)	4 (100%)	4 (100%)	3 (75,0%)
Median (Scorewert)	6,50	6,50	5,89	0,50	6,00
Minimum (Scorewert)	0,00	0,00	3,00	0,50	0
Maximum (Scorewert)	10,0	10,0	7,00	6,77	10,0

Tabelle 22: FasL-Expression in HCC bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

HCC und Differenzierungsgrade (modifiziert nach E&S):

In allen 5 Karzinomarealen, die als Grad 1 oder 1-2 eingestuft worden waren, lag der Score-Wert FasL-exprimierender Zellen zwischen 1,00 und 10,0 (Median 9,00).

13 von 17 Arealen (76,5%) in den Differenzierungsgraden 2 oder 2-3 zeigten eine FasL-Positivität im Bereich zwischen 2,00 und 10,0 (Median 7,00).

9 Areale von 10 (90,0%), die als Grad 3, 3-4 oder 4 eingestuft worden waren, erreichten FasL-Werte zwischen 1,00 und 10,0 (Median 4,00).

HCC und intratumorale Morphologie

In 9 von 11 eosinophil-trabekulären Arealen (81,8%) war eine FasL-Positivität zwischen 2,00 und 10,00 zu beobachten (Median 9,00).

Bei 9 von 10 klarzellig-soliden Arealen (90,0%) erstreckten sich die FasL-Werte über das Score-Spektrum von 1,00 bis 10,0 (Median 8,00).

Bei 6 von 7 basophil-pseudoglandulären Arealen (85,7%) wurden in der FasL-Immunhistochemie Score-Punkte zwischen 1,00 und 10,0 vergeben (Median 4,00).

HCC und Tumorgröße

In 12 von 13 HCC (92,3%), die kleiner oder gleich 2,0cm waren, zeigten sich FasL-Score-Werte zwischen 0,50 und 7,00 (Median 5,00), während 33 von 37 HCC (89,2%) mit einem Durchmesser von mehr als 2,0cm eine FasL-Expression zwischen 0,50 und 10,0 (Median 6,77) aufwiesen.

In 36 von 39 HCC (92,3%), die bis zu 5,0cm groß waren, ergab sich eine FasL-Positivität zwischen 0,50 und 10,0 (Median 6,52). 9 von11 HCC(81,8%), die größer als 5,0cm waren, ließen FasL-Score-Werte zwischen 0,50 und 10,0 erkennen (Median 5,28).

FasL	Tumorgröße (in cm)					
	HCC_{gesamt} n=52	≤ 2,00 n=13	2,01 – 4,00 n=20	4,01 – 6,00 n=8	6,01 – 8,00 n=5	> 8,00 n=4
Positive Fälle	46 (88,5%)	12 (92,3%)	18 (90%)	8 (100%)	3 (60%)	4 (100%)
Median (Scorewert)	6,50	5,00	6,86	8,30	3,50	4,60
Minimum (Scorewert)	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,50
Maximum (Scorewert)	10,0	7,00	10,0	10,0	9,25	7,00

Tabelle 23: FasL-Expression in HCC in Abhängigkeit der Tumorgröße

5.4.2.2. Dysplastische Läsionen

In 7 von 9 dysplastischen Knoten (77,8%) wurde eine zytoplasmatische FasL-Expression in einem Anteil zwischen 4,00 und 10,0 Score-Punkten nachgewiesen (Median 9,00), dabei lag der Anteil bei 2 von 3 LG-DN (66,7%) bei 4,00 und 9,00 (Median 4,00) und bei 5 von 6 HG-DN (83,3%) zwischen 8,00 und 10,0 (Median 9,50).

5.4.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

Im Hepatozellulären Adenom wurde für die FasL-Expression ein Score-Wert von 9,30 ermittelt.

In allen 3 Fällen von FNH lag der Wert für die FasL-Untersuchung im Bereich von 9,00 bis 10,0 (Median 9,00).

Die 5 Regeneratknoten zeigten in der FasL-Immunhistochemie alle positive Werte im Bereich von 5,00 bis 10,0 (Median 9,00).

5.4.2.4. Referenzgewebe

In 58 von 61 Referenzgewebsproben (95,1%) bewegte sich der FasL-Score-Wert zwischen 1,70 und 10,0 (Median 8,00). 46 von 48 (95,8%) zirrhotisch umgebauten Lebern wiesen FasL-Score-Werte zwischen 1,70 und 10,0 auf (Median 8,55), alle 12 nicht-zirrhotischen Referenzgewebsproben wiesen FasL-Score-Werte zwischen 2,00 und 10,0 auf (Median 8,00).

In der an das HCA angrenzenden Leber war ein FasL-Scorewert von 9,30 zu beobachten.

In 49 von 51 (96,1%) nicht-neoplastischen Gewebeproben aus HCC-Lebern war eine FasL-Expression mit Werten zwischen 1,70 und 10,0 zu beobachten (Median 8,0). Dabei zeigten sich in 40 von 41 Fällen (97,6%) von zirrhotischem Parenchym in HCC-Lebern FasL-Werte zwischen 1,70 und 10,0 (Median 8,60). In allen 10 Fällen aus nicht-zirrhotisch umgebauter Leber mit HCC waren FasL-Werte im Bereich von 2,00 bis 10,0 nachzuweisen (Median 7,75).

Bei 5 von 6 Patienten (83,3%), bei denen unter Malignitätsausschluss die Diagnose einer kompletten Leberzirrhose gestellt worden war, erfolgte ein FasL-Nachweis mit Werten zwischen 4,75 und 9,30 (Median 7,25), wobei der Maximalwert von 9,30 im Fall von M. Wilson erreicht wurde. Bei dem Patienten mit Dysplasie ohne zirrhotischen Umbau lag der FasL-Score-Wert im nicht-dysplastischen Parenchym bei 8,00.

Referenzgewebe und Ätiologie:

FasL	Referenz n=61	HCV n=23	HBV n=5	Alkohol n=5	Hämochromatose n=4	M. Wilson n=1
Positive Fälle	58 (95,1%)	22 (95,7%)	5 (100%)	4 (80%)	3 (75%)	
Median (Scorewert)	8,00	8,00	9,00	5,00	9,25	9,30
Minimum (Scorewert)	0,00	0,00	7,00	0,00	0,00	
Maximum (Scorewert)	10,0	10,0	10,0	7,00	10,0	

Tabelle 24: FasL-Expression in Referenzgewebe bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

5.4.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung

1. Entitäten

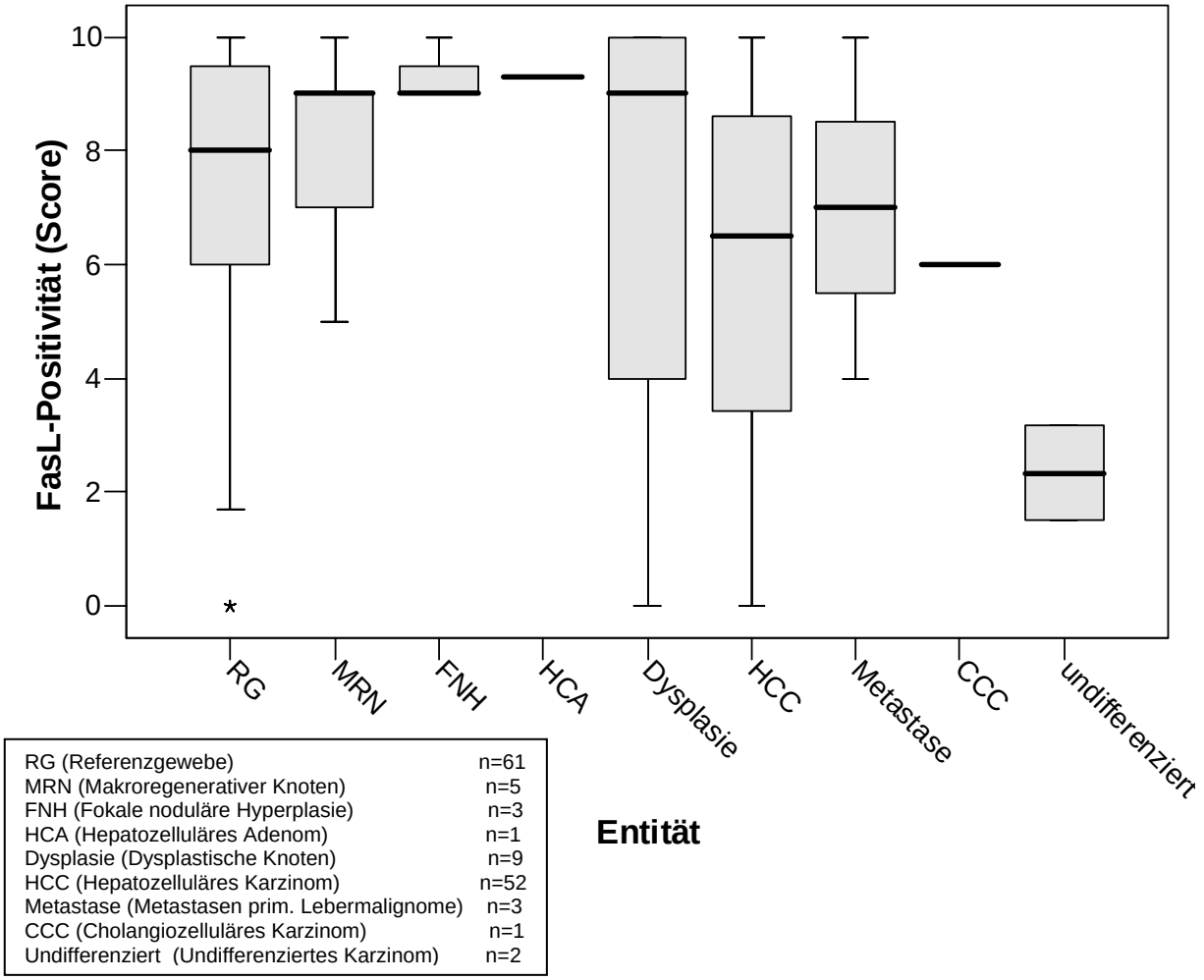
In den Karzinomen wurden höchst signifikant weniger FasL-exprimierende Zellen beobachtet als im angrenzenden Leberparenchym ($p<0,001$; Wilcoxon-Test).

Es zeigte sich eine geringe positive Korrelation zwischen FasL-Werten in den Karzinomen mit den korrespondierenden FasL-Werten im angrenzenden Leberparenchym ($p<0,01$; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho $r=0,42$).

Das HCA (9,30), die Gruppe der FNH (Median 9,00) und die MRN (Median 9,00) zeigten eine dem Referenzgewebe (Median 8,55) vergleichbar hohe FasL-Expression.

Die Gruppe der dysplastischen Knoten differierte stark in der FasL-Expression und konnte deshalb nicht eindeutig mit dem Referenzgewebe oder der HCC-Gruppe verglichen werden.

Die 3 Metastasen hepatozellulärer Neoplasien wiesen in der Tendenz eine eher höhere FasL-Expression auf als die primären Malignome.



Graphik 18: FasL-Expression der untersuchten Entitäten im Überblick: Darstellung in Boxplots. Ausreißer sind mit * markiert.

2. Ätiologie

Im Referenzgewebe war die FasL-Expression in Fällen von bekanntem Alkoholabusus (Median 5,00) signifikant niedriger als in Fällen ohne Alkoholanamnese (MWU-Test; $p<0,01$).

Relativ hohe FasL-Score-Werte zeigten sich in nicht-neoplastischen Hepatozyten bei HBV-Infektion (Median 9,00) und Hämochromatose (Median 9,25). HCV-Referenzgewebe (Median 8,00) war dem der Referenzgewebsproben vergleichbar.

Auch bei den Malignomen resultierte in der Gruppe der alkoholbedingten HCC (Median 0,50) die niedrigste FasL-Expression im Verhältnis zur HCC-Gesamtgruppe. HBV-assoziierte HCC (Median 5,89), HCV-assoziierte HCC (Median 6,50) und HCC

mit Hämochromatoseverdacht (Median 6,00) sind in ihrer FasL-Expression mit der HCC-Gesamtgruppe vergleichbar (Median 6,50).

3. Differenzierungsgrade

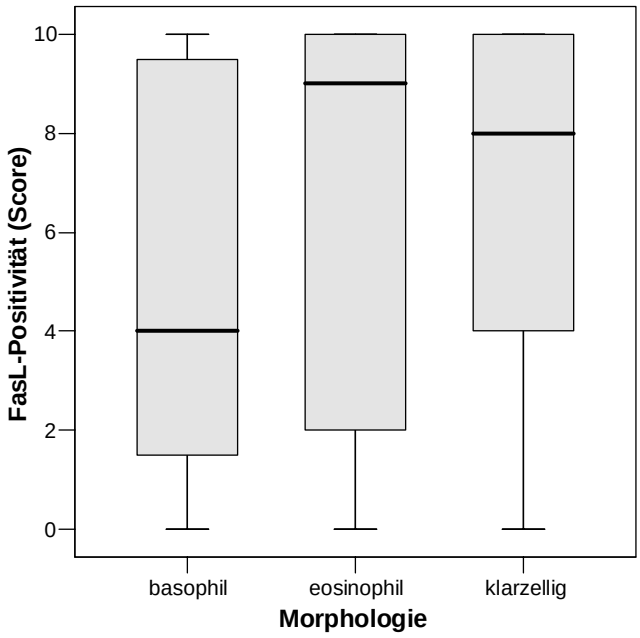
Im Vergleich der Differenzierungsgrade im HCC ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der FasL-Immunhistochemie, tendenziell war aber mit sinkendem Differenzierungsgrad eine niedrigere FasL-Expression zu beobachten.

4. Morphologie

Im Vergleich der histomorphologisch verschiedenen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der FasL-Immunhistochemie. Der Median lässt für basophil-pseudoglanduläre Areale eine Tendenz zu niedrigerer FasL-Expression vermuten.

Das CCC des Kollisionstumors wies keine Besonderheiten im Vergleich mit den histomorphologischen HCC-Untergruppen auf.

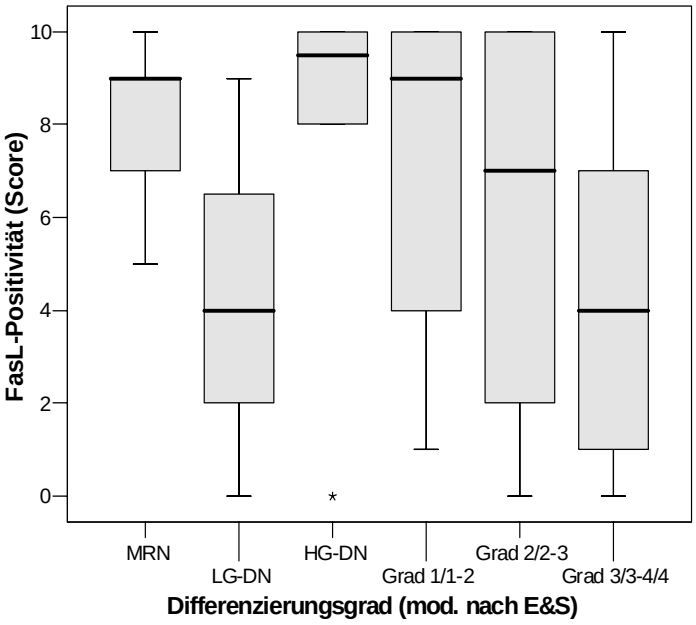
Die undifferenzierten Karzinome zeigten beide eine niedrige FasL-Expression (Median 2,34) im Vergleich zu den HCC.



Graphik 19:

FasL-Expression in HCC mit unterschiedlicher Morphologie: Darstellung in Boxplots

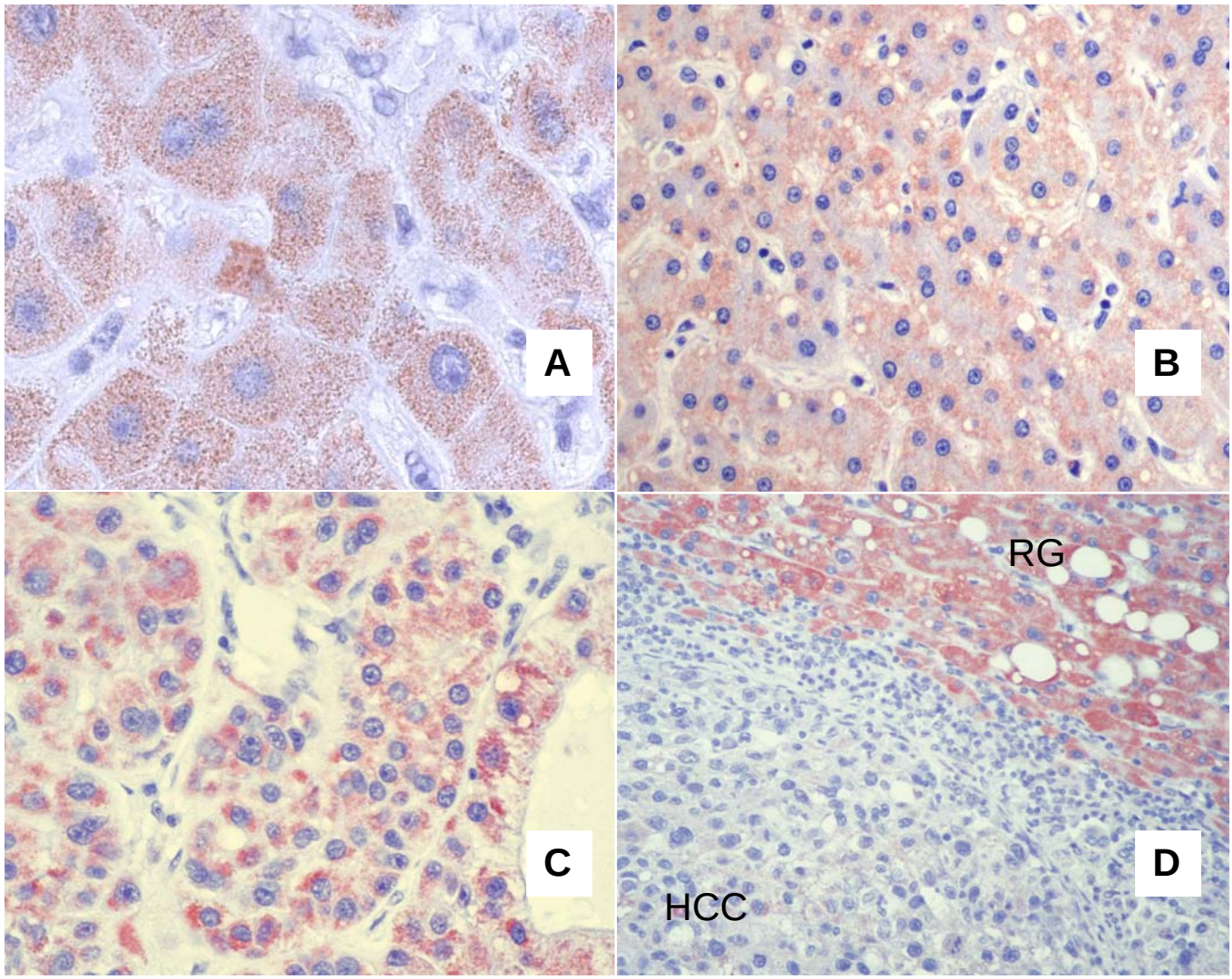
Klarzellig-solide HCC-Areale	n=10
Eosinophil-trabekuläre HCC-Areale	n=11
Basophil-pseudoglanduläre HCC-Areale	n=7



Graphik 20:
FasL-Expression in MRN, dysplastischen Knoten und HCC unterschiedlicher Differenzierungsgrade:
Darstellung in Boxplots
(Ausreißer mit * markiert)

MRN (Makroregenerative Knoten)	n=5
LG-DN (Dyspl. Knoten geringer Atypie	n=3
HG-DN (Dyspl. Knoten hoher Atypie	n=6
Grad 1/1-2 (HCC E&S 1 und 1-2)	n=5
Grad 2/2-3 (HCC E&S 2 und 2-3)	n=17
Grad 3/3-4/4 (HCC E&S 3, 3-4 und 4)	n=10

Abbildung 10 (unten):
Immunhistochemische Färbungen von FasL: Referenzgewebe (A), MRN (B), HCC Differenzierungsgrad 2 (C) mit gröber granulärem, inhomogenem Färbemuster und HCC Differenzierungsgrad 3 mit angrenzendem RG (D).



5. pT-Stadien

In der FasL-Immunhistochemie wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen pT-Stadien festgestellt.

6. Tumorgröße

Hinsichtlich der Tumorgröße wurden in der FasL-Immunhistochemie keine signifikanten Unterschiede innerhalb der HCC festgestellt.

7. Leberzirrhose

Es wurden keine Unterschiede in der FasL-Immunhistochemie festgestellt zwischen HCC mit oder ohne Zirrhose. Auch Referenzgewebe mit oder ohne Zirrhose war nicht signifikant unterschiedlich.

8. Angrenzendes HCC

Im Referenzgewebe zeigte sich kein signifikanter Unterschied je nach Vorhandensein oder Fehlen eines synchronen HCC.

5.5. Bax-Immunhistochemie

5.5.1. Färbeeigenschaften

Die immunhistochemische bax-Expression zeigt sich als ein fein- bis grobgranuläres Färbemuster, das auf das Zytoplasma begrenzt ist.

Bax-positive Zellen waren im HCC herdförmig in unterschiedlicher Häufigkeit verteilt. Eine Regelmäßigkeit konnte dabei nicht festgestellt werden.

Im zirrhotischen Parenchym waren Bax-positive Zellen eindrucksmäßig häufiger im Randbereich der Regeneratknoten zu beobachten.

5.5.2. Quantifizierung der Bax-Immunhistochemie

5.5.2.1. Hepatozelluläres Karzinom

Von den 52 Heptozellulären Karzinomen konnten aus gewebetechnischen Gründen nur 51 ausgewertet werden. Bei 39 von 51 gewerteten HCC (76,5%) ergaben sich Werte in der bax-Immunhistochemie zwischen 0,04 und 9,50 (Median 1,00).

Das Fibrolamelläre Karzinom zeigte einen bax-Score-Wert von 1,00.

Das CCC des Kollisionstumors erhielt in der bax-Immunhistochemie den Score-Wert 8,0, während der bax-Wert des HCC bei 1,00 lag.

Für die beiden undifferenzierten Karzinome wurden in der Auswertung der bax-Immunhistochemie die Score-Werte 1,0 und 8,33 vergeben (Median 4,67).

Für die 3 bax-positiven Metastasen wurden die Score-Werte 1,00 und 10,0 vergeben (Median 1,00).

HCC und Ätiologie:

In 12 von 17 HCC (70,6%) mit klinisch bekannter chronischer HCV-Infektion waren bax-Score-Werte zwischen 0,17 und 7,00 (Median 0,83) nachzuweisen.

Alle 4 Fälle von HCC mit klinischerseits angegebener HBV-Infektion zeigten bax-markierte Zellen, die Score-Werten zwischen 0,50 und 4,72 entsprachen (Median 2,84).

In allen 4 Fällen von HCC, in denen laut klinischen Angaben ein chronischer Alkoholabusus vorlag, wurden in der bax-Immunhistochemie nur positive Score-Werte zwischen 0,50 und 5,00 erreicht (Median 2,66).

In 2 von 3 gewerteten Fälle (66,7%) von Hämochromatose-assoziierten HCC waren bax-Werte zwischen 0,71 und 3,67 zu beobachten (Median 0,71). Ein Fall der 4 Hämochromatose-assoziierten HCC konnte aus gewebetechnischen Gründen nicht ausgewertet werden.

Das undifferenzierte Karzinom mit gleichzeitiger HCV- und HBV-Infektion zeigte in der bax-Immunhistochemie einen Score-Wert von 1,00.

bax	HCC_{gesamt} n=51	HCV n=17	HBV n=4	Alkohol n=4	Hämochromatose **n=3**
Positive Fälle	39 (76,5%)	12 (70,6%)	4 (100%)	4 (100%)	2 (66,7%)
Median (Scorewert)	1,00	0,83	2,84	2,66	0,71
Minimum (Scorewert)	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00
Maximum (Scorewert)	9,50	7,00	4,72	5,00	3,67

Tabelle 25: bax-Expression in HCC bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

HCC und Differenzierungsgrade (modifiziert nach E&S):

In den 5 HCC-Arealen, die als Grad 1 oder 1-2 klassifiziert worden waren, lag in 4 Fällen (80%) der Wert bax-positiver Zellen zwischen 1,00 und 2,00 (Median 2,00).

In 10 von 17 Arealen (58,8%), die als Grad 2 oder 2-3 eingestuft worden waren, lag die bax-Positivität im Bereich zwischen 1,00 und 10,00 (Median 1,00).

7 Areale von 10 (70,0%) mit Grad 3, 3-4 oder 4 erreichten bax-Werte zwischen 6,00 und 9,00 (Median 6,50).

HCC und intratumorale Morphologie

Von den 11 eosinophil-trabekulären Arealen war in 8 Fällen (72,7%) eine zytoplasmatische bax-Positivität zwischen 1,00 und 9,00 zu beobachten (Median 1,00).

Unter den 10 klarzellig-soliden Arealen wurden in 7 Fällen (70,0%) positive bax-Werte zwischen 1,00 und 8,00 erreicht (Median 1,00).

Bei den 7 basophil-pseudoglandulären Arealen wurden in 4 Fällen (57,1%) Score-Punkte zwischen 1,00 und 9,00 vergeben (Median 1,00).

HCC und Tumorgröße

In 9 von 13 HCC (69,2%), die kleiner oder gleich 2,0cm waren, zeigten sich bax-Score-Werte zwischen 0,50 und 6,00 (Median 1,06), während 29 von 37 HCC (78,4%) mit einem Durchmesser von mehr als 2,0cm eine bax-Expression zwischen 0,04 und 9,50 (Median 1,00) aufwiesen.

29 von 39 HCC (74,4%), die kleiner oder gleich 5,0cm waren, zeigten eine bax-Positivität zwischen 0,17 und 7,0 (Median 0,90), während 9 von11 HCC (81,8%), die größer als 5,0cm waren, bax-Score-Werte zwischen 0,04 und 9,50 aufwiesen (Median 2,00).

34 von 46 HCC (73,9%), die bis zu 8,0cm groß waren, zeigten eine bax-Expression mit Score-Werten zwischen 0,04 und 10,0 (Median 2,07). Alle 4 HCC (100%), die größer als 8,0cm waren, zeigten dagegen bax-Score-Werte von 2,00 bis 9,50 (Median 3,57).

bax	Tumorgröße (in cm)					
	HCC_{gesamt} n=51	≤ 2,00 n=13	2,01 – 4,00 n=20	4,01 – 6,00 n=8	6,01 – 8,00 n=5	> 8,00 n=4
Positive Fälle	39 (76,5%)	9 (69,2%)	15 (75%)	6 (75%)	4 (80%)	4 (100%)
Median (Scorewert)	1,00	1,06	0,77	1,05	0,72	3,57
Minimum (Scorewert)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
Maximum (Scorewert)	9,50	6,00	7,00	4,50	7,10	9,50

Tabelle 26: bax-Expression in HCC in Abhängigkeit der Tumorgröße

5.5.2.2. Dysplastische Läsionen

In 4 HG-DN von den insgesamt 9 dysplastischen Knoten (44,4%) zeigte sich eine zytoplasmatische Färbung mit bax in einem Anteil zwischen 1,00 und 4,00 Score-Punkten (Median 0).

5.5.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

Im Hepatozellulären Adenom wurde ein Score-Wert von 0,33 vergeben.

In den 3 Fällen von FNH konnte jeweils keine Expression von bax in Hepatozyten nachgewiesen werden. Eine starke Expression wiesen jedoch die Gallengangsproliferate auf.

Von den 5 Regeneratknoten zeigten in der bax-Immunhistochemie 2 Fälle (40,0%) positive Werte von 1,00 (Median 0).

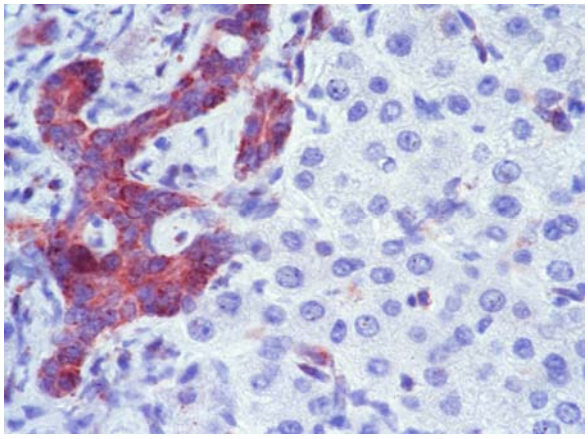


Abbildung 11:

Immunhistochemische Färbung von bax in FNH: bax-Expression durch Gallengangs-proliferate

5.5.2.4. Referenzgewebe

In 25 von 61 Referenzgewebsproben (41,0%) bewegte sich der bax-Score-Wert zwischen 0,16 und 4,00 (Median 0,00). 21 von 48 (43,8%) zirrhotisch umgebauten Lebern wiesen bax-Score-Werte zwischen 0,16 und 3,00 auf (Median 0), 4 von 12 (33,3%) nicht zirrhotisch umgebauten Lebern wiesen bax-Score-Werte zwischen 0,50 und 4,00 auf (Median 0).

In der HCA-angrenzenden Leber war ein bax-Scorewert von 0,67 zu beobachten.

Bei 20 von 51 Fällen (39,2%) von Referenzgewebe aus Lebern mit HCC, lagen die vergebenen bax-Werte zwischen 0,16 und 3,00 (Median 0). In 18 von 41 Fällen

(43,9%) von zirrhotischem Gewebe bei gleichzeitigem HCC zeigten sich bax-Werte im Bereich von 0,16 bis 3,00 (Median 0,00). 2 von 10 Fällen (20,0%) ohne Leberzirrhose bei HCC wiesen Score-Werte von 0,50 und 1,00 (Median 0,00) auf.

Bei 2 von 6 Patienten (33,3%) mit einer kompletten Leberzirrhose ohne Malignom wurde eine bax-Positivität von 1,00 nachgewiesen (Median 0). Bei dem Patienten mit Dysplasie ohne zirrhotischen Umbau zeigte sich im nicht-dysplastischen Parenchym der bax-Score-Wert von 4,00.

