

Aus dem Institut für Pathologie
des Diagnostikzentrums
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

Semiquantitative histopathologische und immunhistochemische
Merkmalsanalyse zur Differentialdiagnose primär hepatozellulärer
und primär cholangioduktaler Cholestasen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Jörg Wohlleben
aus Quedlinburg
Hamburg 2009

Angenommen an der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 25.02.2010

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Hansjörg Schäfer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Martina Sterneck

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. med. Rainer Ganschow

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Arbeitshypothese und Fragestellung	6
2. Einleitung	7 - 26
2.1. Embryologie der Intra- und Extrahepatischen Gallengänge.	8
2.1.1. Das extrahepatische Gallensystem.	8
2.1.2. Die intrahepatischen Gallengänge und die Duktalplatte.	9
2.1.3. Die Porta hepatis.	12
2.2. Theorien zur Entstehung von Gallengangsatresien.	12
2.2.1. Der Duktalplattenumbau.	12
2.2.2. Gefäßanomalien.	13
2.2.3. HNF 1 α .	14
2.2.4. Anormale Wechselwirkung zwischen Galle und Gallengangsepithelien.	14
2.2.5. Extrahepatische biliäre Atresie (EBA).	15
2.2.6. Beeinträchtigung der kanalikulären Motilität.	15
2.3. Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase (PFIC).	16
2.4. Sonstige Lebererkrankungen mit Cholestase und Lebererkrankungen ohne Cholestase.	17
2.5. Die mittels Immunhistochemie untersuchten hepatozellulären Antigene.	23
2.5.1. CD10 (Cluster of Differentiation 10).	24
2.5.2. CK7 (Cytokeratin 7).	24
2.5.3. MDR 3 (Multidrug-Resistant Protein 3).	25
2.5.4. CEACAM 1 (Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 1).	25

3.	Arbeitsmaterial und Methoden	27 - 39
3.1.	Gewebeproben.	27
3.2.	Fixierung.	27
3.3.	Patientenauswahl.	28
3.4.	Färbungen.	30
3.5.	Prozeduren und Auswertungsverfahren.	33
3.6.	MDR3- Versuche.	37
4.	Ergebnisse	40 - 84
4.1.	Die Cholestase und Gewebsveränderungen im Allgemeinen.	40
4.1.1.	Histologie mittels konventioneller Methoden.	41
4.1.2.	Immunhistochemische Parameter.	44
4.2.	Die primär cholangioduktale und die primäre hepatozelluläre Cholestase.	51
4.2.1.	Histologie mittels konventioneller Methoden.	52
4.2.2.	Immunhistochemische Parameter.	55
4.2.3.	Merkmalstabelle.	58
4.3.	Die Differentialdiagnose Morbus Wilson vs. primäre Galletransportstörung.	59
4.3.1.	Histologie mittels konventioneller Methoden.	60
4.3.2.	Immunhistochemische Parameter.	63
4.4.	Die Applikation der Merkmalsparameter auf Beispiele für cholestatische und cholestasefreie Erkrankungen.	67
4.5.	MDR3- Versuche.	79
5.	Diskussion	85 - 106
5.1.	Die Cholestase und Gewebsveränderungen im Allgemeinen.	85
5.1.1.	Histologie mittels konventioneller Methoden.	85
5.1.2.	Immunhistochemische Parameter.	86
5.2.	Der cholangioduktulale und der hepatozelluläre Typ der Cholestase: pathophysiologische Überlegungen.	90
5.2.1.	Histologie mittels konventioneller Methoden.	90

5.2.2. Immunhistochemische Parameter.	95
5.3. Der Morbus Wilson im Vergleich zur primär cholangio- duktale und primär hepatozellulären Cholestase.	101
5.4. Anwendung der Merkmalstabelle anhand ausgewählter Beispiele.	103
5.5. Fazit.	105
6. Zusammenfassung	107
7. Literaturverzeichnis	108
8. Anhang	114
8.1. Abkürzungsverzeichnis.	114
8.2. p-Wert-Tabellen der 2-seitige Signifikanz nach Fischers exaktem Test.	116
8.3. Die untersuchten Parameter.	119
8.4. Patiententabellen.	120
8.5. Danksagung.	122
8.6. Lebenslauf.	123
8.7. Erklärung.	124

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Cholestatische Erkrankungen der Leber können in obstruktiv und nicht-obstruktiv unterteilt werden. Hierbei stellen Neugeborene und Kinder eine besondere Patientengruppe dar, da sich hier neben Entzündungen und Gallensteinen gehäuft Stoffwechselkrankheiten mit Leberbeteiligung und angeborene Störungen des Gallenflusses finden. Zu diesen zählen Beeinträchtigungen der hepatozellulären Ausscheidung und die intra- und extrahepatischen Gallengangsatresien, deren pathogenetischer Hintergrund umstritten ist. Primär hepatozelluläre Cholestasen zeigen im Vergleich zu primär cholangioduktalen Cholestasen ein anderes Muster der Leberveränderungen. So ist die histopathologische Auswertung, unter anderem an der Feinnadelbiopsie, von großem klinischem Interesse und praktischer differentialdiagnostischer Bedeutung. Neben Hinweisen auf die Erkrankungsursache erlangt man einen Eindruck über die Ausprägung der Leberparenchymschädigung. Häufig erweist sich die Erkrankungseinordnung aufgrund von Degenerations- und Umbauvorgänge als schwierig. Da eine Therapie so spezifisch wie möglich zu erfolgen hat, kommt raschen und zielführenden diagnostischen Maßnahmen ein hoher Stellenwert zu. In dieser Arbeit wird die Aussagefähigkeit histopathologischer Kriterien zur Abgrenzung primär hepatozellulär von primär cholangioduktal bedingten Cholestasen untersucht. Es wird ein Kollektiv von 38 Leberproben des Pathologischen Instituts des UKE ausgewertet. Neben der deskriptiven lichtmikroskopischen Histologie hilft die Immunhistochemie beim Einblick in physiologische und pathophysiologische Vorgänge bei der Cholestase. So lässt sich die Epithelproliferation mit dem Mib-1-Antikörper und die hepatozelluläre Expression von Gallengangszytokeratin 7 als adaptive Cholestasereaktion werten. Das Adhäsionsprotein CEACAM 1 und das Epithelantigen CD 10 können als Indikatoren für Schäden des Bürstensaumes oder Störungen der polaren Differenzierung der Hepatozyten dienen. Die Anwendung des MDR3-Antikörpers erleichtert die Diagnosestellung einer PFIC 3 (Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase Typ 3), die in ihrer Pathogenese eine primär hepatozellulär bedingte Cholestase darstellt. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, in wieweit durch bestimmte diagnostische Merkmale die Schädigungsebene bei Störungen des Galletransportes präzisiert und so die Differenzierung von kindlichen cholestatischen Lebererkrankungen am Lichtmikroskop erleichtert werden kann.

2. EINLEITUNG

Im Alltag der pathologischen Diagnostik kindlicher cholestatischer Lebererkrankungen stehen zum Zeitpunkt der Leberbiopsie nicht selten weiterführende klinische Informationen, zum Beispiel aus der Humangenetik, aus. In diesem Fällen ist es angesichts unterschiedlicher Therapieoptionen von Interesse, zügig zwischen einer primär hepatozellulären Cholestase (im weiteren als *PHZC* abgekürzt) und einer primär cholangioduktalen Cholestase (im weiteren als *PCDC* abgekürzt) im Sinne einer duktaalen Galleabflussstörung zu unterscheiden.

Diese Arbeit befasst sich mit der Morphologie der Leber bei Cholestase, mit dem Ziel, diese Differenzierung zu erleichtern.

Hierbei wurden konventionelle und immunhistochemische Parameter semiquantitativ untersucht. Mit konventionellen Färbemethoden ist häufig eine grobe Unterscheidung zwischen einer *PHZC* und einer *PCDC* möglich. Die Immunhistochemie ergänzt und präzisiert die Abgrenzung dieser beiden großen Cholestasegruppen, indem sie Informationen über den Funktionszustand der Zellen und deren Schädigungsausmaß liefert. Zusätzlich gestattet sie Einblicke in die Umdifferenzierung hepatozellulärer Strukturen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die semiquantitative Auswertung der Lebermorphologie mit zwei Schwerpunkten.

Zunächst war es interessant zu wissen, wie sich die Lokalisation und Ausprägung der Cholestase auf allgemeine und immunhistochemische Merkmale auswirkt (4.1). Zum anderen konnte schließlich auf die Hauptfrage eingegangen werden, mit welchen Merkmalen die Unterscheidung zwischen einer *PHZC* und einer *PCDC* möglich ist (4.2.). Der Vergleich dieser Ergebnisse mit sekundären Cholestaseerkrankungen, könnte die ausgearbeiteten Kriterien bestätigen und das Bild von Möglichkeiten und Grenzen der Leberanpassung auf eine Cholestase abrunden (4.3. und 4.4.).

Bei der Abgrenzung zwischen einer *PHZC* und primär duktaalen Galleabflussstörungen im Sinne einer *PCDC* ist es von Nutzen, die Gallengangsentwicklung zu verstehen. Eine Störung hierbei kann sich bei Neugeborenen und Kindern in Form einer Gallengangsatresie manifestieren (Abschnitte 2.1. und 2.2.). Die Leberentwicklung mit ihrem Gallengangssystem durchläuft komplexe Auf- und Umbauvorgänge (Abschnitt 2.1.). Ein Einblick in die Mechanismen dieser Abläufe ist für das

Verständnis von Degenerations- und Anpassungsvorgängen in der cholestatisch erkrankten Leber von Bedeutung. Denn auch hier kommt es zu einer Epithelproliferation, zu Zytokeratinveränderungen und zu einem bindegewebigen Umbau als adaptative Reaktion auf einen Gallestau. Entsprechend werden neben der konventionellen Histologie mit Hilfe der Immunhistochemie speziell die Antigene CD10, Mib-1, CK7 und CEACAM1 untersucht (Abschnitt 2.5.). Hierbei erlaubt das CD10 die Beurteilung der strukturellen Integrität der galleleitenden Wege, während die Lokalisation des CEACAM1 im Hepatozyten ein Aufheben der Zellpolarisation, und damit einen frühen hepatozellulären Zellschaden, aufdecken kann. Die Epithelproliferation wird mit dem Mib-1-Antikörper erkannt und die hepatozelluläre Expression des Gallengangszytokeratins 7 kann als adaptive Cholestasereaktion gewertet werden.

Das MDR3-Protein hat eine pathogenetische und diagnostische Bedeutung bei der Progressiven Familiären Intrahepatischen Cholestase Typ 3 (PFIC3), einer Subgruppe hepatozellulär bedingter Cholestasen (Abschnitte 2.3. und 2.5.). Neben primär cholestatischen Erkrankungen, wie der Gallengangsatresien und der PFIC, wurden hierzu vergleichend sekundäre Cholestasen untersucht (Abschnitt 2.4.).

2.1. Embryologie der Intra- und Extrahepatischen Gallengänge

Während der vierten Schwangerschaftswoche entsteht die Leber aus dem Leberdivertikel. Diese Zellknospe geht aus der ventralen Wand des Vorderdarms hervor, die nahe bei der Verbindung mit dem Dottersack liegt.

Bei dem Menschen, wie auch bei der Maus, setzt sich das Divertikel aus zwei Teilen zusammen: einer Pars cranialis (Pars hepatica) und einer Pars caudalis (Pars cystica). Aus dem Erstgenannten gehen Lebervorläuferzellen hervor, die in das Mesenchym des Septum transversum hineinwachsen [94, 135].

2.1.1. Das extrahepatische Gallensystems.

Der kaudale Anteil des hepatischen Divertikels entwickelt sich zum extrahepatischen Gallensystem (Gallenblase, Ductus cysticus, Ductus hepaticus communis und Ductus choledochus). Der extrahepatische Gallengang (*EHGG*, hier: Ductus hepaticus

communis und Ductus choledochus), eine gut abgrenzbare Struktur seit der fünften Schwangerschaftswoche, verlängert und weitet sich und schließt sich proximal der sich entwickelnden Leber an [116]. Es folgt ein Formungsprozess („molding“) durch das umgebende Mesenchym [116]. Während dieser Periode differenziert das Entoderm in die Mukosafalten des Ductus hepaticus communis. Etwa ab der elften Schwangerschaftswoche ist der *EHGG* mit der Leber durch ein bis vier Gangäste, abhängig von Variationen des mesenchymalen Formungsprozesses, verbunden. Für gewöhnlich sind es zwei: der rechte und der linke Ductus hepaticus.

Entgegen früherer Thesen gibt es keine „solide Phase“ [113,74], bei der das Ganglumen zunächst durch Entoderm verschlossen wäre und eine Öffnung sich erst in der weiteren Entwicklung bilden würde [112,116,128]. Wie auch in der Gallenblase, entwickeln sich ab der elften Schwangerschaftswoche intramurale Schleimdrüsen in der Wand des *EHGG*. Wie bei den intrahepatischen Gallengängen (*IHGG*) ist an der Entwicklung des *EHGG* der Transkriptionsfaktor HNF6 (hepatocyte nuclear factor 6) beteiligt [14].

2.1.2. Die intrahepatischen Gallengänge und die Duktalplatte.

Die Pars cranialis besitzt ein T-geformtes Kopfe, das durch ein stärker ausgeprägtes Wachstum der lateral-wandigen Epithelsprossen die frühe Kontur des rechten und linken Leberlappens erkennen lässt. Eine Interaktion von Mesoderm und Epithel führt zu einem Vorwachsen der embryonalen Leberzellen in des Anlagegebiet des Septum transversum. Hierbei handelt es sich um ein unter der Herzanlage und über der Leberanlage befindliches Mesenchymzellager aus dem ventralen Gekröse, das als Teil des Zwerchfells die Bauchhöhle von einem cavum pleuro-pericardiacum abtrennt [111]. Es kommt zu einem vielfältigen Durchdringen von einsprossendem Bindegewebe und aussprossendem Epithel. Die hepatozellulären Vorläuferzellen wachsen in kleine, Endothel-begrenzte Zwischenräume, die mit dem Kapillarplexus der vitelline veins kommunizieren und bilden so die grundlegende Struktur des Leberparenchyms: parenchymale Stränge und Platten alternieren mit den Lebersinusoiden [22,132]. Letztere entstehen, nach dem klassischen Konzept von Severn (1972), *in situ* durch das „Anzapfen“ von Dottersack- und Umbilicalvenen [95]. Es gibt zwei Haupttheorien, mit denen die Entwicklung und Ausreifung der *IHGG* erklärt wird.

Nach der einen Theorie entwickeln sich die *IHGG* aus einwachsenden Epithelien größerer hilärer extrahepatischer Gangstrukturen [37,59].

Die zweite Theorie vertritt die Meinung, dass sich das gesamte intrahepatische Gallengang-System aus der Duktalplatte entwickelt, aus der sich kleinere und größere Gänge differenzieren, die sich der extrahepatischen Gallengangsknospe am Hilus anschließen [18,21,22,50,95,118,126]. Diese zweite Theorie wird mittlerweile nicht mehr angezweifelt und wird durch sämtliche Experimente und Erkenntnisse der letzten Jahre bestätigt. Sie wird im Folgenden näher erläutert.

In der sechsten bis neunten Schwangerschaftswoche [113,126], bzw. in der siebten SSW nach Vijayan und Tan [128], lagern sich um die größten Portalvenenäste hepatozelluläre Vorläuferzellen an, die für die Zytokeratine CK 8, CK 18 und CK 19 immunreaktiv sind [126] (siehe 2.5.2). Diese Zellschicht, die die Portalvenenäste wie eine Manschette umschließt, wird als Duktalplatte (*DP*) bezeichnet [18,21,22,118,125,126]. Eine zweite Schicht noch keratin-reicherer Zellen verdoppelt die *DP*, die sich in den folgenden Wochen auch um die kleineren, distal liegenden Portalvenenäste ausbildet. In der Zwischenzeit verlieren jene Zellen, die nicht an der Ausbildung der *DP* beteiligt sind, nach und nach das Zytokeratin CK 19, so dass sie nach zehn Wochen nur noch für die Zytokeratine CK 8 und CK 18 immunreaktiv sind, wie es auch später bei den Leberparenchymzellen von Erwachsenen der Fall ist.

Etwa ab der zwölften Schwangerschaftswoche beginnt ein „Umgestalten (remodeling)“ der *DP*, beginnend an den ältesten Anteilen, die um die größeren Venenästen der Porta hepatis angelagert sind [18,19,50]. Die Entwicklung der Gallengänge aus der *DP* an der Porta hepatis verläuft wie folgt:

Kurze Bereiche der doppel-schichtigen Zelllage erweitern sich und bilden tubuläre, zunehmend CK 7-positive Strukturen (siehe unten: 2.5.2. CK 7) [116].