Referenzgewebe und Ätiologie:

bax	Referenz n=61	HCV n=23	HBV n=5	Alkohol n=5	Hämochromatose n=4	M. Wilson n=1
Positive Fälle	25 (41,0%)	13 (56,5%)	4 (80%)	2 (40%)	1 (25%)	
Median (Scorewert)	0,00	0,50	0,33	0,00	0,00	0,00
Minimum (Scorewert)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Maximum (Scorewert)	4,00	1,67	3,00	0,50	0,16	

Tabelle 27: bax-Expression in Referenzgewebe bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

5.5.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung

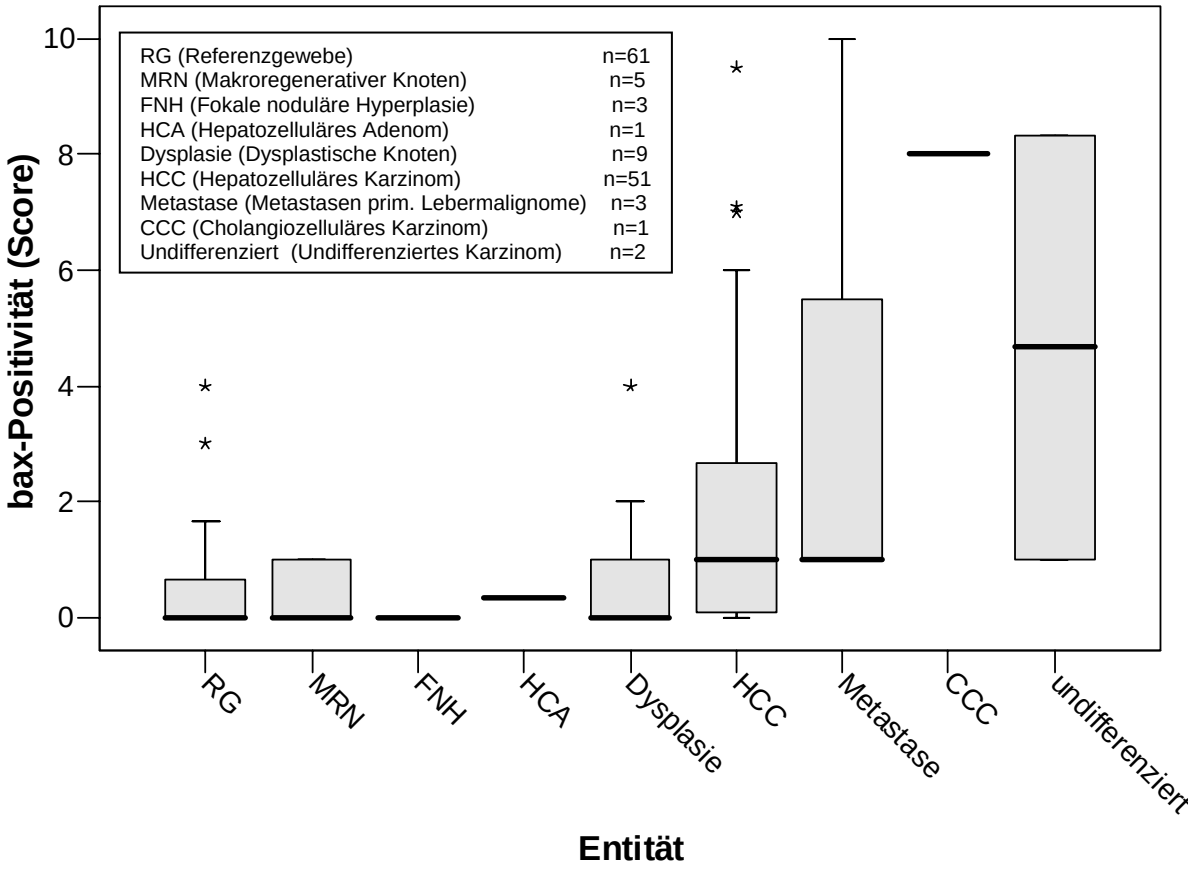
1. Entitäten

Im Karzinom wurden höchst signifikant mehr bax-positive Zellen nachgewiesen als im angrenzendem Leberparenchym ($p<0,001$; Wilcoxon-Test).

FNH und MRN wiesen dem Referenzgewebe vergleichbare Werte auf.

Die bax-Werte von HCA (0,33) und dysplastischen Knoten waren nicht eindeutig der Referenz- oder HCC-Gruppe vergleichbar.

Die 3 Metastasen hepatischer maligner Tumoren (Median 1,00) wiesen mindestens gleich hohe bax-Score-Werte auf wie die primären Leberkarzinome.



Graphik 21: bax-Expression der untersuchten Entitäten im Überblick: Darstellung in Boxplots. Ausreißer sind mit * markiert.

2. Ätiologie

Im Referenzgewebe zeigten die Fälle von viraler Hepatitis höhere bax-Expressionen als das nicht-virale Referenzgewebe. In den 23 Fällen von HCV-Infektion (Median 0,50) war dieses Resultat signifikant (0,05), in den Fällen von HBV-Infektion (Median 0,33) zeigte sich die Tendenz. Die Referenzgewebsproben der ätiologischen Gruppen „Alkohol“, „Hämochromatose“ und „M. Wilson“ verhielten sich in der bax-Immunhistochemie wie das Gesamtreferenzgewebe.

Im Vergleich zwischen den Gruppen unterschiedlicher Ätiologie wiesen die HBV-assoziierten HCC (Median 2,84) die höchsten bax-Werte auf, auch im Vergleich mit der HCC-Gesamtgruppe (Median 1,00), gefolgt von den äthyltoxisch-bedingten HCC (Median 2,66), den HCV-assoziierten HCC (Median 0,83) und den 4 HCC bei Hämochromatoseverdacht (Median 0,71), letztere mit deutlich weniger positiven Zellen.

3. Differenzierungsgrade

Im Vergleich von MRN, dysplastischen Knoten und Differenzierungsstufen im HCC hinsichtlich der bax-Immunhistochemie konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, sondern lediglich die Tendenz zu eher höherer bax-Expression in dysplastischen Knoten mit hoher Atypie als mit geringer Atypie sowie in niedriger differenzierten HCC als in höher differenzierten HCC.

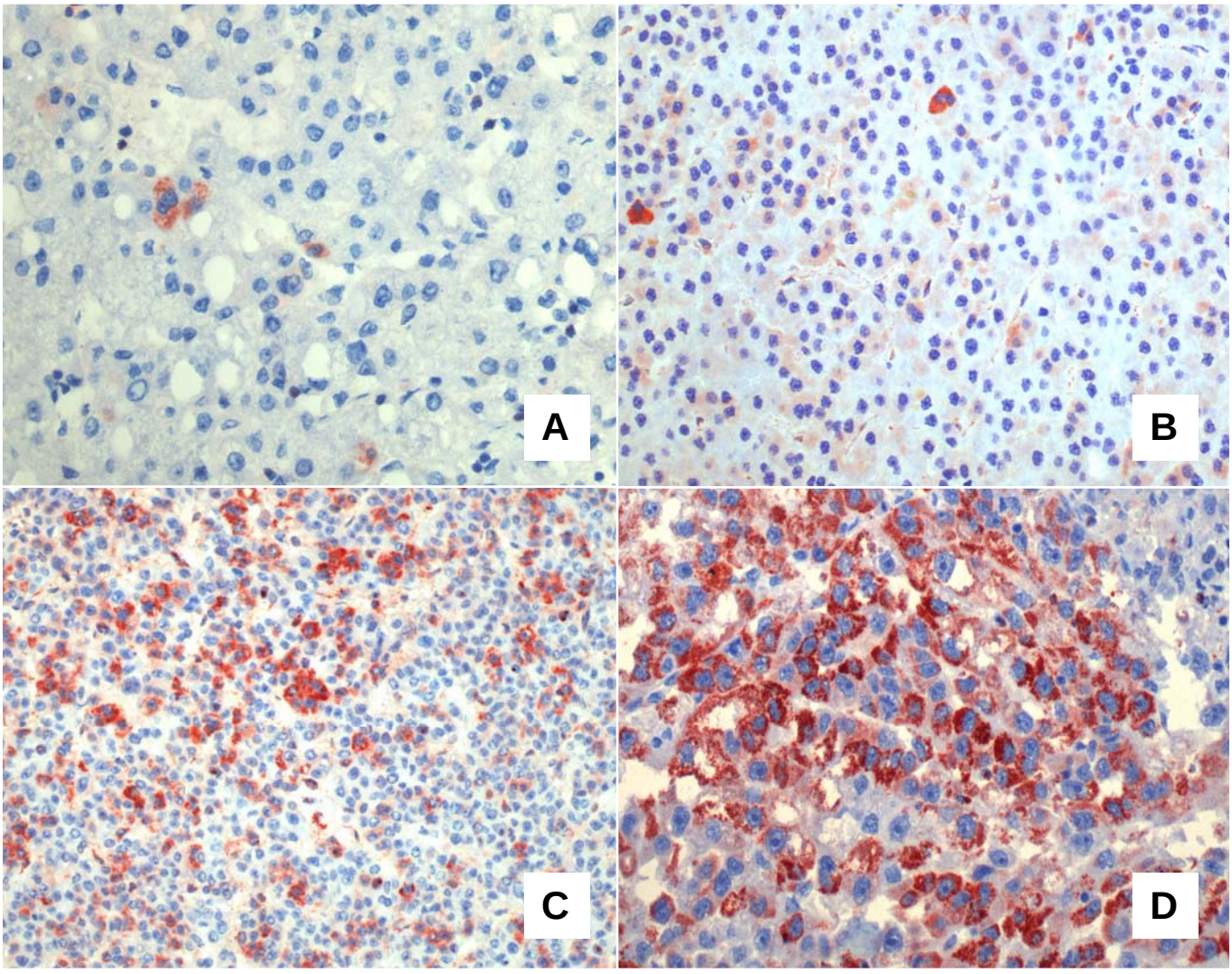
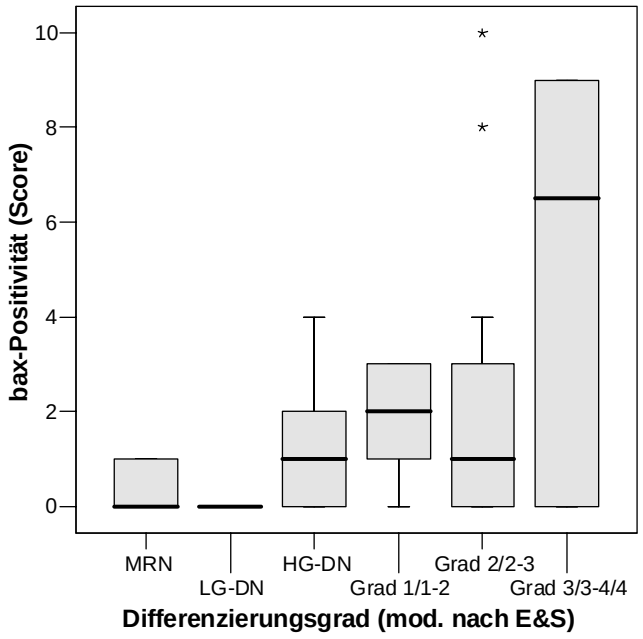


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen von bax in HG-DN (A) und HCC Grad 1 (B), Grad 2 (C) und Grad 3 (D)



Graphik 22:
bax-Expression in MRN, dysplastischen Knoten vom LG- und HG-Typ, sowie in HCC unterschiedlicher Differenzierungs-grade:
Darstellung in Boxplots
(Ausreißer sind mit * markiert)

Keine statistisch signifikanten Unterschiede.
Tendenz zu höherer bax-Expression mit höherem Dysplasiegrad in DN und schlechterem Differenzierungs-grad in HCC.

MRN (Makroregenerative Knoten)	n=5
LG-DN (Dyspl. Knoten geringer Atypie	n=3
HG-DN (Dyspl. Knoten hoher Atypie	n=6
Grad 1/1-2 (HCC E&S 1 und 1-2)	n=5
Grad 2/2-3 (HCC E&S 2 und 2-3)	n=17
Grad 3/3-4/4 (HCC E&S 3, 3-4 und 4)	n=10

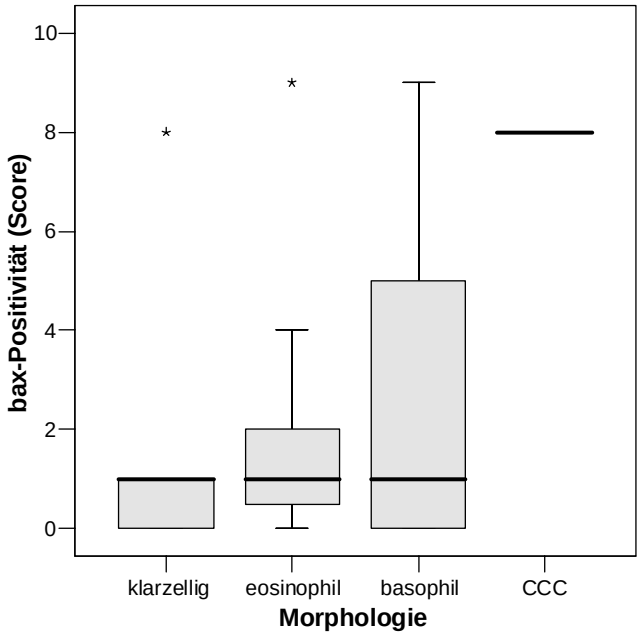
4. Morphologie

Im Vergleich der histomorphologisch verschiedenen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In der Tendenz wurden jedoch in den basophil-pseudoglandulären Arealen höhere bax-Score-Werte erreicht als in eosinophil-trabekulären und deutlicher noch als in klarzellig-soliden Arealen.

Das CCC des Kollisionstumors war mit den basophil-pseudoglandulären Arealen vergleichbar.

Die beiden undifferenzierten Karzinome differierten stark und waren damit nicht als eine Gruppe im Gesamtvergleich repräsentativ.



Graphik 23:

bax-Expression in HCC mit unterschiedlicher Morphologie und im CCC.
(Ausreißer sind mit * markiert)

Tendenz zu höherer bax-Expression in basophil-pseudoglandulären Arealen bei jedoch gleichen Medianen.

Klarzellig-solide HCC-Areale	n=10
Eosinophil-trabekuläre HCC-Areale	n=11
Basophil-pseudoglanduläre HCC-Areale	n=7
CCC-Areal	n=1

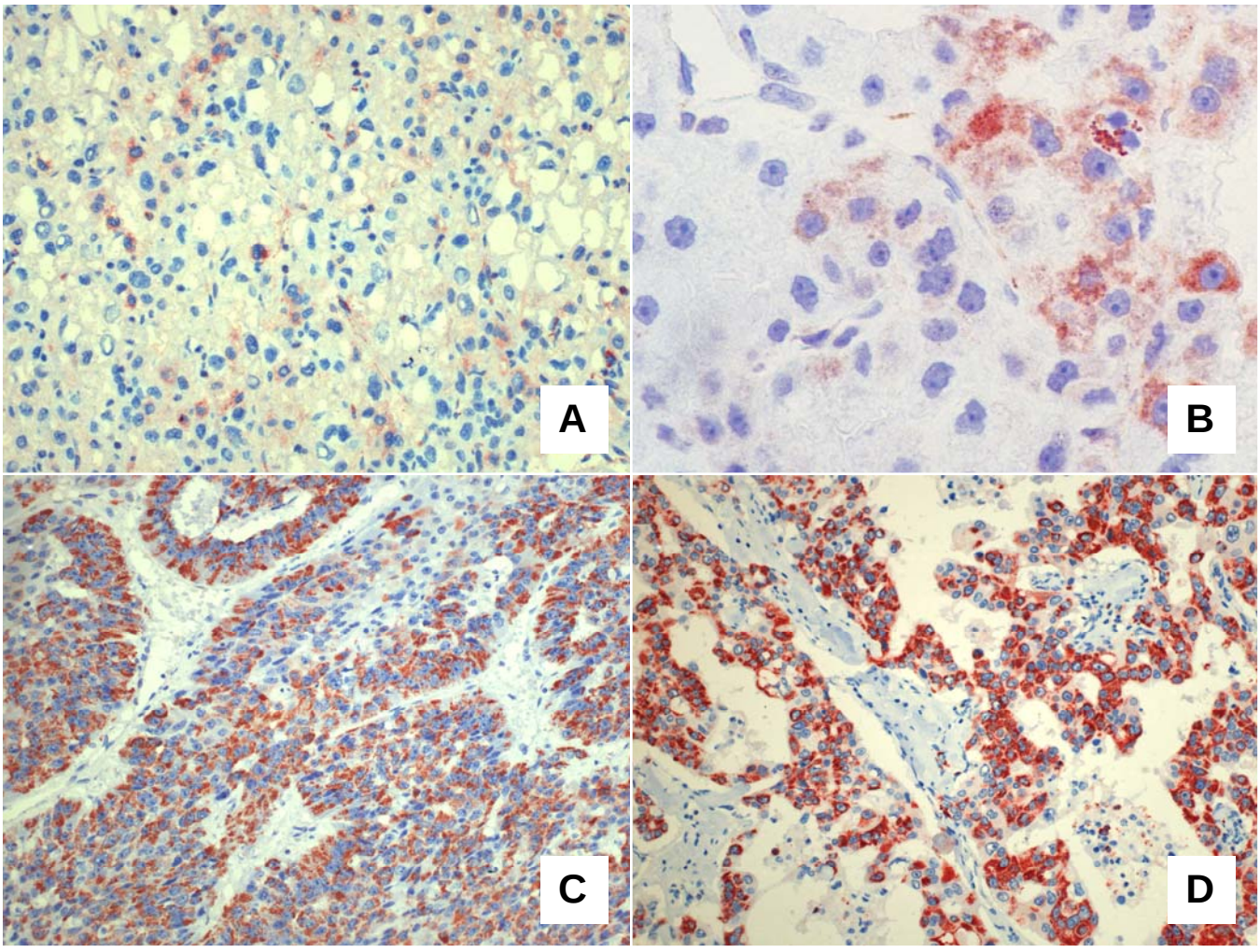


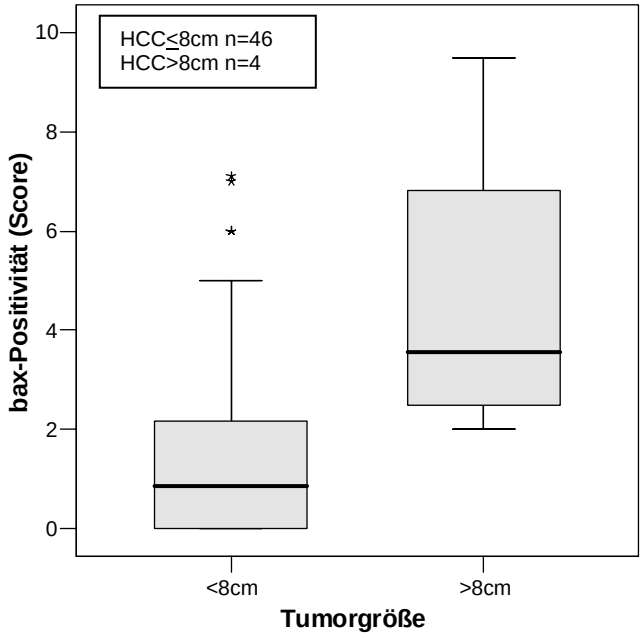
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbungen von bax in HCC mit klarzellig-solider (A), eosinophil-trabekulärer (B) und basophil-pseudoazinärer Morphologie (C) in Gegenüberstellung zu einem CCC-Areal (D).

5. pT-Stadien

In der bax-Immunhistochemie wurden keine signifikanten Unterschiede der einzelnen pT-Stadien festgestellt.

6. Tumorgröße

Im Vergleich der HCC hinsichtlich ihrer Tumorgrößen an verschiedenen Grenzwerten wiesen HCC, die größer als 8,00cm waren, signifikant höhere bax-Expressionen auf als HCC, die kleiner oder gleich 8,00cm maßen. Vergleich an Grenzwerten darunter waren ohne Unterschied.



Graphik 24:

bax-Expression in HCC abhängig von der Tumorgröße:
Darstellung in Boxplots
(Ausreißer sind mit * markiert)

HCC > 8cm vs. HCC ≤ 8cm p<0,05

7. Leberzirrhose

Es wurden keine Unterschiede in der bax-Immunhistochemie festgestellt zwischen HCC mit oder ohne Leberzirrhose. Ebenso wenig zeigten sich signifikante Unterschiede im Referenzgewebe mit oder ohne Leberzirrhose.

8. Angrenzendes HCC

Hinsichtlich eines gleichzeitigen HCC wurden unter den Referenzgewebsproben keine Unterschiede festgestellt.

5.6. TUNEL-Hybridisierung

5.6.1. Färbeeigenschaften

Die in-situ-Hybridisierung mittels der TUNEL-Technik führt bei Positivität der Zelle zu einer fokalen Färbung des apoptotischen Zellkerns bzw. des Apoptosekörpers (14). In der Bewertung müssen bei dieser Technik aber auch morphologische Kriterien der Apoptose berücksichtigt werden, um nekrotische und autolytische Zellen abzugrenzen. (2; 34; 67; 73; 128)

TUNEL-positive Zellen waren teilweise im Lumen pseudoglandulärer Formationen anzutreffen.

5.6.2. Quantifizierung der TUNEL-Methode

5.6.2.1. Hepatozelluläres Karzinom

Bei den 52 untersuchten sämtlich positiven HCC lag der Anteil der positiven Zellen in der TUNEL-Technik zwischen 0,16% und 6,67% (Median 0,86%).

Das Fibrolamelläre Karzinom, zeigte einen Anteil TUNEL-positiver Zellen von 0,53%.

Im CCC des Kollisionstumors wurde nach der TUNEL-Methode der Wert 1,77% ermittelt, im HCC lag dieser Wert bei 1,03%.

In den 2 undifferenzierten Karzinomen waren TUNEL-Werte von 1,48% und 2,00% zu beobachten (Median 1,74%).

Der Anteil der TUNEL-positiven Zellen in den 3 jeweils positiven Metastasen bewegte sich zwischen 0,15% und 1,06% (Median 0,20%).

HCC und Ätiologie:

In den 17 TUNEL-positven HCC mit chronischer HCV-Infektion waren Werte zwischen 0,16% und 3,05% zu beobachten (Median 1,16%).

Alle 4 Fälle von HCC mit klinischerseits angegebener HBV-Infektion wiesen eine TUNEL-Positivität auf mit Werten zwischen 0,45 % und 1,56% (Median 0,86%).

In allen 4 Fällen von HCC, in denen laut klinischen Angaben ein chronischer Alkoholabusus vorlag, wurden in der TUNEL-Methode positive Werte zwischen 0,38% und 6,67% erreicht (Median 0,94%).

Die 4 TUNEL-positiven Fälle von HCC, denen eine Hämochromatose zugrunde lag, zeigten Werte zwischen 0,29% und 0,85% (Median 0,59%).

Bei einem der beiden undifferenzierten Karzinome mit gleichzeitiger HCV- und HBV-Infektion wurde der TUNEL-Wert von 2,00% nachgewiesen.

TUNEL	HCC_{gesamt} n=52	HCV n=17	HBV n=4	Alkohol n=4	Hämochromatose n=4
Positive Fälle	52(100%)	17 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)
Median (in %)	0,86	1,16	0,86	0,94	0,59
Minimum (in %)	0,16	0,16	0,45	0,38	0,29
Maximum (in %)	6,67	3,05	1,56	6,67	0,85

Tabelle 28: TUNEL-Positivität in HCC bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

HCC und Differenzierungsgrade (modifiziert nach E&S):

In allen 5 Karzinomarealen, die als Grad 1 oder 1-2 modifiziert nach E&S klassifiziert worden waren, lag der Anteil TUNEL-positiver Zellkerne zwischen 0,48% und 2,30% (Median 1,16%).

In allen 17 Arealen mit Differenzierungsgrad 2 oder 2-3 lag die TUNEL-Positivität zwischen 0,20% und 2,75% (Median 0,85%).

Von den 10 Arealen mit Grad 3, 3-4 oder 4 konnten aus gewebe- und färbetechnischen Gründen nur 9 in Auswertung eingehen, bei denen zwischen 0,16% und 4,15% TUNEL-markierte Zellkerne zu beobachten waren (Median 0,65%).

HCC und intratumorale Morphologie

In allen 11 eosinophil-trabekulären Arealen war eine TUNEL-Positivität zwischen 0,20% und 3,65% zu beobachten (Median 0,80%).

In 9 von 10 klarzellig-soliden Arealen (90%) wurden zwischen 0,10% und 2,64% TUNEL-positive Zellkerne nachgewiesen (Median 0,44%).

Von den 7 basophil-pseudoglandulären Arealen konnten aus gewebe- und färbetechnischen Gründen nur 6 Fälle bewertet werden. In allen 6 ausgewerteten

Arealen lag der Anteil TUNEL-positiver Zellkerne zwischen 0,08% und 2,00% (Median 0,72%).

HCC und Tumorgröße

Alle 13 HCC (100%), die kleiner oder gleich 2,0 cm waren, zeigten eine TUNEL-Positivität zwischen 0,16% und 3,11% (Median 1,48%), während sich in allen 37 HCC (100%), die größer als 2,0cm waren, TUNEL-Werte zwischen 0,30% und 6,67% ergaben (Median 0,86%).

In allen 39 HCC (100%), die kleiner oder gleich 5,0 cm waren, konnten zwischen 0,16% und 6,67% TUNEL-positive Zellen nachgewiesen werden (Median 0,86%), während alle 11 HCC (100%), die größer als 5,0cm waren, eine TUNEL-Positivität von 0,38% bis 3,11% beobachten ließen (Median 1,01).

In allen 41 Karzinomen, die kleiner oder gleich 6,0 cm waren, lag der Anteil TUNEL-positiver Zellen zwischen 0,16% und 6,67% (Median 0,86%). In allen 9 HCC, die größer als 6,0 cm waren, wurden TUNEL-Werte zwischen 0,38% und 3,11% bestimmt (Median 8,55%).

TUNEL	Tumorgröße (in cm)					
	HCC_{gesamt} n=52	≤ 2,00 n=13	2,01 – 4,00 n=20	4,01 – 6,00 n=8	6,01 – 8,00 n=5	> 8,00 n=4
Positive Fälle	52(100%)	13 (100%)	20 (100%)	8 (100%)	5 (100%)	4 (100%)
Median (in %)	0,86	1,48	0,79	0,91	0,61	1,81
Minimum (in %)	0,16	0,16	0,30	0,34	0,38	0,86
Maximum (in %)	6,67	3,11	3,23	6,67	3,11	2,93

Tabelle 29: TUNEL-Positivität in HCC in Abhängigkeit der Tumorgröße

5.6.2.2. Dysplastische Läsionen

In 8 von 9 untersuchten dysplastischen Knoten (88,9%) zeigte sich eine nukleäre TUNEL-Markierung in einem Anteil zwischen 0,10% und 3,40% (Median 0,88%). 2 von 3 LG-DN (66,7%) wiesen Werte von 0,96% und 1,25% auf (Median 0,96%), alle 9 HG-DN lagen im Bereich zwischen 0,10% und 3,40% (Median 0,64%).

5.6.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

Im Hepatozellulären Adenom waren die Zellkerne zu einem Anteil von 0,74% TUNEL-positiv.

In allen 3 Fällen von FNH konnten zwischen 0,29% und 0,53% TUNEL-positive Zellen festgestellt werden (Median 0,33%).

Von den 5 Regeneratknoten konnten aus gewebe- und färbetechnischen Gründen nur 4 Fälle gewertet werden; diese zeigten eine nukleäre Positivität für TUNEL zwischen 0,37% und 0,67% (Median 0,49%).

5.6.2.4. Referenzgewebe

Von den 61 Proben des nicht-neoplastischen Referenzgewebes konnte eine Probe aus gewebe- bzw. färbetechnischen Gründen nicht bewertet werden. In 58 von 60 (96,7%) untersuchten Proben bewegte sich die TUNEL-Positivität zwischen 0,07% und 3,47% (Median 0,42%).

46 von 47 gewerteten (ein Präparat nicht auswertbar) zirrhotisch umgebauten Lebern (97,9%) wiesen TUNEL-Werte zwischen 0,07% und 3,47% auf (Median 0,42), alle 12 nicht zirrhotisch umgebauten Lebern wiesen TUNEL-Werte zwischen 0,23 und 0,96 auf (Median 0,52).

Im HCA-angrenzenden Leberparenchym waren 0,41% der Zellen TUNEL-positiv.

In 49 von 51 Gewebeproben (96,1%) von HCC-angrenzender Leber waren zwischen 0,07% und 3,47% der Zellen positiv in der TUNEL-Methode (Median 0,40%).

Bei allen 6 Patienten mit einer kompletten Leberzirrhose ohne Malignom wurde eine TUNEL-Positivität zwischen 0,25% und 1,65% (Median 1,03%) nachgewiesen, wobei der Maximalwert bei der Patientin mit klinischerseits bekanntem M. Wilson beobachtet wurde. Bei dem Patienten mit Dysplasie ohne zirrhotischen Umbau fanden sich im nicht-dysplastischen Parenchym 0,40% TUNEL-positive Zellen.

Referenzgewebe und Ätiologie:

TUNEL	Referenz n=60	HCV n=22	HBV n=5	Alkohol n=5	Hämochromatose n=4	M. Wilson n=1
Positive Fälle	58 (96,7%)	22 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	2 (50%)	
Median (in %)	0,42	0,43	0,35	0,43	0,06	1,65
Minimum (in %)	0,00	0,09	0,23	0,07	0,00	
Maximum (in %)	3,47	1,29	1,79	0,76	1,79	

Tabelle 30: TUNEL-Expression in Referenzgewebe bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

5.6.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung

1. Entitäten

In den untersuchten HCC zeigten sich höchst signifikant mehr apoptotische Zellen in der TUNEL-Technik als im angrenzenden Leberparenchym ($p<0,001$; Wilcoxon-Test).

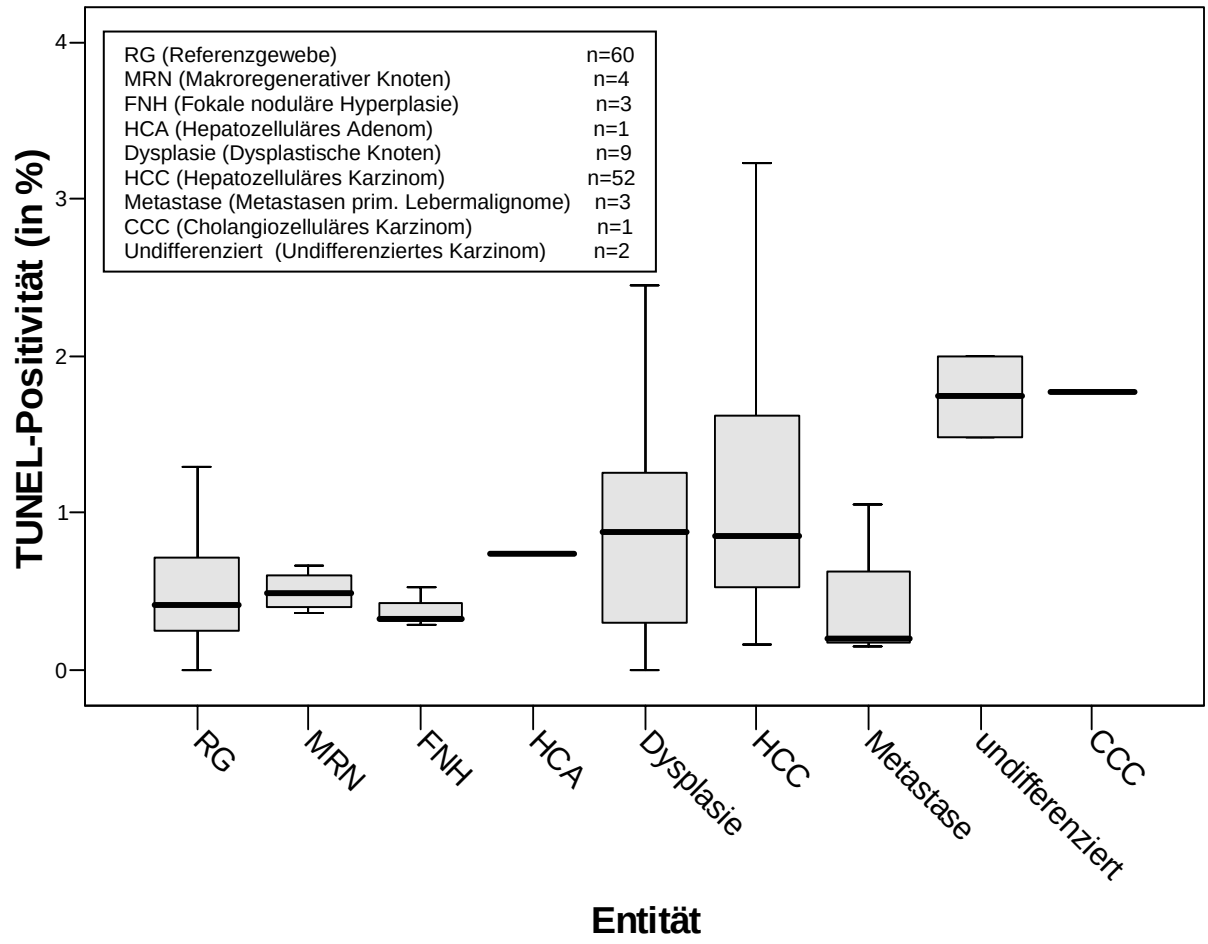
Je mehr TUNEL-Zellen im HCC nachweisbar waren, desto höher war auch der Anteil markierter Zellen im angrenzenden Lebergewebe ($p<0,01$; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho $r=0,41$).

Das HCA zeigte im Vergleich mit dem HCA-angrenzenden Parenchym eine relativ höhere Apoptoserate.

FNH und MRN waren in der TUNEL-Methode nicht vom Referenzgewebe zu unterscheiden.

Die dysplastischen Knoten wiesen im Hinblick auf den Median eher höhere TUNEL-Werte auf als das Referenzgewebe und waren vergleichbar mit der HCC-Gruppe.

Die 3 Metastasen hepatozellulärer Läsionen wiesen eine niedrige Apoptoserate im Vergleich mit den übrigen Entitäten auf.



Graphik 25: TUNEL-Positivtät der untersuchten Entitäten im Überblick: Darstellung in Boxplots. Ausreißer sind mit * markiert.

2. Ätiologie

Nicht-neoplastische Gewebeproben bei Hämochromatoseverdacht wiesen die niedrigsten TUNEL-Werte (Median 0,06%) auf im Vergleich mit den anderen Ätiologien. Eine hohe Apoptoserate zeigten die nicht-neoplastischen Hepatozyten im Fall von M. Wilson. Referenzgewebe bei HBV- und HCV- Infektion, sowie bei klinisch bekannter Alkoholanamnese hob sich nicht vom allgemeinen Referenzgewebe ab.

Im Vergleich der HCC der unterschiedlichen Ätiologien waren keine Unterschiede zu beobachten.

3. Differenzierungsgrade

Im Vergleich der Differenzierungsgrade der HCC-Areale ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und prozentualer TUNEL-Positivität.

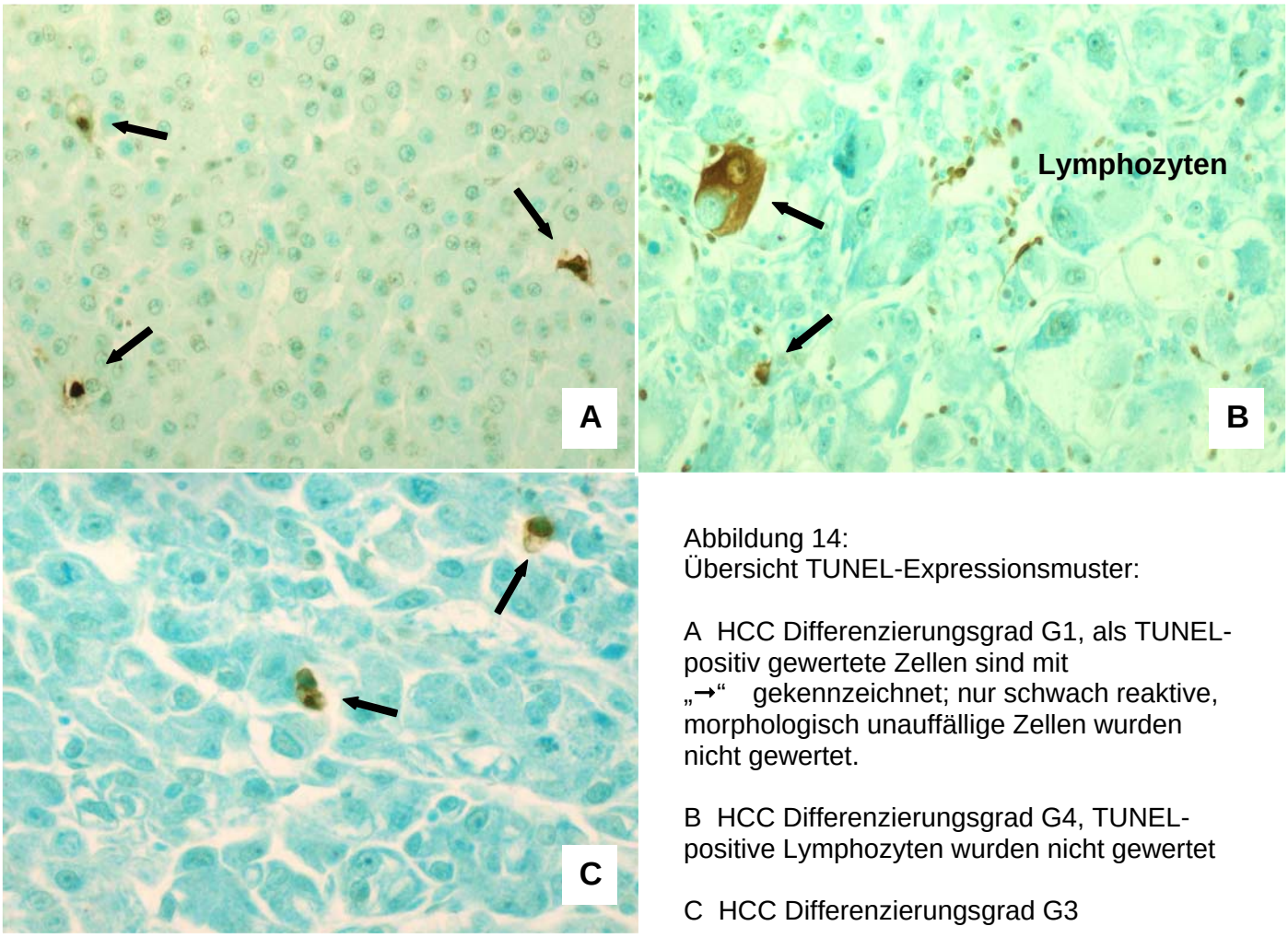


Abbildung 14:
Übersicht TUNEL-Expressionsmuster:

A HCC Differenzierungsgrad G1, als TUNEL-positiv gewertete Zellen sind mit „→“ gekennzeichnet; nur schwach reaktive, morphologisch unauffällige Zellen wurden nicht gewertet.

B HCC Differenzierungsgrad G4, TUNEL-positive Lymphozyten wurden nicht gewertet

C HCC Differenzierungsgrad G3

4. Morphologie

Die histomorphologisch verschiedenen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell wiesen klarzellig-solide Areale weniger TUNEL-positive Zellen auf als eosinophil-trabekuläre und basophil-pseudoglanduläre Areale.

Der CCC-Herd und die beiden undifferenzierten Karzinome wiesen gegenüber den HCC-Fällen wesentlich höhere TUNEL-Werte auf.

5. pT-Stadien

Im Vergleich der Karzinome unterschiedlicher pT-Stadien zeigten sich in der TUNEL-Methode keine signifikanten Unterschiede.

6. Tumorgröße

Bei der Betrachtung der Tumorgröße stellten sich in der TUNEL-Methode keine signifikanten Zusammenhänge oder Unterschiede heraus.

7. Leberzirrhose

Es wurden keine Unterschiede in der TUNEL-Methode festgestellt zwischen HCC mit oder ohne Leberzirrhose. Ebenso wenig zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen zirrhotischem und nicht-zirrhotischem Referenzgewebe.

8. Angrenzendes HCC

Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Referenzgewebe beobachtet hinsichtlich der Anwesenheit von HCC-Herden.

5.7. M30-Immunhistochemie

5.7.1. Färbeeigenschaften

Bei Positivität der M30-Immunhistochemie sind apoptotische Zellen markiert mit einem fein- bis grobgranulären zytoplasmatischen Färbemuster und membranöser Betonung. M30-positive Zellen waren disseminiert im Gewebe verteilt.

5.7.2. Quantifizierung der M30-Immunhistochemie

5.7.2.1. Hepatozelluläres Karzinom

Bei 36 von 52 (69,2%) untersuchten Hepatozellulären Karzinomen lag der maximal nachweisbare Anteil M30-positiver Zellen zwischen 0,01% und 1,38 % (Median 0,03%).

Das Fibrolamelläre Karzinom zeigte 0,01% M30-positive Zellen.

Im CCC des Kollisionstumors lag der Anteil M30-positiver Zellen bei 0,40%, während der M30-Wert im HCC bei 0,06% lag.

In den beiden untersuchten undifferenzierten Karzinomen waren maximale M30-Werte von 0,12% und 1,42% zu beobachten (Median 0,77%).

Die 3 Metastasen waren alle positiv in der M30-Immunhistochemie und zeigten Werte von 0,01% bis 0,70% (Median 0,04%).

HCC und Ätiologie:

9 von 17 HCC (52,9%) mit HCV-Infektion wiesen M30-Werte zwischen 0,01% und 1,38% auf (Median 0,01%).

3 von 4 HCC (75,0%) mit bekannter HBV-Infektion zeigten eine M30-Positivität zwischen 0,03% und 0,43% (Median 0,11%).

In 3 von 4 HCC (75,0%), in denen klinischerseits ein chronischer Alkoholabusus angegeben wurde, wurden in der M30-Immunhistochemie Werte zwischen 0,28% und 0,90% erreicht (Median 0,34%).

3 von 4 HCC (75,0%), denen laut klinischen Angaben eine Hämochromatose zugrunde lag, zeigten M30-Werte zwischen 0,01% und 0,10 % (Median 0,02 %).

Im undifferenzierten Karzinom mit gleichzeitiger HCV-und HBV-Infektion wurde in der M30-Immunhistochemie der Wert 1,42% ermittelt.

M30	HCC_{gesamt} n=52	HCV n=17	HBV n=4	Alkohol n=4	Hämochromatose n=4
Positive Fälle	36 (69,2%)	9 (52,9%)	3 (75,0%)	3 (75,0%)	3 (75,0%)
Median (in %)	0,03	0,01	0,11	0,34	0,02
Minimum (in %)	0,00	0	0	0	0
Maximum (in %)	1,38	1,38	0,43	0,90	0,10

Tabelle 31: M30-Expression in HCC bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

HCC und Differenzierungsgrade (modifiziert nach E&S):

2 von 5 Karzinomarealen (40,0%) mit Grad 1 oder 1-2 lagen mit ihren Anteilen M30-positiver Zellen bei 0,03% (Median 0%).

In 12 von 17 Arealen (70,6%), die als Grad 2 oder 2-3 eingestuft worden waren, lag die M30-Positivität im Bereich zwischen 0,01% und 0,20% (Median 0,01%).

In 5 von 10 Arealen (50,0%) mit Differenzierungsgrad 3, 3-4 oder 4 waren zwischen 0,01% und 0,30% der Zellen positiv in der M30-Immunhistochemie (Median 0,01%).

HCC und intratumorale Morphologie

In 7 von 11 eosinophil-trabekulären Arealen (63,6%) war eine M30-Positivität zwischen 0,01% und 0,30% zu beobachten (Median 0,03%).

In 2 klarzellig-soliden Arealen von 10 (20,0%) wurden 0,01% M30-positive Zellkerne nachgewiesen (Median 0,00%).

In 5 von 7 basophil-pseudoglandulären Arealen (71,4%) lag der Anteil M30-positiver Zellen zwischen 0,05% und 0,40% (Median 0,10%).

HCC und Tumorgröße

In 5 von 13 HCC (38,5%), die kleiner oder gleich 2,0cm waren, konnte eine M30-Positivität zwischen 0,01% und 0,06% erhoben werden (Median 0,00%). 30 von 37 HCC (81,1%), die größer als 2,0cm waren, zeigten zwischen 0,01% und 1,38% M30-positive Zellen (Median 0,06%).

27 von 39 HCC (69,2%) mit einem Durchmesser bis zu 5,0cm waren in einem Anteil zwischen 0,01% und 1,38% M30-positiv (Median 0,03%), während 8 von 11 HCC (72,7%), die größer als 5,0cm waren, zwischen 0,01% und 0,52% M30-positive Zellen zeigten (Median 0,16%).

M30	Tumorgröße (in cm)					
	HCC_{gesamt} n=52	≤ 2,00 n=13	2,01 – 4,00 n=20	4,01 – 6,00 n=8	6,01 – 8,00 n=5	> 8,00 n=4
Positive Fälle	36 (69,2%)	5 (38,5%)	17 (85%)	7 (87,5%)	2 (40%)	4 (100%)
Median (in %)	0,03	0,00	0,05	0,18	0,00	0,42
Minimum (in %)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16
Maximum (in %)	1,38	0,06	1,38	0,90	0,18	0,52

Tabelle 32: M30-Expression in HCC in Abhängigkeit der Tumorgröße

5.7.2.2. Dysplastische Läsionen

Nur in einem HG-DN von allen 9 dysplastischen Knoten (11,1%) zeigte sich eine zytoplasmatische Positivität von M30 in einem Anteil von 0,03% (Median 0%).

5.7.2.3. Benigne Tumoren, tumorartige und reparative Läsionen der Leber

Im Hepatozellulären Adenom waren keine M30-markierten Zellen nachzuweisen.

In einem von 3 Fällen von FNH (33,3%) wurden 0,01% positive Zellen der M30-Untersuchung beobachtet (Median 0%).

2 von 5 Regeneratknoten (40,0%) zeigten in der M30-Immunhistochemie eine zytoplasmatische Positivität zwischen 0,01% und 0,10% (Median 0%).

5.7.2.4. Referenzgewebe

In 11 von 61 nicht-neoplastischen Referenzgewebsproben (19,7%) bewegte sich der maximale Anteil M30-positiver Zellen zwischen 0,01% und 0,20% (Median 0,00%).

10 von 48 zirrhotisch umgebauten Lebern (20,8%) wiesen M30-Werte zwischen 0,01% und 0,20% auf (Median 0%), 2 von 12 nicht zirrhotisch umgebauten Lebern (16,7%) wiesen M30-Werte zwischen 0,01% und 0,07% auf (Median 0%).

Im HCA-angrenzenden Leberparenchym waren 0,07% der Zellen M30-positiv.

In 6 von 51 nicht-neoplastischen Referenzgewebsproben (11,8%) bei gleichzeitig vorliegendem HCC waren höchstens zwischen 0,01% und 0,10% der Zellen M30-positiv (Median 0%).

Bei 4 von 6 Patienten (66,7%) mit der Diagnose einer kompletten Leberzirrhose ohne Malignomnachweis, zeigte sich eine M30-Positivität zwischen 0,01% und 0,20% (Median 0,01%), wobei der Maximalwert bei der Patientin mit klinischerseits bekanntem M. Wilson beobachtet wurde. Bei dem Patienten mit Dysplasie ohne zirrhotischen Umbau fanden sich im nicht-dysplastischen Parenchym 0,01% M30-positive Zellen.

Referenzgewebe und Ätiologie:

M30	Referenz n=61	HCV n=23	HBV n=5	Alkohol n=5	Hämochromatose n=4	M. Wilson n=1
Positive Fälle	11 (19,7%)	6 (26,1%)	1 (20%)	2 (40%)	2 (50%)	
Median (in %)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,20
Minimum (in %)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Maximum (in %)	0,20	0,10	0,20	0,01	0,02	

Tabelle 33: M30-Expression in Referenzgewebe bei unterschiedlicher Ätiologie im Überblick

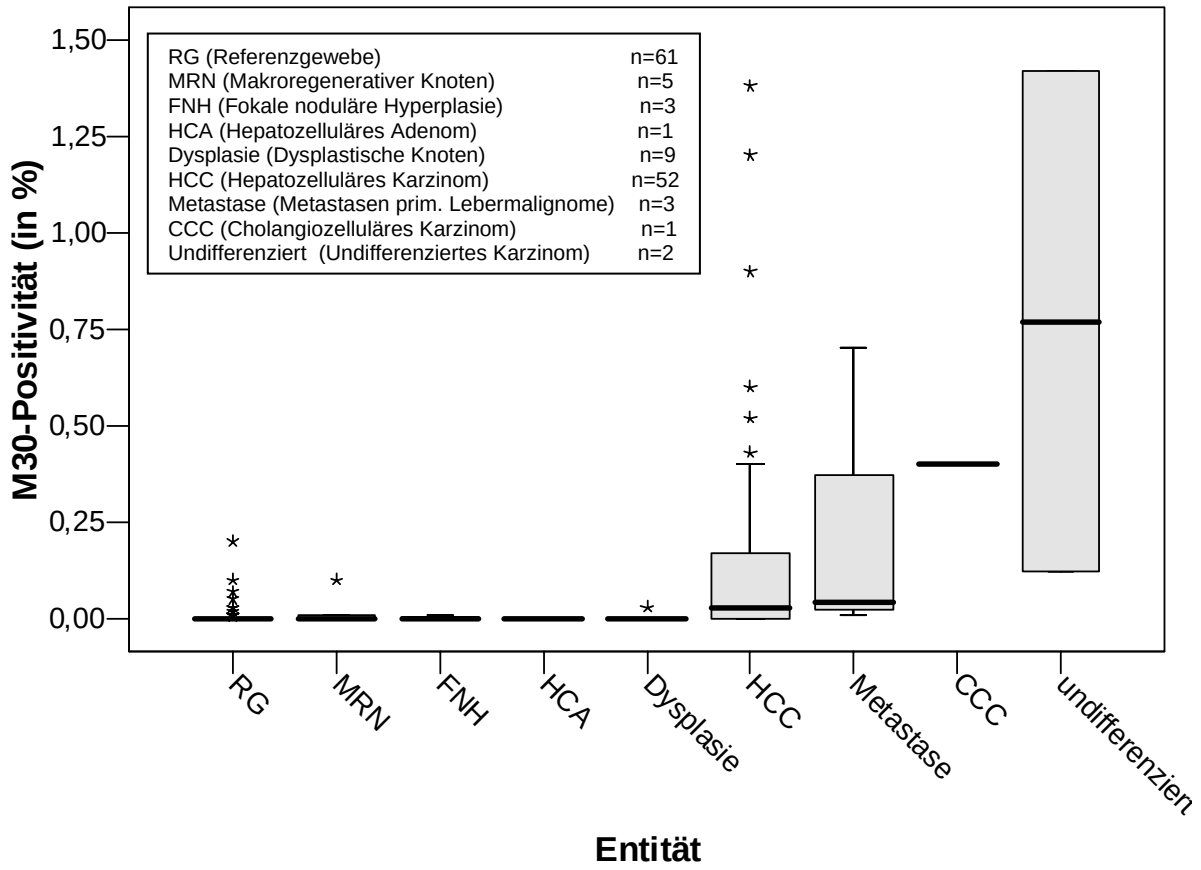
5.7.3. Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung nach statistischer Auswertung

1. Entitäten

Trotz der Unterschiede der immunhistochemischen Reaktionsergebnisse zwischen Karzinomen und angrenzendem Leberparenchym (Referenzgewebe) ergab sich keine statistische Signifikanz. Dies lässt sich durch die Häufung negativer Fälle in beiden Gruppen, die einen statistischen Vergleich nicht zulassen, erklären.

In der M30-Immunhistochemie zeigten HCA, FNH, MRN und dysplastische Knoten eher niedrigere Werte oder sind negativ, und waren damit tendenziell eher mit dem Referenzgewebe vergleichbar als mit der HCC-Gruppe.

In allen 3 Metastasen (Median 0,04) waren M30-positive Zellen nachweisbar und waren damit vergleichbar mit den malignen Primärneoplasien.



Graphik 26: M30-Expression der untersuchten Entitäten im Überblick: Darstellung in Boxplots. Ausreißer sind mit * markiert.

2. Ätiologie

Referenzgewebe im Fall von M. Wilson zeigte für nicht-neoplastisches Parenchym relativ viele M30-positive Zellen (0,20%). Referenzgewebe der übrigen Ätiologien wiesen in der M30-Immunhistochemie keine Unterschiede auf.

HCC mit klinischerseits bekannter HCV-Infektion zeigten signifikant niedrigere Apoptosewerte in der M30-Immunhistochemie als Karzinome ohne diese Infektion ($p<0,05$; MWU-Test). Im Vergleich zwischen den Gruppen unterschiedlicher Ätiologie wiesen die äthyltoxisch-bedingten HCC (Median 0,34%) die höchsten M30-Werte auf, auch im Vergleich mit der HCC-Gesamtgruppe (Median 0,03%), gefolgt von den HBV-assoziierten HCC (Median 0,11%), den 4 HCC bei Hämochromatoseverdacht (Median 0,02%) und den HCV-assoziierten HCC (Median 0,01%).

3. Differenzierungsgrade

Unabhängig vom Differenzierungsgrad wurden in den Karzinomarealen signifikant mehr M30-positive Zellen diagnostiziert als in dysplastischen Knoten ($p<0,05$; MWU-Test).

Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht.

Es stellte sich keine Korrelation zwischen Graduierungsstufen und Höhe der M30-Positivität dar.

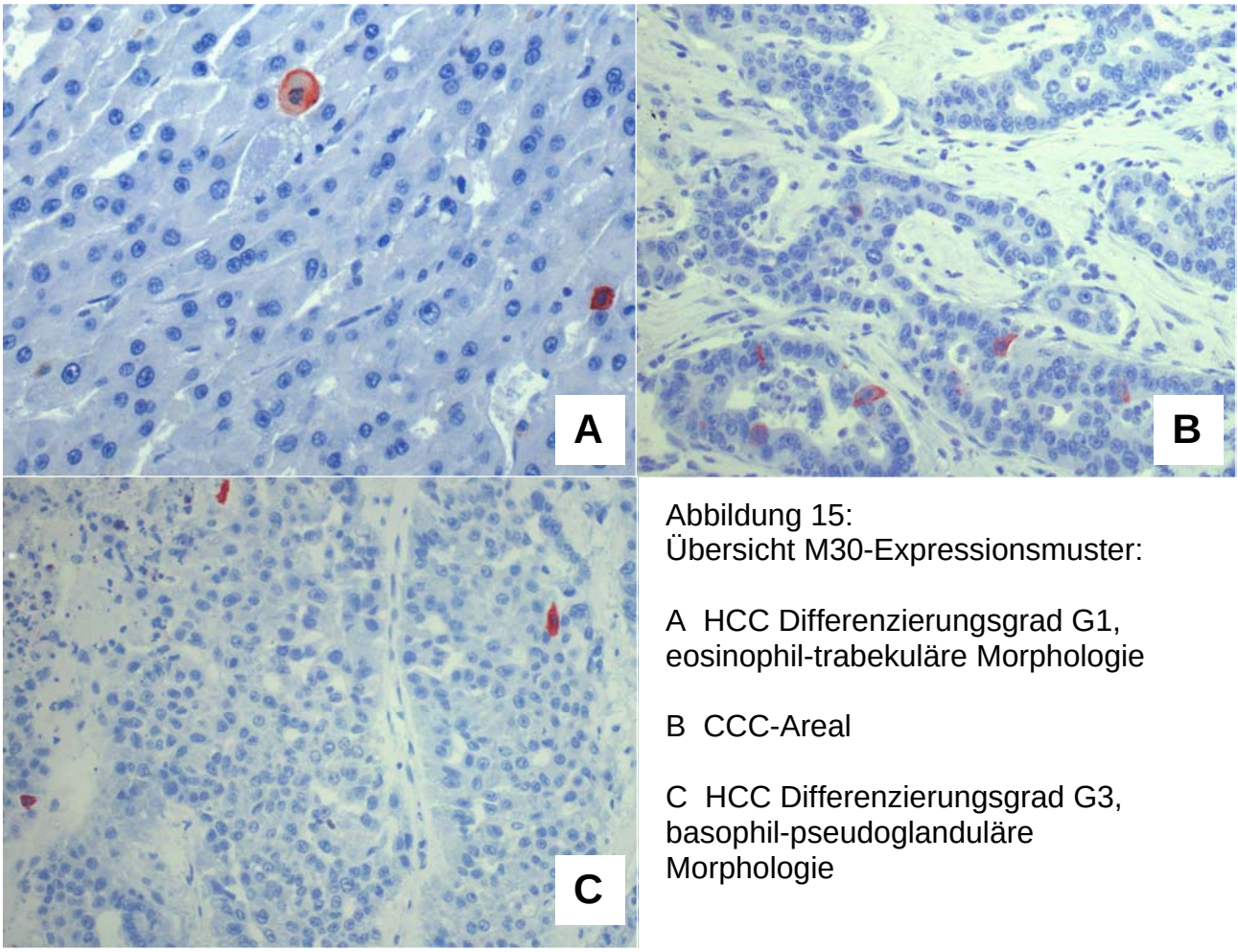


Abbildung 15:
Übersicht M30-Expressionsmuster:

A HCC Differenzierungsgrad G1, eosinophil-trabekuläre Morphologie

B CCC-Areal

C HCC Differenzierungsgrad G3, basophil-pseudoglanduläre Morphologie

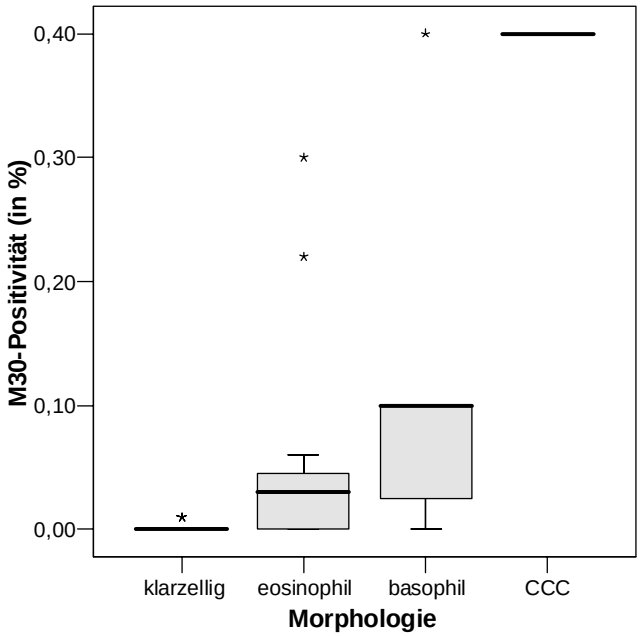
4. Morphologie

Im Vergleich der histomorphologisch unterschiedlichen Gruppen wurden folgende signifikante Unterschiede im MWU-Test erhoben:

Klarzellig-solide Areale zeigten signifikant geringere Apoptoseraten in der M30-Immunhistochemie als basophil-pseudoglanduläre ($p<0,05$) und eosinophil-trabekuläre Areale ($p<0,05$).

Der CCC-Herd zeigte mehr M30-positive Zellen als die unterschiedlichen morphologischen Gruppen im HCC.

Die beiden Fälle undifferenzierter Karzinome differierten stark voneinander und waren deshalb nicht als eine Gruppe in das Gesamtbild zu integrieren.



Graphik 27:

M30-Expression in HCC mit unterschiedlicher Morphologie und im CCC

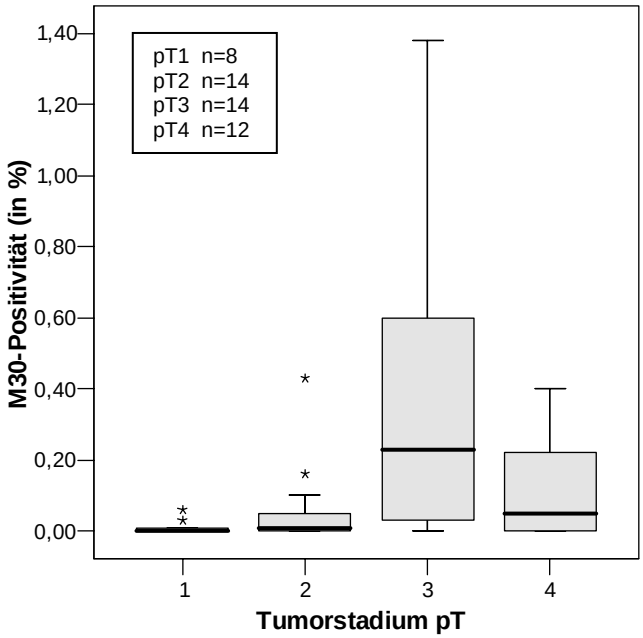
(Ausreißer sind mit * gekennzeichnet)

Basophil vs. Klarzellig p<0,05
Eosinophil vs. Klarzellig p<0,05

Klarzellig-solide HCC-Areale	n=10
Eosinophil-trabekuläre HCC-Areale	n=11
Basophil-pseudoglanduläre HCC-Areale	n=7
CCC-Areal	n=1

5. pT-Stadien

Im Vergleich der Tumorstadien pT1, pT2 und pT3 zeigte sich ein signifikant mit dem pT-Stadium zunehmend höherer Anteil M30-positiver Zellen (p<0,01; KW-Test).



Graphik 28:

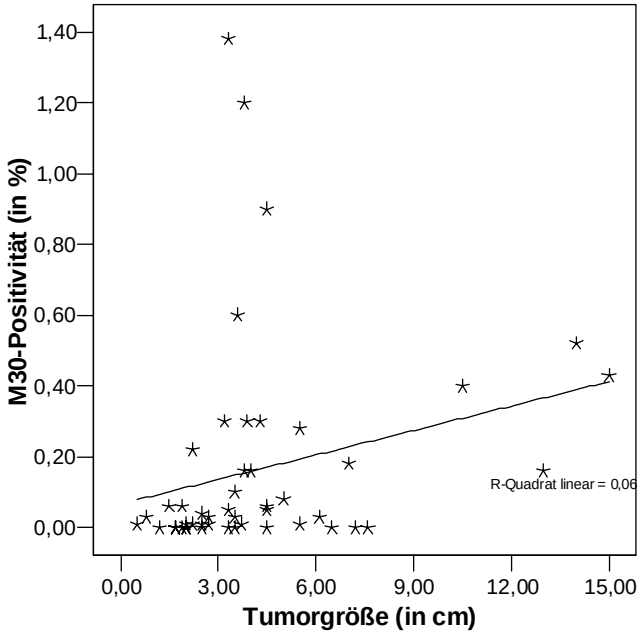
M30-Expression in HCC unterschiedlicher pT-Stadien. Darstellung in Boxplots
(Ausreißer sind mit * markiert)

Signifikante Zunahme der Expression mit ansteigendem Tumorstadium.

pT4 fiel dabei aus der Reihe, vermutlich aufgrund der Heterogenität der Gruppenzuordnung (Befall beider LL oder Gefäßinvasion).

6. Tumorgröße

Die M30-Immunhistochemie korrelierte gering in gleichläufiger Richtung mit der Tumorgröße (p<0,01; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho r=0,42).



Graphik 29:

M30-Expression in HCC, Darstellung im Streudiagramm mit Anpassungslinie

Zunahme der M30-Expression mit zunehmender Tumorgröße.