Es folgt eine Mesenchymproliferation, die hepatozelluläre Anlagen von den vorläufigen Gallengängen trennt, und die Ausbildung von Mesenchym-Manschetten um jene Gallengänge, die dazu bestimmt sind, zu definitiven Gallengängen auszureifen. Es bilden sich periluminale Drüsenstrukturen aus, gefolgt von einer Deletion überflüssiger *DP*- Elemente, die noch an die sich entwickelnden Gänge angeschlossen sind [116].

Die Hauptäste der hilären intrahepatischen Gallengänge sind ab der 16. Schwangerschaftswoche angelegt [114,128]. Das Ergebnis des „remodeling“ ist ein

Anastomosensystem von Gallengängen, die in die mesenchymale Umgebung der Portalvenenäste eingegliedert sind.

Das Mesenchym spielt eine zentrale Rolle im Umbauprozess der *DP* [97], was durch die Transplantat-Experimente von Shiojiri veranschaulicht wurde. Hier entwickelten sich Maus-Hepatoblasten nur dann in *IHGG*, wenn sie in subkutanen Bindegewebe der neugeborenen Mäuse implantiert wurden und nicht in deren Hoden [96]. Der mesenchymale Einfluss zeigt sich außerdem darin, dass sich Hepatoblasten in Gallengangsepithelien umdifferenzieren, wenn sie mit Leber- oder Lungenmesenchym kultiviert werden [98].

Während dieser Phase des Umbaus ist die Apoptoseaktivität innerhalb der fetalen Gallenepithelien, des umgebenden Mesenchyms und der angrenzenden Hepatozyten deutlich erhöht [116,118]. Ein bestens kontrolliertes Gleichgewicht zwischen Zelltod und Proliferation führt dazu, dass aus der *DP* schließlich das endgültige Gallengangsmuster des erwachsenen Menschen hervorgeht [116]. Eosinophile, neutrophile und mononukleäre Zellen wurden vermehrt in diesen Umbauzonen beobachtet [114]. Zytokine scheinen am Remodeling beteiligt zu sein: Transforming growth factor $\alpha 1$ (ein an der Organentwicklung bei Menschen und Tieren beteiligtes Zytokin) fördert mesenchymale Proliferation und hemmt epitheliales Wachstum. Es wurde im *DP* –Epithel nachgewiesen und zeigt eine Verlagerung nach apikal während des letzten Stadiums der Gallengangsentwicklung [115]. Es wird vermutet, dass diese Verschiebung den Abschluss des Differenzierungsprozesses signalisiert [115,116].

Die Differenzierung der intra- und extrahepatischen Gallengänge aus Vorläuferzellen wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch den Transkriptionsfaktor HNF6, der den HNF1 α -Promotor aktiviert, kontrolliert [14].

Es scheint drei Differenzierungswege für Hepatoblasten zu geben. Zum Einen existieren Hepatoblasten, die sich nur zu Gallengangsepithelien entwickeln, zum Anderen solche, die sich nur zu Hepatozyten differenzieren und schließlich auch eine Zelllinie, die sich in beide entwickeln kann [99].

Mittlerweile ist es gelungen, in Kollagenkulturen mit Hilfe des hHGF (human hepatocyte growth factor) menschliche Gallengangsepithelien anzuzüchten, was zur Erforschung der atypischen Gallengangsentwicklung einen wichtigen Beitrag leisten könnte [43]. Zum Zeitpunkt der Geburt [126,133] (und bis zu zehn Tage danach [14])

sind an peripher gelegenen Portalvenenäste noch zytokeratinreiche Zellschichten im Duktalplattenmuster beschrieben worden. Das deutet darauf hin, dass bei der Geburt das intrahepatische Gallengangssystem noch unreif ist.

2.1.3. Die Porta hepatis.

Zum Zeitpunkt der tubulären Ausdifferenzierung des *EHGG*, in der sechsten Schwangerschaftswoche, gibt es noch keine differenzierten intrahepatischen Gallengänge an der Porta hepatis. Der *EHGG* ist statt dessen direkt mit der *DP* verbunden [80,81,113]. Erst nach der achten Entwicklungswoche kann ein kontinuierlicher Lumenübergang zwischen *DP* und *EHGG* beobachtet werden [113]. Bei Beginn des Duktalplattenumbaus an der Porta hepatis (11.SSW) behalten das Lumen des *EHGG* und die sich entwickelnden *IHGG* eine Kontinuität bei. Der Ursprung des distalen (extrahepatischen) Anteils des rechten und linken Ductus hepaticus entstammt dem *EHGG*, während die proximalen (intrahepatischen) Anteile aus der *DP* hervorgehen [114]. Der Auslöser des Remodeling- Prozesses ist zur Zeit noch ungeklärt und mag vielleicht durch den *EHGG* induziert sein. Der Beginn der Gallenexkretion ab der zwölften Entwicklungswoche spielt womöglich auch eine Rolle [116].

2.2. Theorien zur Entstehung von Gallengangsatresien

Im Hinblick auf die Entstehung von Gallengangsatresien werden mehrere Theorien diskutiert. Vermutlich handelt es sich bei diesem Krankheitsbild um das Ergebnis einer Fehlentwicklung. Diese führt zu dem histologischen Bild einer primär cholangioduktalen Cholestase. Im Folgenden werden einige Gedanken zur Pathogenese aufgeführt.

2.2.1. Der Duktalplattenumbau.

Der so genannten ‚Duktalplattenmalformation‘ wird die größte Bedeutung als morphologische Schädigung zugeschrieben, die auf sämtlichen Ebenen des Gallenbaumes zu variablen Gallengangsfehlbildungen führen kann [22]. Bei der Entwicklung intrahepatischer Gallengänge aus der Duktalplatte ist der Notch-Ligand erforderlich, der im Falle des Alagille-Syndrom defekt ist [58].

2.2.2. Gefäßanomalien.

Hypertrophierte und hyperplastische Leberarterien in der Leberpforte bei extrahepatischer biliärer Atresie wurden zum ersten Mal von Stowens [105] beschrieben. Wenige Jahre später, 1969, wurde diese Beobachtung noch einmal bestätigt [7].

Basierend auf Ergebnissen histologischer und ultraschallgestützter Untersuchungen stellte man 1993 morphologisch veränderte Leberarterien in Verbindung mit entzündlich-degenerativen und fibrotischen Veränderungen des Gallengangssystems bei Kindern mit biliärer Atresie fest [39]. Die Arterien waren in ihrer Zahl vermehrt, gewunden, dilatiert und wiesen eine Hypertrophie der Tunica media mit einer Verdickung der gesamten Gefäßwand auf. Ob diese Gefäßveränderungen durch einen abnormalen Blutfluss und Blutdruck an der Pathogenese der Gallengangsatresien beteiligt sind, bleibt offen [39].

Es wurde zudem veröffentlicht, dass ~25-50% der Patienten mit Atresien der Gallengänge unter assoziierten angeborenen Fehlbildungen leiden, darunter Gefäßanomalien mit Fehlen der Vena cava inferior, einer präduodenalen Vena porta und Anomalien des Ursprungs der Arteria hepatica [52]. Eine Untersuchung an 114 unter biliären Atresien leidenden Patienten zeigte, dass bei diesen nur 45,6% der Fälle eine aus der A.hepatica entspringende A.cystica aufwiesen, im Gegensatz zu 73% bis 95% bei dem Gesunden [13].

Es wurde die Hypothese entwickelt, dass diese Beobachtungen auf einen allgemeinen teratogenen Faktor während der fetalen Entwicklung hinweisen, der zu der Kombination einer Gallengangsatresie mit einer Angiopathie und/oder anormalem Gefäßursprung der Leberarterien führt [39].

Einer anderen Theorie zu Folge ist die Zerstörung und Fibrose des Gallengangbaumes Folge einer intrauterinen Entzündungsreaktion, die von einem Gefäßverschluss herrührt [6]. Die Leberarterien versorgen unter anderem die Epithelien der Gallengänge, und eine Unterbrechung der Blutversorgung führt zu einem Fortbestehen des fetalen Architekturmusters der extrahepatischen Gallengänge, die einer tierexperimentellen Gallengangsatresie ähneln [2]. So hat man bei Tierföten eine intra- und extrahepatische Atresie der Gallengänge durch Unterbindung der arteriellen Gallengangs-Blutversorgung provozieren können [76,86]. Die These einer vaskulären Genese von Gallengangsatresien wird auch in einer Veröffentlichung von

DiSant'Agnese und Blanc diskutiert, wo der Fall eines Kindes mit Koagulationsnekrose der Wand des Hauptgallenganges nach einer explorativen Laparotomie beschrieben wird [26].

Ein vergrößerter Ductus venosus Arantii könnte an einer Obliteration von Gallengängen im Versorgungsgebiet von Endarterien beteiligt sein, die aus den Hauptgallengang beliefernden Nachbargefäßen entspringen [56]. Eine Übergröße der pränatalen Kreislaufverbindung zwischen Nabelvene und der unteren Hohlvene würde den portalen Blutfluss stark reduzieren und so sekundär zu einer Mangelversorgung, vor allem an Sauerstoff, in den dafür prädisponierten Leberarealen führen. Es wurde auch ein anderer Zusammenhang in der Entwicklung von Gefäßen und Gallengängen aufgezeigt. Der Transkriptionsfaktor HNF1 α (siehe 2.2.3.) führt in inaktivierter Form bei Mäusen neben Gallengangsfehlbildungen zu einem Fehlen von Interlobulararterien [16].

2.2.3. HNF 1 α .

Versuche zeigten, dass ein Mangel an intrahepatischen Gallengängen, Fehler in der Gallengangsstruktur und das Fehlen von Interlobulararterien an eine gestörte Funktion des Transkriptionsfaktors HNF (hepatocyte nuclear factor) 1 α gekoppelt ist [16]. Dieser wurde in Gallengangsepithelien und, in viel schwächerer Expression, in den periportal Hepatozyten lokalisiert [15]. Der Verlust von HNF1 α äußert sich in einer Wachstumsretardierung mit Ikterus bei starker Abnahme der Anzahl von kleinen Gallengängen und einem Fortbestehen der Duktalplatte [16]. Neben der essentiellen Bedeutung bei der Gallengangsentwicklung ist HNF 1 α auch an etlichen Stoffwechselfunktionen der Leber beteiligt [53]. Beim Menschen existiert eine autosomal-dominante Mutation des HNF1 α -Genes im Zusammenhang mit einem speziellen Typ II Diabetes, der mit MODY 5 (maturity onset diabetes of the young typ 5) bezeichnet wird [41]. Zumindest in einigen Fällen wurden Leberfunktionsstörungen beschrieben [65]. Ob diese Leberdysfunktion an einen Gallengangsdefekt gekoppelt ist, wie er bei Mäusen beobachtet wurde, bleibt unbekannt.

2.2.4. Anormale Wechselwirkung zwischen Galle und Gallengangsepithelien.

In einzelnen Fällen entwickeln unter Gallengangsanomalien leidende Kinder nicht direkt nach der Geburt einen Ikterus. Das lässt vermuten, dass die Fähigkeit der Leber,

mit gestauter Galle zurechtzukommen, mit einem zunehmenden Leberwachstum erst allmählich überfordert wird. Die Folge ist eine hepatobiliäre Störung mit Cholestase, die sich erst in den der Geburt folgenden Wochen manifestiert [57]. Das Fortschreiten einer Cholangiopathie in eine Duktulopenie wird beim Alagille-Syndrom (verursacht durch eine Mutation des JAGGED1-Gens, Abschnitt 2.4.3.) beobachtet [23,78].

2.2.5. Extrahepatische biliäre Atresie (EBA).

Damit wird eine partiell oder komplett ausbleibende Fusion des extra- und intrahepatischen Gallengangssystems mit der Konsequenz eines zunehmenden Ikterus und Leberversagens bezeichnet. In 20% der Fälle ist die EBA mit anderen kongenitalen Anomalien assoziiert, was den Verdacht einer pränatalen Schädigung nahe legt [42,72]. Die Rolle des Reovirus 3 in der Pathogenese bleibt umstritten [8,75]. In Anbetracht der Möglichkeit einer embryonalen Ursache der biliären Atresie wurde die normale intrauterine Entwicklung des Gallenbaumes in Embryonen und Feten untersucht (siehe oben: Abschnitt 2.1.). Neben einem fehlerhaften Treffen zwischen extra- und intrahepatischen Gallengängen, wurde eine vulnerable Phase der Gangentwicklung (zwischen der 11. und 13. SSW) als mitbestimmend für die Fehlbildung in Erwägung gezogen [112,114]. Ein Misserfolg des Umbaus der Duktalplatte durch einen gestörten Selektion-/Deletion- Prozess und eine unzureichende gangumschließende Mesenchym-Manschette könnte zu Gallengängen mit Rupturneigung führen. Ab dem Beginn des Gallenflusses in der 12. bis 13. SSW wäre so ein Galleaustritt mit sekundärer Entzündung, Fibrose und Obstruktion/Obliteration der extrahepatischen Gallengangsstrukturen vorstellbar [112]. Rückwirkende Umbauvorgänge würden die Beobachtung erklären, dass schon bei drei Tage alten neonatalen Kindern mit biliärer Atresie abnormale intrahepatische Gallengänge gefunden wurden [34]. Zusammenfassend wird die Entwicklung einer biliären Atresie auf einen intrinsischen Entwicklungsfehler zurückgeführt, der wahrscheinlich von einer gestörter Epithel/Mesoderm-Interaktion in der Embryogenese herrührt [93].

2.2.6. Beeinträchtigung der kanalikulären Motilität [85].

Die Gallensekretion wird vor allem von den Hepatozyten in der Zone 1 der Leberarchitektur bewerkstelligt [49]. Hier ist auch eine Kontraktion der

Gallenkanälchen bei der Rattenleber *in vivo* besonders regelmäßig zu beobachteten [130]. An der Leberoberfläche wurden keine Kontraktionen beobachtet [130]. In der Zirkumferenz der Gallenkanälchen liegt ein Band aus Mikrofilamenten, das sowohl α -Aktinin und Tropomyosin (Kontraktionskontrollproteine in Muskelzellen) als auch Aktin, Myosin II und Zytokeratin enthält [120]. Ein Defekt der die Gallenkanälchen umschließenden Mikrofilamente und der damit beeinträchtigten Motilität könnte somit eine intrahepatische Cholestase auslösen oder verstärken [130].

2.3. Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase (PFIC)

Hierunter wird eine heterogene, autosomal-rezessiv vererbte Gruppe primär hepatozellulärer Cholestasen (*PHZC*) zusammengefasst. Sie wird schon in der neonatalen Periode oder im ersten Lebensjahr symptomatisch. Unbehandelt führt die PFIC spätestens in der Adoleszenz zu einem Leberversagen [131].

Molekularbiologische und genetische Studien haben zur Identifizierung von drei Subtypen der PFIC geführt. Es wurde gezeigt, dass eine Genmutation des hepatozellulären Transportsystems zu einer Störung der Gallebildung führt [45].

Die **PFIC1** wurde zuerst bei den Verwandten der Familie Byler beobachtet und erhielt aus diesem Grund den Namen Bylerkrankheit (Byler disease). Als Ursache wird das Gen *FIC1* verantwortlich gemacht, das für eine Adenosintriphosphatase vom P-Typ kodiert [10]. Dies scheint zu einem Defekt im enterohepatischen Kreislauf der Gallensalze zu führen [46].

Der zweite Typ, die **PFIC2**, wird durch Mutation im BSEP (bile salt export pump)-Gen hervorgerufen [48]. Es sind ungefähr 50 Mutationen des BSEP-Gens (*ABCB11*) bei Patienten mit einer PFIC2 bekannt [40]. Die Folge der reduzierten Gallesalzexkretion ist eine Akkumulation dieser Salze in den Hepatozyten mit einer starken Zellschädigung [1]. Bis vor kurzem wurde die PFIC2 als Byler-Syndrom bezeichnet, da sich, obwohl sie der Bylerkrankheit klinisch ähnelt, bei den Patienten keine Verwandtschaft zur Bylerfamilie feststellen ließ [46]. Trotz Cholestase weisen Patienten mit PFIC1 und PFIC2 eine normale Serumaktivität der γ -Glytamytransferase (GGT) auf [131]. In der Leberhistologie zeigen sich charakteristischerweise wenig neoduktuläre Prolifere, obwohl meist eine stark ausgeprägte hepatozelluläre Cholestase mit bizarr verformten, dysplastischen und zum

Teil mehrkernigen Hepatozyten vorliegt [1].

Der dritte Typ, **PFIC3** genannt, lässt sich von den anderen beiden Subtypen durch eine erhöhte Serumaktivität der GGT abgrenzen. Histologisch zeigt sich schon im Frühstadium eine duktuläre Proliferation mit Entzündungsinfiltraten trotz intakten intra- und extrahepatischen Gallengängen [17]. Als Ursache der Schädigung ist ein defekter Phospholipidtransporter MDR P-Glykoprotein der Klasse III (MDR3 beim Menschen, MDR2 bei Mäusen) an der kanalikulären Hepatozytenmembran ausfindig gemacht worden [17,40]. In einer Studie konnte bei einem Drittel der Patienten mit einem PFIC3-Phänotyp eine Genmutation in den entsprechenden Allelen nachgewiesen werden [46].