Neben dieser positiven Korrelation zeigten sich in der M30-Immunhistochemie im Vergleich der HCC unterschiedlicher Tumorgrößen an verschiedenen Grenzwerten folgende signifikanten Unterschiede im MWU-Test:

1. Gruppe	2. Gruppe	Signifikanzniveau	Expressionsvergleich 1. Gruppe (1) vs. 2. Gruppe (2)
HCC ≤ 2,00 cm	HCC > 2,00 cm	** p<0,01	1 < 2
HCC ≤ 3,00 cm	HCC > 3,00 cm	** p<0,01	1 < 2
HCC ≤ 8,00 cm	HCC > 8,00 cm	* p<0,05	1 < 2

Tabelle 34: Signifikante Unterschiede in der M30-Expression bei unterschiedlicher Tumorgröße

Bei Betrachtung der Tumorgröße zeigten damit Karzinome mit einer Größe von mehr als 2,00cm hoch signifikant höhere M30-Werte als Karzinome, die kleiner als 2,00cm waren (p<0,01; MWU-Test)

7. Leberzirrhose

Es wurden keine Unterschiede in der M30-Immunhistochemie festgestellt zwischen HCC mit oder ohne Leberzirrhose. Gleiches gilt für Referenzgewebe mit oder ohne Leberzirrhose.

8. Angrenzendes HCC

Es zeigte sich kein Unterschied innerhalb der Referenzgewebsproben im Vergleich von Proben mit angrenzendem HCC und Proben ohne Malignomnachweis der Leber.

5.8. Bcl-2-Immunhistochemie

5.8.1. Färbeeigenschaften

Bei Positivität in der immunhistochemischen bcl-2-Darstellung zeigt sich eine zytoplasmatische Färbung mit leicht granulärem Muster bei Aussparung des Zellkerns. Ein Fall wurde schon bei nur vereinzelt reaktiven Hepatozyten als positiv bezeichnet.

In einem hohen Anteil bcl-2-positiv waren Lymphozyten im Gewebe, die Färbeintensität war häufig von sehr starker Ausprägung.

Auch bei den kleinen Gallengängen und neoduktulären Gallengangsproliferaten wurde häufig eine Positivität für bcl-2 beobachtet, die aber meist nur von mittlerer bis schwacher Färbeintensität war.

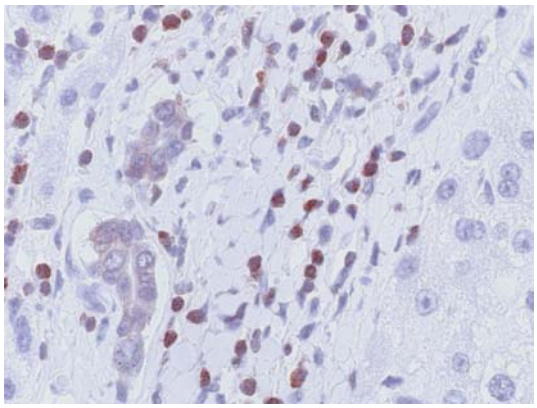


Abbildung 16:
bcl-2-Expression von Lymphozyten und kleinen Gallengängen in FNH

5.8.2. Quantifizierung der bcl-2-Immunhistochemie

In 4 von 52 HCC (7,41%) konnten bcl-2-positive Tumorzellen nachgewiesen werden. Der Anteil positiver atypischer Zellen im HCC belief sich dabei jedoch stets weit unter 1,0%, z.T. waren nur einzelne Zellen positiv. Eine genaue Quantifizierung wurde deshalb nicht durchgeführt.

Weder in den undifferenzierten Karzinomen noch im Kollisionstumors konnten bcl-2-positive Zellen verifiziert werden. In 2 (3,28%) der 61 nicht-neoplastischen Referenzgewebsproben konnten einzelne bcl-2-positive Zellen nachgewiesen werden, dabei war in einem Fall gleichzeitig ein HCC vorhanden, in dem sich aber keine bcl-2-positiven Zellen fanden. Beide Lebern waren zirrhotisch umgebaut.

Keine bcl-2-positiven Zellen zeigten sich in den Metastasen, in den dysplastischen Knoten, in MRN, im Hepatozellulären Adenom und in den FNH-Herden.

5.9. Korrelationen der immunhistochemischen Apoptose- und Proliferationsmarker untereinander

5.9.1. HCC

Verglich man in den 52 HCC die untersuchten Proteine untereinander in der jeweiligen Ausprägung und Expression, so zeigten sich positive Korrelationen zwischen p53 und dem Proliferationmarker Ki-67 ($p<0,05$), bax und M30 ($p<0,05$), Ki-67 und bax ($p<0,05$), Fas und FasL ($p<0,05$). Invers korrelierten der Apoptosevermittler FasL mit dem Apoptosemarker TUNEL ($p<0,01$).

Bcl-2 konnte bei 48 negativen Fällen und nur vereinzelter Expression in den 4 positiven HCC nicht auf eine Korrelation mit den anderen Proteinexpressionen untersucht werden.

1. Antikörper	2. Antikörper	Art der Korrelation & Korrelationskoeffizient r		Signifikanzniveau (Spearman-Rho)	
p53	Ki-67	+	r= 0,31	*	p<0,05
Ki-67	Bax	+	r= 0,48	***	p<0,001
TUNEL	FasL	-	r=-0,30	*	p<0,05
M30	Bax	+	r= 0,31	*	p<0,05
Fas	FasL	+	r= 0,31	*	p<0,05

Tabelle 35: Korrelationen des Antigennachweises im HCC

5.9.2. Referenzgewebe

In den 61 untersuchten nicht-neoplastischen Referenzgewebsproben waren positive Korrelationen zwischen p53 und M30 ($p<0,05$), sowie zwischen FasL und dem Proliferationmarker Ki67 ($p<0,01$) zu beobachten. Der Apoptoserezeptor Fas und der Apoptosemarker TUNEL korrelierten invers ($p<0,05$).

5.9.3. Vergleich der Fas- und FasL-Expression in tabellarischer Übersicht

		Fas (Median; Scorewert)	FasL (Median; Scorewert)
Hepatozelluläres Karzinom, n=52		2,00	6,50
Fibrolamelläres Karzinom, n=1		1,00 (p<0,001)	10,0 (p<0,001)
Referenzgewebe, n=61		10,0	8,00
Makroregenerative Knoten, n=5		9,00	9,00
Dysplastische Knoten, n=9		2,00 (p<0,05)	9,00
Hepatozelluläres Adenom, n=1		1,33	9,30
Metastasen, n=3		1,00	7,00
Differenzierungsgrad Nach E&S	Grad 1/1-2	4,00	9,00 (Tendenz)
	Grad 2/2-3	4,00 (p<0,01)	7,00 (n.s.)
	Grad 3/3-4/4	0,00	4,00
Morphologie	Klarzellig-solide	3,00	8,00
	Eosinophil-trabekulär	2,00 (n.s.)	9,00 (n.s.)
	Basophil-pseudogl.	2,00	4,00
Tumorgröße	≤ 6,0 cm	2,25 (p<0,01)	6,62 (n.s.)
	> 6,0 cm	0,00	3,50
Leberzirrhose	Ja	2,00 (HCC) (p<0,01)	6,50 (HCC) (n.s.)
	Nein	0,75 (HCC)	6,50 (HCC)
	Ja	10,0 (RG) (p<0,01)	8,60 (RG)
	Nein	9,00 (RG)	7,75 (RG)

Tabelle 36: Gegenüberstellung der Fas- und FasL-Expression mit Darstellung signifikanter Unterschiede (n.s. = nicht signifikant)

6. Diskussion

6.1. Apoptose und Proliferation im Hepatozellulären Karzinom (HCC)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Proliferations- und Apoptoseverhalten mittels Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung in HCC in detaillierter Weise unter Berücksichtigung individueller Tumorcharakteristika zu untersuchen, sowie interindividuell und mit anderen lebereigenen Neoplasien, neoplastischen Vorstufen, reparativen Läsionen und Referenzgewebe zu vergleichen.

In unseren immunhistochemischen Untersuchungen mit Ki-67 zeigten die HCC eine höchst signifikant höhere *Proliferationsrate* als nicht-neoplastisches Referenzgewebe. Dieser Unterschied zwischen neoplastischem und nicht-neoplastischem Lebergewebe wurde bereits in früheren Publikationen erwähnt (42; 95). In Untersuchungen zur Proliferationsaktivität im humanen HCC in Abhängigkeit von der krankheitsfreien Überlebenszeit der Patienten fanden Ito et al. (56) in Fällen kürzerer Überlebenszeit signifikant höhere Ki-67-Raten, so dass Ki-67 in der Diagnostik des HCC möglicherweise als prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben der Patienten einzusetzen ist. Beispielsweise bei Prostata- (1) und Mammakarzinomen (79) ist Ki-67 als unabhängiger und signifikanter prognostischer Faktor bekannt.

Gleichzeitig ließ sich in unserem Kollektiv eine höchst signifikant höhere *Apoptoserate* in der TUNEL-Hybridisierung, sowie auch für M30 (hier allerdings nicht statistisch zulässig vergleichbar) in HCC als in nicht-neoplastischem Referenzgewebe nachweisen.

In gesundem Gewebe ist der Mechanismus der Apoptose ein effizienter protektiver Weg, geschädigte Zellen zu eliminieren und an weiterer Proliferation zu hindern. Es ist eine allgemein vertretene Hypothese, dass die Störung der Apoptose die Kanzerogenese bzw. maligne Transformation begünstigen oder auch Ausdruck derselben sein kann. Zum einen können dadurch genetisch alterierte Zellen nicht eliminiert werden und weitere Aberrationen mit dem Risiko der malignen Entartung akkumulieren (81), zum anderen wird das physiologische Gleichgewicht (Homöostase) zwischen Zellwachstum und –untergang zugunsten des überschweifenden, autonomen Wachstums verschoben.

Allerdings war in unseren Untersuchungen keine direkte Korrelation von Apoptose- und Proliferationsrate in den einzelnen Karzinomen erkennbar, was so auch in der

Literatur beschrieben wird (110; 130; 135). Andere Autoren hingegen fanden eine Korrelation, ermittelten jedoch z.T. die Apoptoserate nach zytomorphologischen Kriterien in H.E.-Präparaten. Derartige Befunde sind aber umstritten, weil insbesondere frühe Apoptosestadien damit nicht erfasst werden (42; 56;128).

Die tumorbiologische Bedeutung der parallel erhöhten Proliferations- und Apoptoserate ist daher weder durch die Ergebnisse weniger anderer Studien noch durch die eigenen Untersuchungen befriedigend erklärt. Es ist lediglich festzuhalten, dass diese Befunde Indiz für einen erhöhten Zellumsatz in den Leberzellkarzinomen sind und dafür, dass der Prozess des aktiven Zelltodes auch im Leberzellkarzinom weiterbesteht und ausgelöst werden kann. Dies eröffnet möglicherweise nach weitergehender Aufklärung der dabei wirksamen auslösenden Faktoren und der molekularen Mechanismen neue therapeutische Ansatzpunkte. Prinzipiell kommen für die Induktion der Apoptose die folgenden Möglichkeiten in Betracht:

Im HCC kann Apoptose einerseits *intrinsisch* ausgelöst werden durch beispielsweise noch funktionstüchtige aktivierte Apoptoseregulatoren der bcl-2-Familie (97; 98). So war bax-Protein in unseren Untersuchungen höchst signifikant häufiger im HCC anzutreffen als im nicht-neoplastischen Referenzgewebe. Dieser Regulationsmechanismus kann damit in unserem Kollektiv einen wichtigen Beitrag zur erhöhten Apoptoserate geleistet haben, worauf auch die signifikante positive Korrelation zwischen bax und dem Apoptoseeffektor M30 hindeutet.

Apoptose im HCC kann aber auch durch *extrinsische* Faktoren induziert werden. Beispielsweise können durch eine defizitäre Neoangiogenese (Mikrovaskularisation) Karzinomzellen durch Hypoxie und andere metabolische Störungen geschädigt werden. Dadurch kommt es nicht nur zur Nekrose, sondern auch zur Induktion der Apoptose (81; 111). Eine weitere extrinsische Apoptoseinduktion in Tumorzellen erfolgt über aktivierte T-Lymphozyten.

6.2. Fas und FasL: Bedeutung im HCC – „Immunevasion“

Physiologisch ist FasL im nicht-neoplastischen Lebergewebe eines der Haupteffektormoleküle der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Bedeutung kommt diesen CTL in der Elimination von Fas-exprimierenden Hepatozyten zu. Durch FasL-

Expression wird in Fas-exprimierenden Hepatozyten die Apoptose induziert und damit ein Überleben möglicherweise genetisch alterierter Hepatozyten verhindert.

In zahlreichen Arbeiten wurde dieses Apoptosesystem im alterierten Lebergewebe und in der Karzinogenese bereits untersucht, deren Ergebnisse die besondere Bedeutung des Fas-/Fas-Ligand (FasL)-Systems als relevanten Signalweg der Apoptose für die Leber belegen.

Auffallend im Vergleich verschiedener Publikationen ist das unterschiedlich beschriebene immunhistochemische Reaktionsmuster von Fas. Manche Autoren berichteten von rein membranöser Anfärbung Fas-exprimierender Zellen (41), andere beschrieben eine vorwiegend zytoplasmatische Fas-Reaktion mit nur teilweise vorkommender membranöser Färbung (31; 41; 43; 57). Die Ursache für dieses stark variierende Expressionsverhalten in den unterschiedlichen Studien dürfte in den verwendeten Antikörpern mit unterschiedlichen Zielepitopen zu suchen sein. In unserer Arbeit zeigte sich unter Verwendung des monoklonalen Fas-Antikörpers Dx2, der in keiner der genannten Arbeiten verwendet wurde, eine fast ausschließlich membranöse Farbreaktion mit nur vereinzelt zytoplasmatischer Positivität.

Topographisch beobachteten wir im nicht-tumorösen Referenzgewebe eine läppchenzentrale Intensitätsabschwächung der Fas-Reaktion und stärkere Färbeintensität in Hepatozyten der periportalen Grenzlamelle insbesondere bei lymphozytärer Infiltration der Portalfelder, wie bereits früher beschrieben (31; 43).

Im Vergleich von zirrhotisch umgebautem Leberparenchym mit nicht-zirrhotischem Gewebe konnten wir eine hoch signifikant höhere Fas-Expression in den Fällen mit Leberzirrhose und variablem lymphozytärem Infiltrat in den Bindegewebssepten beobachten.

Dabei konnte in unserem Referenzgewebe keine signifikante Differenz der hohen Fas-Werte bei unterschiedlicher Grunderkrankung bzw. Noxe (HBV, HCV, C2, Hämochromatose, M. Wilson) festgestellt werden.

Die zirrhotische Umstrukturierung ist Folge eines Leberzelluntergangs mit sekundärer uncharakteristischer Entzündungsreaktion oder einer primär schädigenden Entzündung unterschiedlicher immunologischer Genese, die für eine erhöhte Fas-Expression verantwortlich gemacht werden kann. Galle et al. (33) sprechen neben niedriger Fas-Expression in normaler humaner Leber von

Hochregulierung des Fas-Rezeptorstatus in Lebern mit chronischer HBV-Infektion oder akutem Leberversagen. Roskams et al. (99) sehen die Ursache einer erhöhten Fas-Expression allgemeiner im Zusammenhang mit inflammatorischen Ereignissen in der Leber.

Hepatozyten sind nicht nur Zielzellen für Apoptoseinduktion, sie sind selbst in der Lage, Apoptose auszulösen (32). Über eine autokrine oder parakrine Sekretion von löslichem sFasL durch Hepatozyten selbst kann in denselben oder in benachbarten Fas-exprimierenden Zellen Apoptose induziert werden. Die Koexpression von Fas und FasL mit der Möglichkeit autokrin induzierter Apoptose wird in Fällen von toxischem Leberschaden, beispielsweise durch Alkoholabusus oder durch übermäßige Kupferspeicherung im Rahmen eines Morbus Wilson diskutiert (33; 84). Zusätzlich zeigte sich in unserem Kollektiv eine Zunahme der Fas-Färbeintensität nicht-neoplastischen Lebergewebes direkt angrenzend an die Invasionsfront von HCC, im Konsens mit früheren Beobachtungen (31). Roskams et al. (99) berichteten von einer hochgradigen Koexpression von Fas und FasL in diesen Grenzarealen. Der Theorie des „Brudermordes“ folgend könnte dieses Phänomen für eine Apoptoseinduktion des Parenchyms durch die angrenzenden Tumorzellen sprechen und die Infiltration der Invasionsfront ins umliegende Gewebe begünstigen.

Dennoch können im Referenzgewebe nicht alle Fas-exprimierenden Hepatozyten apoptotisch werden, denn die von uns nachgewiesene hohe Fas-Expression bei gleichzeitig hoher FasL-Expression steht in keiner Korrelation zur effektiven niedrigen Apoptoserate (M30 und TUNEL). Es existieren zahlreiche Mechanismen auf molekularer Ebene, die in den Fas/FasL-Signalweg inhibitorisch eingreifen. So könnten lösliches sFas FasL vor Bindung an den zellgebundenen Rezeptor abfangen, um Apoptose zu verhindern (16; 83) und inhibierende Zellproteine, wie FAP-1 (Fas-assoziierte Phosphatase) und bcl-2, die Fas-Signalkaskade blockieren (72; 109).

In unserem HCC-Kollektiv zeigte sich als Hinweis auf ein Unterlaufen des potenten Fas-/FasL-Signalwegs in der Apoptoseinduktion allgemein eine höchst signifikant niedrigere Fas- und FasL-Expression als in nicht-neoplastischen Referenzgewebsproben, wie auch in anderen Arbeiten beschrieben (31; 41; 65).

Dabei war im intertumoralen Vergleich in unserer Arbeit eine große Schwankungsbreite in der Fas-Expression zu beobachten – von Fas-positiver

Reaktion nahezu aller Zellen des Karzinomherdes bis hin zu Anfärbung nur einzelner Zellen.

Durch den Verlust des Fas-Rezeptors könnten sich Karzinomzellen auf effektive Weise der Immunüberwachung entziehen, indem zytotoxische T-Lymphozyten keinen Angriffspunkt für eine FasL-vermittelte Apoptose finden. Auch der Mechanismus des sog. Brudermordes durch FasL-exprimierende Hepatozyten könnte nicht greifen, wodurch sich eventuell ein Selektionsvorteil mit prognostischer Relevanz ergeben könnte (32; 127). Studien, die die Überlebensprognose in Abhängigkeit des Fas-Status im HCC untersuchten, wiesen bei Fas-Verlust im HCC eine signifikant verkürzte krankheitsfreie Überlebenszeit auf (55; 57; 127).

Trotz erniedrigter Expression des Apoptoserezeptors Fas war im HCC die Apoptoserate gegenüber dem Referenzgewebe höchst signifikant erhöht (TUNEL-Methode). Manche Autoren berichten von einer Korrelation zwischen Apoptose und Fas-Expression: Bei Fas-Verlust beobachtete Nagao (83) eine signifikant niedrigere Apoptoserate (TUNEL), in Fas-reichen HCC-Arealen fand Higaki (41) eine signifikant höhere Apoptoserate (morphologisch im H.E.-Präparat). Eine derartige Korrelation zwischen Fas-Expression und Apoptoserate (TUNEL/M30) konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Auch andere Autoren konnten diese Korrelation nicht nachweisen (56; 57; 65). Diese fehlende Korrelation ist möglicherweise darin begründet, dass der Fas-Rezeptor durch abnorme Transkription eventuell nicht funktionsfähig ist, das zur Signalinitiierung notwendige FasL fehlt oder eine Inhibition innerhalb des Fas-Signalweges stattfindet (57). Außerdem existieren neben dem Fas-/FasL-System zahlreiche weitere Signalwege, wie die bcl-2-Familie mit dem proapoptotischen Protein bax, und Mechanismen, die in die Apoptoseinitiierung und -regulation involviert sind.

Zusammenfassend scheint dem Fas-/FasL-System für die immunhistochemisch fassbare Regulation der Apoptose in verschiedenen Lebererkrankungen und im HCC eine wichtige Bedeutung zuzukommen.

6.3. Rolle des p53-Proteins

Die Inaktivierung der Tumorsuppressor-Aktivität von p53 durch Genmutation wird als gängiges Ereignis im Tumorprogress auch des humanen HCC angesehen. Greenblatt berichtete von p53-Mutationen in 25-50% der HCC-Fälle je nach geographischer Verteilung (39).

Welche Rolle jedoch eine p53-Mutation für Initiation, Kanzerogenese und Tumorprogress beim HCC hat, ob ihr kausale Bedeutung zukommt oder sie als Phänomen maligner Transformation zu werten ist, ist unklar. Ebensowenig ist der Zusammenhang einer p53-Genmutation und der immunhistochemischen Nachweisbarkeit des Proteins bzw. die tumorbiologische Relevanz des Proteinnachweises bekannt. Es stellt sich somit die Frage, wie p53-Positivität in HCC *biologisch* oder *technisch* begründet zu interpretieren ist.

Als allgemein gesichert gilt, dass unter physiologischen Bedingungen in der Zelle p53 unterhalb der Nachweisgrenze bleibt (74; 130). Eine Positivität der p53-Immunhistochemie kann unterschiedlich begründet sein: 1. eine quantitative Vermehrung der Proteinbiosynthese durch Aktivierung des p53-Tumorsuppressor-Gens bei allgemeinem Zellstress (39; 74; 75), 2. eine Komplexbindung von p53 durch intrazelluläre Regulatorproteine, wie z.B. mdm-2 (80) oder 3. virale Proteine (39; 75) mit verlängerter oder vermehrter Nachweisbarkeit von p53, oder 4. eine Mutation des p53-Gens, die zu einem stabilen Genprodukt führen kann ohne Aussagemöglichkeit bezüglich der Funktionstüchtigkeit (8; 45; 75).

Die meisten kommerziellen Antikörper für den p53-Nachweis erkennen sowohl den Wildtyp als auch das mutierte Protein p53, so auch der in unserer Arbeit verwendete Antikörper DO-7. Dabei sind verschiedene p53-Antikörper aufgrund unterschiedlicher Sensitivitäten und Spezifitäten im Ergebnis kaum miteinander vergleichbar (8).

Während in der vorliegenden Arbeit nur in Einzelfällen nicht-neoplastischer Leber ein geringgradiger p53-Nachweis zu beobachten war, wird in der Literatur häufiger von p53-Positivität in nicht-neoplastischem Parenchym berichtet. Livni et al. (75) wiesen p53 in zirrhotisch umgebautem Lebergewebe nach, allerdings unter der Verwendung des Bp 53.12-Antikörpers.

In unseren Untersuchungen zeigten 59,6% der HCC eine z.T. sehr ausgeprägte p53-Positivität gegenüber einem nur sehr spärlichen p53-Nachweis im nicht-

neoplastischen Referenzgewebe, eine Signifikanzprüfung war allerdings aufgrund der gehäuften Negativität der Referenzgruppe statistisch nicht zulässig.

In verschiedenen Arbeiten, darunter auch Untersuchungen an HCC, wird über eine Korrelation mit hoher Sensitivität zwischen der Positivität der p53-Immunhistochemie, insbesondere des DO-7-Antikörpers, und dem Vorhandensein von Mutationen im p53-Gen berichtet (8; 45), so dass eine mit DO-7-nachgewiesene p53-Positivität für eine Gen-Mutation zu sprechen scheint.

Im Falle einer p53-Genmutation könnte somit ein funktionsloses oder –gestörtes p53-Protein resultieren, das die immunhistochemische Nachweisgrenze bei Verwendung des DO-7-Antikörpers überschreitet, ohne eine erhöhte Apoptoserate zu induzieren. Die fehlende positive Korrelation von Apoptoserate und p53-Immunhistochemie in unserem HCC-Kollektiv könnte dahingehend interpretiert werden. Andere Arbeiten kommen zu demselben (110; 130), aber auch zu anderen Ergebnissen (135).

In unseren Untersuchungen korrelierte die Überexpression von p53 in den HCC mit einer gesteigerten Proliferation. Auch in anderen immunhistochemischen Untersuchungen (44; 59; 110; 130) stellte sich dieser Zusammenhang dar; ein molekularbiologischer p53-Mutationsnachweis erfolgte jedoch auch in diesen Arbeiten nicht, so dass unklar bleibt, ob der p53-Überexpression in HCC eine gesteigerte Mutationsrate über eine erhöhte Proliferationsrate zugrunde liegt.

Ein möglicher Zusammenhang besteht zwischen p53 und dem Fas-/FasL-System, da das Tumorsuppressorprotein p53 ein Transkriptionsfaktor von Fas ist (89) und damit auch über diesen Signalweg eine Apoptoseinduktion bewirken kann. Auf diesem Weg kommt dem Fas-System klinische Bedeutung in der Zytostatikatherapie zu, indem Zytostatika, wie Bleomycin und Doxorubicin über Transkriptionsstimulation durch in der Zelle vorhandenes wt-p53 zu einer Fas-Hochregulierung und Fas-Apoptoseinitiierung führen. Im Fall von mutiertem p53 gelingt diese Transkriptionsregulation nicht mehr (32). In diesem Zusammenhang fanden sich in Untersuchungen europäischer HCC bei Aberrationen des p53-Gens signifikant mehr Fälle von Fas-Verlust als bei erhaltenem wt-p53 (127). Wir konnten in unseren Untersuchungen weder einen Zusammenhang zwischen erhöhter p53-Expression und Fas-Verlust, noch eine *negative* Korrelation zwischen p53-Expression und Apoptose feststellen.

Kritisch und zusammenfassend ist festzustellen, dass auch durch die vorliegende Studie keine klare Antwort auf die Frage gegeben werden kann, welche tumorbiologische Rolle dem p53-Protein in der Dysregulation von Apoptose und Proliferation in der Entstehung (Kanzerogenese) und in der Wachstumskinetik des HCC spielt.

6.4. Bcl-2 – Bedeutung im HCC?

Bcl-2 als Mitglied der bcl-2-Familie wirkt als Apoptoseinhibitor. Experimentelle Untersuchungen an humanen Hepatoma-Zelllinien zeigten, dass bcl-2 seine antiapoptotische Wirkung unter anderem über eine Inhibition des Fas-Systems ausübt, denn bcl-2-exprimierende Zellen waren resistent gegenüber FasL-vermittelter Apoptose (118).

In unserem Kollektiv fanden wir bcl-2-positive Tumorzellen nur in 7,41% der HCC, im Referenzgewebe waren nur 3,28% der Fälle mit vereinzelten bcl-2-positiven Hepatozyten zu beobachten. Diese seltene Expression des bcl-2-Onkoproteins im HCC wird auch in der Literatur beschrieben mit einer Schwankungsbreite von 0% (14) und 25% (95) und z.T. nur geringen Fallzahlen (14; 83; 95; 110; 130; 137).

Eine Korrelation zwischen Apoptoserate (TUNEL) und bcl-2-Expression konnte in-vivo bisher nicht festgestellt werden (130). Die niedrige Rate bcl-2-positiver HCC und die *fehlende* inverse Korrelation mit Apoptosemarkern in der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass bcl-2 eher keine Bedeutung in malignen hepatischen Neoplasien besitzt.

In unseren Untersuchungen zeigten sich dagegen häufig bcl-2-positive Zellen im Bereich der kleinen Gallengänge und der Gallengangsproliferate nicht-neoplastischen Lebergewebes. Auffallend deutlich war diese Beobachtung in den Fällen von FNH. Mehrere Autoren berichten über diese bcl-2-Positivität in kleinen Gallengängen, insbesondere in chronischer Hepatitis und FNH (14; 85; 95; 110). Der hier untersuchte CCC-Herd eines kombinierten Karzinoms wies keine bcl-2 Expression auf im Gegensatz zu anderen Arbeiten mit einer Schwankungsbreite zwischen 31,7% und 72,7% bcl-2-positiven CCC in größeren Kollektiven (14; 58).

Bcl-2 spielt damit anscheinend eine Rolle in der Regulation von Apoptose und Proliferation nicht-neoplastischer cholangiozellulärer Zellen.

6.5. HCC und Differenzierungsgrade

Eine Intention der Differenzierungsgradeinteilung eines Tumors ist es, eventuell prognostische Aussagen über das Tumorverhalten treffen und daraus Konsequenzen für das therapeutische Vorgehen ableiten zu können. Die Graduierung erfolgt dabei nach strukturellen und zytologischen Eigenschaften.

In unserer Arbeit untersuchten wir das Apoptose- und Proliferationsverhalten im HCC auch in Korrelation zu den unterschiedlichen Differenzierungsgraden.

Dabei konnte hinsichtlich der allgemeinen Apoptoserate weder in der TUNEL-Hybridisierung noch in der M30-Immunhistochemie ein Zusammenhang mit den Differenzierungsgraden des HCC festgestellt werden, wie auch für TUNEL in früheren Arbeiten berichtet wird (95; 110; 135). Andere Publikationen verweisen dagegen auf eine signifikante Zunahme der Apoptoserate mit sinkendem Differenzierungsgrad des HCC (42). In unserer Arbeit konnte eine höhere Rate des proapoptotischen Faktors bax in gering differenzierten als in höher differenzierten Karzinomen verifiziert werden.

Während für FasL keine Unterschiede zwischen den Differenzierungsgraden festzustellen waren, konnten wir in gering differenzierten Karzinomen gegenüber mäßig differenzierten Karzinomen eine hochsignifikant niedrigere Fas-Expression beobachten. Auch über diese Beobachtung wurde in der Literatur berichtet (31; 41; 57). Die Einstufung von HCC mit Fas-Verlust als Risikogruppe scheint daher gerechtfertigt zu sein, da mit Fas-Verlust eine ungünstige Prognose verbunden wird (55; 57; 127).

In mäßig und gering differenzierten HCC war tendenziell häufiger ein p53-Nachweis zu verzeichnen als in hoch differenzierten HCC.

Dagegen zeigten sich in unseren Untersuchungen hochsignifikant höhere Proliferationsraten in gering differenzierten HCC gegenüber hoch und mäßig differenzierten HCC, wie es sich auch in anderen Arbeiten zeigte (42; 56; 95). Das erhöhte Wachstumspotential gering differenzierter hepatozellulärer Karzinome dürfte entscheidend mitverantwortlich sein für eine schlechtere Prognose mit verkürzter krankheitsfreier Überlebenszeit (56).

Ob der Ki-67-Proliferationsindex und die Fas-Expressionsrate gegenüber der zytohistologischen Graduierung als unabhängige Prognosefaktoren Bedeutung haben, müsste in prospektiven Verlaufsstudien geklärt werden.

6.6. Tumorgröße und Tumorstadien

Nur in wenigen Studien ist der Zusammenhang von Apoptose- und Proliferationsverhalten – mit Anwendung immunhistochemischer Methoden – mit Tumorgröße und -stadien untersucht worden (55; 65). In der vorliegenden Arbeit verglichen wir die Tumorgröße der HCC im Hinblick auf stadienrelevante Grenzwerte mit den unterschiedlichen immunhistochemischen Reaktionsergebnissen.

Es wurde ein positiver Zusammenhang mit *direkter Korrelation* von Tumorgröße und M30-Expression gefunden, indem in größeren Tumoren signifikant höhere Apoptoseraten zu beobachten waren als in kleineren. In der Literatur wird für die TUNEL-Methode die Tendenz zu höherer Positivität in größeren Tumoren berichtet (65), was sich in unseren Untersuchungen mit höherem Median und Minimalwert ab einer Tumorgröße von 8,0 cm widerspiegelt. Für die übrigen untersuchten Antigene bestand keine *direkte Korrelation* mit der Tumorgröße.

Im Vergleich zwischen kleineren und größeren HCC, definiert über verschiedene *abgestufte Grenzwerte*, fiel auf, dass die relevanten Größengrenzwerte für die unterschiedlichen untersuchten Antigene differierten:

In der M30-Immunhistochemie wiesen HCC, die größer als *2,0 cm* waren hoch signifikant höhere Apoptoseraten auf als Karzinome, die kleiner waren.

Bezüglich Fas konnten wir erst ab einem Tumordurchmesser von *4,0 cm* eine hoch signifikant niedrigere Expression in größeren HCC feststellen. Für FasL zeigten unsere Analysen jedoch keine größenabhängigen Unterschiede. Der Zusammenhang von niedrigerer Fas-Expression in größeren HCC wurde auch schon in früheren Untersuchungen beobachtet (55), in einer anderen Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Fas- bzw. FasL-Expression feststellt werden (65). Abgesehen von Fas-Verlust als deskriptive Eigenschaft größerer HCC, ließe sich auf der Basis unserer Resultate spekulieren, dass HCC eventuell dadurch erst ein größeres Ausmaß (>4,0 cm) erreichen können, indem sie sich durch eine verminderte Fas-Expression einer FasL-vermittelten Apoptose entziehen.

Die Proliferationsaktivität war bei Karzinomen ab einem Grenzwert von *5,0 cm* signifikant bzw. ab einem Grenzwert von *6,0 cm* hoch signifikant gegenüber kleineren HCC erhöht.

Die in unserer Arbeit nachgewiesene, signifikant höhere Expression von p53 in größeren Tumoren galt ebenfalls für einen Grenzwert von 6,0 cm. Als Erklärung für dieses Resultat lässt sich eine Zunahme von p53-Genmutationen mit immunhistochemisch detektierbarem p53-Protein in fortgeschrittenen HCC diskutieren, ebenso wie die Möglichkeit, dass die p53-Mutation kein initiales Ereignis der hepatozellulären Karzinogenese ist.

Erst Karzinome, die größer als 8,0 cm waren, ließen signifikant höhere bax-Expressionen beobachten, als kleinere HCC, eventuell als Hinweis auf eine größenabhängige Veränderung intratumoraler nutritiver und zirkulatorischer Faktoren, indem ab einer bestimmten Tumorgröße möglicherweise die erforderliche Tumorangiogenese nicht mehr mit dem Tumorwachstum Schritt halten kann.

Diesen Befunden zufolge sind HCC mit zunehmender Größe durch ein progressiveres Wachstumsverhalten mit gesteigertem Zellumsatz gekennzeichnet. Für die tumorbiologische Bedeutung der HCC-Größe und dabei zunehmende genetische Instabilität bzw. Aberrationsrate spricht, dass in einer Studie HCC, die größer als 5,0cm waren, in 95% eine Metastasierung aufwiesen, während dies bei HCC, die kleiner als 5,0cm waren, in nur 60% der Fall war (125).

Dass die Klassifizierung der *Tumorstadien* nach UICC für HCC neben Multifokalität, Lokalisation, Invasion von Gefäßen und Nachbarstrukturen u.a. auf der Tumorgröße basiert, ist sinnvoll. In der bis 2002 und damit für unsere Untersuchungen geltenden TNM-Klassifikation von 1997 (51) galt dabei ein cut-off von 2,0 cm, in der neuen Fassung von 2002 wurde der Grenzwert auf 5,0 cm angehoben (52).

Die Relevanz des Grenzwertes von 2,0 cm oder Zusammenhänge mit den Tumorstadien der TNM-Klassifikation von 1997 spiegelte sich in den Daten der vorliegenden Arbeit bezüglich Proliferationsrate, Expression von p53, Ki-67 oder Fas nicht wider.

Lediglich in der M30-Immunhistochemie wiesen größere HCC hoch signifikant höhere Apoptoseraten auf als Karzinome, die kleiner 2,0 cm waren. Weiterhin stellte sich in der M30-Immunhistochemie ein direkter Zusammenhang mit den Tumorstadien dar, indem mit zunehmendem Tumorstadium eine signifikant

ansteigende M30-Expression zu beobachten war. Aus der ansteigenden Reihe fiel dabei das Stadium T4 heraus, das nicht auf der Tumorgröße basiert, sondern z.B. auf Multifokalität in beiden Leberlappen.

Im Vergleich dazu war in dieser Arbeit bei einem cut-off von 5,0 cm – wie er in der neuen TNM-Klassifikation (52) zur Anwendung kommt – eine signifikant höhere Proliferationsaktivität, sowie eine hoch signifikante Minderung der Fas-Expression zu beobachten. Die bei Grenzwerten von 6,0 cm bzw. 8,0 cm gefundenen Unterschiede in der p53- bzw. bax-Expression ließen sich bei 5,0 cm jedoch noch nicht feststellen.

Mit dem geltenden Grenzwert von nunmehr 5,0 cm dürfte die neue TNM-Klassifikation von 2002 (52) den Proliferations- und Apoptosecharakteristika des hepatozellulären Karzinoms eher gerecht werden.

6.7. Ätiologische Faktoren des HCC

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir mit immunhistochemischen Methoden und TUNEL-Hybridisierung HCC und Referenzgewebe mit der Absicht, eventuelle Unterschiede in der Expression von Faktoren der Apoptose und Proliferation je nach Ätiologie im Referenzgewebe erkennen zu können und eventuell für bestimmte Grunderkrankungen typische Expressionsmuster auch in den assoziierten HCC aufzudecken.

Der Vergleich von Apoptoserate und Proliferationsaktivität zeigte im HCC mit den entsprechenden Raten im jeweils angrenzenden nicht-neoplastischen Leberparenchym des gleichen Falles eine positive signifikante Korrelation, d.h. je höher die Proliferation bzw. Apoptose im HCC, desto höher war auch die Proliferation bzw. Apoptose von Zellen im Referenzgewebe desselben Patienten. Über ähnliche Ergebnisse berichten auch Pizem et al. (95).

Es stellt sich damit die Frage, ob dieses Phänomen möglicherweise auf dieselbe Wirkung ätiologischer Faktoren auf „gesundes Gewebe“ und HCC in denselben Patienten zurückzuführen ist.

Zu den bekannten ätiologischen Faktoren für die Entstehung des HCC zählen HBV-Infektion, HCV-Infektion, chronischer Alkoholabusus, Aflatoxin und Stoffwechselerkrankungen, wie hereditäre Hämochromatose und Morbus Wilson.

Unabhängig von der Ätiologie stellt jedoch der zirrhotische Umbau der Leber per se einen der wichtigsten Risikofaktoren des HCC dar (18; 106). Unter Berücksichtigung einer geographisch bedingten Variation entwickeln sich HCC allgemein in 75-90% auf dem Boden einer Leberzirrhose (54), dabei sind in Teilen Afrikas HCC in bis zu 40% in nicht-zirrhotischen Lebern vorzufinden (3; 37).

Auch in unserem Kollektiv zeigte sich dieses Verhältnis: 80,4% der HCC waren in zirrhotischer Leber zu finden, während bei 19,6% der HCC-Patienten kein zirrhotischer Umbau der angrenzenden Leber zu beobachten war.

In Referenzgewebsproben konnten wir bezüglich Apoptose- und Proliferations-verhalten, sowie p53-, bax- und FasL-Expression keine Unterschiede zwischen zirrhotischem und nicht-zirrhotischem Parenchym erheben.

Es zeigte sich jedoch eine hoch signifkante Mehrexpression von Fas in zirrhotischer Leber gegenüber nicht-zirrhotischer Leber. Eine ebenfalls hoch signifikant höhere Fas-Expression war auch in HCC in einer Leberzirrhose gegenüber HCC in nicht-zirrhotisch umgebauter Leber zu beobachten, während die übrigen Parameter unter dem Aspekt „Leberzirrhose“ keine weiteren Unterschiede erkennen ließen. Diese erhöhte Fas-Expression scheint Ausdruck einer erhöhten Apoptosebereitschaft der Hepatozyten in einer vorgeschädigten, strukturell transformierten Leber zu sein.

Ätiologisch werden über die Hälfte der weltweit vorkommenden HCC einer *HBV-Infektion* zugeschrieben (94). Dabei wird der Leberschaden, der bei Chronifizierung schließlich in eine Zirrhose mündet, vor allem durch wirtseigene Abwehrmechanismen im Rahmen der Elimination virusbefallender Hepatozyten verursacht (69). Eine erhöhte Apoptoserate (M30, TUNEL) konnte in der vorliegenden Arbeit für *HBV-assoziiertes Referenzgewebe* nicht nachgewiesen werden, es zeigte sich aber eine deutliche Tendenz zu höherer bax-Expression im Vergleich zu Fällen mit anderer Ätiologie. In der Literatur wird eine erhöhte bax-Expression HBV-infizierter Hepatozyten ebenfalls beschrieben (25).

Es wird weiterhin spekuliert, dass die Elimination infizierter Zellen über ein stimuliertes Fas-/FasL-System erfolgen könnte (11; 33). In der Literatur zeigten Experimente an Hepatomazelllinien eine Induktion von FasL durch das HBx-Protein (108), sowie eine HBx-Gen-assoziierte Reduktion der Fas-Level (109). Beide Mechanismen könnten zu einer Protektion der infizierten Hepatozyten gegenüber

Zellen der Immunabwehr beitragen. Während wir im Referenzgewebe bei HBV-Infektion keine auffallend niedrigen Fas-Level beobachteten, war die FasL-Expression in HBV-assoziiertem Referenzgewebe jedoch tendenziell im Vergleich zu HCV-assoziiertem und Referenzgewebe ohne bekannte Ätiologie gesteigert, möglicherweise induziert durch das HBx-Protein des HB-Virus.

Weiterhin konnten wir eine eher gesteigerte Proliferationsrate im HBV-assoziierten Referenzgewebe nachweisen, wie sie auch in früheren Arbeiten schon beobachtet wurde (11; 25). Eine gesteigerte Proliferation wird per se als Risikofaktor für die Entstehung eines HCC angesehen (22).

Zusammenfassend ließen sich somit bei HBV-Infektion im Referenzgewebe typischerweise gegenüber anderer Ätiologie vermehrt bax, FasL und Ki-67 nachweisen.

In den *HBV-assoziierten HCC* des Kollektivs konnte keine Abweichung der Apoptoserate (M30, TUNEL) vom HCC-Gesamtkollektiv festgestellt werden. Im Sinne einer höheren Apoptosebereitschaft fand sich wie auch im HBV-assoziierten Referenzgewebe eine etwas erhöhte bax-Expression, jedoch keine auffällige Fas- und FasL-Expression, letzteres kann möglicherweise als Hinweis auf einen relativen Verlust bei der Entstehung eines HBV-assoziierten HCC gewertet werden.

Im Gegensatz zum HBV-assoziierten Referenzgewebe war eine deutliche p53-Expression in allen 4 HBV-assoziierten HCC nachweisbar und ist daher möglicherweise als weiteres Kriterium einer malignen Transformation in HBV-Lebern zu werten. In der Literatur wird dem Virus eine direkte Rolle in der Hepatokarzinogenese über das HBx-Protein mit einer Inaktivierung und Akkumulation des Tumorsuppressors p53 mittels Komplexbindung zugeschrieben (91; 123). In einer anderen Studie (115) wird gehäuft in p53-positiven HCC eine Mutation im Bereich des p53-Gens nachgewiesen. Weil solche Mutationen häufig in Verbindung mit HBV beschrieben werden (15; 91), kommt auch die Integration des DNA-Virusgenoms ins Wirtsgenom als weiterer direkter Virus-Effekt in der Karzinogenese in Betracht.

Die chronische Entzündungsreaktion bei *HCV-Infektion* ist – wie auch bei der HBV-Infektion – Ausdruck der Immunabwehrmechanismen des Wirts. Während wir im *HCV-assoziierten Referenzgewebe* keine vergleichbar erhöhte Apoptoserate (M30,

TUNEL) gegenüber den Fällen mit anderer Ätiologie nachweisen konnten, zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression des proapoptotischen bax-Proteins gegenüber nicht-HCV-assoziiertem Gewebe. Dies war auch bei HBV-Infektion in einer Tendenz zu beobachten. Die vermehrte bax-Expression wurde zuvor von Ehrmann et al. (25) nur für HBV-Fälle beschrieben. Weshalb die vermehrte bax-Expression nicht zu einer nachweisbaren Apoptosevermehrung führt, bleibt unklar.

Hinsichtlich der p53-, Fas- und FasL-Expression konnten wir bei HCV-Infektion im Vergleich zum Referenzgewebe der Fälle mit anderer Ätiologie keine Unterschiede feststellen.

Eine Proliferationssteigerung wie im HBV-assoziierten Referenzgewebe fanden wir bei HCV-Infektion nicht, wogegen in der Literatur eine Korrelation zwischen erhöhter Proliferationsaktivität und Anti-HBc-Positivität bei chronischer HCV-Infektion festgestellt wurde (23).

Die Apoptoserate *HCV-assoziierter HCC* war in der TUNEL-Hybridisierung nicht von anderen HCC zu unterscheiden. In der M30-Immunhistochemie zeigte sich jedoch eine signifikant niedrigere Apoptoserate gegenüber nicht HCV-bedingten HCC. Darüberhinaus fand sich anders als beim entsprechenden Referenzgewebe keine erhöhte bax-Expression, möglicherweise als Hinweis auf einen relativen Verlust bei maligner Transformation in HCV-Lebern. Weiterhin war eine nur relativ niedrige Fas-Expression bei regulärer FasL-Expression zu beobachten. Diese Konstellation könnte wiederum auf eine mögliche Immunevasion mit dadurch erniedrigter Apoptoserate hinweisen.

Eine erhöhte p53-Expression wie bei HBV-assoziierten HCC fand sich für HCV-assoziierte HCC nicht. Das könnte ein weiteres Indiz sein für eine induzierte p53-Mutation, die erst durch direkte Interaktion des HBV-DNA-Virus, nicht jedoch durch das HCV-RNA-Virus wirksam wird (107).

Hinsichtlich der Proliferationsrate waren HCC bei HCV-Infektion nicht von anderen HCC abzugrenzen.

Ein undifferenziertes Karzinom mit gleichzeitiger HBV- und HCV-Infektion wies dagegen im Vergleich mit HCC der HCV-Gruppe die höchste Proliferationsaktivität auf.

Es ist deshalb in weiteren Untersuchungen zu klären, inwiefern das HBV-Virus durch eventuell noch unbekannte Faktoren in die Proliferationsregulation eingreifen könnte. In der Literatur bekannt ist eine signifikante Risikozunahme für die Entwicklung eines HCC bei gleichzeitiger HBV- und HCV-Infektion gegenüber einer alleinigen HBV- oder HCV-Infektion (5; 23).

Chronischer Alkoholkonsum als Risikofaktor für die Entstehung eines HCC kann über Steatosis hepatis zu alkoholischer Steatohepatitis (ASH) führen und bei ca. 20% der Alkoholiker in eine mikronoduläre Leberzirrhose münden (21). Apoptose spielt dabei im alkoholtoxischen Leberschaden eine bedeutende Rolle. Darin involviert sind Signalwege mit Induktion von Cytochrom P450, das TNF-System und das Fas-System (86).

Referenzgewebe bei Alkoholabusus zeigte in unseren Untersuchungen jedoch weder einen relevanten Unterschied der Apoptoserate (M30, TUNEL) gegenüber anderen Fällen, noch Auffälligkeiten in der Expression von bax und Fas. Zirrhotisches Referenzgewebe bei Alkoholabusus zeigte allerdings statistisch signifikant die niedrigste FasL-Expression aller ätiologischen Fallgruppen. In der Literatur wird hingegen über eine gesteigerte Expression von FasL bei gleichzeitigem Vorhandensein des Fas-Rezeptors in der ASH berichtet (32; 86). Diese Diskrepanz könnte darin begründet sein, dass in den von uns untersuchten Referenzgeweben keine ASH vorlag und der zirrhotische Parenchymumbau bereits weitgehend abgeschlossenen war.

Eine p53-Positivität konnte in zirrhotischer Leber bei gleichzeitiger HCV-Infektion und Alkoholabusus nachgewiesen werden, und könnte Ausdruck einer gegenseitigen Toxizitätssteigerung sein. In der Literatur wird von einer Verdopplung des HCC-Risikos bei Alkoholabusus ausgegangen, wenn eine HCV-Infektion additiv als ätiologischer Faktor hinzukommt (20; 132).

Referenzgewebe bei Alkoholabusus war hinsichtlich der Proliferationsrate unauffällig gegenüber anderen Ätiologien.

HCC in äthyltoxisch geschädigten Lebern wiesen in unseren Untersuchungen anders als im entsprechenden Referenzgewebe die höchsten Apoptoseraten mittels M30-Immunhistochemie gegenüber den Fällen anderer Ätiologie auf.

Anders als im alkoholassoziiertem Referenzgewebe bestand eine stark reduzierte Fas-Expression und eine – wie auch im Referenzgewebe – erniedrigte FasL-Expression, so dass sich Tumorzellen in äthyltoxisch bedingten HCC einer Fas-/FasL-getriggerten Apoptose möglicherweise durch Fas-Verlust im Zuge der Kanzerogenese entziehen könnten.

Auch die *hereditäre Hämochromatose (HH)* birgt ein erhöhtes Risiko für die Entstehung primärer Leberkarzinome und auch für Malignome anderen Ursprungs (30). Eisenfreie Herde in ansonsten eisenüberladenem Lebergewebe bei Hämochromatose werden dabei als prämaligne Läsion interpretiert (7; 82).

In unseren Untersuchungen wies HH-assoziiertes *Referenzgewebe* die niedrigste Apoptoserate (TUNEL) gegenüber anderen Grunderkrankungen auf bei jedoch höherer Expression von Fas, wie sie auch Galle (32) schon beschrieb. Auch eine höhere FasL-Expression war in Referenzgewebe mit HH zu beobachten. Das lässt den Schluss zu, dass der Fas-/FasL-Signalweg wahrscheinlich bei Hämochromatose effektiv antagonisiert wird. Die Proliferationsaktivität im Referenzgewebe erscheint gegenüber den Fällen mit anderer Ätiologien bei Hämochromatose eher niedriger.

In den untersuchten *HCC auf dem Boden einer Hämochromatose* ergab sich wie im Referenzgewebe die relativ höchste Fas-Expression bzw. der geringste Fas-Verlust. Auffallend war auch eine deutliche p53-Positivität in HH-bedingten HCC, die nur in HBV-assoziierten HCC noch ausgeprägter war. Vautier (126) und Morcos (82) berichten über eine hohe p53-Mutations-Frequenz in HCC und CCC in Hämochromatosefällen, so dass allgemein bei malignen Leberneoplasien bei Hämochromatose eine Mutation im Bereich des Tumorsuppressorgens p53 eine Rolle spielen könnte.

In dem in dieser Arbeit untersuchten *Referenzgewebe bei Morbus Wilson* zeigten sich die relativ höchsten Apoptoseraten sowohl für TUNEL als auch für M30, verglichen mit den Leberveränderungen bei anderer Ätiologie. Auch frühere Arbeiten berichten über eine gesteigerte Apoptoseaktivität bei Morbus Wilson (93). Die gleichzeitig in unseren Untersuchungen beobachtete hohe Fas- und FasL-Expression lässt sich dahingehend interpretieren, dass die erhöhte Apoptose bei M. Wilson speziell über Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges läuft. Strand (113)

untersuchte den Mechanismus der fulminanten Hepatitis im Morbus Wilson genauer und fand ebenfalls ein hochreguliertes Fas-/FasL-System. Die Fas-Expression wird in Zusammenhang mit einer wt-p53-Akkumulation gesehen, die im weiteren Verlauf zu erhöhter Fas-Transkription beiträgt. Zurückgeführt wird diese wt-p53-Akkumulation auf einen DNA-Schaden, ausgelöst durch oxidativen Stress bei Generation freier Radikale durch Kupfer im Zellmilieu (32; 113). Interessanterweise fanden wir in unserem Fall von Morbus Wilson die höchsten p53-Werte im gesamten Referenzgewebe ohne den Hinweis auf dysplastische oder neoplastische Veränderungen. Da der hier verwendete Antikörper DO-7 sowohl das mutierte Protein als auch den Wildtyp detektiert, könnte es sich bei stark positiver Immunhistochemie in unserem Fall tatsächlich um einen wt-p53-Nachweis mit erhaltener physiologischer Funktion handeln. Einer hohen Apoptoserate stand in unseren Untersuchungen eine erhöhte Proliferationsaktivität gegenüber, so dass insgesamt ein stark erhöhter Zellumsatz vorzuliegen scheint.

6.8. HCC und Morphologie

Untersuchungen der vorliegenden Arbeit galten weiterhin einer möglichen Korrelation zwischen zytomorphologischen und strukturellen Charakteristika des HCC und seiner proliferativen und apoptotischen Aktivität.

Damit wurden zum ersten Mal in der Literatur immunhistochemisch Apoptose- und Proliferationsverhalten an humanen HCC unter der Berücksichtigung phänotypischer Unterschiede untersucht. In unserem HCC-Kollektiv ließ sich bei bekannter ausgeprägter intratumoraler Heterogenität dieser Entität zumindest abschnittsweise ein klarzellig-solider, eosinophil-trabekulärer und basophil-pseudoglandulärer Phänotyp definieren.

In den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen war dabei in *klarzellig-soliden* HCC-Arealen eine geringere Apoptoserate zu beobachten als in HCC-Arealen des eosinophil-trabekulären oder basophil-pseudoglandulären Typs: Während in der TUNEL-Methode nur eine Tendenz zu erkennen war, war dieser Unterschied in der M30-Immunhistochemie signifikant.

Bezüglich des bax-Nachweises zeigten *basophil-pseudoglanduläre* HCC-Areale eine tendenziell höhere Expression als eosinophil-trabekuläre und klarzellig-solide HCC-Areale und ähnelten damit dem CCC unseres Kollektivs. Diese Ähnlichkeit basophil-

pseudoglandulärer Areale zu CCC ließ sich auch in hier ausgeprägter p53-Expression erkennen gegenüber nur geringgradiger Positivität in eosinophil-trabekulären und klarzellig-soliden Arealen. HCC-Areale des basophil-pseudoglandulären Typs wiesen weiterhin eine signifikant bzw. hoch signifikant höhere Proliferationsaktivität auf als eosinophil-trabekuläre bzw. klarzellig-solide HCC-Areale. In der FasL-Immunhistochemie wiesen basophil-pseudoglanduläre Areale eine eher niedrige Positivität auf im Vergleich zu den beiden anderen Phänotypen. Bezüglich der Fas-Reaktivität konnten die phänotypisch verschiedenen HCC-Areale nicht unterschieden werden.

Die deutliche Ähnlichkeit des immunhistochemischen Expressionsmusters basophil-pseudoglandulärer HCC-Areale mit dem untersuchten CCC im Gegensatz zu eosinophil-trabekulären oder klarzellig-soliden Arealen des Kollektivs lässt Spekulationen über eine formalpathogenetische Verwandtschaft bzw. eine ähnliche Ursprungszelle zu.

In Untersuchungen der hepatischen Karzinogenese definierte Bannasch bereits 1994 im Tiermodell „präneoplastische Herde veränderter Hepatozyten“ (FAH = foci of altered hepatocytes) nach morphologischen und zytochemischen Kriterien (134). Im Progress der Karzinogenese unterschied er verschiedene Phänotypen, die nach seinem Modell eine Abfolge von glykogenreichen klarzelligen und azidophilen FAH über FAH mit intermediarem Phänotyp und gemischter/basophiler Zellpopulation zu glykogenreichen (*klarzelligen*) gut differenzierten und glykogenärmeren, *basophilen* schlecht differenzierten HCC darstellten. In der Untersuchung der FAH und HCC beobachtete er dabei in „fortgeschrittenen“ gemischten *basophilen* FAH signifikant höhere Apoptose- und Proliferationsraten als in anderen Zellherden, glykogenarme, *basophile* HCC wiesen massiv höhere Proliferationsraten im Vergleich zu glykogenreichen HCC (sog. klarzelligen Karzinomen) auf. Eine spätere Arbeit an *humaner* Leber berichtet ebenfalls über höhere Proliferationsaktivität in glykogen-ärmeren präneoplastische Läsionen als glykogenspeichernden Zellen (116).

In Analogie zu diesem experimentellen Ansatz mit morphologischen und biologischen Differenzen rechtfertigen unsere morphologisch korrelierten Unterschiede eine diagnostisch differenzierende Erfassung der von uns unterschiedenen Phänotypen des HCC. Insbesondere könnten – nicht zuletzt

aufgrund einer höheren Proliferationsrate (56) – HCC mit Dominanz eines basophil-pseudoglandulären Phänotyps einen prognostisch ungünstigeren Verlauf nehmen.

6.9. Dysplasie-Karzinom-Sequenz

Außer den Karzinomen wurden makroregenerative Knoten und Fälle von fokaler nodulärer Hyperplasie als Vertreter reparativer und tumorartiger Läsionen, ein hepatozelluläres Adenom (HCA) als benigne Neoplasie und dysplastische Knoten, um eventuelle immunhistochemische Charakteristika bezüglich Apoptose und Proliferation definieren zu können.

Die Nomenklatur ist insbesondere bezüglich Regeneratknoten und dysplastischen Läsionen in der Literatur nach wie vor uneinheitlich, so dass die Vergleichbarkeit unserer Resultate mit Literaturangaben eingeschränkt ist. Wir legten dabei die nomenklatorischen Vorschläge der IWP (International Working Party) zugrunde. Diese leistete mit der 1995 publizierten „Terminology of Nodular Hepatocellular Lesions“ (53) einen wichtigen Beitrag zur Vereinheitlichung der Nomenklatur, eine standardisierte Verwendung ist jedoch auch nach dieser Übereinkunft noch nicht gebräuchlich. So wird nach wie vor häufig von (atypischer) adenomatöser Hyperplasie (z.B. 63; 71; 102) oder makroregenerativen Knoten Typ I und II (z.B. 47; 88; 121) gesprochen, wenn dysplastische Knoten (DN-LG, DN-HG) Gegenstand der Diskussion sind. Die Begriffe sollten nach IWP nicht mehr verwendet werden, weil hiermit ursprünglich eine Einstufung als regenerative Läsion verbunden war und auch immer wieder Verwechslungen mit dem hepatozellulären Adenom entstanden. Zudem betont der Dysplasiebegriff klarer den Charakter einer prämalignen Läsion (103).

In unseren immunhistochemischen Resultaten nicht vom Referenzgewebe abzugrenzen waren *makroregenerative Knoten* und die *fokale noduläre Hyperplasie*. Letztere wies tendenziell eine etwas höhere Proliferationsrate auf als das Referenzgewebe. Beide Läsionen besitzen aber keinen neoplastischen Charakter und kein Malignitätspotential (54). Dies wird durch die vorliegenden Untersuchungen gestützt.

Das hier untersuchte bifokale *HCA* einer Patientin wies eine gegenüber dem allgemeinen Referenzgewebe und HCA-angrenzendem Leberparenchym erhöhte

Proliferationsrate auf. Zudem zeigte sich eine deutliche Reduktion der Fas-Expression im HCA bei gleichzeitig hoher Fas-Expression im angrenzenden Gewebe, allerdings auch bei unverändertem FasL-Nachweis im Vergleich mit angrenzendem Referenzgewebe, ein Befund, der mit einer Reduktion der FasL-vermittelten Apoptose über Downregulation des Rezeptors vereinbar ist. Apoptotische Zellen waren jedoch im HCA uneinheitlich häufiger (TUNEL-Hybridisierung) oder seltener (M30-Immunhistochemie) als im angrenzenden Parenchym nachweisbar. Bei erhöhter Proliferationstendenz und gleichzeitig erniedrigter Fas-Expression bestehen tendenziell „Ähnlichkeiten“ mit HCC in bezug auf dieses immunhistochemische Expressionsmuster.

In der Literatur wird ein Entartungsrisiko des HCA noch immer kontrovers diskutiert. Tannapfel et al. (119) bezeichnen das Leberzelladenom als morphologisch definiertes Endstadium einer (durch anabole Steroide) induzierten hepatozellulären Proliferation. Im Einklang damit steht die in unseren Untersuchungen erhöhte Ki-67-Expression im HCA. Teilweise wird aber eine maligne Transformation im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz, wie sie in der Karzinogenese des Kolonkarzinoms besteht, postuliert (17; 28; 29; 54). Dagegen spricht jedoch das Fehlen zytogenetischer Aberrationen im HCA (29). Weitere immunhistochemische Untersuchungen eines größeren HCA-Kollektivs sind jedoch notwendig.

Der vorherrschende Mechanismus der Hepatokarzinogenese scheint die *Dysplasie-Karzinom-Sequenz* zu sein. In der Literatur werden dazu dysplastische Läsionen der Leber beschrieben, die ein variables Risiko einer malignen Transformation zum HCC bergen, wie klarzellige Veränderungen (23), kleinzellige (SLCD) oder großzellige hepatozelluläre Dysplasie (LLCD) (47; 71; 78; 96; 120; 129). In unserer Arbeit wurden dysplastische Knoten in *low grade* (LG) und *high grade* (HG) unterschieden, entsprechend den Empfehlungen der *International Working Party* (53).

Die histologische Beobachtung der Knoten-in-Knoten-Erscheinung (47; 63; 71, 102; 121) wird als weiterer Hinweis auf eine Dysplasie-HCC-Sequenz gewertet (62). In zwei Fällen konnten wir beobachten, dass dysplastische Läsionen den Rand eines HCC bildeten. Darüber hinaus ist das Phänomen beschrieben, dass sich in höher differenzierten HCC geringer differenzierte Herde im Rahmen der klonalen Selektion entwickeln können (63).

Gegenstand unserer Untersuchungen an dysplastischen Läsionen war, inwiefern sich die morphologische Dysplasie-Karzinom-Sequenz auch im immunhistochemischen Expressionsmuster von Apoptosefaktoren und Proliferation widerspiegelt.

In der Abgrenzung von *nicht-neoplastischem Referenzgewebe* zeigten dysplastische Knoten eine Tendenz zu geringgradig höherer Proliferation. Höchst signifikant war dabei die ansteigende Proliferationsrate von MRN über dysplastische Knoten zu hoch, mäßig und gering differenzierten HCC. Damit lässt sich eine gleichläufige proliferative Tendenz für Dysplasien und HCC gegenüber Referenzgewebe belegen. Die Apoptoserate in den von uns untersuchten dysplastischen Knoten war in der M30-Immunhistochemie dem Referenzgewebe vergleichbar, in der TUNEL-Hybridisierung überwog sie gegenüber dem Referenzgewebe, wie auch in der Literatur beschrieben (92). Auffallend war die Fas-Expression in den dysplastischen Knoten mit signifikant erniedrigter Expression gegenüber MRN bei einer Fas-Expression vergleichbar zu hoch und mäßig differenzierten HCC.

In der Abgrenzung dysplastischer Knoten gegenüber *HCC* zeigten die Karzinome allgemein höchst signifikant höhere Proliferationsraten, dabei konnten hoch differenzierte HCC allein noch nicht signifikant von dysplastischen Knoten abgegrenzt werden. In der M30-Immunhistochemie waren HCC durch eine signifikant höhere Apoptoserate gekennzeichnet gegenüber dysplastischen Knoten, während sich dieser Zusammenhang in der TUNEL-Hybridisierung nicht zeigte. In der Fas-Immunhistochemie wiesen erst gering differenzierte HCC eine signifikant niedrigere Rezeptorexpression auf als dysplastische Knoten. Die p53-Expression war deutlich häufiger und höher in HCC als in Dysplasien, in denen sich nur vereinzelt in Fällen von HG-Dysplasien p53-positive Zellen fanden.