2.4. Sonstige Lebererkrankungen mit Cholestase und Lebererkrankungen ohne Cholestase

Im Folgenden werden weitere Lebererkrankungen beschrieben, die in die Untersuchungsgruppe dieser Arbeit mit aufgenommen wurden. Zum größten Teil handelt es sich um obstruktive und nicht obstruktiv bedingte Cholestasen. Aber auch andere zu einer Cholestase führenden Erkrankungen wurden untersucht, um eine große Bandbreite zwischen dem Ausmaß der Gallennoxe und der Parenchymreaktion beobachten zu können.

Als Kontrollgruppe bei der vergleichenden Histologie und Immunhistochemie diente sowohl das Lebergewebe eines Oxalose-Patienten, als auch das Lebergewebe aus der Umgebung einer Sigmakarzinommetastase (siehe Abschnitt 3.3).

Crigler-Najjar-Syndrom.

Dieser seltene autosomal-rezessiv vererbte Defekt des Bilirubinstoffwechsels manifestiert sich im frühen Neugeborenenalter. Man unterscheidet den Typ 1 mit schwerem Ikterus mit einem hohen Bilirubinlevel, von einem Typ 2, bei dem ein milderer Verlauf und seltener intellektuelle Folgeschäden beobachtet werden [69].

Die Patienten des Typ 1 zeigen einen Defekt des Enzyms Uridindiphosphat-Glukuronyltransferase und sind folglich nicht in der Lage, Bilirubin zu konjugieren [110]. Der Gendefekt liegt auf dem Chromosom 2 in den Exons 1-5 [44].

Histopathologisch zeigt sich beim Crigler-Najjar Typ 1 eine intrahepatische Cholestase, wobei die Leber ansonsten normal erscheinen kann [69].

Die Vererbung des Crigler-Najjar-Syndroms Typ 2 scheint autosomal-dominant zu erfolgen, es wird aber auch gelegentlich von autosomal-rezessiv vererbten Fällen berichtet [36,69]. Die Leber verfügt beim Typ 2 bei der Bilirubinkonjugation nur über eine verminderte Aktivität des Enzyms Uridindiphosphat-Glukuronyltransferase [69].

Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC).

Diese chronische cholestatische Erkrankung entsteht durch eine unspezifische entzündliche Fibrose in der Wand des Gallenbaumes mit Stenosen und Ektasien . Befallen sind in der Regel die extrahepatischen und die großen intrahepatischen Gallengänge, aber auch die kleinen Gallengänge sind oft mitbeteiligt und in seltenen Fällen ausschließlich betroffen [68,69].

Ein familiäres Auftreten und die Assoziation mit HL-Antigenen, wie zum Beispiel -B8, -DR3, -DR2 und DR52, spricht für eine genetische Prädisposition der Erkrankung [69]. Ein im DR-Molekül enthaltener Leucin-Rest soll angeblich den Patienten für die Entwicklung einer PSC empfänglich machen [31]. Das häufige Einhergehen einer PSC mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung lässt einen gemeinsamen ätiopathologischen Faktor vermuten [69].

Neben humoralen Abnormalitäten zeigen sich auch Veränderungen auf zellulärer Ebene [69]. Hierzu gehören unter anderem die lymphozytäre Sensibilisierung auf biliäre Antigene [71] und ein Überwiegen von T-Lymphozyten im Infiltrat des Gallenbaumes [101]. Obwohl einige dieser Veränderungen nur sekundär sein mögen, scheint ein Immunmechanismus für das Fortwähren der Gallengangschädigung verantwortlich zu sein [69].

Die charakteristische zwiebelschalenartige periduktuläre Fibrose der größeren Gallengänge, Narben und die verminderte Anzahl interlobulärer Gänge sind histologische Hinweise für diese Erkrankung in der Feinnadelbiopsie [69]. Trotzdem erweist sich die Abgrenzung zu anderen cholestatischen, degenerativen und entzündlichen Lebererkrankungen an diesen feinen Gewebsstanzen häufig als schwierig und erfordert eine ERCP [69].

Alagille-Syndrom.

Diese auch unter arteriohepatische Dysplasie bekannte Fehlbildungsstörung ist eine syndromale Gallengangsmangelerkrankung. Auf dem Chromosom 20 wurden autosomal-dominante Mutationen entdeckt, die den Notch-Rezeptor-Liganden JAGGED 1, oder den Notch-2-Rezeptor selbst betreffen [69,70]. Diesen wird eine Störung der Entwicklung intrahepatischer Gallengänge zugeschrieben [67]. Zusätzlich beobachtet man bei den häufig mental und Wachstums- retardierten Kindern neben einem abnormen Gallenbaum komplexe Herzfehler, Pulmonalarterienstenose, typische Gesichtszüge, Augenfehlbildungen, Wirbel- und Nierenfehlbildungen [29]. Was die Gallengangsfehlbildungen betrifft, so kann man eine Hypoplasie der extrahepatischen Gallengänge, eine Gallenblasenhypoplasie und Gallensteine beobachten. Die ERCP zeigt sowohl Verengungen als auch Stenosen intrahepatischer Gänge und eine verminderte Gallenbaumaufzweigung [69]. Die Leberzirrhose schreitet selten fort [121].

Histopathologisch zeigt sich als Hauptmerkmal eine zunehmende Reduktion von Gallengängen in den Portalfeldern. Der Verlust von Gallengängen ist vom Kleinkindes- bis Kindesalter progredient.

Das Ausmaß der Cholestase ist in seiner Intensität variabel und in den ersten 12 Monaten besonders deutlich ausgeprägt [69]. Die Ausbildung von Riesenzellen, eine pseudoxanthomatöse Hepatozytentransformation und eine vermehrte Kupferspeicherung in den periportal Hepatozyten wurden beschrieben [83]. Eine portale Entzündungszellinfiltration und eine neoduktuläre Proliferation werden, wenn überhaupt vorhanden, vor allem im Kleinkindesalter beobachtet [53].

Ultrastrukturelle Studien zeigten eine vermehrte Gallenpigmentsretention in den Lysosomen und im Golgi-Apparat, was vermuten ließ, dass bei der arteriohepatischen Dysplasie eine Störung der Gallensekretion vorliegt [124].

Morbus Wilson.

Hier liegt ein autosomal-rezessiver vererbter Defekt eines ATPase-abhängigen Kupfertransporter vom P-Typ auf dem Chromosom 13 vor. Die Abgabe von Kupfer in die Galle oder über Coeruloplasmin in das Blut ist stark beeinträchtigt. Die Symptome der erkrankten Patienten lassen sich auf eine Kupferüberladung vor allem in Gehirn,

Kornea, Leber und Niere, zurückführen [69]. Eine schwere kupfervermittelte mitochondriale Schädigung durch freie Radikale und Oxidationsschäden scheinen in der Pathogenese dieser Organschäden eine entscheidende Rolle zu spielen [35].

Typischerweise manifestiert sich der M. Wilson im Adoleszenzalter mit den Zeichen eines Leberleidens [88].

In der Leberbiopsie sieht man klassischerweise geschwollenen Leberepithelien, Apoptose, spärliche lymphozytäre Infiltrate und eine Cholestase. Im präzirrhotischen Stadium lässt sich auch eine Leberzellverfettung feststellen. Glykogenierte Nuklei, eine vermehrte Kupferablagerung und Lipofuszinpigment lassen sich in der Regel in den periportalen Hepatozyten beobachten. Bei fortschreitender Erkrankung kommt es zu einer periportalen cholangiolären Proliferation, Fibrose und einer Zirrhose, die meist makronodulär ist [69].

Die Veränderungen sind häufig schwer von einer chronischen Hepatitis anderer Genese zu unterscheiden.

Eine Anfärbung des Kupfers und der kupferassoziierten Proteine in der Leber erfolgt am Besten mit der p-Dimethyl-Aminobenzylidin-Rhodanin-Methode. Eine fehlende Anfärbung schließt einen M. Wilson aber nicht aus, da im frühen Stadium der Erkrankung das zytosolische Kupfer sehr löslich ist und das kupferbindende Protein in den Lysosomen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden sein kann. Hinzu kommt, dass die Kupferverteilung in den zirrhotischen Knötchen stark variiert [69].

Budd-Chiari-Syndrom.

Hierunter wird das weite klinische Spektrum zusammengefasst, das mit einer Thrombose der Lebervene einhergeht. Ursachen können in Hyperkoagulopathie, Stase, Gefäßverletzungen oder im Zusammenhang mit unklaren Mechanismen gefunden werden. Klassischerweise präsentieren die Patienten eine Klinik mit Hepatomegalie, Aszites, abdominelle Schmerzen und im unterschiedlichen Ausmaß eine Leberdysfunktion [69].

Die Thromben scheinen zu Beginn nur in den Sinusoiden oder in den terminalen Lebervenen vorzuliegen. Erst im weiteren Verlauf kommt es zu einem Fortschreiten der Thrombosierung in die größeren Lebervenen [69].

Nach einem akuten Lebervenenverschluss kommt es zunächst zu einer Dilatation mit Blutstau in den vorgeschalteten Venen und Sinusoiden. Bei Progression des Leidens

fibrosieren die Sinusoide mit der Folge, dass Leberepithelien atrophisch werden oder verloren gehen. Die sich entwickelnde Fibrose spart im wesentlichen die Portalfelder aus und ist in der Regel verstärkt um die Zentralvenen herum angesiedelt [69].

Die Leber formt sich entsprechend dem Gefäßbefall um. Die Areale mit einem guten venösen Abfluss hypertrophieren kompensatorisch [117].

Besonders an kleinen Biopsien kann die histologische Diagnose schwierig sein, da Blutstau und die Umbauvorgänge häufig nur fokal zu sehen sind. Eine Leberventhrombose sollte aber in Betracht gezogen werden, wenn eine fibrotische bzw. zirrhotische Leber mit einer auffälligen Erweiterung der Sinusoide oder Gefäßen zu sehen ist. Auch eine Hämosiderose kann auftreten, besonders im Zusammenhang mit der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie [69].

Viele Chirurgen nutzen die Leberbiopsie als Hilfe bei der Therapieentscheidung: Nekrosen legen eine Shunt-OP nahe, während bei einer weit ausgedehnte Fibrose eher eine Lebertransplantation in Frage kommt [69].

Tyrosinämie Typ 1 (hereditäre Tyrosinämie).

Diese Erkrankung gehört zu den Störungen des Aminosäurestoffwechsels. Sie ist durch einen fortschreitenden Leberschaden mit Aszites, Hepatosplenomegalie, Ödeme, Hypoglykämie, einer tubulärer Nierenschädigung und einer schweren Koagulopathie gekennzeichnet. Leberfunktionskrisen manifestieren sich typischerweise in den ersten zwei Jahren des Lebens und werden häufig durch Infektionen beschleunigt. Auch neurologische Probleme mit Paralysen und Parästhesien können im Rahmen der Erkrankung beobachtet werden [69].

Über 80 % der Patienten weisen eine tubuläre Nierenschädigung mit interstitieller Nephritis, Fibrose oder Glomerulosklerose auf. Das hepatozelluläre Karzinom tritt in 10-20% der Fälle auf [47].

Der Tyrosinämie Typ 1 liegt ein Mangel an Fumarylacetoacetathydrolase (FAH), dem letzten Enzym im Tyrosinabbau, zugrunde. Toxische Stoffwechselprodukte sammeln sich an und schädigen vor allem die Leber und die Nieren, da FAH in diesen Organen ansässig ist. Ein hoher Succinylacetonlevel im Urin dient als diagnostisches Mittel. Es wurden etliche Mutationen im FAH-Gen auf dem Chromosom 15 beschrieben. Bei der Autopsie findet sich eine mäßig vergrößerte, gelbe, feste und knotige Leber. Histologische Charakteristika sind Steatose, neoduktuläre Prolifere mit Cholestase,

Zirrhose und eventuell Leberzell dysplasien [69].

Äthyltoxische Leberzirrhose.

Wie bei den cholestatischen Lebererkrankungen sind auch die alkoholbedingten Schäden an der Leber vielfältig. Beide ähneln sich auch in einigen Aspekten. Die alkoholassoziierte Zirrhose ist meist mikronodulär. Breite Bindegewebsbänder mit neuen Gefäßformationen umschließen die Regeneratknoten. Steatose und eine Begleithepatitis ist meistens zu beobachten, besonders wenn der Alkoholkonsum fortgesetzt wird. Neben dem Entzündungsinfiltrat sieht man besonders in der Peripherie der Pseudolobuli Leberzellnekrosen [69]. Auch eine CK 7 und CK19 - positive Gallengangsproliferation kann bei dem alkoholinduziertem Leberleiden gesehen werden [127].

Schwere Cholestasen im Zusammenhang mit der Alkoholkrankheit treten vor allem in Verbindung mit Leberverfettung, 'schaumiger' Leberzelldegeneration, Hepatitis, dekompensierter Leberzirrhose und dem Zieve-Syndrome auf [69]. Die Fibrosierung der Portalfelder scheint mit einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen zusammenzuhängen, deren freigegebene zytotoxischen Mediatoren wohl einen wesentlichen Beitrag zur Leberzellschädigung liefern [54]. Eine Siderose, die Manifestation der Porphyria cutanea tarda und nicht zuletzt das hepatozelluläre Karzinom sind weitere Beispiele alkoholgekoppelter Leberkomplikationen [69].

Kurzdarmsyndrom.

Unter Kurzdarmsyndrom versteht man die große Anzahl von metabolischen und nutritiven Folgen, die oft nach einer Resektion eines Dünndarmsegments auftritt. Sie sind abhängig von der entnommen Länge des spezifischen Segmentes, der Integrität der Ileocaecalklappe, einer eventuellen zusätzlichen Dickdarmentfernung, sowie vom Grad der Anpassung und der Restkrankung im verbleibenden Darmabschnitt [5].

Oxalose.

Die primäre Oxalose ist eine seltene vererbte Stoffwechselstörung. Eine gesteigerte Oxalsäureproduktion, die wohl von mindestens zwei verschiedenen Enzymdefekten herrührt, führt zur Hyperoxalämie und zur Ablagerung von Kalziumoxalatkristallen in den Geweben. Sehr problematisch ist der Befall der Nieren, der in der Regel zum

Tode vor dem 20. Lebensjahr führt. Arthritis und Periarthritis sind Komplikationen in den späteren Jahren der Krankheit. Die sekundäre Oxalose ist weiter verbreitet als die primäre Störung. Sie ist Teil der vielen Stoffwechselstörungen, die im Endstadium von Nierenerkrankungen stehen.

Bei der primären Erkrankung führt die Lebertransplantation zu einer signifikanten Verminderung der Kristalldepots [5]. Trotz des in der Leber wirksamen Enzymdefektes mit Rückwirkung auf den allgemeinen Oxalsäurestoffwechsel sind die Histologie und die sonstige Funktion der Leber aber normal, so dass das hierbei explantierte Lebergewebe als 'Normalkontrolle' bezüglich der Cholestaseerkrankungen verwendet wurde.

2.5. Die mittels Immunhistochemie untersuchten hepatozellulären Antigene

Um einen Einblick in die Funktion, Schädigung und Umdifferenzierung der Leber bei Cholestase zu erlangen, bietet die Immunhistochemie ein nützliches Hilfsmittel um die konventionelle Histologie zu ergänzen.

Die einzelnen Stationen des Galletransportes sind Hepatozyt, Gallenkanälchen, Gallengänge. Schäden auf diesen Stufen können immunhistochemisch mit ausgewählten Markern nachgewiesen werden, auf die in diesem Abschnitt eingegangen wird.

Das CD10 kann als unspezifischer Indikator für die Integrität der galleleitenden Strukturen, von den Kanalikuli bis zu den großen Gallegängen, genutzt werden. Das CK7 als gallengangstypisches Zytokeratin kann, in Hepatozyten ausgeprägt, eine cholangiozelluläre Umdifferenzierung der Hepatozyten anzeigen. Ergänzend dazu ist das CEACAM1 als Zeichen für die Aufrechterhaltung der polaren Differenzierung des Hepatozyten einsetzbar. Mit Hilfe des Proliferationsmarker Mib-1 wird die Regenerationsdynamik und eine erhaltene Zellfunktion erfasst.

Dem gegenüber ist der kanalikuläre Marker MDR3 als selektive Marker für die PFIC-Erkrankungsgruppe anwendbar.

2.5.1. CD10 (Cluster of Differentiation 10).

Dieses zunächst als CALLA (common acute lymphoblastic leukaemia antigen) benannte Zelloberflächenmolekül wurde auf Zellen der akuten lymphatischen Leukämie entdeckt. Erst später wurde es auf dem ersten internationalen Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigen als CD 10 klassifiziert [3]. Codiert wird es von dem MME (Mendelian Inheritance in Man), dass auf dem Chromosom 3 lokalisiert ist [11].