In der Gegenüberstellung von *LG- und HG-Dysplasien* stellten sich weder in der Apoptose- (TUNEL und M30) noch in der Proliferationsrate signifikante Unterschiede dar. Dabei wird in der Literatur über eine erhöhte Proliferationsrate (PCNA) in HG-Dysplasien berichtet (71). Auch in der Fas-Expression ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen HG- und LG-Dysplasie. Bemerkenswert dagegen war, dass sich nur in HG-Dysplasien p53- und bax-Expressionen finden ließen, was möglicherweise als weiterer Hinweis auf eine Dysplasie-HCC-Sequenz gewertet werden kann. Als ursächlich für die p53-Expression wurden oben bereits die

Komplexbildung mit Zellproteinen und die Mutation diskutiert. In Hinblick auf p53-positive dysplastische Leberläsionen konnten in einer früheren Arbeit keine p53-Mutationen detektiert werden, so dass der p53-Positivität als Ausdruck einer *Genmutation* in der Karzinogenese des HCC wohl eine eher geringe Bedeutung zukommt (60) und in ihre Ursache in dysplastischen Läsionen möglicherweise in einer Akkumulation bei funktioneller Inaktivierung und Komplexbindung findet.

Zusammenfassend scheint die formale Hepatokarzinogenese morphologisch eher einem Kontinuum als einer sprunghaften Entwicklung zu entsprechen. Die Grenzen unterschiedlicher Läsionen, sei es der MRN im Vergleich zum dysplastischen Knoten, oder der dysplastische Knoten im Vergleich zum hoch differenzierten Karzinom, können dabei fließend sein und sind derzeit anhand einzelner Kriterien nicht scharf zu definieren.

In unser Kollektiv war auch ein *HCC vom Fibrolamellären Typ* einbezogen, wozu in der Literatur bisher nur wenig Daten zum Apoptose- und Proliferationsverhalten zur Verfügung stehen.

In unseren immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine gegenüber dem Referenzgewebe erhöhte Proliferationsrate in der Ki-67-Immunhistochemie, während in einer kürzlich publizierten Arbeit in vier untersuchten FLC kein Nachweis von Ki-67 gelang, bei stark variierender PCNA-Expression (36).

Weiterhin ergab sich gegenüber den übrigen HCC eine eher niedrige Apoptoserate, insbesondere in der M30-Immunhistochemie. Auffallend dagegen im Vergleich zum HCC-Kollektiv mit gleichläufigem Verlust von Fas und FasL war eine stark erhöhte FasL-Expression bei minimaler Fas-Expression im Sinne eines gegenläufigen Expressionsmusters. Vor dem Hintergrund, dass HCC vom Typ FLC meist erst im fortgeschrittenen Stadium mit Gefäßeinbrüchen und Metastasierung entdeckt werden (54), und auch in unserem Fall bereits eine Metastasierung vorlag, könnte diese Konstellation für einen späten Selektionsvorteil sprechen, indem die Tumorzellen einerseits durch Fas-Verlust einer FasL-vermittelten Apoptose entgehen, andererseits durch erhöhte FasL-Expression/-Sekretion zur Elimination immunkompetenter T-Lymphozyten beitragen.

In der Untersuchung zu differenten HCC-Phänotypen nahmen wir den *CCC-Herd* des Kollisionstumors sowie die beiden *undifferenzierten Karzinome* mit in den Vergleich auf.

In den beiden undifferenzierten Karzinomen war kein einheitliches, diese kennzeichnendes immunhistochemisches Expressionsmuster festzustellen.

Anders verhielt es sich mit dem CCC-Anteil des Kollisionstumors. Eine Fas-Expression war im CCC-Herd nicht zu beobachten, wie dies auch in den eher gering differenzierten HCC der Fall war. Das FasL-Expressionmuster war der HCC-Gesamtgruppe vergleichbar. Im Vergleich mit den phänotypisch unterschiedlichen HCC-Arealen war der CCC-Herd in den immunhistochemischen Untersuchungen für p53, Ki-67 und bax qualitativ der Gruppe basophil-pseudoglandulärer HCC-Areale vergleichbar, quantitativ waren die Unterschiede zur HCC-Gesamtgruppe jedoch noch stärker ausgeprägt. Dies begründet den Verdacht einer morphogenetischen Verwandtschaft zwischen basophil-pseudoglandulären HCC- Arealen und CCC.

Erstmalig wurden in unserer Arbeit Metastasen hepatischer Primärneoplasien immunhistochemisch auf ihr Apoptose- und Proliferationsverhalten hin untersucht. Unser Kollektiv enthielt drei *Metastasen* unterschiedlicher lebereigner Primärkarzinome. Es handelte sich um eine Netzmetastase eines konventionellen HCC (Grad 3-4 nach E&S) und um zwei Lymphknotenmetastasen jeweils eines HCC vom fibrolamellären Typ (Grad 2 nach E&S) und eines undifferenzierten Karzinoms.

Unabhängig von der Art des Primärtumors ließen sich interessante immunhistochemische Resultate beobachten, die möglicherweise typisch für den Umstand der Metastasierung sein könnten.

Während weder für die Apoptoserate (M30 und TUNEL), noch für die Antikörper p53 und bax relevante Unterschiede zu Primärmalignom oder HCC-Gesamtgruppe erhoben werden konnten, fiel – abgesehen von der FLC-Metastase – eine um ein Vielfaches erhöhte Proliferationsrate auf im Vergleich mit den entsprechenden Primärmalignomen und in Relation zur Proliferationsrate aller HCC.

Die Metastasen zeigten eine den Primärmalignomen vergleichbar niedrige Fas-Expression, die im Vergleich zum Gesamtkollektiv tendenziell etwas niedriger war. Der Mechanismus des Fas-Verlustes, insbesondere im metastasierten Stadium, wurde auch in anderen Karzinomen (z.B. Bronchial- und Kolonkarzinom) beobachtet (64; 80).

In der FasL-Immunhistochemie kam in den untersuchten Metastasen gegenüber ihren Primärneoplasien und dem HCC-Gesamtkollektiv eine eher gesteigerte Expression zur Darstellung.

Dieses gegenläufige Expressionsmuster, das auch schon bei FLC zu beobachten war, könnte eventuell Ausdruck eines erworbenen Selektionsvorteils sein, eine Elimination immunkompetenter Lymphozyten („Immunevasion“) begünstigen (114) und somit einen Beitrag zum Metastasierungspotential leisten. Allerdings erlauben die Fallzahlen unseres Metastasenkollektivs nur Spekulationen.

7. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt weltweit zu den häufigsten Karzinomen, in Europa macht es zwar nur 3% der Karzinome aus – jedoch mit steigender Inzidenzrate. Diese ist möglicherweise auf eine Infektionswelle mit Hepatitis B und C von 1950 bis 1980 zurückzuführen (29, 125). Daneben zählen chronischer Alkoholabusus, Aflatoxin B1-Exposition und Leberzirrhose per se zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms. Die Kenntnisse der molekularen Mechanismen der Karzinogenese in der Leber, insbesondere der Dysregulation von Proliferation und Apoptose sind indessen noch sehr lückenhaft.

Die vorgelegte Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, einen Beitrag zur Klärung der formalen und molekularen Pathogenese der Hepatokarzinogenese zu leisten. Es wurde das Proliferations- und Apoptoseverhalten im hepatozellulären Karzinom (HCC, n=52) über immunhistochemische Verfahren und TUNEL-Hybridisierung untersucht. Dabei wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67, der Zellzyklus- und Apoptosekontrollproteine Fas-Rezeptor (Fas), Fas-Ligand (FasL), bax, bcl-2, p53 und der Apoptosemarker M30 und TUNEL mit normalem Referenzgewebe (RG, n=61), dysplastischen Knoten (DN, n=9), einem hepatozellulären Adenom (HCA, n=1), makroregenerativen Knoten (MRN, n=5), fokaler nodulärer Hyperplasie (FNH, n=3), undifferenzierten Karzinomen (n=2), einem cholangiozellulären Areal eines Kollisionstumors (n=1) und Metastasen primärer Lebermalignome (n=3) verglichen. Fragen waren dabei,

- ob bestimmte Expressionsmuster der untersuchten Zellzyklus- und Apoptose-regulatoren kennzeichnend für die Hepatokarzinogenese sein könnten,
- ob sich Hinweise auf eine Adenom-Karzinom- oder Dysplasie-Karzinom-Sequenz ergeben,
- ob interindividuelle Unterschiede zwischen HCC abhängig von Ätiologie, histologischem Differenzierungsgrad, Tumorgröße, pT-Stadium und Morphologie bestehen und sich daraus Rückschlüsse auf ein jeweils charakteristisches tumorbiologisches Verhalten ziehen lassen,
- ob sich aus den Ergebnissen relevante Schlussfolgerungen für Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms ableiten lassen.

Damit wird mit dieser Arbeit erstmalig eine komplexe Beleuchtung des Proliferations- und Apoptoseverhaltens im hepatozellulären Karzinom und in anderen Veränderungen der menschlichen Leber vorgelegt, die so bisher nicht vorgenommen wurde.

Folgende Ergebnisse waren in der Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen festzustellen: HCC zeigten eine signifikant gesteigerte Ki-67-Expression, TUNEL-Positivität, bax-Expression, sowie eine signifikant verminderte Fas- und FasL-Expression gegenüber normalem Referenzgewebe (RG) ($p<0,001$), daneben zeigten HCC eine relativ starke M30- und p53-Expression bei nur vereinzelter bcl-2-Expression. HCV-assoziierte HCC wiesen eine signifikant niedrigere Apoptoserate (M30) auf, HBV-assoziierte HCC zeigten tendenziell eine höhere p53-Expression als HCC anderer Ätiologie. Gering differenzierte HCC zeigten die höchste Ki-67-Expression ($p<0,001$) und niedrigste Fas-Expression ($p<0,01$). Hoch differenzierte HCC zeigten eine Tendenz zu seltenerer p53-Exposition als mäßig und gering differenzierte HCC. Größere Tumoren wiesen eine signifikant höhere Ki-67-, p53- ($p<0,01$) und bax- ($p<0,05$) Positivität, sowie eine niedrigere Fas-Expression ($p<0,01$) auf. Die Tumorgröße korrelierte direkt mit der M30-Expression ($p<0,01$). Mit ansteigendem pT-Stadium bis pT3 war eine Zunahme der M30-Expression ($p<0,01$) zu beobachten. Im Vergleich verschiedener morphologischer Erscheinungsformen des HCC zeigten basophil-pseudoglanduläre Areale eine signifikant gesteigerte Ki-67-Expression gegenüber eosinophil-trabekulären ($p<0,05$) und klarzellig-soliden ($p<0,01$) Arealen, klarzellig-solide Areale zeigten die niedrigste M30-Expression ($p<0,05$). Das fibrolamelläre Karzinom (FLC) zeigte ein gegenläufiges Expressionsmuster mit Fas-Verlust bei hoher FasL-Expression. Die untersuchten Metastasen wiesen im Vergleich zu ihren Primärneoplasien in der Tendenz eine gesteigerte Ki-67-Expression und einen vergleichbar hohen Fas-Verlust bei allerdings höherer FasL-Expression auf. Bei M. Wilson war die höchste p53-Expression und Apoptoserate (M30, TUNEL) in Referenzgewebe zu beobachten. Während makroregenerative Knoten (MRN) und fokale noduläre Hyperplasien (FNH) im Expressionsverhalten dem Referenzgewebe vergleichbar waren, zeigte das untersuchte hepatozelluläre Adenom (HCA) eine höhere Ki-67-Expression bei gleichzeitig niedrigerer Fas-Expression als angrenzendes Referenzgewebe. Dysplastische Knoten zeigten im Vergleich zu MRN einen signifikanten Fas-Verlust ($p<0,05$) und waren erst von gering differenzierten HCC, die

die niedrigste Fas-Expression aufwiesen, zu unterscheiden ($p<0,05$). Die Ki-67-Expression korrelierte höchst signifikant mit einer Progression von MRN über dysplastische Knoten hin zu hoch, mäßig und gering differenzierten HCC. Eine p53- und bax-Expression war nur in Dysplasien mit höhergradiger Atypie (HG-DN) zu beobachten.

Kurzgefasste Diskussion der Ergebnisse: In unseren Untersuchungen wiesen HCC gegenüber Referenzgewebe eindeutige Veränderungen auf, die auf eine molekulare Dysregulation schließen lassen und bei gleichzeitig erhöhter Proliferations- und Apoptoserate Indiz für einen erheblich gesteigerten Zellumsatz sind. Der bekannte Fas-Verlust in HCC impliziert einerseits ein Umgehen der FasL-vermittelten Apoptose, andererseits war trotz verminderter FasL-Expression gegenüber Referenzgewebe abschnittsweise in HCC eine höhere FasL-Expression zu beobachten. Dadurch könnte eine Apoptoseinduktion immunkompetenter Lymphozyten bzw. angrenzenden Lebergewebes erfolgen. Dieses gegenläufige Expressionsmuster scheint umso mehr Bedeutung zu besitzen, als es sich gerade in den untersuchten Metastasen und im zu frühzeitiger Metastasierung neigenden fibrolamellären Karzinom feststellen ließ und dem Fas/FasL-System damit über das Phänomen der „Immunevasion“ eine wesentliche Bedeutung in der Karzinogenese zuweist. Neben dem Fas-/FasL-System stehen Störungen des Tumorsuppressorgens p53 und seines Genprodukts in der Diskussion der Hepatokarzinongenese. In unseren Untersuchungen scheint die höchste nachgewiesene p53-Positivität in Referenzgewebe bei M. Wilson einem physiologischen, möglicherweise oxidativ induzierten wt-p53-Protein zu entsprechen. Dagegen dürfte die in HCC gehäuft zu beobachtende p53-Expression am ehesten Ausdruck der Akkumulation eines funktionslosen Proteins sein. HBV-assoziierte HCC wiesen zudem eine höhere p53-Positivität auf als HCC anderer Ätiologie, was nach bisherigem Erkenntnisstand als p53-Genmutation durch DNA-Integration oder p53-Interaktion mit dem HBx-Genprodukt interpretiert wird. Die p53-Mutation wird als spätes Ereignis einer „Multistepkarzinogenese“ diskutiert, wofür in unseren Untersuchungen einerseits ein höherer p53-Nachweis in größeren und mäßig bzw. gering differenzierten HCC spricht. Andererseits war aber p53 auch in Dysplasien höhergradiger Atypie nachweisbar, ein Hinweis auf einen möglichen zweiten Pathogeneseweg mit direktem Übergang von höhergradiger Dysplasie in ein gering differenziertes Karzinom ohne den Weg über zunächst höher differenzierte

Karzinome. Nachdem in der vorgelegten Arbeit p53 nur auf Proteinebene untersucht wurde, sind keine Aussagen zum Vorkommen oder zur Häufigkeit von p53-Mutationen möglich. Zur Klärung dieser Frage ist eine Gensequenzierung erforderlich. In Dysplasien war neben der erhöhten p53-Akkumulation ein erheblicher Fas-Verlust zu verzeichnen. Unsere Ergebnisse stützen somit die in der Literatur favorisierte Hypothese der Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Ob dagegen das Expressionsmuster des HCA mit erhöhter Ki-67-Expression und verminderter Fas-Expression als Hinweis auf eine mögliche Transformation im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz zu werten ist oder allgemeines Neoplasie-Merkmal darstellt, das sich auch im gutartigen Adenom manifestiert, ist anhand der vorliegenden Studie nicht abschließend zu klären.

Im interindividuellen Vergleich der HCC wiesen gering differenzierte HCC die höchste Proliferationsrate und den größten Fas-Verlust auf. Das heißt, die immunhistochemischen Ergebnisse widerspiegeln den histologischen Differenzierungsgrad und lassen sich als Indiz für eine Korrelation zwischen Phänotyp und Veränderungen auf molekularer Ebene deuten. Mit zunehmender Tumorgröße war ein gesteigerter Zellumsatz zu beobachten. Die von uns erstmalig vorgenommene Unterscheidung morphologisch verschiedener Phänotypen des HCC mit partiell signifikanten Unterschiede im Proliferations- und Apoptoseverhalten gibt Hinweise darauf, dass zusätzlich zu den konventionell erfassten Differenzierungsgraden auch andere strukturelle und zytologische Eigenschaften für die Prognose von HCC von Bedeutung sein könnten. Insbesondere trifft dies für basophil-pseudoglanduläre Karzinome bei höherer Proliferationsrate zu. Ob ätiologische Faktoren für die Induktion bestimmter Phänotypen verantwortlich sind, konnte durch diese Untersuchung nicht geklärt werden.

Eine erhöhte Apoptoserate trotz Fas-Verlust in HCC deutet darauf hin, dass zum einen neben dem Fas/FasL-System weitere Signaltransduktionswege (z.B. bax) in die Apoptoseinduktion involviert sind, und zum anderen die Induktion des programmierten Zelltods auch in fortgeschrittenen HCC zu beobachten ist. Daraus könnten sich nach weitergehender Aufklärung der molekularen Mechanismen therapeutische Ansätze ergeben. Unsere Ergebnisse könnten Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen der Hepatokarzinogenesemechanismen liefern und für eine daraus resultierende differenzielle molekularpathologische Diagnostik als Grundlage einer zielgerichteten molekular definierten Therapie.

8. Literaturverzeichnis

1. Aaltomaa, S., P. Lipponen, S. Vesalainen, M. Ala-Opas, M. Eskelinen, K. Syrjänen.
Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer.
European Urology 32: 410-415, 1997.

2. Ansari, B., P. J. Coates, B. D. Greenstein, P. A. Hall.
In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states.
Journal of Pathology 170: 1-8, 1993.

3. Anthony, P.
Precursor Lesions for Liver Cancer in Humans.
Cancer Research 36: 2579-2583, 1976.

4. Benvegnu, L., A. Alberti.
Risk Factors and Prevention of Hepatocellular Carcinoma in HCV Infection.
Digestive Diseases and Sciences 41 (12): 49S-55S, 1996 Supplement.

5. Benvegnu, L., A. Alberti.
Patterns of heptocellular carcinoma development in hepatitis B virus and heptitis C virus related cirrhosis.
Antiviral Research 52: 199-207, 2001.

6. Bisceglie di, A. M.
Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma.
Seminars in Liver Disease 15 (1): 64-69, 1995.

7. Blanc, J. F., D. De Ledinghen, P. Trimoulet, B. Le Bail, P.-H. Bernard, J. Saric, Ch. Balabaud, P. Bioulac-Sage.
Premalignant lesions and hepatocellular carcinoma in a non-cirrhotic alcoholic patient with iron overload and normal transferrin saturation.
Journal of Hepatology, 30: 325-329, 1999.

8. Bosari, S., G. Viale.
The clinical significance of p53 aberrations in human tumours.
Virchows Archiv 427: 229-241, 1995.

9. Bosch, F. X., J. Ribes, J. Borras.
Epidemiology of Primary Liver Cancer.
Seminars in Liver Disease 19 (3): 271-285, 1999.

10. Bosserhoff, A. K., C. Hellerbrand, R. Buettner.
Klinische und genetische Aspekte der hereditären Hämochromatose.
Pathologe, 22: 191-196, 2001

11. Brechot, C., D. Gozuacik, Y. Murakami, P. Paterlini-Brechot.
Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC).
Seminars in Cancer Biology 10, 211-231, 2000.

12. Bühl, A., P. Zöfel.
SPSS 11. Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. 8. Auflage.
Addison-Wesley.

13. Carson, D. A., L. M. Ribeiro.
Apoptosis and disease.
Lancet 341: 1251-1254, 1993.

14. Charlotte, F., A. L'Hermine, N. Martin, Y. Geleyn, M. Nollet, Ph. Gaulard, E. S. Zafrani.
Immunhistochemical Detection of bcl-2 Protein in Normal and Pathological Human Liver.
American Journal of Pathology 144 (3): 460-465, 1994.

15. Chen, P.-J., D.-S. Chen.
Hepatitis B Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Genetics and Clinical Perspectives.
Seminars in Liver Disease 19 (3): 253-262, 1999.

16. Cheng, J., T. Zhou, C. Liu, J. P. Shapiro.
Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule.
Science 263: 1759-1762, 1994.

17. Chuang, W. Y., T.C. Cheng, H. L. Hsu, W. C. Lee, L. B. Jeng, S. F. Huang.
Liver cell adenoma with concomitant hepatocellular carcinoma: report of two cases.
Journal of Formos Medical Association (Abstract) 101 (11): 798-802, 2002.

18. Colombo, M.
Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma.
Seminars in Liver Diseases 19 (3): 263-269, 1999.

19. Cross, S. M., C. A. Sanchez, C. A. Morgan, M. K. Schimke, S. Ramel, R. L. Idzerda, W. H. Rasking, B. J. Reid.
A p53-dependent mouse spindle checkpoint.
Science 267: 1353-1356, 1995.

20. Degos, F.
Hepatitis C and alcohol.
Journal of Hepatology 31 (Suppl. 1): 113-118, 1999.

21. Denk, H., C. Stumptner, A. Fuchsbichler, K. Zatloukal.
Alkoholische und nichtalkoholische Steatohepatitis.
Pathologe 22: 388-398, 2001.

22. Donato, M. F., E. Arosio, E. Del Ninno, G. Ronchi, P. Lampertico, A. Morabito, M. R. Balestrieri, M. Colombo.
High Rates of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients With High Liver Cell Proliferative Activity.
Hepatology 34: 523-528, 2001.

23. Dutta, U., J. Kench, K. Byth, M.K. Khan, R. Lin, Ch. Liddle, G.C. Farrell.
Hepatocellular Proliferation and Development of Hepatocellular Carcinoma: A Case-Controll Study in Chronic Hepatitis C.
Human Pathology 29: 1279-1284, 1998.

24. Edmondson, H. A., P. E. Steiner
Primary Carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies.
Cancer 7: 462-503, 1954.

25. Ehrmann, J., D. Galuszkova, J. Ehrmann, I. KRC, V. Jezdinska, B. Vojtesek, P. Murray, Z. Kolar.
Apoptosis relates Proteins, BCL-2, BAX, FAS, FAS-L and PCNA in Liver Biopsies of Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection.
Pathology Oncology Research 6 (2): 130-135, 2000.

26. El-Serag, H. B., J. A. Davila.
Is fibrolamellar carcinoma different from hepatocellular carcinoma? A US-population based study.
Hepatology, 39: 798-803, 2004.

27. Fausto, N.
Liver regeneration.
Journal of Hepatology 32 (Suppl. 1): 19-31, 2000.

28. Ferrell, L.
Liver Pathology: Cirrhosis, Hepatitis, and Primary Liver Tumors. Update and Diagnostic Problems.
Modern Pathology 13 (6): 679-704, 2000.

29. Flemming, P., L. Wilkens, H.H. Kreipe.
Histopathologische Diagnostik primärer Lebertumoren.
Pathologe 22: 184-190, 2001.

30. Fracanzani, A. L., D. Conte, M. Fraquelli, E. Taioli, M. Mattioli, A. Losco, S. Fargion.
Increased cancer risk in cohort of 230 Patients with Hereditary Hemochromatosis in Comparison to Matched Control Patients with non-iron-related chronic liver disease.
Hepatology, 33: 647-651, 2001.

31. Fukuzawa, Y., K. Takahashi, K. Furuta, T. Tagaya, T. Ishikawa, K. Wada, Y. Omoto, T. Koji, S. Kakumu.
Expression of Fas/Fas ligand (FasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC).
Journal of Gastroenterology 36: 681-688, 2001.

32. Galle P. R., P. H. Krammer.
CD95-Induced Apoptosis in Human Liver Disease.
Seminars in Liver Disease 18 (2): 141-151, 1998.

33. Galle, P.R., W.J. Hoffmann, H. Walczak, H. Schaller, G. Otto, W. Stremmel, P.H. Krammer, L. Runkel.
Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage.
Journal of Experimental Medicine 182: 1223-1230, 1995.

34. Gavrieli, Y., Y. Sherman, S. Ben-Sasson.
Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation.
The Journal of Cell Biology 119 (3): 493-501, 1992.

35. Geissler, M., A. Gesien, J. R. Wands.
Inhibitory effects of chronic ethanol consumption on cellular immune response to hepatitis C virus core protein are reversed by genetic immunizations augmented with cytokine-expressing plasmids.
Journal of Immunology 159: 5107-5113, 1997.

36. Gornicka, B., B. Ziarkiewicz-Wroblewska, T. Wroblewski, G. M. Wilczynski, L. Koperski, M. Krawczyk, A. Wasiutynski.
Carcinoma, a fibrolamellar variant – immunhistochemical analysis of 4 cases.
Hepatogastroenterology 52 (62): 519-523, 2005.

37. Grando-Lemaire, V., C. Guettier, S. Chevret, M. Beaugrand, J.-C. Trinchet.
Hepatocellular Carcinoma without cirrhosis in the West: epidemiological factors and histopathology of the non-tumorous liver.
Journal of Hepatology 31: 508-513,1999.

38. Green, D. R., J. C. Reed.
Mitochondria and Apoptosis.
Science 281: 1309-1312, 1998.

39. Greenblatt, M.S., W.P. Bennett, M. Hollstein, C.C. Harris.
Mutation in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis.
Cancer Research 54: 4855-4878, 1994.

40. Herold, Gerd et al.
Innere Medizin – Eine vorlesungsorientierte Darstellung, 2004.

41. Higaki, K., H. Yano, M. Kojiro.
Fas Antigen Expression and Its Relationship with Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma and Noncancerous Tissues.
American Journal of Pathology 149 (2): 429-437, 1996.

42. Hino, N., T. Higashi, K. Nouso, H. Nakatsukasa, T. Tsuji.
Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma.
Liver 16: 123-129, 1996.

43. Hiramatsu, N., N. Hayashi, K. Katayama, K. Mochizuki, Y. Kawanishi, A. Kasahara, H. Fusamoto, T. Kamada.
Immunhistochemical Detection of Fas Antigen in Liver Tissue of Patients with Chronic Hepatitis C.
Hepatology 19: 1354-1359, 1994.

44. Hofmann, W. J., M. Volkmann, D. Haag, G. Otto, P. R. Galle.
P53 overexpression in HCC is correlated with the proliferative activity but not with EGF-R expression in the tumors. (Abstract)
Hepatology 18: 185, 1993.

45. Hsia, C.C., Y. Nakashima, S. Thorgeirsson, C. Harris, M. Minemura, S. Momosaki, N.J. Wang, E. Tabor.
Correlation of immunhistochemical staining and mutations of p53 in human hepatocellular carcinoma.
Oncology Reports 7: 353-356, 2000.

46. Hsu, I. C., R. A. Metcalf, T. Sun, J. A. Welsh, N. J. Wang, C. C. Harris.
Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma.
Nature 350: 427-428, 1991.

47. Hytiroglou, P., ND. Theise, M. Schwartz, E. Mor, C. Miller, S. Thung.
Macroregenerative Nodules in a Series of Adult Cirrhotic Liver Explants: Issues of Classification and Nomenclature.
Hepatology 21: 703-708, 1995.

48. Intergen Company.
The Complete ApopTag® Manual.

49. International Agency for Research on Cander (IARC). Edited by Ferlay, J., D. M. Parkin, P. Pisani.
Cancer incidence and mortality worldwide.
IARC*Press*, Lyon 1998.

50. International Agency for Research on Cander (IARC). Edited by St. R. Hamilton, L. A. Aaltonen.
Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.
IARC*Press*, Lyon 2000.

51. International Union against Cancer (UICC).
TNM Classification of Malignant Tumours, 5. Auflage, 1997.

52. International Union against Cancer (UICC).
TNM Classifikation of Malignant Tumours, 6. Auflage, 2002.

53. International Working Party.
Terminology of Nodular Hepatocellular Lesions.
Hepatology 22:983-993, 1995.

54. Ishak, K. G., Z. D. Goodman, J. Th. Stocker.
Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts. 3rd Series. Fascicle 31. Published by the Armed Forces Institute of Pathology, 2001.

55. Ito, Y., M. Monden, T. Takeda, H. Eguchi, K. Umeshita, H. Nagano, S. Nakamori, K. Dono, M. Sakon, M. Nakamura, M. Tsujimoto, M. Nakahara, K. Nakao, Y. Yokosaki, M. Matsuura.
The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma.
British Journal of Cancer 82 (6): 1211-1217, 2000.

56. Ito, Y., N. Maatsuura, M. Sakon, T. Takeda, K. Umeshita, H. Nagano, S. Nakamori, K. Dono, M. Tsujimoto, M. Nakahara, K. Nakao, M. Monden.
Both cell proliferation and apoptosis significantly predict shortened disease-free survival in hepatocellular carcinoma.
British Journal of Cancer 81 (4): 747-751, 1999.

57. Ito, Y., T. Takeda, K. Umeshita, M. Sakon, K. Wakasa, N. Matsuura, M. Monden.
Fas antigen expression in hepatocellular carcinoma tissues.
Oncology Reports 5: 41-44, 1998.

58. Ito, Y., T. Takeda, Y. Sasaki, M. Sakon, M. Monden, T. Yamada, S. Ishiguro, S. Imaoka, M. Tsujimoto, N. Matsuura.
Bcl-2 expression in cholangiocellular carcinoma is inversely correlated with biologically aggressive phenotypes.
Oncology, 59: 63-67, 2000.

59. Jing, Z., K. J. Kan, M. L. Hu.
Cell proliferation, apoptosis and the related regulators p27, p53 expression in heptocellular carcinoma.
World Journal of Gastroenterology, 11 (13): 1910-1916, 2005.

60. Kang, Y.K., C.J. Kim, W.H. Kim, H.O. Kim, G.H. Kang, Y.I. Kim.
p53 Mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in the liver.
Virchows Archiv 432: 27-32, 1998.

61. Kanzler, S., P.R. Galle.
Apoptosis and the liver.
Seminars in Cancer Biology 10: 173-184, 2000.

62. Kojiro, M.
Histopathology of liver cancers.
Best Practical Research of Clinical Gastroenterology 19 (1): 39-62, 2005.

63. Kojiro, M., O. Nakashima.
Histopathologic Evaluation of Hepatocellular Carcinoma with Special Reference to Small Early Stage Tumors.
Seminars in Liver Disease, 19 (3): 287-296, 1999.

64. Koomagi, R., M. Volm.
Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predective relevance.
International Journal of Cancer 84: 239-243, 1999.

65. Kubo, K., Y. Matsuzaki, M. Okazaki, A. Kato, N. Kobayashi, K. Okita.
The Fas system is not significantly involved in apoptosis in human hepatocellular carcinoma.
Liver 18: 117-123,1998.

66. Kuper, H., A. Tzonou, E. Kaklamani, C. Hsieh, P. Lagiou, H.-O. Adami, D. Trichopoulos, S. O. Stuver.
Tobacca smoking, alcohol consumption and their interaction in the Causation of Hepatocellular Carcinoma.
Internat. Journal of Cancer 85: 498-502, 2000.

67. Labat-Moleur, F. , C. Guillermet, Ph. Lorimier, C. Robert, S. Lantuejoul, E. Brambilla, A. Negoescu.
TUNEL Apoptotic Cell Detection in Tissue Sections: Critical Evaluation and Improvement.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 46 (3): 327-334,1998.

68. Lane, D.P.
p53, guardian of the genome.
Nature 358: 15-16, 1992.

69. Lau, J., X. Xie, M. Lai, P.C. Wu.
Apoptosis and Viral Hepatitis.
Seminars in Liver Disease 18 (2): 169-176, 1998.

70. Lazutka J. R.
Genetic toxicity of cytokines.
Mutation Research 361: 95-105, 1996.

71. Le Bail, B., G. Belleannee, P.-H. Bernard, J. Saric, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage.
Adenomatous Hyperplasia in Cirrhotic Livers: Histological Evaluation, Cellular Densitiy, and Proliverative Activity of 35 Macronodular Lesions in the Cirrhotic Explants of 10 Adult French Patients.
Human Pathology 26: 897-906, 1995.