Obwohl sich die erstmalige Beschreibung auf unreife lymphatischen Blutzellen und ihre malignen Formen beschränkt [33], stellte sich bald heraus, dass das Antigen viel weiter im normalen und neoplastischen Geweben verbreitet ist. Dies schließt, neben Melanomen [12], Nierenepithelien [87], Brust- und Kolonkarzinomen [9,84] und vielen anderen Geweben, auch die galleleitenden Strukturen der Leber ein [129]. Loke *et al* beobachtete elektronenmikroskopisch eine Verteilung des CD10-Antigens auf den Mikrovilli der Gallenkanälchen und vermutete eine Rolle im kanalikulären Transport [66].

Es gelang durch Klonen des CD10-spezifischen Proteins aus Zelllinien einer pre-B ALL und der menschlichen Niere, die Peptidsequenz festzustellen. Sie war zu 100% identisch mit einem menschlichen membran-assoziierten Enzym, der Neutralen Endopeptidase 24.11 [61,100] (Enkephalinase oder Neprilysin, eine membranassoziierte Metallopeptidase [28]). Es ist noch nicht gelungen das Enzym in der Leber biochemisch zu lokalisieren und zu charakterisieren, da die Komplexität der kanalikulären Region und ihr reicher Gehalt an Enzymen es erschweren, eine spezifische Enzymaktivität zu identifizieren [66]. Swain *et al.* veröffentlichte 1993 eine Studie, in der die Aktivität der Plasma-Endopeptidase 24.11 als nützlicher biochemischer Marker der Cholestase, neben der Alkalischen Phosphatase, γ -Glutamyltranspeptidase und Aminopeptidase, vorgestellt wird [109].

2.5.2. CK7 (Cytokeratin 7).

Die Markierung von Zytokeratinen ist zur Identifizierung zellulärer Phänotypen von besonderem Nutzen. Zytokeratine sind die Intermediärfilamente des charakteristischen Zytoskelettes epithelialer Zellen. Neunzehn verschiedene Zytokeratin-Polypeptide wurden identifiziert und von Moll *et al.* katalogisiert [73]. Die Parenchymzellen in der Leber des erwachsenen Menschen bilden nur die Zytokeratine 8 und 18 aus,

wohingegen sich die Epithelien der intrahepatischen Gallengänge (*IHGG*) die Zytokeratine 7 und 19 enthalten.

In ihrem frühen Entwicklungsstadium setzt sich die embryonale Leber aus epithelialen Vorläuferzellen zusammen, in denen die Zytokeratine CK 8, CK 18 und CK 19 nachweisbar sind [20,103]. Nach der zehnten Schwangerschaftswoche verlieren die nicht an der Duktalplattenbildung beteiligten Zellen ihr Zytokeratin CK 19 (siehe oben: 2.1.2. Die intrahepatischen Gallengänge und die Duktalplatte).

Etwa ab der zwanzigsten Schwangerschaftswoche bilden die aus der Duktalplatte hervorgegangenen Gangstrukturen zunehmend das CK7 aus und dies zuerst in den Epithelien der hilusnahen größeren Gallengänge. Bis ungefähr einen Monat nach der Geburt steigt die Expressionsstärke für CK7 nach und nach an [20,126].

2.5.3. MDR 3 (Multidrug-Resistant Protein 3).

Dieses Glykoprotein gehört in eine Gruppe von hepatobiliären Transportsystemen, die die Aufnahme und Abgabe von Gallesalzen, organischen Anionen (z.B. Bilirubin), organischen Kationen (z.B. Medikamente) und Lipiden (z.B. Cholesterol) vermitteln. Zu der letzteren Transportergruppe gehört das MDR3, das vor allem an der Ausscheidung von Phospholipiden (Phosphatidylcholin) in die Galle beteiligt ist und über 80% der kanalikulären MDR-Proteine stellt [82]. Eine Mutation in den für den Transporter kodierenden Genen kann zu einer Ausbildung von defekten Transportern führen. Im Falle eines in seiner Funktion eingeschränkten MDR 3 wurde ein Zusammenhang mit der PFIC3 (progressive familial intrahepatic cholestasis Typ 3) nachgewiesen [24]. Bestimmte Mutationen (z.B.S3461) des MDR3 bei PFIC3-Patienten gehen mit einer normalen immunhistochemischen kanalikulären MDR3-Loaklisation einher [55]. Mutationen im MDR3-Gen scheinen auch ein Entstehungsfaktor bei der Bildung von Cholesteringallensteinen zu sein [90].

2.5.4. CEACAM 1 (Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 1).

Zum ersten Mal wurde dieses auch unter CD66a bekannte Zelladhäsions-Glykoprotein in der menschlichen Galle identifiziert [108]. Später wurde es in Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen, Granulozyten, in Epithelzellen und in erhöhter Form im Serum von Patienten mit Lebererkrankungen nachgewiesen. Obwohl beim Menschen nur ein einziges CEACAM1-Gen existiert, können mehr als

elf verschiedene mRNA-Isoformen durch Splicing generiert werden [27]. CEACAM1 ist an der Signaltransduktion beteiligt und hat Einfluss auf die Zellproliferation, Apoptose, Angiogenese, Tumorwachstum und die Epithelzellpolarisation [107]. Zwei Hauptisoformen mit unterschiedlich langen zytoplasmatischen Domänen sind hierbei von Bedeutung: CEACAM1-L (long), das an der lateralen und apikalen, und CEACAM1-S (short), welches nur an der apikalen Oberfläche von Epithelzellen anzutreffen ist. In der Zelle ist das Adhäsionsprotein direkt mit den Zytoskelettproteinen Aktin und Tropomyosin verbunden [92]. Man vermutet eine Beteiligung von CEACAM1 an der Regulation der Mikrovillimotilität intestinaler Epithelzellen und an der Aufrechterhaltung der epithelialen polaren Differenzierung [107].

3. ARBEITSMATERIAL UND METHODEN

3.1. Gewebeproben

Die untersuchten Lebergewebeproben wurden 1992 bis 2003 im Rahmen der pathologischen Routinediagnostik im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf asserviert. Sie wurden, wenn nicht anders angegeben, in Formalin fixiert und in Paraffinwachs eingebettet. Neben diesen Paraffinwachsblöcken, standen uns zur Auswertung die bereits angefertigten Färbungen Hämatoxylin-Eosin (HE), Masson-Goldner, Periodsäure-Schiff-Reagenz (PAS) und Berliner-Blau-Reagenz (Fe-Färbung) zur Verfügung.

3.2. Fixierung

Im Folgenden wird auf die Fixierungen eingegangen, die an den untersuchten Geweben angewendet wurden. Dazu gehören:

- die Formalinfixierung
- die Kryostatpräparation
- die HOPE-Fixierung
- die Zink-Fixation

Für die **Formalinfixation** wurden kleine Gewebsblöcke (10 x 10 x 3 mm) für maximal 24 Stunden in gepuffertem Formalin (100ml Formalin; 4g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat; 6,5 g wasserfreies di-Natriumhydrogenphosphat; auf 1 Liter destilliertem Wasser) gelagert und routinemäßig bis zur Paraffineinbettung verarbeitet.

Bei der **Kryostatpräparation** wurden kleine unfixierte, native Gewebelöcke (5 x 5 x 3 mm) in flüssigen Stickstoff schockgefroren und am Kryostat 4-8 µm dünne Schnitte hergestellt. Die Präparate wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fixierung erfolgte in Aceton (Raumtemperatur, 7 Minuten). Nach dem Trocknen standen die Präparate sofort für die Immunhistologische Färbung zur Verfügung oder wurden gefroren und zwischengelagert.

Zur **HOPE-Fixierung** wurde Gewebe (8 x 8 x 3 mm) in Röhrchen mit eiskalter HOPE- Lösung I (0-4°C) eingebracht und 16 bis 64 Stunden im Kühltank (0-4°C) inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgegossen und durch 5 ml einer vorbereiteten eiskalten Acetonlösung (100 ml reines Aceton gemischt mit 100 µl HOPE-Lösung II) ersetzt und für 2 Stunden bei 0-2°C belassen. Nach nochmaligem Abgießen wurde reines Aceton (0-2°C) zugesetzt und 2 Stunden als Einwirkungszeit angesetzt. Dieser Vorgang wird zwei Mal mit einer Inkubationsdauer von jeweils zwei Stunden wiederholt. Daraufhin wurden die Röhrchen entleert, unverzüglich vorgewärmtes Paraffin dazugegeben und über Nacht bei 54-55°C in den Brutschrank gestellt. Die Gewebstücke wurden unter Zugabe von frischem Paraffin eingebettet, auf Eis gekühlt und bis zum Schneiden im Kühltank aufbewahrt.

Die **Zink-Fixierung** ist eine Alternative zur routinemäßigen Formalin-Fixierung bei Geweben, die für die Einbettung in Paraffin bestimmt sind. Hierzu wurden frische Gewebstücke (nicht dicker als 3 mm) in I.H.C. Zinc Fixative (Katalog- Nr.: 550523, BD Biosciences, Europe) für 24-48 Stunden in Raumtemperatur belassen und daraufhin der standardisierten Paraffineinbettung zugeführt.

3.3. Patientenauswahl

Für die Arbeit wurden Fälle untersucht, bei denen Kinder unter einer cholestatischen Lebererkrankung litten. Unter Einbezug von Erkrankungen im Sinne einer *PHZC* und *PCDC* , sowie sekundärer Cholestasen, ergab sich ein Kollektiv aus insgesamt 38 Fällen (siehe Tabellen im Abschnitt 8.Anhang).

In einer **ersten Gruppe** wurden exemplarisch für eine *PHZC* Lebergewebeproben unterschiedlicher Subgruppen von diagnostisch gesicherten Progressiven Familiären Intrahepatischen Cholestasen (PFIC) einbezogen. Hierbei handelt es sich um eine Galletransportstörung aufgrund eines Defektes der apikalen Zellmembran der Leberepithelien.

Vierzehn Jungen und Mädchen im Alter von drei Monaten bis sieben Jahren bilden die **zweite Gruppe** der *PCDC* , die Extra- und/oder Intrahepatischen Gallengangsatresien beinhaltet. Hier liegt eine Galletransportstörung aufgrund eines

Defektes im abführenden Gallensystem vor. Bei vier Patienten wurden mittels der Kasai-Operation ein Versuch der Cholestasenminderung durchgeführt. In diese Untergruppe der Gallengangsatresien gehört auch das Alagille-Syndrom, welches durch einen Fall vertreten ist.

Eine **dritte Gruppe** (17 Patienten) beinhaltet Patienten mit **cholestatischen und cholestasefreien Leber- und Systemerkrankungen**, die nicht einer *PHZC* oder einer *PCDC* zuzuordnen waren. Hierzu zählt auch der M. Wilson, repräsentiert durch zwei Jungen und zwei Mädchen im Alter von sieben bis sechzehn Jahren. Drei Fälle gelten als diagnostisch gesichert sind, in einem Fall gilt die Diagnose als sehr wahrscheinlich.

Dieser Gruppe wurden außerdem zugeordnet:

- Hypertyrosinämie (n=1; ein Mädchen im Alter von sechs Jahren)
- Crigler-Najjar Syndrom (n=1; ein dreizehn-jähriger Junge)
- Chronisch Sklerosierende Cholangitis (n=1; Junge im Alter von vierzehn Jahren)
- Budd-Chiari Syndrom bei bestehender Polycythämia vera (n=1; ein zehn Jahre altes Mädchen)
- Kurzdarmsyndrom (n=1; ein zehn Monate altes Mädchen, das aufgrund einer nekrotisierenden Enterokolitis operiert wurde)
- Äthyltoxische Leberzirrhose (n=1; bei einem 31 Jahre alten Mann) .

Zusätzlich wurden der dritten Gruppe sieben junge Patienten mit zirrhotischen und cholestatischen Leberbefunden ohne definitive Ätiologie zugeordnet. Sie beinhaltet folgende pathologischen Befunde:

- Akute Leberdystrophien (n=2; Jungen im Alter von 6 Monaten und einem Jahr)
- Unklare Leberzirrhosen (n=2; bei einem 15 Jahre alten und einem einjährigen Jungen)
- neonatale Hepatitis (n=1; bei einem zwei Jahre alten Jungen)
- schwere, eitrige und vernarbende Cholangitis der großen Gallengänge (n=1; bei einem fünf Monate altem Mädchen)
- Ein Explantat eines Lebertransplantates mit ausgedehnten, unterschiedlich alten arteriellen Infarkten (n=1; bei einem acht Monate alten Mädchen).

Als **Referenz** diente die Leberprobe eines Jungen im Alter von drei Jahren mit einer Oxalose-Erkrankung, in der lichtmikroskopisch kein pathologischer Befund erhoben wurde. Bei den Versuchen der MDR3-Darstellung stand als Referenz Lebergewebe aus der Umgebung von zwei operierten Karzinommetastasen (E-21126/02: in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet; E-12511/03: kryostatpräpariert, HOPE-, und zinkfixiert) zur Verfügung.

Auch die Tyrosinämie und das Budd-Chiari-Syndrom aus der Gruppe der nicht-cholestatischen Leber-/und Systemerkrankungen (dritte Gruppe, siehe oben) als vergleichende Histologien hilfreich.

3.4. Färbungen

In der Histologie mittels konventioneller Färbemethoden ist eine erste morphologische Einschätzung bezüglich der Ätiologie einer Cholestase möglich. Die Immunhistochemie ergänzt und präzisiert die in der konventionellen Histologie erworbenen Informationen. Mit ihr kann die Parenchymfunktion mittels Mib-1 und die hepatozelluläre Umdifferenzierung durch CK7 erfasst werden. Ein cholestasebedingter Schaden des Gallenpols wird durch einen CD10-Mangel aufgedeckt und eine hepatozelluläre Zellschädigung im Allgemeinen durch eine CEACAM 1-Akkumulation im Zytoplasma erkannt.

Als Ausgangsmaterial dienten die Paraffinblöcke der formalinfixierten Gewebeproben repräsentativer Areale der Leber. Die daraus gewonnenen 4µm dicken Schnitte wurden auf Objektträger gebracht und für 20 min bei 60°C getrocknet. Zum Entparaffinieren und Rehydrieren wurden sie daraufhin in die Alkoholreihe (Xylol für 3 Minuten, Ethanol 100% für zwei Minuten, jeweils zwei Mal; dann Ethanol 96%, Ethanol 80%; je ein Mal für zwei Minuten) eingebracht.

Die Schnitte wurden bis zur Weiterverarbeitung in Aqua dest. gelagert. Nach einer entsprechenden Vorbehandlung (siehe unten) standen die Präparate für die immunhistochemischen Färbungen bereit.

Prinzip.

Die Färbungen gegen die Epitope CD10, CK7, Mib-1 wurden nach der APAAP (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase) -Methode mit einem Färbegerät (DAKO TechMate™ 500/1000) durchgeführt. Nach jedem Arbeitsschritt wurden die bestückten Objektträger gespült und für eine Minute in DAKO ChemMate™ - Puffer (Citrat Puffer, pH 6.0; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) inkubiert.

Der jeweilige Primärantikörper wurde in der geeigneten Verdünnung (siehe unten) aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Es folgt der Kaninchen-Anti-Maus Antikörper (350µl, 8 Tropfen, 30 Minuten). Danach wurde der APAAP-Immunkomplex (350µl, 8 Tropfen, 30 Minuten) aufgebracht, der an den sekundären Antikörper bindet. Für eine intensivere Farbreaktion wurde der Kaninchen-Anti-Maus Antikörper ein zweites Mal aufgetragen, für 10 Minuten dort belassen, gespült und folgend der APAAP-Komplex für 10 Minuten aufgetragen. Als chromogene Substratlösung für alkalische Phosphatase wurde Neufuchsin-Substrat für 20 Minuten auf dem Objektträgern inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Für die immunhistochemischen Färbungen mit dem CEACAM1 (CD66a)- und den MDR3- Antikörpern stand das Ventana/VIEW™ DAB DETECTION KIT (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson/Arizona, USA) mit dem NexES IHC System zur Verfügung. Auch einige CD10-Färbungen wurden mit diesem System durchgeführt. Die Färbung mit dem ABC (Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex)-Verfahren verlief am Ventana-Gerät automatisch nach einer festgelegten Prozedur: Nach jedem Schritt werden die bestückten Objektträger gespült. Die Zeitangaben sind an eine Temperatur von 37°C gebunden.

Die Endogene Peroxidase-Aktivität wird durch die 4-minütige Behandlung mit 3.0% H₂O₂ (0,5 mM Levamisol bei Kryo-Material) unterdrückt. Danach wird der entsprechende Antikörper (siehe unten) appliziert und für 30 Minuten (60 Minuten bei den Kryo-Schnitten) inkubiert. Es folgt das Auftragen von Biotin-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG (<120 µg/ml, 8min), das den spezifischen Antikörper lokalisiert. Daraufhin wird Streptavidin- Peroxidase (<250 µg/ml, 8min) zugesetzt, das an den Biotin-Arm des zweiten Antikörpers bindet. Wasserstoffperoxid (0,04%-0,08%) wird mit DAB (3,3'Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid)- Lösung (2g/l, in

25ml) auf den Objektträgern gemischt, und für acht Minuten dort belassen. Kupfer-DAB-Enhancer wird zuletzt für 4 Minuten auf den Schnitten vermischt.

Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin für zwei Minuten inkubiert.

Vorbehandlungen.

Zur Darstellung bestimmter Antigene war eine Vorinkubation der fixierten Gewebsschnitte in Puffern oder Enzymen erforderlich. Die entparaffinierten und rehydrierten Präparate wurden in diesen Fällen für fünf Minuten vorgewärmt, und dann für 20 Minuten bei Stufe 7 in der Mikrowelle den entsprechenden Puffern bzw. der Säure zugesetzt. Auf die später mit Citrat-, DAKO-, TEC-Puffer, Bor-Säure und Pronase benannten Vorbehandlungen wird im Folgenden kurz eingegangen.

Für die Herstellung des **Citratpuffers** (10mM, pH6,0) wurden zwei Lösungen (A und B) angesetzt und vermischt. Lösung A (0,1M Zitronensäure) enthält 21,01g Zitronensäure auf 100ml Aqua dest., Lösung B (0,1M Na-Citrat) 29,41g Na-Citrat auf 100ml Aqua dest. Für ein Liter des gewünschten Citratpuffers wurden 18ml Lösung A und 82ml Lösung B zu 900ml Aqua dest gegeben. Der pH-Wert wurde mit Lösung A eingestellt.

Der **DAKO-Puffer** (pH 6,0) ist ein kommerzieller Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,0 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark). Er wurde in einer Verdünnung von 1:10 (für 800ml: 80 ml DAKO + 720ml Aqua bidest.) angewendet.

Der **TEC-Puffer** setzt sich aus 5g Tris-Base (Merck 108382), 10g EDTA-Triplex III (Merck 108418) und 6,4g Tri-Na-Citrat-dihydrat (Merck 106430) auf 1 Liter Aqua dest. (pH 7,8) zusammen. Der Puffer wurde für die Anwendung 20fach verdünnt (für 800ml: 40ml TEC + 760ml Aqua bidest).

Pronase wird aus *Streptomyces griseus* gewonnen, und ist als Enzym kommerziell zu erwerben (Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg). Die Präparate wurden bei dieser Vorbehandlung für 10 min in einem Ansatz aus 0,01g Pronase-Pulver auf 1ml Aqua dest. bzw. Puffer inkubiert. Es wurde **Bor-Säure** (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) bei der Vorbehandlung der Präparate in der Verdünnung 1:50 eingesetzt (für 800ml: 16ml Bor + 784ml Aqua bidest.). Nach der entsprechenden Vorbehandlung ließen wir die Schnitte für 20min abkühlen. Dann wurden sie entweder mit Aqua dest. gespült oder, wenn am DAKO-Gerät

weitergearbeitet werden sollte, in TBS-Puffer (Tris-buffered saline: 50mmol/l Tris, 150mmol NaCl, pH 7,6) bzw. in VENTANA-Spülpuffer, bei geplantem Fortsetzen an diesem Gerät, für 5 min gewaschen.

3.5. Prozeduren und Auswertungsverfahren

Für die mikroskopische Auswertung verwendeten wir ein Mikroskop der Marke Zeiss (Standard 20, 450805-9901). Allgemeine histologische Merkmale und die folgenden immunhistochemischen Parameter wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS nach Fischer's exaktem Test ausgewertet und die 2-seitige Signifikanz bestimmt. Als empirische Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p < 0,05$ festgelegt. Die Signifikanztabellen mit den p-Werten finden sich im Anhang (Kapitel 8) der Arbeit. Hier finden sich auch ergänzende Erläuterungen zu den Merkmalen der konventionellen Leberhistologie, auf die im folgendem Abschnitt nicht eingegangen werden wird (8.2. Legende zu den p-Wert-Tabellen) .

Anti-CD10 (CALLA).

Für dieses Epitop stand ein monoklonaler Maus-Antikörper der IgG2b-Klasse (Klon BA-3, BioGenex, San Ramon, USA) zur Verfügung. Die optimale Verdünnung liegt bei 1:40. Die Vorbehandlung erfolgte mit DAKO-Puffer. Die Färbung wurde am DAKO-Gerät (siehe oben) durchgeführt.

Aufgrund der unterschiedlichen Zirrhosegrade des Fallkollektivs und der zum Teil fokal unterschiedlichen Ausprägung des pseudolobulären Umbaus, wurde der prozentuale Anteil der CD10-positiven Gallenkanälchen im Präparat geschätzt und in folgende Grade eingeordnet:

Gallenkanälchen.

Grad I: <25% positiv

Grad II: >25% positiv

Für die weiter distal folgenden Gallenabflussstrukturen (Hering'sche Kanäle, kleine/mittlere/große Gallengänge) wählten wir die folgende Gradierung:

Gallengänge.

Grad I: vermindert und stark vermindert

Grad II: unauffällig

Als 'unauffällig' galten die jeweiligen Strukturen, wenn sie gleichmäßig über das Präparat verteilt CD10-positiv sind und keine vollständig negativen Gallengangsepithelien zu sehen waren.

Bei den Präparaten mit 'vermindert' nachweisbarer CD10-Expression sah man negative Abschnitte der quer geschnittenen Gallengänge, wobei aber insgesamt die positiven überwogen.

Dementsprechend wählten wir die Bewertung 'stark vermindert' für Präparate mit einer geringen Restpositivität der untersuchten Abflusswege der Galle. Hier überwogen die negativen Gallengänge.

Anti- Ki-67 (Mib-1).

Monoklonaler Maus-Antikörper (50mg/l) vom Isotyp IgG1 (DAKO A/S, Golstrup/Denmark) wurde in der Verdünnung 1:400 angewendet. Er wurde mit Hilfe des DAKO-Gerätes auf die zu untersuchenden Gewebe aufgetragen. Als Vorbehandlung wurden sie einem 20-minütigen Bad in TEC-Puffer unterzogen.

Die Auswertung von sieben Gesichtsfelder erfolgte bei einer 100fachen Vergrößerung .

Die mit dem Proliferationsmarker hervorgehobenen Nuklei der Hepatozyten setzten wir in Relation zu der durchschnittlichen Anzahl der Zellkernen im 25er Gesichtsfeld. Zur Bestimmung der proliferativen Aktivität wurde der prozentuale Anteil der in der Färbung nukleär markierten Hepatozyten bestimmt, wobei durchschnittlich etwas 400 Hepatozyten evaluiert wurden.

Hepatozyten.

Grad I: <5 % positiv

Grad II: >5%.positiv

Auch der Schwerpunkt der Proliferation in den Leberläppchen bzw. Pseudolobuli wurde registriert ('peripher', 'disseminiert').

Die proliferierenden Epithelien der Gallengänge wurden zweistufig bewertetet :

Gallengänge.

Grad I: vereinzelt. 0% bis 25% der Epithelien pro Gallengang befinden sich in Proliferation.

Grad II: vermehrt. >25% der Epithelien pro Gallengang sind in Proliferation.

Anti- Cytokeratin 7 (CK7).

Der monoklonaler Maus-Antikörper der IgG1- Klasse (Konzentration 205 mg/l, Klon OV-TL 12/30, DAKO A/S, Glostrup, Denmark) wurde in einer Verdünnung von 1:50 vor der Weiterbehandlung am DAKO-Gerät aufgetragen. Vor der Färbeprozedur wurden die Präparate in Pronase inkubiert. Wie bei der vorangegangenen Färbung stand uns als Referenzfall die Oxalose-Gewebsprobe zur Verfügung.

Zu den gleichmäßig angefärbten positiven Strukturen zählen die Epithelien der galleableitenden Wege (Hering'sche Kanäle und Gallengänge). Auch hier unterschieden wir folgende Abstufungen der CK7-Expression:

Gallengänge.

Grad I: vermindert (d.h., es existieren negative Gallengangsepithelien)

Grad II: unauffällig (keine negativen Gallengangsepithelien im Präparat zu sehen)

Zur Auswertung wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung gearbeitet. Zur Bewertung der Hepatozyten wurden 10 Gesichtsfelder untersucht, für die Auswertung der Gallengangsepithelien wurden gezielt 10 Portalfelder betrachtet.

Als 'positiv' wurden jene Leberepithelien gewertet, die eine Affinität für diesen Antikörper zeigten, und keine Nekrosezeichen aufwiesen. Sie wurden in Relation zur Gesamtepithelienzahl im Gesichtsfeld gestellt.

Das histologische Bild der Oxalose diente als Vergleich für die folgende Fallauswertung. Wir achteten zudem auf die entsprechende Leberläppchenverteilung ('peripher, disseminiert, zentral'). Wir bildeten zwei Gradierungen:

Hepatozyten.

Grad I: <10 % **positiv**

Grad II: >10 % **positiv**

CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP).

Die Forschungsgruppe Professor Dr. Lönings am Pathologischen Institut des UKE stellte den Antikörper zur Verfügung. Die Verdünnung lag bei 1:100 und wurde auf rehydriertes, vorgewärmtes und mit DAKO-Puffer vorbehandeltes Gewebe aufgetragen. Als Referenzfall stand uns das oben genannte Oxalose-Präparat (E-21501/96) zur Verfügung. Bei der histologischen Auswertung arbeiteten wir mit einer 100fachen Vergrößerung. Als 'positive' Hepatozyten bezeichneten wir jene Epithelien, die eine diffuse, die ganze Zelle ausfüllende, granuläre Anfärbung aufweisen. Sie unterscheiden sich darin von den Hepatozyten, die eine akkumulierte granuläre Zeichnung an den Gallenkanälchen zeigen, wie es in dem als normale Referenz dienendem Oxalose- Präparat zu sehen ist.

Wir bildeten zwei Gruppen, entsprechend des Anteils an positiven Hepatozyten in den Leberläppchen bzw. Pseudolobuli :

Grad I: 0 - 25% **positiv**

Grad II: > 25% **positiv**

Der Oxalose-Fall diene als Referenz für die Wertung 'normal'.

Es wurden exemplarisch 18 Fälle auf CEACAM1 untersucht.

Rhodanin-Färbung (Lindquist 1969) zum Kupfer-Nachweis.

Die Schnitte wurden, nach dem Entparaffinieren und Dehydrieren, bei 56°C für drei Stunden in Rhodanin- Lösung inkubiert. Die Stammlösung setzte sich wie folgt zusammen: 0,3g p-Dimethylaminobenzylidene Rhodanine (Aldrich Kat.Nr. 11,458-8, 10g) wurden 100 ml Ethanol zugesetzt und in einem Wasserbad erhitzt. Die Gebrauchslösung bestand aus 3 ml dieser Stammlösung und 47 ml Aqua bidest. Sie wurde kräftig durchgeschüttelt, filtriert und auf 56°C erwärmt wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin

3.6. MDR3-Versuche

Für den Nachweis dieses kanalikulären Transporterproteins konnten wir auf zwei Antikörper zurückgreifen. Ein kommerzieller monoklonaler Maus-Antikörper vom IgG2b-Isotyp (Klon P3II-26; Alexis® Biochemicals, Product No.: 801-028-C250) und ein hauseigener Ziegen-Antikörper, mit dem bisher noch keine Versuchserfahrung bestand. Der Alexis-Antikörper wird für Untersuchungen an Aceton-fixierten Gewebeproben empfohlen. Die Markierung des MDR3-Epitopes an Formaldehyd-fixierten menschlichen Geweben ist mit diesem Antikörper bisher nicht gelungen.

Als Untersuchungsmaterial diene uns, neben dem Oxalose-Fall (SäF 8656), das Lebergewebe aus der Umgebung einer operierten Karzinommetastase (E-21126/02, SäF 13457, E-12511/03, SäF 13535). Dieses Gewebe lag teils in Form von Paraffinschnitte nach Formalin- oder HOPE-, oder Zink-Fixierung, teils als Kryostatschnitte von nativ eingefrorenem Gewebe vor.

Die Färbungen wurden mit Hilfe des VENTANA-Gerätes durchlaufen. Die angewandte Verdünnung des kommerziellen Maus-Antikörper lag bei 1:20 und 1:50, die des Ziegen-Antikörpers bei 1:10, 1:100 und 1:1000.

Als Arbeitsanweisung für die MDR3-Detektion diene uns eine Veröffentlichung im 'Cancer Research', in der über die Lokalisation des P-Glycoproteins an Aceton-fixierten Geweben berichtet wurde [91].

Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (30 min) folgte das Auftragen von Peroxidase- gekoppelten Kaninchen-Anti-Ratte Immunglobulin (1:200; Code No. P0450, Lot 080, DAKO Corporation, Kalifornien, USA), bzw. Maus-Anti-Ziege IgG (1:200; Code No. 205-005-108, Lot 46662, Jackson Immuno-Research, Dianova GmbH, Hamburg), das bei einer Inkubationsdauer von 16 min an den Primärantikörper bindet. Es folgte für 10 Minuten eine Inkubation mit FITC-gebundenem Tyramin [Herstellung: 25 µl 150 mM Tyramin (Aldrich) in Dimethylsulphoxide gemischt in 50 µl 150-160 mM N-Hydroxysuccinimide-Ester des Fluorochromes (Boehringer Mannheim)] in der Verdünnung 1:1000 (in 0,2 M Tris-HCl. 10 mM Imidazol, 0.01% H₂O₂, pH 8.8)]. Ein HRP(horseradish peroxidase)-gekoppelter Fluorescein- Antikörper (1:100, DAKO Rabbit F(ab') Anti-FITC/HRP, Code No.: P 5100, Lot 052; DAKO Corporation, Kalifornien, USA)

wurde hinzugegeben und mit Amino-Ethyl-Carbazole/H₂O₂ entwickelt [91].

Es wurde mit Hämatoxylin (2 min) gegengefärbt und danach mit Bluing-Reagent (2 min) inkubiert.

Im Einzelnen wurden folgende Versuche angesetzt:

Versuch 1.

Es wurde untersucht, ob der hauseigene MDR3-Antikörper ohne Vorbehandlung an den Epitopen von formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Lebergeweben bindet. Hierzu wurde der hauseigene MDR3- Ziegenantikörper an dem Oxalose-Präparat ausgetestet. Als Kontrolle wurde eine EMA- Färbung (1:700, Epithelial Membrane Antigen, Seralab, Ziegen-Antikörper, polyklonal) an dem Fall SäF 12840 durchgeführt.

Versuch 2.

Da ohne Vorbehandlung keine spezifische Färbung mit dem hauseigenen Marker erzielt wurde, wurden das formalinfixierte Lebergewebe aus der Umgebung einer Lebermetastase ((E-21126/02, SäF 13457) Prozeduren unterzogen, die zur Demaskierung des MDR3-Epitopes beitragen sollten. Das formalinfixierte Lebergewebe wurde somit einer Vorbehandlung mit TEC-Puffer, Bor-Säure, Citrat-Puffer und Pronase1 unterzogen, bevor die Inkubation mit den beiden MDR3-Markern durchgeführt wurde.

Versuch 3.

Hier wandten wir uns dem kommerziellen MDR3-Marker zu. An dem angrenzenden Lebergewebe einer operierten Lebermetastase (E- 12511/03, SäF13535) sollte das MDR3-Protein nachgewiesen werden. Die angewandten Verdünnungen waren 1:20 und 1:50. Das operativ entnommene Gewebe wurde zügig der Kryostatpräparation, HOPE- und Zinkfixation zugeführt. Eine Vorbehandlung fand nicht statt.

Versuch 4.

An dem HOPE- fixierten Gewebe des Falles E- 12511/03 (SäF13535, Sigmakarzinommetastase, siehe Versuch 3 und 5) wurde am VENTANA- Gerät nach der APAAP-Methode der kommerzielle MDR3- Antikörper ausgetestet. Im

Gegensatz zum vorangegangenen Versuch 3 wurden die Schnitte zusätzlich der Vorbehandlung mit TEC-Puffer, DAKO-Puffer und Bor-Säure unterzogen.

Versuch 5.

Die Expression des MDR3-Transporterproteins bei einer gesicherten PFIC3-Erkrankung (E-15490/03, SäF 13615) sollte bei diesem Versuchslauf untersucht werden. Die aus der Resektatleber entnommene Gewebeprobe wurde kryostatpräpariert. Jeweils ein Schnitt wurde mit dem kommerziellen bzw. dem hauseigenen Ziegen- MDR3- Marker inkubiert. Zusätzlich wurde an einem weiteren Schnitt die CD10-Expression mit einer entsprechenden Färbung untersucht. Als Kontrolle diente ebenfalls kryostatpräpariertes Lebergewebe aus der Umgebung einer operierten Sigmakarzinommetastase (siehe Versuche 3 und 4: E-12511/03, SäF 13535).

Versuch 6.

Vergleichend zum vorangegangenen Versuch 5 wurde dieses Mal eine Färbung nach der ABC-Methode mit dem kommerziellen Maus-Antikörper gegen MDR3 durchgeführt. Die untersuchten Schnitte wurden den Proben entnommen, die im Versuch 5 als Untersuchungsgewebe dienten. Um die Hintergrundfärbung zu beurteilen, wurde jeweils ein Schnitt ohne den ersten Antikörper inkubiert. Angewandte Verdünnungen des 1. Antikörpers: 1: 20 und 1: 50.

Versuch 7.

Auch hier erfolgte die Färbung mit dem kommerziellen MDR3-Antikörper am DAKO-Gerät an den Leberproben der PFIC3-Erkrankung (E-15490/03, SäF 13615) und aus der Umgebung der Sigmakarzinommetastase (E-12511/03, SäF 13535). Im Unterschied zu Versuch 6 wurde die APAAP-Methode angewendet um eventuelle Qualitätsunterschiede der Färbung festzustellen. Auch hier durchliefen zwei Schnitte die Färbeprozedur ohne die Inkubation mit dem ersten Antikörper, um die unspezifische Hintergrundfärbung bewerten zu können. Angewandte Verdünnungen des 1. Antikörpers: 1: 20 und 1: 50.

4. ERGEBNISSE

Die histologischen und immunhistochemischen Beobachtungen der cholestatischen Lebererkrankungen wurden in themenbezogenen Kombinationen in Kreuztabellen zusammengetragen. Hieraus wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS nach Fischer's exaktem Test die 2-seitige Signifikanz bestimmt. Als empirische Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p < 0,05$ festgelegt. Es wurden Zusammenhänge der mit einer Cholestase einhergehenden entzündlichen, bindegewebigen und parenchymatösen Prozessen untersucht (4.1.).

In einem zweiten Schritt wurden Merkmalsunterschiede zur Differenzierung zwischen dem cholangioduktalen und dem hepatozellulären Typ der Cholestase herausgearbeitet, und am Ende mit anderen cholestatischen Lebererkrankungen verglichen (4.2.).

In der Histologie ist mittels konventioneller Färbemethoden eine erste morphologische Einschätzung bezüglich der Diagnosestellung möglich. Die Immunhistochemie ergänzt und präzisiert die in der konventionellen Histologie erworbenen Informationen. Mit ihr kann die Parenchymfunktion mittels Mib-1 und die hepatozelluläre Umdifferenzierung durch CK7 erfasst werden. Die Intaktheit des Bürstensaumes kann mit dem CD10-Nachweis dargestellt werden. Die Beurteilung der epithelialen polaren Differenzierung ist mit der CEACAM1-Färbung möglich.

4.1. Die Cholestase und Gewebsveränderungen im Allgemeinen.

In diese Auswertung konnten 38 Fälle einfließen. Fünf p-Wert-Tabellen mit unterschiedlichen Schwerpunkten veranschaulichen die Ergebnisse. Signifikante und interessante Ergebnisse der einzelnen Tabellen werden im folgenden benannt und erläutert. Die vollständigen p-Wert-Tabellen sind im Anhangsteil (Kapitel 8) beigelegt.

Es zeigt sich, dass eine vermehrte Mib-1-Aktivität der neoduktulären Strukturen nicht zwingend an eine Vermehrung der Gallengangsepithelien gekoppelt ist, obwohl der

Zusammenhang zwischen einer Cholestase in den galleleitenden Strukturen und der Bildung neoduktulärer Gänge deutlich wurde.

Die Cholestase zieht eine CD10- Reduktion in den betroffenen galleleitenden Strukturen nach sich. Aber auch in nicht cholestatisch betroffenen Arealen zeigt sich eine Reduktion des CD10.

Des weiteren geht der Gallestau mit einer erhöhten Mib-1-Aktivität und CK7-Expression in den Leberepithelien einher. Beide Marker verhalten sich in ihrer Ausprägung ähnlich, lassen aber keinen deutlichen Rückschluss auf einen an ihrem Expressionsort vorliegenden Gallestau zu. Das CK7 ist aber deutlicher als Mib-1 an cholestatische Hepatozyten gekoppelt.

Hepatozelluläre Riesenzellen und geschwollene Epithelien treten vor allem in kleinknotigen und einem stark degenerativ veränderten Leberparenchym auf.

Mit zunehmender Cholestase gesellen sich vermehrt Entzündungszellinfiltration, Epithelschwellung und ein Parenchymschwund dem histologischen Bild hinzu.

4.1.1. Histologie mittels konventioneller Methoden.

Die Pseudolobuli.

Die Bildung von Pseudolobuli geht mit einer Epithelschwellung einher. Dies wird vor allem bei mikronodulärem Läppchenumbau deutlich (Tab.1, I, $p=0,009$. II, $p=0,006$, siehe Abb.1). Allerdings sind geschwollene Epithelien nicht nur hier zu beobachten (Tab.1, II).

		geschwollene Epithelien		Gesamt
		nein	ja	
Pseudolobuli	ja	5	24	29
	nein	6	3	9
Gesamt		11	27	38

Tabelle 1, I.

In Präparaten ohne Pseudolobuli zeigen sich in nur drei von 27 Fällen geschwollene Epithelien.

		geschwollene Epithelien		Gesamt
		nein	ja	
kleine Pseudolobuli	nein	11	14	25
	ja	0	13	13
Gesamt		11	27	38

Tabelle 1, II.
In allen Fällen mit kleinen Pseudolobuli finden sich geschwollene Epithelien (13 von 13 Fälle).
siehe Abb.1.

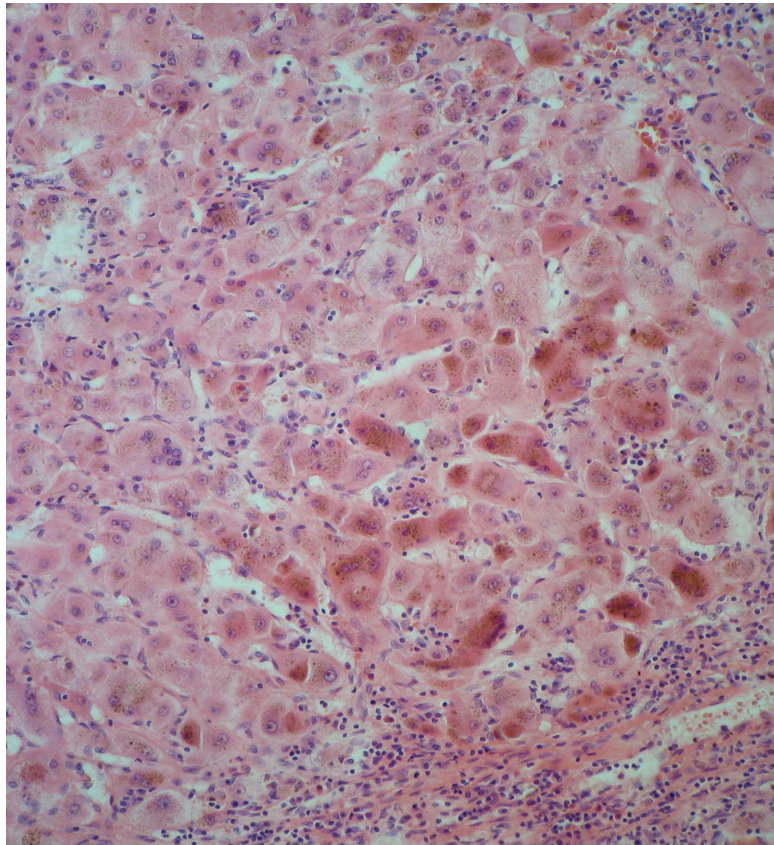


Abbildung 1: Zellschwellung und hepatozelluläre Riesenzellen in kleinen Pseudolobuli. Hier PFIC 3, ein drei Jahre alter Junge. HE, Vergr. 200fach.

Die hepatozellulären Riesenzellen.

Mit Zunahme der Pseudolobuligröße nimmt die Wahrscheinlichkeit ab, in diesen Leberarealen Riesenzellen vorzufinden (Tab.1, III, $p=0,028$). Diese werden auch vermehrt dann angetroffen, wenn die Leber lichtmikroskopisch einen ausgeprägten Parenchymschwund erkennen lässt (Tab.1, IV, $p=0,034$).

		Riesenzellen vorhanden		Gesamt
		nein	ja	
kleine Pseudolobuli	nein	20	5	25
	ja	5	8	13
Gesamt		25	13	38

Tabelle 1, III.

Riesenzellen sind in acht von 13 Fällen in kleinen Pseudolobuli zu finden. In dem Großteil der Fälle fanden sich weder Riesenzellen noch kleine Pseudolobuli (20 von 38 Fälle).

		Riesenzellen vorhanden		Gesamt
		nein	ja	
mittel-erhebl. Parenchym- schwund	nein	8	0	30
	ja	17	13	8
Gesamt		25	13	38

Tabelle 1, IV.

Riesenzellen finden sich in Präparaten, in denen ein ausgeprägter Parenchymschwund vorliegt (13 von 13 Fälle).

Die Cholestase und andere morphologische Merkmale.

Eine Zunahme der Cholestase geht mit einer Entzündungszellzunahme einher (Tab. 1, V, $p=0,028$).

Wenn eine Zellballonierung der Hepatozyten verzeichnet wurde, dann lag zudem meist eine mäßige oder schwere Cholestase vor (Tab.1, VI, $p=0,047$).

Es gibt kaum einen stärkeren Parenchymschwund in dem untersuchten Fallkollektiv, der nicht mit einem vermehrten Anteil an Leberzellnekrosen (Tab.1, VIII, $p=0,005$) oder geschwollenen Epithelien (Tab.1, VII, $p=0,031$) einhergeht.

		mittel bis schwere Entzündungsreaktion		Gesamt
		nein	ja	
mäßige bis schwere Cholestase	nein	8	3	11
	ja	8	19	27
Gesamt		16	22	38

Tabelle 1, V.

Eine schwere Cholestase korreliert mit einer ausgeprägten Entzündungsreaktion (19 von 22 Fälle).

		geschwollene Epithelien		Gesamt
		nein	ja	
mäßige bis schwere Cholestase	nein	6	5	11
	ja	5	22	27
Gesamt		11	27	38

Tabelle 1, VI.

Eine mäßige bis schwere Cholestase geht mit in der Regel mit einer Schwellung des Leberparenchyms einher. (22 von 27 Fälle).

		geschwollene Leberepithelien		Gesamt
		nein	ja	
mittel-erhebl. Parenchym-schwund	nein	5	3	8
	ja	6	24	30
Gesamt		11	27	38

Tabelle 1, VII.

Geschwollene Epithelien finden sich auch bei einem ausgeprägten Parenchymschwund. (24 von 27 Fälle).

		vermehrte bis ausgiebige Leberzellnekrosen		Gesamt
		nein	ja	
mittel-erhebl. Parenchym-schwund	nein	8	0	8
	ja	13	17	30
Gesamt		21	17	38

Tabelle 1, VIII.

Eine große Anzahl von Leberzellnekrosen war quasi gleichbedeutend mit einem mittleren bis erheblichen Parenchymschwund. (17 von 17 Fälle).

4.1.2. Immunhistochemische Parameter.

Neoduktuläre Proliferation, die Gallengänge und Mib-1.

Bei einer geringen Teilungsaktivität neoduktulärer Epithelien zeigt sich auch eine verminderte Mib-1-Aktivität der kleinen Gallengänge ($p=0,002$, Tab.2, I, orange).

Eine starke neoduktuläre Proliferation ist aber nicht nur ausschließlich an eine starke Proliferation der kleinen Gallengänge gekoppelt ($p=0,002$, Tab.2, II, orange).

		Mib-1 Gallengangsproliferate: 0-25% der Epithelien		Gesamt
		nein	ja	
Mib-1 kl. Gallengänge: 0-25% der Epithelien	nein	8	1	9
	ja	8	21	29
Gesamt		16	22	38

Tabelle 2, I.

In 22 Fällen mit einer geringen neoduktulären Epithelproliferation ist nur bei einem Fall eine gesteigerte Proliferation der kleinen Gallengänge zu sehen.

		Mib-1 Gallengangsproliferate: > 25% der Epithelien		Gesamt
		nein	ja	
Mib-1 kl. Gallengänge: > 25% der Epithelien	nein	21	8	29
	ja	1	8	9
Gesamt		22	16	38

Tabelle 2, II.

In 16 Fällen mit einer ausgeprägten neoduktulären Proliferationsrate zeigt sich nur in der Hälfte der Fälle eine gesteigerte Proliferation der kleinen Gallengänge.

Schädigung des Gallepols: CD10 und die Gallengänge.

Bei einer Cholestase in den großen Gallengängen lässt sich ausnahmslos eine Verminderung der CD10-Expression in diesen Gallengängen feststellen ($p=0,014$, Tab.2, III, orange). Allerdings können auch cholestasefreie Gallengänge eine verminderte CD10- Expression aufweisen (Tab.2, III, blau).

		Cholestase in den großen Gallengängen		Gesamt
		nein	ja	
CD 10 in den Gallengängen unauffällig	nein	15	9	24
	ja	14	0	14
Gesamt		29	9	38

Tabelle 2, III.

Unter neun Fällen mit Cholestase in den großen Gallengängen ist keiner mit unauffälliger CD10-Expression (orange). Die CD10-Reduktion ist aber nicht cholestase-spezifisch (blau).

Die Lokalisation der Cholestase und Mib-1.

Alle untersuchten Fälle mit einer betont läppchenperipheren Cholestase wiesen schwerpunktmäßig in der selben Läppchenregion eine durch Mib-1 signalisierte Hepatozytenproliferation auf ($p=0,003$, Tab.3, I und Abb. 2a+b). Allerdings lässt sich ein Umkehrschluss nicht zwingend ableiten. Das heißt, eine leberläppchenperiphere Mib-1- Betonung ist nicht unbedingt an eine histologisch sichtbare läppchenperiphere

Cholestase gekoppelt.

Eine verstreute Mib-1- Verteilung im Leberläppchen ist nicht gleichbedeutend mit einer diffusen Cholestase ($p=0,05$, Tab.3, II), obwohl eine Tendenz zu dieser Aussage zu erkennen ist.

		Mib-1 Betonung in Leber- läppchen peripher		Gesamt
		nein	ja	
Cholestase läppchen- peripher	nein	20	11	31
	ja	0	7	7
Gesamt		20	18	38

Tabelle 3, I.

Von sieben Fällen mit einer klaren läppchen-peripheren Mib-1-Betonung weisen alle eine läppchenperiphere Cholestase auf. (siehe Abb. 2a+b)

		Mib-1 disseminiert im Leber- läppchen		Gesamt
		nein	ja	
Cholestase diffuslobulär	nein	14	6	20
	ja	6	12	18
Gesamt		20	18	38

Tabelle 3, II.

In 12 von 18 Fällen geht eine diffuslobuläre Cholestase mit einer disseminierten Mib-1-Expression einher.

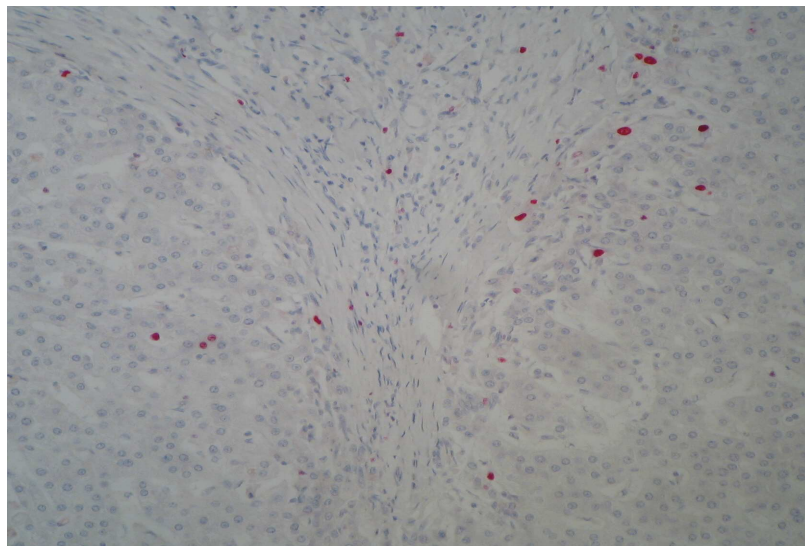


Abbildung 2a: 16 Monate altes Mädchen mit Gallengangsatriesie.

Mib-1: läppchenperiphere Betonung der Mib-1-Expression bei läppchen-peripherer Cholestase (Tab.3.I). Vergr. 150fach.