72. Lee, S.H., M.S. Shin, H.S. Lee, J.H. Bae, H.K. Lee, H.S. Kim, S.Y. Kim, J.J. Jang, M. Joo, Y. K. Kang, W.S. Park, J.Y. Park, S.Y. Han, J.H. Lee, S.H. Kim, J.Y. Lee, N.J. Yoo.
Expression of Fas and Fas-Related Molecules in Human Hepatocellular Carcinoma.
Human Pathology 32 (3): 250-256, 2001.

73. Leers, M., W. Kölgen, V. Björklund, T. Bergman, G. Tribbick, B. Persson, P. Björklund, F. Ramaekers, B. Björklund, M. Nap, H. Jörnvall, B. Schutte.
Immunocytochemical detection and mapping of cytokeratin 18 neo-epitop exposed during early apoptosis.
Journal of Pathology 187: 567-572, 1999.

74. Levine, A.J.
p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division.
Cell 88: 323-331, 1997.

75. Livni, N., A. Eid, Y. Ilan, A. Rivkind, E. Rosenmann, L. Blendis, D. Shouval, E. Galun.
p53 Expression in Patients with Cirrhosis with and without Hepatocellular Carcinoma.
Cancer 75 (10): 2420-2426, 1995.

76. Majno, G., I. Joris.
Apoptosis, Oncosis and Necrosis; an Overview of Cell Death.
American Journal of Pathology 146 (1): 3-15, 1995.

77. Makino, Y., K. Shiraki, K. Sugimoto, T. Ito, T. Yamanaka, K. Fujikawa, K. Takase, T. Nakano.
Histological Features of Cirrhosis with Hepatitis C Virus for Prediction of Hepatocellular Carcinoma Development; A Prospective Study.
Anticancer Research 20: 3709-3716, 2000.

78. Mathieu, D., H. Kobeiter, P. Maison, A. Rahmouni, D. Cherqui.
Oral Contraceptive Use and Focal Nodular Hyperplasia of the Liver.
Gastroenterology 118: 560-564, 2000.

79. Molino, A., r. Micciolo, M. Turazza, F. Bonetti, Q. Piubello, A. Bonetti, R. Nortilli, G. Pelosi, G. L. Cetto.
Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: assoziation with clinical and pathological variables and prognosis.
International Journal of Cancer 74: 433-437, 1997.

80. Möller, P., K. Koretz, F. Leithäuser, S. Brüderlein, C. Henne, A. Quentmeiner, Ph. Krammer.
Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal an neoplastic colon epithelium.
International Journal of Cancer 57: 371-377, 1994.

81. Momand, J., G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George, A. J. Levine.
The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.
Cell 69: 1237-1245, 1992.

82. Morcos, M., S. Dubois, M.-P. Bralet, J. Belghiti, C. Degott, B. Terris.
Primary Liver Carcinoma in Genetic Hemochromatosis Reveals a Broad Histologic Spectrum.
American Journal of Clinical Pathology, 116: 738-743, 2001.

83. Nagao, M., Y. Nakajima, M. Hisanaga, N. Kayagaki, H. Kanehiro, Y. Aomatsu, S. Ko, H. Yagita, T. Yamada, K. Okumura, H. Nakamo.
The Alteration of Fas Receptor and Ligand System in Hepatocellular Carcinomas: How do Hepatoma Cells Escape the Host Immune Surveillance In Vivo?
Hepatology 30: 413-421, 1999.

84. Nagata, S., P. Golstein.
The Fas Death Factor.
Science 267: 1449-1456, 1995.

85. Nakapoulou, L., K. Stefanaki, Ch. Vourlakou, N. Manolaki, H. Gakiopoulou, G. Michalopoulos.
Bcl-2 Protein Expression in Acute and Chronic Hepatitis, Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma.
Pathology, Research and Practice 195: 19-24, 1999.

86. Nanji, A.
Apoptosis and Alcoholic Liver Disease.
Seminars in Liver Disease 18 (2): 187-190, 1998.

87. Niederau, C., R. Fischer, A. Sonnenberg.
Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis.
New England Journal of Medicine, 313: 1256-1262, 1985.

88. Orsatti, G., ND. Theise, S. Thung, F. Paronetto.
DNA Image Cytometric Analysis of Macroregenerative Nodules (Adenomatous Hyperplasia) of the Liver: Evidence in Support of Their Preneoplastic Nature.
Hepatology 17: 621-627, 1993.

89. Owen-Schaub, L. B., W. Zhang, J. C. Cusack.
Wildtype human p53 and temperature-sensitive mutant induce FAS/APO-1 expression.
Molecular Cell Biology 15: 3032-3040, 1995.

90. Ozturk, M.
P53 mutation in heptocellular carcinoma after aflatoxin exposure.
Lancet 338: 1356-1359, 1991.

91. Ozturk, M.
Genetic Aspects of Hepatocellular Carcinogenesis.
Seminars in Liver Disease 19 (3): 235-242, 1999.

92. Park, Y.N., K.J. Chae, Y.B. Kim, D. Park, N. Theise.
Apoptosis and Proliferation in Hepatocarcinogenesis Related to Cirrhosis.
Cancer 92: 2733-2738, 2001.

93. Patel, T., L. Roberts, B. Jones, G. Gores.
Dysregulation of Apoptosis as a Mechanism of Liver Disease: An Overview.
Seminars in Liver Disease 18 (2): 105-114, 1998.

94. Pisani, P., D. M. Parkin, N. Munoz.
Cancer and infection: Estimates of the attribute fraction in 1990.
Cancer Epidemiology Biomark Preview 6: 387-400, 1997.

95. Pizem, J., V. F. Marolt, B. Luzar, A. Cör.
Proliferative and apoptotic activity in hepatocellular carcinoma and surrounding non-neoplastic liver tissue.
Pflügers Archiv – European Journal of Physiology 442 (Suppl. 1): R174-R176, 2001.

96. Randall G. Lee, C. Athanassios Tsamandas, A. J. Demetris.
Large cell change (Liver Cell Dysplasia) and Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Matched Case-Controll Study, Patholgical Analysis, and Pathogenetic Hypothesis.
Hepatology 26: 1415-1422, 1997.

97. Reed, J. C.
Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.
Journal of Cell Biology 124: 1-6, 1994.

98. Reed, J. C.
Bcl-2 family proteins.
Oncogene 17: 3225-3236, 1998.

99. Roskams, T., L. Libbrecht, B. Van Damme, V. Desmet.
Fas and Fas ligand: strong co-expression in human hepatocytes surrounding hepatocellular carcinoma; can cancer induce suicide in peritumoural cells?
Journal of Pathology 191: 150-153, 2000.

100. Rubin, E., J. L. Farber.
Pathology, 2nd Edition, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1994.

101. Ruggieri, A., T. Harada, Y. Matsuura, T. Miyamura.
Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein.
Virology 229: 68-76, 1997.

102. Sakamoto, M., S. Hirohashi, Y. Shimosato.
Early Stages of Multistep Hepatocarcinogenesis: Adenomatous Hyperplasia and Early Hepatocellular Carcinoma.
Human Pathology 22 (2): 172-178, 1991.

103. Schirmacher, P., W. Prange, V. Dries, H. P. Dienes.
Hochdifferenzierte hepatozelluläre Tumoren. Konzepte, Kriterien und Differenzialdiagnose.
Pathologe 22: 407-416, 2001.

104. Schneider, P., N. Holler, J.L. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontano, J. Tschopp.
Conversion of Membrane-bound Fas (CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity.
Journal of Experimental Medicine 187: 1205-1213, 1998.

105. Scholzen, T., J. Gerdes.
The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown.
Journal of Cellular Physiology 182: 311-322, 2000.

106. Shibata, M., T. Morizane, T. Uchida, T. Yamagami, Y. Onozuka, M. Nakano, K. Mitamura, Y. Ueno.
Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis-C-virus infection.
Lancet 351:1773-1777, 1998.

107. Shimotohno, K.
Hepatitis C virus and its pathogenesis.
Seminars in Cancer Biology 10: 233-240, 2000.

108. Shin, E.-C., J.-S. Shin, J.-H. Park, H. Kim, S.-J. Kim.
Expression of Fas Ligand in Human Hepatoma Cell Lines: Role of Hepatitis-B Virus X (HBX) in Induction of Fas Ligand.
Internat. Journal of Cancer 82: 587-591, 1999.

109. Shin, E.C., J.S. Shin, J.H. Park, J.J. Kim, H. Kim, S.J. Kim.
Expression of Fas-related genes in human hepatocellular carcinomas.
Cancer Letters 134: 155-162, 1998.

110. Soini, Y., N. Virkajärvi, V-P. Lento, P. Pääkkö.
Hepatocellular carcinomas with high proliferation index and a low degree of apoptosis and necrosis are associated with a shortened survival.
British Journal of Cancer 73, 1025-1030, 1996.

111. Soini, Y., P. Pääkkö, V.-P. Lehto.
Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer.
American Journal of Pathology 153 (4): 1041-1053, 1998.

112. Stal, P., R. Hultcrantz, L. Möller, L. C. Eriksson.
The Effekts of Dietary Iron on Initiation and Promotion in Chemical Hepatocarcinogenesis.
Hepatology 21: 521-528, 1995.

113. Strand, S., W.J. Hofmann, A. Grambihler, H. Hug, M. Volkmann, G. Otto, H. Wesch, S.M. Mariani, V. Hack, W. Stremmel, P.H. Krammer, P.R. Galle.
Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilsons`s disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis.
Nature Medicine 4 (5): 588-593, 1998.

114. Strand, S., W.J. Hofmann, H. Hug, M. Müller, G. Otto, D. Strand, S.M. Mariani, W. Stremmel, P.H. Krammer, P.R. Galle.
Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells – A mechanism of immune evasion?
Nature Medicine 2 (12): 1361-1366, 1996.

115. Su, Q., C. H. Schroder, G. Otto, P. Bannasch.
Overexpression of p53 protein is not directly related to hepatitis B x protein expression and is associated with neoplastic progression in hepatocellular carcinomas rather than hepatic preneoplasia. (Abstract)
Mutation Research 462 (2-3): 365-380, 2000.

116. Su, Q., P. Bannasch.
Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. (Abstract)
Toxicol Pathology 31 (1): 126-133, 2003.

117. Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, E. Daugas, H. G. Wang, S. Geley, F. Fassy, J. C. Reed, G. Kroemer.
The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis.
Journal of Experimental Medicine 186: 25-37, 1997.

118. Takahashi, M., H. Saito, T. Okuyama, T. Miyashita, M. Kosuga, F. Sumisa, M. Yamada, H. Ebinuma, H. Ishii.
Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis.
Journal of Hepatology 31: 315-322, 1999.

119. Tannapfel, A., C. Wittekind.
Präneoplasien der Leber. Definition-Differenzialdiagnose-klinische Konsequenz.
Pathologe 22: 399-406, 2001.

120. Terasaki, S., S. Kaneko, K. Koboyashi, A. Nonomura, Y. Nakanuma.
Histological Features Predicting Malignant Transformation of Nonmalignant Hepatocellular Nodules: A Prospective Study.
Gastroenterology 115: 1216-1222, 1998.

121. Theise, ND., K. Marcelin, M. Goldfischer, P. Hytiroglou, L. Ferrell, S. Thung.
Low proliferative activity in macroregenerative nodules: Evidence for an alternate hypothesis concering human hepatocarcinogenesis.
Liver 16: 134-139, 1996.

122. Thorgeirsson, S., T. Teramoto, V. Factor.
Dysregulation of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma.
Seminars in Liver Disease 18 (2): 115-122, 1998.

123. Truant, R., J. Antunovic, J. Greenblatt, C. Prives, J. A. Cromlish.
Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation.
Journal of Virology 69: 1851-1859, 1995.

124. Tsukuma H., T. Hiyama, S. Tanaka.
Risk factors associated for hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver diseases.
New England Journal of Medicine 328: 1797-1801, 1993.

125. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwigs-Maximalians-Universität und der Technischen Universität. 7. Auflage 2006
MANUAL - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Gastrointestinaler Tumoren: Primäre Lebermalignome
W. Zuckschwerdt Verlag München

126. Vautier, G., A. B. Bomford, B. C. Portmann.
P53 mutations in British Patients with hepatocellular carcinoma: clustering in genetic hemochromatosis.
Gastroenterology, 117: 154-160, 1999.

127. Volkmann, M., J.H. Schiff, Y. Hajjar, G. Otto, F. Stilgenbauer, W. Fiehn, P.R. Galle, W.J. Hofmann.
Loss of CD95 expression in linked to most but not all p53 mutants in European hepatocellular carcinoma.
Journal of Molecular Medicine 79: 594-600, 2001.

128. Walker, J.A., P. Quirke.
Viewing apoptosis through a ‚TUNEL'.
Journal of Pathology 195: 275-276, 2001.

129. Watanabe, S., K. Okita, T. Harada, T. Kodama, Y. Numa, T. Takemoto, T. Takahashi.
Morphologic Studies of the Liver Cell Dysplasia.
Cancer 51: 21d97-2205, 1983.

130. Wu, P.-C., VK-T. Lau, JW-S. Lai, JY-N. Lau.
Imbalance between cell proliferation and cellular DNA fragmentation in hepatocellular carcinoma.
Liver 19: 444-451, 1999.

131. Yamaguchi, R., T. Tajika, H. Kanda, K. Nakanishi, J. Kawanishi.
Fibrolamellar Carcinoma of the Liver.
Hepatogastroenterology 46: 1706-1709, 1999.

132. Yamanaka, T., K. Shiraki, S. Nakazawa, H. Okano, T. Ito, M. Deguchi, K. Takase, T. Nakano.
Impact of Hepatitis B and C Virus Infection on the Clinical Prognosis of Alcoholic Liver Cirrhosis.
Anticancer Research 21: 2937-2940, 2001.

133. Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. Peng, D. P. Jones, X. Wang.
Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked.
Science 275: 1129-1136, 1997.

134. Zerban, H., S. Radig, A. Kopp-Schneider, P. Bannasch.
Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability.
Carcinogenesis 15 (11): 2467-2473, 1994.

135. Zhao, M., A. Zimmermann.
Apoptosis in human hepatocellular carcinoma and in liver cell dysplasia is correlated with p53 protein immunoreactivity.
Journal of Clinical Pathology 50: 394-400, 1997.

136. Zhao, M., N.X. Zhang, J.A. Laissue, A. Zimmermann.
Immunhistochemical analysis of p53 protein overexpression in liver cell dysplasia and in hepatocellular carcinoma.
Virchows Archiv 424: 613-621, 1994.

137. Zhao, M., N.X. Zhang, M. Economou, I. Blaha, J.A. Laissue, A. Zimmermann.
Immunhistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions: bcl-2 protein is expresses in hepatocellular carcinomas but not in liver cell dysplasia.
Histopathology 25: 237-245, 1994.

138. Zhu, N., A. Khoshnan, R. Schneider, M. Matsumoto, G. Dennert, C. Ware, M. M. C. Lai.
Hepatitis C Virus Core Protein Binds to the Cytoplasmatic Domain of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 1 and Enhances TNF-Induced Apoptosis.
Journal of Virology 72: 3691-3697, 1998.

9. Anhang

9.1. Methodischer Anhang

9.1.1. Praktischer Ablauf der immunhistochemischen Färbungen

9.1.1.1. Vorbehandlung

In formalinfixiertem Gewebe kommt es häufig zur Bildung von überschießenden Aldehydvernetzungen, die die Gewebsantigene maskieren und somit eine Detektion durch immunhistochemische Verfahren verhindern. Deshalb wird an Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte eine Vorbehandlung angeschlossen, in der die Gewebsantigene demaskiert und damit für den Primärantikörper zugänglich gemacht werden.

Die Präparate wurden dazu in Puffern, die für den darauf folgenden Primärantikörper geeignet sind, bei 750 Watt für 15 bzw. 30 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Um Siedeverzug auszugleichen, wurde nach jeweils 10 Minuten Puffer aufgefüllt. Es folgte eine Abkühlungszeit von 20 Minuten. Die Schnitte wurden dann 2x5 Minuten in 50mM TRIS-Puffer gespült.

9.1.1.2. Avidin-Biotin-Methode

Es wurde mit VECTASTAIN UNIVERSAL ELITE ABC-Kit (Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) und DAKO LSAB-Kit (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark) gearbeitet.

Vorbehandlung	
Blockierung mit Wasserstoffperoxid (7,5%)	10 min.
Spülen unter fließenendem Wasser	10 min.
Spülen in TRIS-Puffer	2 x 5 min.
Proteinblockierung	LSAB 10 min. ABC-Elite 20 min.
Biotinblockierung	Avidin 10 min. + Biotin 10 min.

Spülen in TRIS-Puffer	2 x 5 min.
Primärantikörper	60 min.
Spülen in TRIS-Brij-Puffer Brij dient der Reduktion der Oberflächenspannung	2 x 5 min.
Brückenantikörper	30 min.
Spülen in TRIS-Brij-Puffer	2 x 5 min.
Komplex des ABC-Elite- oder LSAB-Systems	30 min.
Spülen in TRIS-Brij-Puffer	2 x 5 min.
Färbung in AEC-Lösung	15 min.
Spülung unter fließendem Wasser	10 min.
Hämalaun Gill's Formula	30-60 sek.
Bläuung unter fließendem Wasser	10 min.
Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine	

9.1.1.3. APAAP-Methode

Vorbehandlung	
Spülen in TRIS-Puffer	2 x 5 min.
Primärantikörper	60 min.
Spülen in TRIS-Brij-Puffer Brij dient der Reduktion der Oberflächenspannung	2 x 5 min.
APAAP-Anti-Mouse-IgG (1:25)	30 min.
Spülen in TRIS-Brij-Puffer	2 x 5 min.
APAAP-Komplex (1:50)	30 min.
Spülen in TRIS-Brij-Puffer	2 x 5 min.
APAAP-Anti-Mouse-IgG (1:25)	10 min.
Spülen in TRIS-Brij-Puffer	2 x 5 min.
APAAP-Komplex (1:50)	10 min.
Spülen in TRIS-Brij-Puffer	2 x 5 min.
Färbung mit FAST RED	10 min.
Spülung unter fließendem Wasser	10 min.
Hämalaun Gill's Formula	30-60 sek.
Bläuung unter fließendem Wasser	10 min.
Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine	

9.1.2. Praktischer Ablauf der TUNEL-Methode

9.1.2.1. Vorbehandlung

Im Anschluss an Entparaffinierung und Rehydierung wurden die Schnitte für 5 Minuten in 3%-igem Wasserstoffperoxid blockiert und dann 10 Minuten unter fließendem Wasser gewässert.

Nach 5-minütigem Einstellen in Aqua dest. wurden die Präparate zum enzymatischen Verdau für 10 Minuten bei 37^0C mit Proteinase K (5 µg/ml; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) inkubiert.

9.1.2.2. TUNEL-Methode

Zur Durchführung der TUNEL-Methode wurde mit ApopTag Peroxidase Kit (Fa. Intergen Company, New York, USA) gearbeitet.

Vorbehandlung	
Spülen in aqua dest.	3 x 2 min.
Equilibrierungspuffer 100µl	1 min.
Working Strength TdT Enzym (77µl/Schnitt)	60 min. bei 37^0C
Stop-Puffer-Lösung	10 min. bei 37^0C
Spülen in PBS-Puffer	3 x 2 min.
Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat (100µl/Schnitt)	60 min.
Spülen in PBS-Puffer	6 x 2 min.
Färbung mit DAB Plus	1 min.
Spülung unter fließendem Wasser	10 min.
Methylgrün	10 sek.
Spülen in aqua dest.	2 x 2 min.
Dehydrierung in 100%-igem Alkohol	5 min.
Dehydrierung in Xylol	5 min.
Eindecken mit Vectamount	

9.1.3. Reagenzien für Immunhistochemie

<table>
<tr><td>Entparaffinierung:</td><td colspan="2">Xylol..... 30 Minuten
100% Alkohol..... 5 Minuten
96% Alkohol..... 5 Minuten
70% Alkohol..... 5 Minuten
Aqua dest..... 10 Minuten</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Puffer für die Mikrowellen-vorbehandlung</td><td>Citrat:</td><td>9ml Stammlösung A: 0.1 M Zitronensäure
(=21.01g in 1000ml Aqua dest.)
(Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #244)
41ml Stammlösung B:0.1M Natriumcitrat
(=29.41g in 1000ml Aqua dest.)
(Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #6448)
450ml Aqua dest.
10mM pH 6.0</td></tr>
<tr><td>TRS 6:</td><td>1:10 Verdünnung mit Aqua dest. / pH 6.0
(Fa. DAKO, Carpinteria, USA, S1699)</td></tr>
<tr><td>TRS 9</td><td>1:10 Verdünnung mit Aqua dest. / pH9.9
(Fa. DAKO, Carpinteria, USA, S3307)</td></tr>
<tr><td>Glyca:</td><td>1:10 Verdünnung mit Aqua dest. / pH 7.4
(Fa. BioGenex, San Ramon, USA, HK167-5K)</td></tr>
<tr><td>H2O2</td><td colspan="2">7.5%, 1:4 Verdünnung mit Aqua dest., 30% Perhydrol
(Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #7209)</td></tr>
</table>

Verdünnungsmedien für Antikörper:	
DAKO-Medium (DM)	Antibody Diluent with Background Reducing Components (Fa. DAKO, Carpinteria, USA, S3022)
Rotes Medium	0,25g Natriumacid (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, S2002) 25ml Rinderserum 25ml RPMI 1640 Medium (Fa. Seromed, Berlin, 225ml Aqua dest. mit 1M NaOH (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #9137) auf pH 7.4 einstellen
Biotinblockierung	Biotin Blocking System (Fa. DAKO, Carpinteria, USA, X0590)
ABC- Kit:	Vectastain Universal Elite ABC Kit (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA, PK-6200)
LSAB-Kit	Fa. DAKO, Carpinteria, USA, K 681
APAAP-System:	
Anti-Mouse-IgG	1:25 Verdünnung mit Medium (1:8 Humanserum:RM) Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins (Fa. DAKO, Blostrup, Dänemark, Z02259)
Komplex	1:50 Verdünnung mit RM APAAP Mouse Monoclonal (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark, D0651)
TRIS-Puffer (50mM)	4.50g Trizma Base (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deuschland, T-1503) 34.25g Trizma Hydrochlorid (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deuschland, T-3253) 43.90g Natriumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #6404) 5l Aqua dest.
Brij-Zusatz	Brij35-Lösung (Fa.Merck, Darmstadt, Deutschland, #1894) 5ml Brij / 1000ml TRIS-Puffer

AEC-Lösung	20mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland, A-5754) in 12ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (Fa. Merck-Schurchardt, Hohenbrunn, Deutschland, #802912) auflösen und mit 100ml PBS-Brij mischen
PBS-Brij	0.93g Natriumdihydrophosphat-Monohydrat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #6346) 3.18g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #6580) 21.03g Natriumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #6404) 2500ml Aqua dest. 5ml Brij35-Lösung (Fa.Merck, Darmstadt, Deutschland, #1894) mit 1M HCl (Fa.Merck, Darmstadt, Deutschland, # 9057) auf pH 5.0-5.5 einstellen AEC-DMSO-PBS-Gemisch mit Aqua dest. auf 200ml auffüllen, 10µl 30% H_2O_2 zugeben, aufschütteln und filtrieren
Fast Red	"Sigma Fast" FastRed TR/Naphtol AS-MX (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, F4648)
Hämalaun	Hematoxylin Gill's Formula (Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA, H-3401)
Objektträger	Super Frost*Plus (Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
Eindeckmedium	Kaisers Glyceringelatine (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #9242)

9.1.4. Reagenzien für TUNEL

H2O2	3%, 1:10 Verdünnung mit PBS-Puffer (siehe unten), Perhydrol 30% (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland,#7209)
Proteinase K Stammlösung: Gebrauchslösung:	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, P-6556 50µg/ml PBS-Puffer 1:10 Verdünnung der Stammlösung mit PBS-Puffer
TUNEL-Kit	ApopTag Peroxidase Kit S7100 (Fa. Intergen Company, New York, USA)
PBS-Puffer	7.80g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #6346) 34.40g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #6580) 58.50g Natriumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #6404) 5l Aqua dest. mit 1 M NaOH auf pH 7.4 einstellen (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, #9137)
DAB plus	Liquid DAB+ Substrate-Chromogen Solution (Fa. DAKO, Carpinteria, USA, K3467)
Methylgrün	Methylgreen Counterstain (Fa. Zymed, San Francisco, USA, 00-8002)
Eindeckmedium	Vectamount (Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA, H-5000)

9.2. Tabellen zur Kollektivübersicht

Legende:

Diagnose	Undiff	Undifferenziertes Karzinom
	LZ	Leberzirrhose
Geschlecht	m	männlich
	w	weiblich
Ätiologie	HBV	Hepatitis B
	HCV	Hepatitis C
	HDV	Hepatitis D
	HH	Hereditäre Hämochromatose
Lokalisation	LL	Leberlappen
Material	PE 3	Probeexzision (aus Lebersegment 3)
	TR 5, 6	Leberteilresektat Lebersegmente 5 und 6
	TR (li)	Leberteilresektat *aus dem* linken Leberlappen
	Hemi (re)	Leberteilsresektat *gesamter* rechter Leberlappen
	Expl. Leber	Explantierte Leber
Selektierte Areale nach Morphologie	klar	Klarzellig-solide
	Eosino	Eosinophil-trabekulär
	Baso	Basophil-pseudoazinär
Entitäten	RG	Referenzgewebe
	MRN	Makroregenerativer Knoten
Dysplastischen Knoten	LG-DN	Low-grade Dysplastischer Knoten
	HG-DN	High-grade Dysplastischer Knoten

Tabelle 37: Kollektivübersicht maligne Läsionen der Leber Teil 1

Diagnose	Alter	Geschlecht	Ätiologie	Tumorgröße (in cm)	Lokalisation	Material	Herde (Anzahl)	Tumorstadium	Metastasen
HCC 1	63,08	m		3,80	rechter LL	TR 5,6	2	pT3NxMx	
HCC 2	70,57	m		2,70	linker LL	TR 4	1	pT2NxMx	
HCC 3	59,20	m		2,20	beide LL	Expl. Leber	5	pT3NxMx	
HCC 4	49,56	m	Alkohol	10,50	rechter LL	Expl. Leber	3	pT4NxMx	
HCC 5	67,29	w	Alkohol	1,70	linker LL	TR 2	1 + M	pT1NxM**1**	Netz
HCC 6	57,54	m	Alkohol	4,50	linker LL	Expl. Leber	1	pT3NxMx	
HCC 7	68,11	m		6,50	rechter LL	TR 4,5(re)	?	pT2NxMx	
HCC 8	66,29	m	HCV	2,20	rechter LL	TR 6	1	pT2NxMx	
HCC 9	58,93	m	Alkohol	5,50	beide LL	Expl. Leber	4	pT4NxMx	
HCC 10	49,09	m	HCV	5,50	rechter LL	Expl. Leber	1	pT2NxMx	
HCC 11	67,05	m		7,60	rechter LL	TR 6,7	1	pT3NxMx	
HCC 12	66,98	m	HH		rechter LL	Stanze	1	pTxNxMx	
HCC 13	1,50	m		1,70	linker LL	Expl. Leber	2	pT2NxMx	
HCC 14 (+CCC)	60,56	m		4,50	linker LL	TR (li)	1 HCC	pT3NxMx	
HCC 15	67,60	m	HH	3,70	rechter LL	TR 6	1	pT2NxMx	
HCC 16	70,51	m	HH	3,50		TR	1	pT2N0Mx	
HCC 17	66,98	m		6,10	rechter LL	TR (re)	2	pT3NxMx	
HCC 18	42,35	m	HBV+HDV	3,50	rechter LL	Expl. Leber	1	pT2NxMx	
HCC 19	58,48	m		3,50	Hilus	Expl. Leber	1	pT3NxMx	
HCC 20	44,59	m	HCV	1,90	rechter LL	Expl. Leber	1	pT1NxMx	
HCC 21	74,00	w		3,90	rechter LL	TR 5,8	1	pT3NxMx	
HCC 22	68,14	m		13,00	rechter LL	TR 5,6,7	1	pT4N0Mx	
HCC 23	47,59	m	HCV	1,70	rechter LL	Expl. Leber	2	pT1NxMx	
HCC 24	66,60	m		5,00	rechter LL	Hemi re	1	pT3N0Mx	
HCC 25	46,19	m	HCV	2,50	Hilus	Expl. Leber	1	pT2N0Mx	
HCC 26	41,94	m		3,20	beide LL	Expl. Leber	2	pT4NxMx	
HCC 27	57,81	m	HCV	1,20	beide LL	Expl. Leber	3	pT4NxMx	
HCC 28	59,02	m		3,30	beide LL	Expl. Leber	4	pT4NxMx	
HCC 29	60,22	m		3,80	rechter LL	TR 5,6	1	pT2NxMx	
HCC 30	65,61	m	HCV	2,00	rechter LL	Expl. Leber	1	pT1NxMx	
HCC 31	38,36	m		2,70	rechter LL	Expl. Leber	3	pT3NxMx	
HCC 32	56,24	m		1,50	beide LL	Expl. Leber	2	pT4NxMx	
HCC 33	57,39	m	HBV+HH	,80	rechter LL	Expl. Leber	?	pTxNxMx	
HCC 34	62,78	m		2,00	rechter LL	TR 7,8	1	pT1NxMx	
HCC 35	69,07	m	HCV	2,00	linker LL	Hemi (li)	1	pT1NxMx	
HCC 36	72,76	w	HCV	7,20		TR	1	pT4NxMx	
HCC 37	52,79	w	HCV	3,30	beide LL	Expl. Leber	2	pT4NxMx	
HCC 38	76,18	w		4,50	rechter LL	TR 6	?	pT2NxMx	
HCC 39	74,08	m		4,00	linker LL	TR 2,3	2	pT3NxMx	
HCC 40	56,93	m	HCV	3,30	rechter LL	Expl. Leber	2	pT3NxMx	
HCC 41	78,16	m	HBV	7,00	linker LL	Tumor+PE	2	pTxNxMx	
HCC 42	44,01	m	HCV	,50	rechter LL	Expl. Leber	1	pT1NxMx	
HCC 43	77,39	w	HCV	1,90	rechter LL	TR 8	1	pT1N0Mx	
HCC 44	58,21	m	HCV	2,00	beide LL	Expl. Leber	2	pT4NxMx	
HCC 45	46,14	m		4,50	beide LL	TR 4,5	3	pT4NxMx	
HCC 46	62,01	m		4,30	linker LL	Hemi (li)	3	pT3NxMx	
HCC 47	63,84	w	HCV	2,50	rechter LL	TR 8	1	pT2NxMx	
HCC 48	50,69	m	HBV	15,00	rechter LL	Hemi (re)	1	pT2N0Mx	
HCC 49	66,41	m		14,00	rechter LL	Expl. Leber	1	pT3NxMx	
HCC 50	54,05	m	HCV	2,50	rechter LL	Expl. Leber	1	pT2NxMx	
HCC 51 (FLC)	9,72	m			beide LL	PE re+li	2	pT4N**1**Mx	LK
HCC 52	65,80	w	HCV	3,60	rechter LL	TR 5,6	2	pT3NxMx	
CCC (+HCC)	60,56	m		4,50	linker LL	TR (li)	1 CCC	pT3NxMx	
Undiff 1	63,43	m	HBV+HCV	0,80	rechter LL	TR 6,7	2	pT2NxMx	
Undiff 2	64,43	w		17,00	beide LL	Hemi li+6,7	1	pT4N**1**Mx	LK