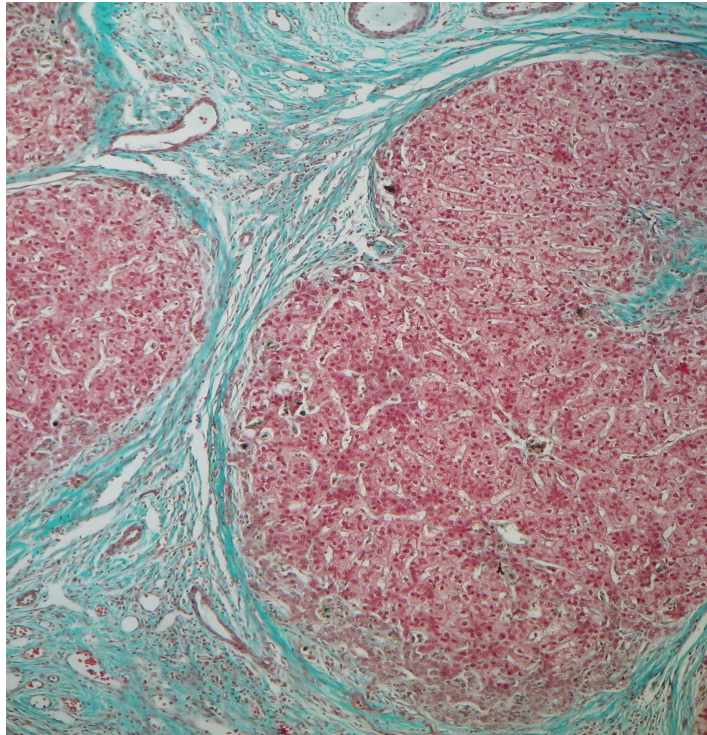


Abbildung 2b: Fall entsprechend Abb. 2a. Komplette feinknotige Zirrhose. Peripher betonte Cholestase. Glatte Abgrenzung der Pseudolobuli durch eine ringförmige perilobuläre Fibrose. Masson-Goldner. Vergr. 100fach.

Die Lokalisation der Cholestase und CK7.

In Bezug auf die Cholestaselokalisation verhält sich das Cytokeratin 7 (CK7) wie Mib-1. Auch zeigten hier alle untersuchten Fälle mit einer läppchenperipher betonten Cholestase ein vermehrtes Auftreten von CK7 in der Läppchenperipherie (Tab.3,III $p=0,009$). Eine läppchenperiphere Betonung dieses Strukturproteins ist, wie Mib-1, aber nicht ausschließlich an eine Cholestase in dieser Region gebunden.

Im Gegensatz zu Mib-1 ist ein Zusammenhang zwischen einer diffusen Verteilung von CK7 und einer disseminierten Cholestase im Leberläppchen zu erkennen (Tab.3, IV $p=0,006$).

		CK 7 Betonung in Leber- läppchenperipher		Gesamt
		nein	ja	
Cholestase läppchen- peripher	nein	18	13	31
	ja	0	7	7
Gesamt		18	20	38

Cholestase (blau). Anm.: zentral war der Gallestau nie betont.

Tabelle 3, III.

In allen sieben Fällen mit läppchenperipherem Akzent der Cholestase zeigt sich auch eine dort lokalisierte CK7-Betonung. Diese findet sich aber auch in 13 von 20 Fällen bei diffuser

		CK 7 disseminiert im Leber- läppchen		Gesamt
		nein	ja	
Cholestase diffuslobulär	nein	17	3	20
	ja	7	11	18
Gesamt		24	14	38

Tabelle 3, IV.

Eine disseminierte CK7-Verteilung in den Leberläppchen ging in 11 von 14 Fällen mit einer diffusen Cholestase einher.

Die Lokalisation von CK7 und Mib-1.

Wie man schon aus den vorangegangenen Beobachtungen ansehen konnte, verhalten sich CK7 und Mib-1 in der Läppchenverteilung bei cholestatischen Lebererkrankungen ähnlich. Dies lässt sich auch an der in Tab.3, V ($p=0,004$) dargestellten Verteilung der läppchenperipheren Zellstrukturen erkennen (siehe Abb. 3a+b).

		CK 7 Betonung im Leber- läppchen peripher		Gesamt
		nein	ja	
Mib-1 Betonung läppchen- peripher	nein	14	6	20
	ja	4	14	18
Gesamt		18	20	38

Tabelle 3, V.

CK7 und Mib-1 zeigen in ihrer Läppchenverteilung ein ähnliches Verhalten. (siehe Abb. 3a+b)

Abbildungen 3 a+b: CK7 und Mib-1 verhalten sich bezüglich der Läppchenverteilung ähnlich (Tab.3.V). Hier Betonung peripher im Leberläppchen.

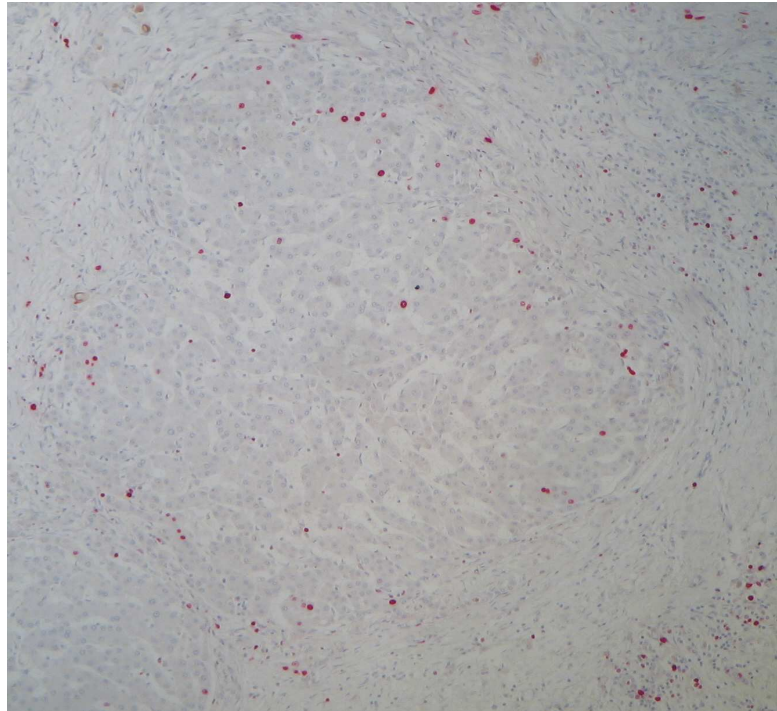


Abbildung 3 a: Gallengangsatresie. Ein Mädchen im Alter von einem Jahr. Läppchenperiphere Betonung der Mib-1-Expression. Mib-1, Vergr. 100fach.

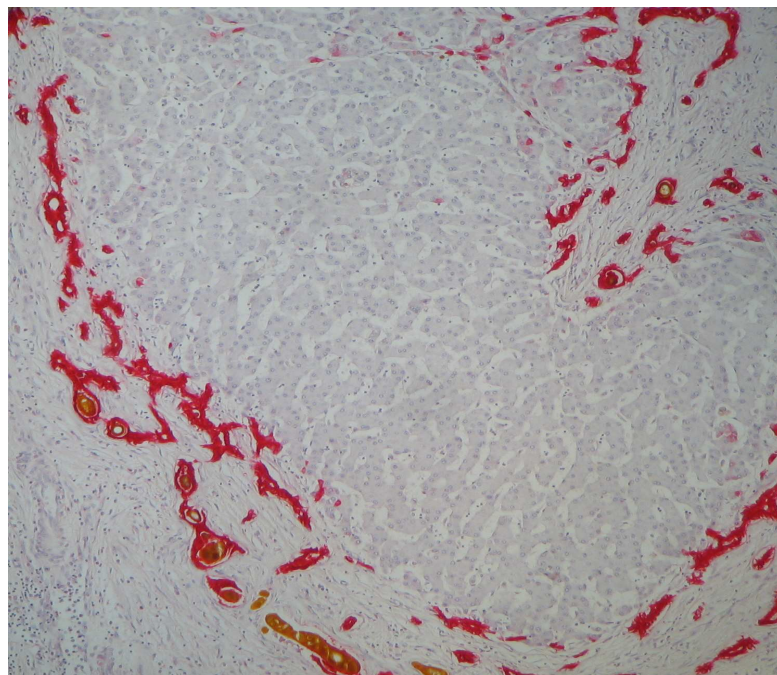


Abbildung 3 b: Fall siehe Abb. 3a. Läppchenperiphere Betonung der hepatozellulären CK-7-Expression. CK7, Vergr. 100fach.

Die Cholestase in den Gallengängen und die neoduktuläre Proliferation.

Eine Cholestase in den kleinen und großen Gallengängen geht mit einer vermehrten neoduktulären Proliferation einher (Tab.4, I .p=0,000. II p=0,001).

		Cholestase in den kleinen Gallengängen		Gesamt
		nein	ja	
neoduktul. Prolif- eration:vermehrt	nein	16	2	18
/stark vermehrt	ja	5	15	20
Gesamt		21	17	38

Tabelle 4, I.
Eine Cholestase in den kleinen Gallengängen geht in der Regel mit einer ausgeprägten neoduktulären Proliferation einher (15 von 17 Fällen).

		Cholestase in den großen Gallengängen		Gesamt
		nein	ja	
neoduktul. Prolif- eration:vermehrt	nein	18	0	18
/stark vermehrt	ja	11	9	20
Gesamt		29	9	38

Tabelle 4, II.
In allen Präparaten des Kollektivs mit einer Cholestase in den großen Gallengängen war eine ausgeprägte neoduktuläre Proliferation zu erkennen (9 von 9 Fällen).

Die Cholestase in den Gallekanälchen und die neoduktuläre Proliferation.

Wenn eine Cholestase in den Gallenkanälchen beobachtet wurde, dann konnte man auch eine vermehrte neoduktuläre Proliferation in den Präparaten feststellen. Umgekehrt konnte man auch bei einem Großteil der Fälle mit einer deutlich ausgeprägten neoduktulären Proliferation eine Cholestase in den Gallenkanälchen sehen (Tab.5, I, p=0,011).

		Cholestase in den Gallekanälchen		Gesamt
		nein	ja	
neoduktul. Prolif- eration:vermehrt	nein	9	9	18
/stark vermehrt	ja	2	18	20
Gesamt		11	27	38

Tabelle 5, I.
Unter 20 Fällen mit einer vermehrten neoduktulären Proliferation sind 18 Fälle mit cholestatischen Gallekanälchen. Umgekehrt finden sich von 27 Fällen mit einer Cholestase in den Galle-

kanälchen nur neun mit einer geringen neoduktulären Proliferation.

4.2. Die primär cholangioduktale und die primär hepatozelluläre Cholestase.

Im Folgenden werden histologische Merkmale der primär cholangioduktalen und der primär hepatozellulären Cholestase verglichen.

Diese zwei Eckfeiler cholestatischer Defektebenen wurden auf Merkmalsmuster hin untersucht. Danach wurden diese mit den restlichen cholestatischen Fällen im Kollektiv verglichen, und erörtert, ob und mit welchen Merkmalen eine Lokalisationsbestimmung des Gallentransportdefektes möglich wäre.

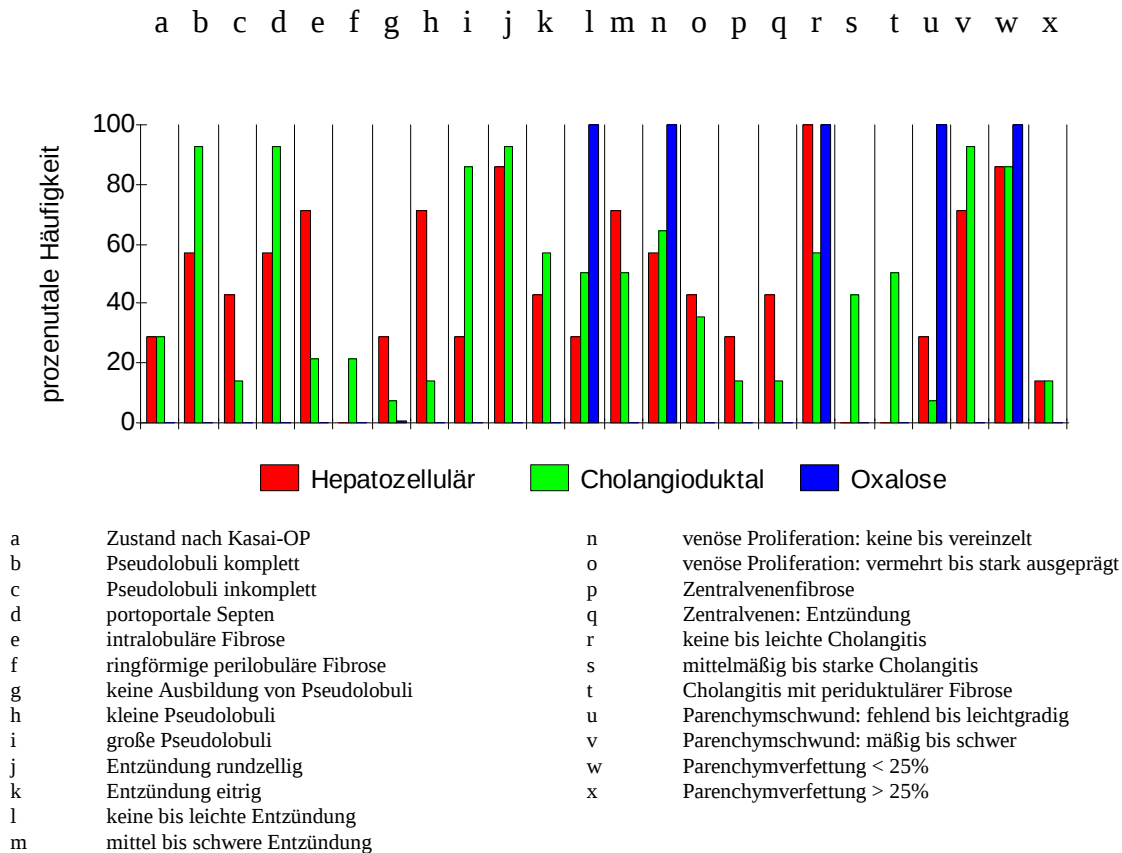
Zur Ausarbeitung differentialdiagnostischer Parameter wurden 47 morphologische bzw. immunhistochemische Merkmale untersucht.

Dabei zeigten sich einzeln genommen nicht sicher diskriminierende Parameter, die in ihrer Gesamtheit als Stütze für differentialdiagnostische Überlegungen zur Defektebenenbestimmung des Gallentransportes dienen können. So sprechen entweder unvollständige oder sehr kleinlobuläre Pseudolobuli und eine intralobuläre Septenbildung genauso für eine *PHZC*, wie eine starke Mib-1-Proliferation bei kleinen CD10-positiven, entzündungsfreien Gallengänge. Auch disseminierte, für CK7 und CEACAM1 positive, diffus im Leberläppchen verteilte cholestatische Hepatozyten weisen neben Riesenzellen, geschwollenen Epithelien und einem vergleichsweise geringen Parenchymschwund auf eine *PHZC* hin.

Auf der anderen Seite stehen perilobuläre Bindegewebsmanschetten, sklerosierende, entzündete, cholestatische, für CD10 negative und in ihrer Anzahl reduzierte Gallengänge für einen weiter distal im Gallenfluss gelegenen Defekt im Sinne einer primär cholangioduktalen Cholestase (*PCDC*).

Cholestatische Gallegänge in entzündlich veränderten Hili und eine neoduktuläre Proliferation sind ebenso unsichere Zeichen für eine *PCDC* wie eine läppchenperiphere Betonung der CK7- und CEACAM1-Expression. Diese Merkmale sind insgesamt jedoch vermehrt bei der *PCDC* zu sehen.

Tabelle 6. Bindegewebige, portale und inflammatorische Veränderungen primär hepatozellulärer und primär cholangioduktales Cholestasen.



4.2.1. Histologie mittels konventioneller Methoden.

Bindegewebige Veränderungen.

Eine vollständige Ausbildung von Pseudolobuli wurde bei der *PCDC* häufig beobachtet (Tab.6b). Nur selten waren lediglich kleine Parenchymbrücken zu sehen, die die Leberläppcheninseln untereinander verbanden (Tab.6c).

Bei der *PHZC* war dieses Übergewicht an kompletter Pseudoläppchenbildung nicht zu sehen. Wenn sie aber ausgebildet waren, dann sind sie häufiger kleinknotig (Tab.6h,i).

Eine portoportale Septenbildung kommt häufig in beiden Erkrankungsgruppen vor (Tab.6d). Eine intralobuläre, feine Bindegewebsvermehrung ist bei den *PHZC* im Vergleich zu den *PCDC* häufiger festzustellen (Tab.6e).

Obwohl die intrazelluläre Cholestase in beiden Fällen oft vorkommt (Tab.7k), scheint die Neigung zur intralobulären Bindegewebsbildung bei der *PHZC* größer zu sein als bei einer sekundären Hepatozytenschädigung mit Cholestase bei der *PCDC* (Tab.6e).

Die Zentralvenenfibrose zeigt keine auffällige Häufigkeitsverteilung (Tab.6p), wurde aber anteilmäßig häufiger bei den *PHZC* gesehen. Fibrosen der Gallengangswände

wurden hier nicht gesehen (Tab.6t), und hängen wahrscheinlich mit der Entzündung der Gangwände bei Cholestase aufgrund von Gallengangsatresien zusammen (Tab.7o,p).