Tabelle 38: Kollektivübersicht maligne Läsionen der Leber Teil 2

Diagnose	Diff.grad mod. nach E&S (gesamter Fall)	Selektierte Areale nach Diff. grad	Selektierte Areale nach Morphologie	RG	Zirrhose	MRN	DN
HCC 1	2-3	2		RG	ja		
HCC 2	2	2		RG	ja		
HCC 3	2		eosino	RG	ja		HG-DN
HCC 4	3	3	baso	RG	ja		
HCC 5	3-4	3	klar	RG	ja		
HCC 6	3			RG	ja		
HCC 7	2			RG	nein		
HCC 8	2	2	baso/eosino/klar	RG	ja		
HCC 9	1-2	1	baso/eosino/klar	RG	ja		
HCC 10	2	2		RG	ja	MRN	
HCC 11	3	3	eosino	RG	nein		
HCC 12				RG	?		
HCC 13	1-2	1-2		RG	ja		LG-DN
HCC 14 (+CCC)	2			RG	nein		
HCC 15	2-3	2-3	klar	RG	ja		
HCC 16	3		baso	RG	ja		
HCC 17	2	2	eosino	RG	nein		
HCC 18	2-3	2-3	eosino	RG	ja		
HCC 19	1	1	eosino	RG	ja		
HCC 20	3			RG	ja		
HCC 21	4	4		RG	nein		
HCC 22	3	3		RG	ja		
HCC 23	3	3	klar	RG	ja		LG-DN
HCC 24	2	2		RG	nein		
HCC 25	2	2	klar	RG	ja		
HCC 26	2-3			RG	ja		LG-DN
HCC 27	2	2		RG	ja		
HCC 28	2-3			RG	ja		HG-DN
HCC 29	2-3			RG	ja		
HCC 30	1-2			RG	ja		HG-DN
HCC 31	1-2	1-2		RG	ja		HG-DN
HCC 32	2		eosino	RG	ja		
HCC 33	2	2		RG	ja		
HCC 34	3	3		RG	ja		
HCC 35	1-2	1-2		RG	ja		
HCC 36	2-3		baso	RG	ja		
HCC 37	2-3	2-3		RG	ja		
HCC 38	3	3	baso/eosino	RG	ja		
HCC 39	2	2		RG	ja		
HCC 40	2-3	2	klar	RG	ja	MRN	
HCC 41	2			RG	ja		
HCC 42	3-4	3-4	klar	RG	ja	MRN	HG-DN
HCC 43	2	2	eosino	RG	ja		
HCC 44	3			RG	ja		
HCC 45	3-4	3-4		RG	nein		
HCC 46	3		eosino	RG	ja		
HCC 47	3		klar	RG	ja		
HCC 48	2-3		baso	RG	nein		
HCC 49	2-3			RG	nein		
HCC 50	2-3	2-3		RG	ja		
HCC 51 (FLC)	2				nein		
HCC 52	2-3	2-3	klar	RG	ja		
CCC (+HCC)	2			RG	nein		
Undiff 1				RG	ja		
Undiff 2				RG	nein		

Tabelle 39: Resultate der immunhistochemischen Färbungen im Kollektiv der malignen Läsionen und in Gegenüberstellung zum jeweiligen Referenzgewebe

	p53		Ki-67		TUNEL		M30		bax		Fas		FasL	
	HCC	RG	HCC	RG	HCC	RG	HCC	RG	HCC	RG	HCC	RG	HCC	RG
HCC 1	5,75	0,00	10,41	0,00	0,58	0,24	1,20	0,00	1,17	0,00	3,09	10,00	6,52	9,50
HCC 2	0,00	0,00	0,70	0,20	0,86	0,24	0,01	0,00	0,00	0,00	2,50	10,00	10,00	10,00
HCC 3	1,10	0,00	0,59	0,12	0,57	0,27	0,22	0,00	0,40	0,00	5,30	9,40	7,20	8,80
HCC 4	9,40	0,00	6,89	0,20	0,86	0,18	0,40	0,00	4,13	0,00	0,00	10,00	0,50	5,00
HCC 5	0,00	0,00	6,89	0,20	0,38	0,07	0,00	0,00	5,00	0,50	0,00	10,00	0,50	5,00
HCC 6	0,00	0,00	0,20	0,07	6,67	0,65	0,90	0,00	0,50	0,00	1,00	9,00	0,50	0,00
HCC 7	0,00	0,00	3,85	0,20	0,38	0,63	0,00	0,00	0,04	0,00	0,48	10,00	9,25	7,00
HCC 8	0,00	0,00	7,17	0,55	0,33	0,09	0,01	0,03	0,00	0,00	2,00	10,00	3,70	9,50
HCC 9	0,00	0,00	2,97	0,08	1,01	0,76	0,28	0,01	1,19	0,50	1,59	10,00	6,77	7,00
HCC 10	0,00	0,00	2,40	0,00	0,53	0,63	0,01	0,10	0,00	0,00	0,00	9,30	10,00	7,70
HCC 11	0,00	0,00	2,66	0,30	0,61	0,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,50	3,50	8,00
HCC 12	29,00	0,00	6,50	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00		0,00	8,00	10,00	0,00	0,00
HCC 13	0,00	0,00	1,35	0,25	0,96	0,49	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,25	0,00	2,25
HCC 14 (+CCC)	0,00	0,00	0,20	0,05	1,03	0,96	0,06	0,00	1,00	0,00	1,00	7,00	7,00	6,50
HCC 15	0,00	0,00	0,96	0,10	0,37	0,00	0,01	0,00	0,71	0,00	6,86	10,00	5,00	9,00
HCC 16	3,47	0,00	3,53	0,20	0,80	0,12	0,10	0,01	0,00	0,00	10,00	9,50	10,00	10,00
HCC 17	1,85	0,00	34,85	0,05	3,11	0,80	0,03	0,00	7,10	0,00	0,20	9,00	0,00	10,00
HCC 18	1,80	0,00	1,15	0,30	0,86	0,23	0,00	0,00	0,50	0,00	10,00	10,00	3,00	7,00
HCC 19	0,00	0,00	1,60	0,20	2,30	1,43	0,03	0,00	2,00	0,00	9,00	10,00	10,00	9,30
HCC 20	2,23	0,00	24,01	0,77	2,72	0,42	0,00	0,00	6,00	0,00	10,00	9,33	4,00	8,60
HCC 21	0,00	0,00	24,70	0,35	0,64	0,81	0,30	0,00	6,00	0,50	1,00	10,00	9,00	8,00
HCC 22	20,47	0,10	62,23	0,60	2,93	0,60	0,16	0,00	9,50	0,00	0,00	8,50	2,70	10,00
HCC 23	0,01	0,00	1,18	1,10	1,48	1,02	0,00	0,05	1,06	0,80	2,13	9,00	5,69	7,00
HCC 24	0,00	0,00	0,70	0,00	0,80	0,40	0,08	0,00	0,00	0,00	10,00	9,00	10,00	2,00
HCC 25	0,00	0,00	1,51	0,20	0,44	0,48	0,00	0,00	1,81	0,50	4,15	10,00	7,39	10,00
HCC 26	2,73	0,00	4,04	0,00	0,61	0,25	0,30	0,00	0,33	0,00	0,40	10,00	4,70	6,00
HCC 27	12,72	0,00	7,52	0,18	2,91	0,70	0,00	0,00	1,67	1,00	0,67	10,00	5,00	9,00
HCC 28	2,13	0,00	3,50	0,18	0,89	0,45	0,05	0,00	2,50	0,75	1,30	10,00	4,50	8,00
HCC 29	0,68	0,00	14,65	1,15	1,32	0,34	0,16	0,00	4,59	0,00	1,42	10,00	3,33	9,00
HCC 30	0,50	0,00	0,80	0,37	3,05	0,81	0,00	0,00	0,50	0,67	6,17	9,67	6,70	6,75
HCC 31	4,59	0,00	2,50	0,13	3,23	2,68	0,03	0,00	1,45	0,80	2,67	9,75	4,79	6,60
HCC 32	0,00	0,00	3,23	0,30	3,11	0,63	0,06	0,00	0,75	0,00	2,50	9,50	4,00	4,00
HCC 33	0,40	0,00	1,40	0,93	0,85	1,79	0,03	0,02	3,67	0,16	2,00	10,00	7,00	9,50
HCC 34	0,00	0,00	13,15	0,30	0,74	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	4,00	8,50
HCC 35	0,00	0,00	2,69	0,25	0,33	0,37	0,01	0,00	2,17	1,00	7,00	9,00	7,00	8,00
HCC 36	75,60	0,00	10,78	0,00	1,25	0,36	0,00	0,00	0,72	0,50	1,64	10,00	0,00	5,50
HCC 37	0,16	0,00	6,72	0,33	0,94	0,24	0,00	0,00	0,00	0,75	2,33	9,50	0,00	3,00
HCC 38	0,00	0,00	7,83	1,20	0,34	0,23	0,05	0,00	2,86	0,00	2,14	10,00	9,78	9,70
HCC 39	7,33	0,00	0,67	0,06	1,33	3,47	0,16	0,00	0,00	0,25	2,00	9,25	8,70	10,00
HCC 40	3,41	0,00	2,57	0,40	1,16	0,31	1,38	0,00	0,83	0,00	4,79	10,00	9,00	10,00
HCC 41	14,54	0,00	25,33	4,00	0,45	0,30	0,18	0,00	4,72	3,00	6,61	10,00	5,28	9,00
HCC 42	0,08	0,00	2,30	0,20	0,16	0,65	0,01	0,00	0,00	0,50	2,00	8,75	7,00	9,50
HCC 43	0,00	0,00	0,30	0,07	1,67	0,20	0,06	0,00	3,50	0,00	3,50	10,00	6,50	1,70
HCC 44	2,63	0,00	0,00	0,03	1,90	1,29	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	9,67	1,50	2,50
HCC 45	0,00	0,00	20,49	1,67	0,65	0,34	0,00	0,00	0,90	0,00	0,97	9,67	8,10	10,00
HCC 46	4,22	0,00	9,68	0,08	1,15	0,35	0,30	0,00	1,28	0,00	3,17	10,00	8,50	9,50
HCC 47	1,85	0,00	1,35	0,20	2,28	0,24	0,04	0,00	0,17	0,00	1,00	10,00	0,00	9,50
HCC 48	8,90	0,00	8,55	0,45	1,56	0,39	0,43	0,00	2,00	1,00	0,00	9,50	6,50	7,50
HCC 49	5,65	0,00	2,00	0,10	2,05	0,23	0,52	0,00	3,00	0,00	0,00	3,00	7,00	10,00
HCC 50	1,30	0,00	0,80	0,25	0,30	0,72	0,01	0,00	1,00	1,00	4,00	10,00	9,00	5,50
HCC 51 (FLC)	2,10		4,40		0,53		0,01		1,00		1,00		10,00	
HCC 52	1,40	0,00	10,57	0,57	0,45	0,20	0,60	0,00	7,00	1,67	7,67	10,00	9,17	9,70
CCC (+HCC 14)	43,80	0,00	9,40	0,05	1,77	0,96	0,40	0,00	8,00	0,00	0,00	7,00	6,00	6,50
Undiff 1	99,0	0,00	30,8	0,10	2,00	0,35	0,12	0,00	1,00	0,33	0,00	10,00	1,50	9,00
Undiff 2	3,27	0,00	3,67	0,13	1,48	0,63	1,42	0,00	8,33	0,00	0,67	6,00	3,17	5,70
Meta HCC 5	0,00		41,66		1,06		0,04		1,00		0,00		7,00	
Meta Undiff 2	27,1		16,50		0,20		0,70		10,00		4,00		4,00	
Meta FLC	1,00		2,85		0,15		0,01		1,00		1,00		10,00	

Tabelle 40: Kollektivübersicht benigne Läsionen der Leber

Diagnose	Alter	Geschlecht	Ätiologie	Lokalisation	Material	RG	Zirrhose	MRN	DN
HG-DN	72,18	m		linker LL	PE 3	RG	nein		HG-DN
HCA	36,91	w		beide LL	TR 2,5	RG	nein		
FNH 1	36,24	w		beide LL	TR 4,5,6		nein		
FNH 2	36,81	w		rechter LL	TR re		nein		
FNH 3	19,54	w		beide LL	TR 4,5		nein		
LZ 1	53,44	m	HCV	-	Expl. Leber	RG	ja		
LZ 2	55,57	w	HCV	-	Expl. Leber	RG	ja		
LZ 3	49,58	m	HCV	-	Expl. Leber	RG	ja	MRN	
LZ 4	58,04	m	HCV	-	Expl. Leber	RG	ja		
LZ 5	15,26	w	M.Wilson	-	Expl. Leber	RG	ja		
LZ 6	36,64	w	HCV+Alkohol	-	Expl. Leber	RG	ja	MRN	

Tabelle 41: Resultate der immunhistochemischen Färbungen im Kollektiv der benignen Läsionen in Gegenüberstellung zum jeweiligen Referenzgewebe

	p53		Ki-67		TUNEL		M30		bax		Fas		FasL	
	Focus	RG	Focus	RG	Focus	RG	Focus	RG	Focus	RG	Focus	RG	Focus	RG
HG-DN	0,00	0,00	8,20	2,10	0,40	0,40	0,00	0,01	4,00	4,00	2,00	2,00	8,00	8,00
HCA	0,00	0,00	1,13	0,60	0,74	0,41	0,00	0,07	0,33	0,67	1,33	10,00	9,30	9,30
FNH 1	0,00		0,40		0,53		0,00		0,00		10,00		9,00	
FNH 2	0,00		0,10		0,33		0,01		0,00		10,00		9,00	
FNH 3	0,00		0,40		0,29						10,00		10,00	
LZ 1		0,00		0,00		1,20		0,00		0,00		10,00		0,00
LZ 2		0,00		0,00		0,25		0,03		1,00		10,00		6,00
LZ 3		0,00		0,15				0,01		1,00		9,50		8,50
LZ 4		0,00		0,33		1,03		0,00		0,00		10,00		8,67
LZ 5 (M.Wilson)		2,70		0,47		1,65		0,20		0,00		10,00		9,30
LZ 6		0,10		0,30		0,43		0,01		0,00		7,00		4,75

Tabelle 42: Resultate der immunhistochemischen Färbungen in nach Differenzierungsgraden selektierten Arealen

Grad	Areal aus Fall	p53	Ki-67	TUNEL	M30	bax	Fas	FasL
1	HCC 9	0,00	0,50	1,13	0,00	1,00	0,00	10,00
1	HCC 19	0,00	1,60	2,30	0,03	2,00	10,00	10,00
1-2	HCC 13	0,00	1,40	1,16	0,00	0,00	0,00	1,00
1-2	HCC 31	0,20	6,70	1,25	0,03	3,00	4,00	4,00
1-2	HCC 35	0,00	0,00	0,48	0,00	3,00	7,00	9,00
2	HCC 1	0,00	6,50	0,57	0,10	1,00	3,00	8,00
2	HCC 2	0,00	0,50	1,45	0,01	0,00	4,00	10,00
2	HCC 8	0,00	8,30	0,80	0,01	0,00	1,00	0,00
2	HCC 10	0,00	2,40	0,53	0,01	0,00	0,00	10,00
2	HCC 17	5,60	46,60	2,75	0,03	10,00	1,00	0,00
2	HCC 24	0,00	0,70	0,80	0,08	0,00	10,00	10,00
2	HCC 25	0,00	3,20	2,08	0,00	3,00	7,00	10,00
2	HCC 27	20,60	4,90	2,13	0,00	1,00	0,00	0,00
2	HCC 33	0,40	1,40	0,85	0,03	2,00	2,00	7,00
2	HCC 39	1,20	0,50	1,28	0,20	0,00	1,00	10,00
2	HCC 40	9,90	1,50	0,63	0,00	1,00	6,00	4,00
2	HCC 43	0,00	0,60	1,30	0,06	4,00	4,00	9,00
2-3	HCC 15	0,00	2,00	0,20	0,01	4,00	9,00	7,00
2-3	HCC 18	1,70	1,60	0,60	0,00	0,00	10,00	2,00
2-3	HCC 37	0,30	14,10	1,38	0,00	0,00	7,00	0,00
2-3	HCC 50	1,30	0,80	0,30	0,01	1,00	5,00	9,00
2-3	HCC 52	0,30	18,10	1,08	0,05	8,00	6,00	6,00
3	HCC 4	30,00	5,60		0,10	9,00	0,00	2,00
3	HCC 5	0,00	9,30	0,34	0,01	7,00	0,00	0,00
3	HCC 11	0,00	3,50	1,03	0,00	0,00	0,00	4,00
3	HCC 22	17,60	49,10	4,15	0,00	9,00	0,00	4,00
3	HCC 23	0,30	8,30	0,84	0,00	6,00	4,00	1,00
3	HCC 34	0,00	13,10	0,80	0,00	0,00	0,00	4,00
3	HCC 38	0,00	21,10	0,63	0,05	7,00	0,00	10,00
3-4	HCC 42	0,08	2,30	0,16	0,01	0,00	2,00	7,00
3-4	HCC 45	0,00	18,00	0,65	0,00	9,00	1,00	1,00
4	HCC 21	0,00	24,70	0,64	0,30	6,00	1,00	9,00
LG-DN	HCC 15	0,00	0,55	0,96	0,00	0,00	0,00	0,00
LG-DN	HCC 23	0,00	0,50	1,25	0,00	0,00	8,00	4,00
LG-DN	HCC 26	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	2,00	9,00
HG-DN	HCC 3	0,00	0,10	0,30	0,00	0,00	1,00	10,00
HG-DN	HCC 28	0,00	0,60	0,10	0,03	2,00	9,00	10,00
HG-DN	HCC 30	0,60	0,40	2,45	0,00	1,00	8,00	10,00
HG-DN	HCC 31	0,30	0,30	3,40	0,00	1,00	3,00	9,00
HG-DN	HG-DN	0,00	8,20	0,40	0,00	4,00	4,00	8,00
HG-DN	HCC 42	0,00	0,20	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00
MRN	HCC 10	0,00	0,00	0,53	0,10	0,00	10,00	7,00
MRN	LZ 3	0,00	0,10		0,01	1,00	9,00	10,00
MRN	LZ 6	0,00	0,10	0,67	0,00	0,00	7,00	5,00
MRN	HCC 40	0,00	2,00	0,37	0,00	0,00	7,00	9,00
MRN	HCC 42	0,00	0,40	0,44	0,00	1,00	9,00	9,00

Tabelle 43: Resultate der immunhistochemischen Färbungen in nach Morphologie selektierten Arealen

Morphologie	aus	p53	Ki-67	TUNEL	M30	bax	Fas	FasL
eosinophil	HCC 3	1,40	1,10	0,32	0,22	1,00	9,00	10,00
eosinophil	HCC 8	0,00	8,30	0,80	0,01	0,00	1,00	0,00
eosinophil	HCC 9	0,00	0,50	1,13	0,00	1,00	0,00	10,00
eosinophil	HCC 11	0,00	1,70	0,30	0,00	0,00	0,00	9,00
eosinophil	HCC 17	5,60	46,60	3,65	0,03	9,00	1,00	0,00
eosinophil	HCC 18	1,70	1,60	0,60	0,00	0,00	10,00	2,00
eosinophil	HCC 19	0,00	1,60	2,30	0,03	2,00	9,00	10,00
eosinophil	HCC 32	0,00	2,70	2,08	0,03	1,00	2,00	2,00
eosinophil	HCC 38	0,00	1,80	0,20	0,00	1,00	10,00	10,00
eosinophil	HCC 43	0,00	0,60	1,30	0,06	4,00	4,00	9,00
eosinophil	HCC 46	1,50	17,80	0,51	0,30	2,00	1,00	10,00
klarzellig	HCC 5	0,00	2,08	0,48	0,00	1,00	0,00	1,00
klarzellig	HCC 8	0,00	1,80	0,10	0,01	0,00	1,00	10,00
klarzellig	HCC 9	0,00	4,20	0,65	0,00	1,00	4,00	10,00
klarzellig	HCC 15	0,00	0,60	0,40	0,00	0,00	6,00	4,00
klarzellig	HCC 23	0,00	0,90	1,68	0,00	1,00	2,00	10,00
klarzellig	HCC 25	0,00	0,70	0,33	0,00	1,00	5,00	9,00
klarzellig	HCC 40	9,90	1,50	0,63	0,00	1,00	6,00	4,00
klarzellig	HCC 42	0,08	2,30	0,16	0,01	1,00	2,00	7,00
klarzellig	HCC 47	0,10	0,00	2,64	0,00	0,00	1,00	0,00
klarzellig	HCC 52	0,00	15,60	0,00	0,00	8,00	10,00	10,00
basophil	HCC 4	30,00	5,60		0,10	9,00	0,00	2,00
basophil	HCC 8	0,00	11,40	0,08	0,10	0,00	4,00	1,00
basophil	HCC 9	0,00	8,00	2,00	0,00	1,00	6,00	9,00
basophil	HCC 16	3,47	3,53	0,80	0,10	0,00	10,00	10,00
basophil	HCC 38	0,00	21,10	0,63	0,05	7,00	0,00	10,00
basophil	HCC 48	0,00	9,40	0,51	0,40	3,00	0,00	4,00
basophil	HCC 36	93,80	9,50	1,27	0,00	0,00	2,00	0,00
CCC	CCC	43,80	9,40	1,77	0,40	8,00	0,00	6,00
undiff	undiff 1	99,00	29,80	2,00	0,01	1,00	0,00	2,00
undiff	undiff 2	8,10	5,00	1,19	1,03	8,00	0,00	4,00

			p53			Ki-67			TUNEL			M30		
			Positive Fälle (in%)	Positive Zellen (in %)	Median	Positive Fälle (in%)	Positive Zellen (in %)	Median	Positive Fälle (in%)	Positive Zellen (in %)	Median	Positive Fälle (in%)	Positive Zellen (in %)	Median
HCC	Gesamt	n=52	59,6	0,01-75,6	0,59	98,1	0,20-62,2	3,10	100	0,16-6,67	0,86	69,2	0,01-1,38	0,03
	+ HCV	n=17	70,6	0,01-75,6	0,50	94,1	0,30-24,0	2,40	100	0,16-3,05	1,16	52,9	0,01-1,38	0,01
	+HBV	n=4	100	0,40-14,5	5,35	100	1,15-25,3	4,98	100	0,45-1,56	0,86	75,0	0,03-0,43	0,11
	+Alkohol	n=4	25	9,40	0,00	100	0,20-6,89	4,93	100	0,38-6,67	0,94	75,0	0,28-0,90	0,34
	+Hämo	n=4	75	0,40-29,0	1,94	100	0,96-6,60	2,47	100	0,29-0,85	0,59	75,0	0,01-0,10	0,02
	G1	n=5	20	0,20	0,00	80	0,50-6,70	1,40	100	0,48-2,30	1,16	40,0	0,03-0,03	0,00
	G2	n=17	52,9	0,30-20,8	0,30	100	0,50-46,6	2,00	100	0,20-2,75	0,85	70,6	0,01-0,20	0,01
	G3	n=10	40	0,08-30,0	0,00	100	2,30-49,1	11,2	100	0,16-4,15	0,65	50,0	0,01-0,30	0,01
	Eosinophil	n=11	36,4	1,40-5,60	0,00	100	0,50-46,6	1,70	90	0,20-3,65	0,80	63,6	0,01-0,30	0,03
	Klarzellig	n=10	30	0,08-9,90	0,00	90	0,60-15,6	1,65	100	0,10-2,64	0,44	20,0	0,01	0,00
	Basophil	n=7	42,9	3,47-93,8	0,00	100	3,53-21,1	9,40	100	0,08-2,00	0,72	71,4	0,05-0,40	0,10
	FLC	n=1	100	2,10		100	4,40		100	0,53		100	0,01	
CCC		n=1	100	43,8		100	9,40		100	1,77		100	0,40	
Undifferenziert		n=2	100	3,27-99,0	51,1	100	3,67-30,8	17,24	100	1,48-2,00	1,74	100	0,12-1,42	0,77
Metastasen		n=3	66,6	1,00-27,1	1,00	100	2,85-41,6	16,50	100	0,15-1,06	0,20	100	0,01-0,70	0,04
Dysplast. Knoten	Gesamt	n=9	22,2	0,30-0,60	0,00	100	0,10-8,20	0,40	88,9	0,10-3,40	0,88	11,1	0,03	0,00
	LG	n=3	0	0,00	0,00	100	0,40-0,55	0,50	66,7	0,96-1,25	0,96	0	0,00	0,00
	HG	n=6	33,3	0,30-0,60	0,00	100	0,10-8,20	0,35	100	0,10-3,40	0,64	16,7	0,03	0,00
Referenz-gewebe	Gesamt	n=61	4,9	0,10-2,70	0,00	86,9	0,03-4,00	0,20	96,7	0,07-3,47	0,42	19,7	0,01-0,20	0,00
	+LZ	n=48	6,25	0,10-2,70	0,00	87,5	0,03-4,00	0,20	97,9	0,07-3,47	0,42	20,8	0,01-0,20	0,00
	+HCC	n=51	2,0	0,10-0,10	0,00	88,7	0,03-4,00	0,20	96,1	0,07-3,47	0,40	11,8	0,01-0,10	0,00
MRN		n=5	0	0,00	0,00	80	0,10-2,00	0,10	100	0,37-0,67	0,49	40	0,01-0,10	0,00
FNH		n=3	0	0,00	0,00	100	0,10-0,40	0,40	100	0,29-0,53	0,33	33,3	0,01	0,00
HCA		n=1	0	0,00		100	1,13		100	0,74		0	0,00	

Tabelle 44: Ergebnisse der statistischen Datenanalyse

			bax			Fas			FasL		
			Positive Fälle (in%)	Positive Zellen (in %)	Median	Positive Fälle (in%)	Positive Zellen (in %)	Median	Positive Fälle (in%)	Positive Zellen (in %)	Median
HCC	Gesamt	n=52	76,5	0,04-9,50	1,00	82,7	0,20-10,0	2,00	88,5	0,50-10,0	6,50
	+HCV	n=17	70,6	0,17-7,00	0,83	94,1	0,67-10,0	2,33	82,4	1,50-10,0	6,50
	+HBV	n=4	100	0,50-4,72	2,84	75,0	2,00-10,0	4,31	100	3,00-7,00	5,89
	+Alkohol	n=4	100	0,50-5,00	2,66	50,0	1,00-1,59	0,50	100	0,50-6,77	0,50
	+Hämo	n=4	66,7	0,71-3,67	0,71	100	2,00-10,0	7,43	75,0	5,00-10,0	6,00
	G1	n=5	80,0	1,00-2,00	2,00	60,0	4,00-10,0	2,00	60,0	1,00-10,0	9,00
	G2	n=17	58,8	1,00-10,0	1,00	88,2	1,00-10,0	4,00	76,5	2,00-10,0	7,00
	G3	n=10	70	6,00-9,00	6,50	40,0	1,00-4,00	0,00	90,0	1,00-10,0	4,00
	Eosinophil	n=11	72,7	1,00-9,00	1,00	81,8	1,00-10,0	2,00	81,8	2,00-10,0	9,00
	Klarzellig	n=10	70	1,00-8,00	1,00	90,0	1,00-10,0	3,00	90,0	1,00-10,0	8,00
	Basophil	n=7	57,1	1,00-9,00	1,00	57,1	2,00-10,0	2,00	85,7	1,00-10,0	4,00
	FLC	n=1	100	1,00		100	1,00		100	10,0	
CCC		n=1	100	8,00		0	0,00		100	6,00	
undifferenziert		n=2		1,00-8,33	4,67	50,0	0,67	0,34	100	1,50-3,17	2,34
Metastasen		n=3		1,00-10,0	1,00	66,7	1,00-4,00	1,00	100	4,00-10,0	7,00
Dysplast. Knoten	gesamt	n=9	44,4	1,00-4,00	0,00	77,8	1,00-9,00	2,00	77,8	4,00-10,0	9,00
	LG	n=3	0	0,00	0,00	66,7	2,00-8,00	2,00	66,7	4,00-9,00	4,00
	HG	n=6	66,7	1,00-4,00	1,00	83,3	1,00-9,00	3,50	83,3	8,00-10,0	9,50
Referenz - gewebe	gesamt	n=61	41,0	0,16-4,00	0,00	100	1,25-10,0	10,0	95,1	1,70-10,0	8,00
	+LZ	n=48	43,8	0,16-3,00	0,00	100	1,25-10,0	10,0	95,8	1,70-10,0	8,55
	+HCC	n=51	39,2	0,16-3,00	0,00	100	1,25-10,0	10,0	96,1	1,70-10,0	8,00
MRN		n=5	40,0	1,00	0,00	100	7,00-10,0	9,00	100	5,00-10,0	9,00
FNH		n=3		0		100	10,0	10,0	100	9,00-10,0	9,00
HCA		n=1	100	0,33		100	1,33		100	9,3	

10. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Udo Löhrs möchte ich danken für die freundliche Aufnahme als Doktorandin in seinem Institut. Seine Vorlesung der Allgemeinen Pathologie hat mich durch ihre unverwechselbare Art – unterhaltsam und die Inhalte durch Anekdoten einprägsam – inspiriert zu einem Themengebiet der Pathologie zu promovieren. Über die Zeit als Direktor des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität hinaus hat er durch zielgerichtete fördernde und fordernde Art zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit hat Frau Dr. Sibylle Haraida geleistet. Ihr möchte ich besonders danken für die hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit, insbesondere für ihren sehr zeitintensiven Einsatz bei den gemeinsamen Stunden des Mikroskopierens. Sie hatte stets ein offenes Ohr für die anstehenden Probleme und half mir mit konstruktiven Ratschlägen und Diskussionsansätzen so manche Hürde zu überwinden.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich auch Frau Andrea Sendelhofert für die hervorragende Einführung in die „Mysterien der Immunhistochemie“. Frau Astrid Hirschmann danke ich für die Anleitung in der „TUNEL“- Hybridisierung, sie sorgte dafür, dass daraus kein Gang durch finstere Tunnel wurde. Beide haben für eine freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre gesorgt und standen mir mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung stets mit Rat und Tat zur Seite.

11. Lebenslauf

Name	EBNER, Veronika Christine
Geburtsdatum/-ort	18.11.1976 in Mühldorf a. Inn
Anschrift	Kronberg 42 84543 Winhöring

Schulbildung und Studium

09/1983 – 07/1987	Grundschule Altmühldorf
09/1987 – 06/1996	Ruperti-Gymnasium, Mühldorf a. Inn Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1996 – 06/2003	Studium der Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/1998	Ärztliche Vorprüfung
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Ausbildung

Famulaturen:

03/1999	Chirurgie (Kreiskrankenhaus Mühldorf: PD Dr. med. C. Hilber)
10/1999	Pathologie (Pathologisches Institut der LMU München: Prof. Dr. med. U. Löhrs)
04/2000	Gynäkologie und Geburtshilfe (Kreiskrankenhaus Altötting: Dr. med. G. Gastroph)
03/2001	Innere Medizin (Krankenhaus Dritter Orden, München: Dr. med. P. Weidinger)

Praktisches Jahr:

04/2002 – 07/2002	Chirurgie (Chirurgische Klinik der LMU, Innenstadt: Prof. Dr. med. W. Mutschler)
08/2002 – 10/2002	Gynäkologie und Geburtshilfe (Städt. Krankenhaus München-Neuperlach: PD Dr. med. G. Debus)

11/2002 – 02/2003	Innere Medizin (Städt. Krankenhaus München-Neuperlach: Prof. Dr. med. W. Schmitt)

Doktorarbeit:

seit 10/1999	Doktorandin am Pathologischen Institut der LMU München: Prof. Dr. med. U. Löhrs

Berufliche Tätigkeit

10/2003-09/2004	Ärztin im Praktikum und
seit 10/2004	Assistenzärztin Abteilung für Innere Medizin, Chefarzt Dr. med. K. Hahn Kreisklinik Altötting