Eine ringförmige perilobuläre Fibrose, welche die Pseudolobuli zu den Portalfeldern regelrecht abkapselten, konnten bei einem Teil der *PCDC* gesehen werden. In der Gruppe der primären hepatozellulären Cholestasen tritt dieser Fibrosetyp nicht auf (Tab.6f).

Die Vermehrung von venösen Gefäßen und ödematöse Auflockerungen in den Portalfeldern zeigen keine Gruppenspezifität (Tab.6n-o).

Entzündung.

Die Unterschiede in der Stärke der Entzündung und in den beteiligten Entzündungszelltypen sind in den verglichenen Erkrankungsgruppen minimal (Tab.6j-m). Ein Unterschied zeigt sich jedoch bei der Lokalisation. So ist eine vermehrte bis starke Entzündungsreaktion, die sich auf die Gallengänge konzentriert, in der Gruppe der *PCDC*, nicht aber bei den *PHZC* zu sehen (Tab.6r,s,t). Der Entzündungsreiz scheint die Galle zu sein, die sich bei einer Atresie der Gallengefäße im Falle der *PCDC* vermehrt zurückstaut (Tab.7o,p).

Intralobuläre Veränderungen.

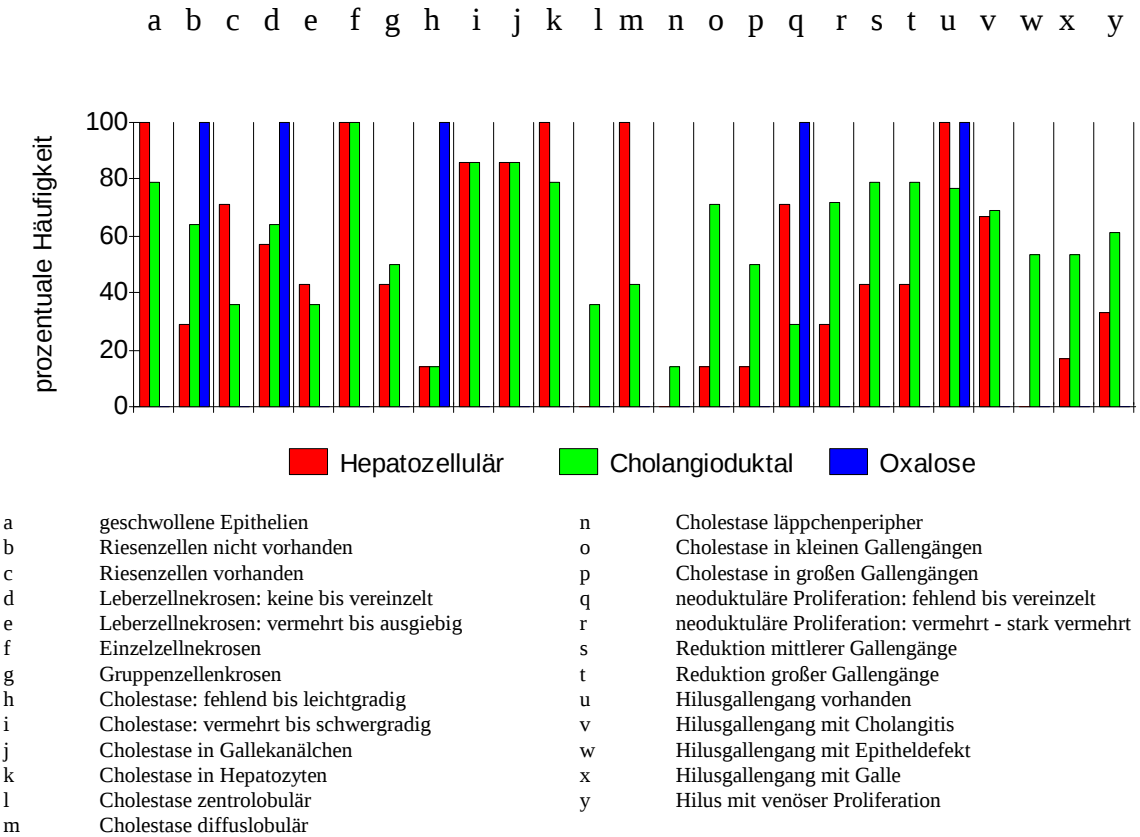
Die Reduktion des Läppchenparenchyms der Leber in Relation zum Bindegewebe ist in den untersuchten Fällen zumeist mäßig bis stark ausgebildet. Die Unterschiede der verglichenen Krankheitsgruppen sind minimal. Die Reduktion ist bei den *PCDC* etwas stärker ausgeprägt (Tab.6v), während in der Gruppe der *PHZC* der Parenchymschwund häufig geringer als in der Gruppe der *PCDC* ausfällt (Tab.6u).

Die Verfettung in den Leberepithelien ist in den meisten Präparaten gar nicht zu sehen, oder nur minimal ausgeprägt. Eine Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen gibt es nicht (Tab.6w,x).

Eine Schwellung (Ballonierung) der Leberepithelien war bei dem Großteil aller Fälle zu sehen. Besonders ist dies ausgeprägt und regelmäßig bei den *PHZC* zu beobachten (Tab.7a). Auch mehrkernige, hepatozelluläre Riesenzellen in den Leberläppchen sind häufig in den Präparaten der *PHZC* zu sehen. Der Anteil der histologischen Befunde mit diesem Zellphänomen ist bei den *PCDC* deutlich geringer (Tab.7b,c).

Leberzellnekrosen haben vielerlei Ursachen. Erwartungsgemäß variiert das Auftreten von Nekrosen in den beiden Gruppen minimal und liefert hier keine diagnostisch verwertbare Information (Tab.7d-f).

Tabelle 7. Cholestase, Gallengänge und Leberepithelveränderungen primär hepatozellulärer und primär cholangioduktaler Cholestasen.



Cholestase.

Der Akkumulation von Galle ist ein Merkmal sowohl der *PHZC* als auch der *PCDC* und ihre Ausprägung bestimmt auch die OP-Indikation. Dementsprechend ist sie in unserem Kollektiv zumeist stark ausgeprägt (Tab.7h,i). Sie betrifft in den Leberläppchen sowohl die Hepatozyten (Tab.7k) als auch die Gallenkapillare (Tab.7j). Die Leberparenchymzellen sind in der *PHZC* -Gruppe offenbar häufiger betroffen (Tab.7k).

Die Lokalisation der Cholestase wies bei den *PCDC* ausgiebigere Variationen als bei den primär hepatozellulären Erkrankungen auf. Bei den letzteren konnte die Cholestase diffus in den Leberläppchen beobachtet werden, ohne

leberläppchenbezogene Schwerpunkte. Die *PCDC* zeigen mit einer läppchenperipher, -diffus, in seltenen Fällen auch -zentral betonte Cholestase eine buntere Verteilung des Gallenstaus als die *PHZC* (Tab.7. l,m,n).

In den Gallengängen ist nur in Einzelfällen im *PHZC*-Kollektiv eine Cholestase zu sehen, im Gegensatz zu den *PCDC*. Hier ist sie zwar nicht die Regel, aber trotzdem sehr oft histologisch nachzuweisen. Bevorzugt ist sie in den kleinen Gallengängen sichtbar (Tab.7. o,p,x).

Die Gallengänge.

Eine Reduktion von mittleren und großen Gallengängen ist prinzipiell in beiden Gruppen möglich. Bei den *PCDC* ist sie aber häufiger und ausgeprägter als bei den *PHZC* (Tab.7s,t). Auch die neoduktuläre Proliferation von Gallengängen ist bei den *PCDC* ein häufiges Merkmal und tritt hier im Vergleich zu den *PHZC* öfter auf (Tab.7q,r). Ein besonderes Augenmerk war auf die großen hilären Gallengänge zu richten, da sie den extrahepatischen Anteil des Gallenbaumes repräsentiert. Zu sehen waren sie innerhalb der Gruppe der *PHZC* in allen Fällen und bei den *PCDC* bei dem Großteil der untersuchten Fälle. Während eine Cholangitis in beiden Erkrankungsgruppen relativ oft zu sehen ist (Tab.7v), sind Epitheldefekte und freie Galle fast ausschließlich bei den *PCDC* zu beobachten, wenn auch nur in der Hälfte der Fälle (Tab.7.w,x). Etwa genauso häufig sieht man in dieser Gruppe eine ödematöse Auflockerung des perihilären Bindegewebes und eine dortige Vermehrung von venösen Gefäßen. Auch bei der *PHZC* kann man diese beiden Merkmale, wenn auch seltener, finden (Tab.7y).

4.2.2. Immunhistochemische Parameter.

Der nukleäre Proliferationsmarker **Mib-1** zeigt sich in seiner hepatozellulären Ausprägung in beiden untersuchten Gruppen annähernd gleich stark. Mit Vorsicht kann man eine stärkere hepatozelluläre Proliferationstendenz bei den *PCDC* verzeichnen (Tab.8a,b).

Eine Differenzierung der beiden Krankheitsgruppen anhand der Mib-1-Lokalisation im Leberläppchen ist nicht möglich. Sie ist vornehmlich disseminiert verteilt (Tab.8c,d). Bei den *PHZC* zeigt sich eine höhere Proliferationsrate der Wandepithelien kleiner Gallengängen als bei den *PCDC* (Tab.8e,f). Bei den größeren

Gallengängen gab es in beiden Gruppen Areale mit vermehrter Proliferation. Die Unterschiede in der Expressionsrate sind hier aber nicht so groß wie bei den kleinen Gallengängen (Tab.8g,h). Die Epithelien der neoduktulären Proliferate zeigen eine höhere Mib1-Aktivität als die der ursprünglich angelegten Gallengänge. Hierbei gibt es keine Unterschiede zwischen den beiden Cholestase- Erkrankungsgruppen (Tab.8i,j).

Hepatozyten mit diffuser zytoplasmatischer Positivität für **CK7** zeigten sich in vielen Präparaten mit geschädigtem Parenchym. Eine Expression des CK7 in über 10% der Hepatozyten war in beiden Fallgruppen eher selten zu sehen (Tab.8k,l). Die Verteilung im Leberläppchen dieser CK7-Hepatozyten erwies sich bei den *PHZC* meistens als disseminiert, bei den *PCDC* am häufigsten peripher betont. Eine eindeutige Festlegung war schwierig, da häufig fokale Unterschiede innerhalb eines Präparates zu sehen waren (Tab.8m,n).

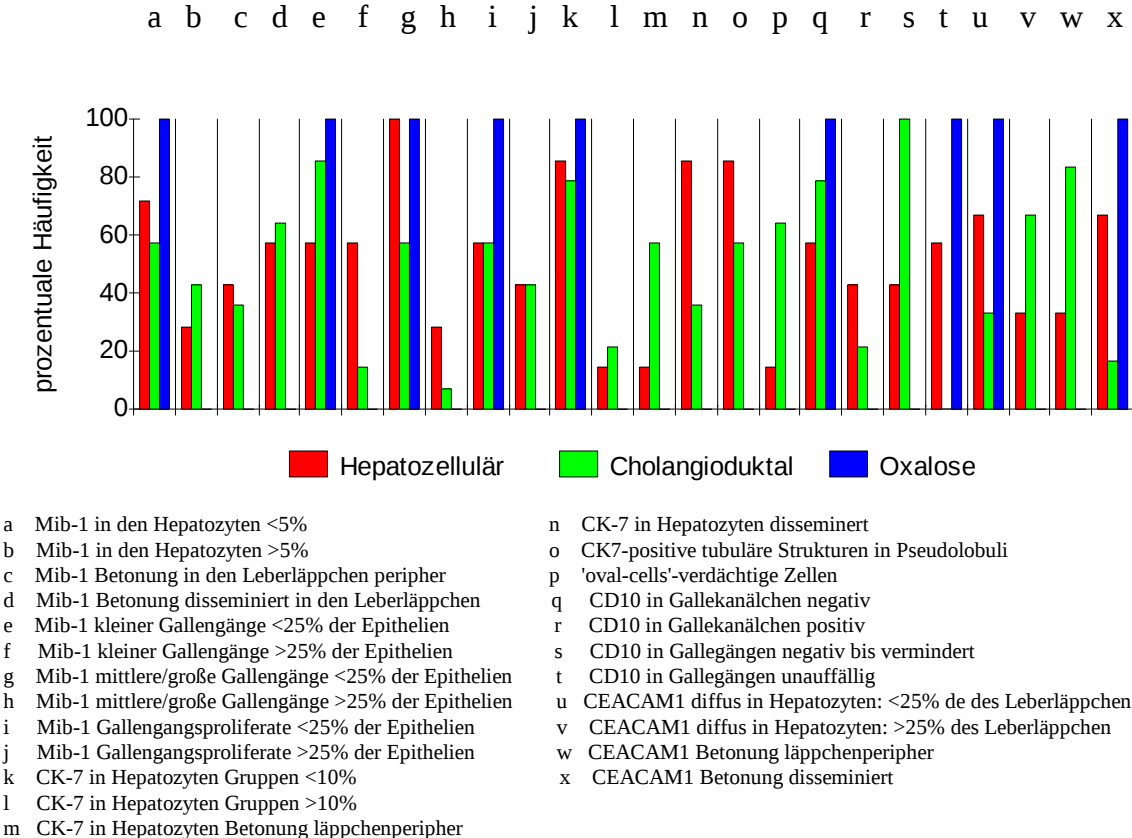
In den Leberläppchen konnten in vielen Präparaten tubuläre Anordnungen mit CK-7-positiven Epithelien gesehen werden, die an neoduktuläre Proliferate erinnerten. Besonders bei den *PHZC* waren sie häufig zu finden (Tab.8.o). Dahingegen wurden bei den *PCDC* häufiger läppchenperipher betont CK7-positive Epithelzellen, die kleiner als die sonstigen Hepatozyten waren, gesehen. Sie wurden als 'oval-cells' interpretiert (Tab.8p).

An dem Gallenpol lokalisiertes **CD10** ließ sich nur in wenigen Fällen gleichmäßig im Präparat nachweisen. Bei einem großen Teil der Fälle war es überhaupt nicht zu sehen, auch nicht nach Methodenwechsel und Wiederholung der Färbungen (Tab.8q). Positive Gallekanälchen waren häufiger bei den *PHZC* als bei den *PCDC* nachzuweisen (Tab.8r). CD10-positive, also unauffällige Gallengänge, waren sogar ausschließlich in der *PHZC*-Gruppe zu sehen (Tab.8t). Bei der histologischen Begutachtung der *PCDC* war die CD10- Expression der Gallengänge dahingegen stark reduziert oder völlig negativ.

Bei der Untersuchung auf das **CEACAM1**-Adhäsionsantigen standen uns geringere Fallzahlen zur Verfügung, weswegen die sich darauf beziehenden Ergebnisse nur eingeschränkt aussagekräftig sind (*PHZC*: drei Fälle, *PCDC*: sechs Fälle).

Normalerweise ist CEACAM1 dicht am Gallepool angelagert. Eine diffuse, dicht, den Zellmembranen entsprechende Anfärbung wurde in dieser Arbeit als auffällig und als Zellpolarisationsstörung gewertet. Der so aus der Reihe fallende Hepatozytenanteil pro Leberläppchen wurde in Prozentzahlen ausgedrückt (siehe Arbeitsmaterial und Methoden). Diese Polarisationsstörung der Hepatozyten scheint bei den *PCDC* in den untersuchten Präparaten tendenziell häufiger als bei den *PHZC* aufzutreten (Tab.8u,v). Die CEACAM1-auffälligen Zellen scheinen bei den *PHZC* im Gegensatz zu den *PCDC* eher gleichmäßig verteilt. Letztere zeigen einen Tendenz zur Läppchenperipherie (Tab.8w,x).

Tabelle 8. Immunhistochemische Parameter primär hepatozellulärer und primär cholangioduktaler Cholestasen.



4.2.3. Merkmalstabelle.

Es folgt abschließend eine Merkmalstabelle mit einer Auflistung von Kriterien, in denen sich die *PCDC* von der *PHZC* am deutlichsten unterschied.

Tabelle 9.

Primär cholangioduktale Cholestase	Primär hepatozelluläre Cholestase
- Vollständige Pseudolobuli - periduktuläre Fibrose - starker Parenchymschwund - Cholestase variabel in ihrer Läppchenlokalisation - Gallengangscholestase - Reduktion mittlerer und großer Gallengänge - ausgeprägte neoduktuläre Proliferation - Hilus mit Epitheldefekt, Galle und Entzündung - CK-7-Betonung läppchenperipher - CD10 in den Gallengängen reduziert - CEACAM1-Betonung läppchenperipher - vermehrte/starke Gallengangs-Entzündung - perilobuläre Fibrose	- wenn komplette Pseudolobuli, dann Neigung zu kleinlobulären Knoten - intralobuläre Septenbildung - keine Entzündung der Gallengänge - vergleichsweise geringer Parenchymschwund - geschwollene Epithelien - hepatozelluläre Riesenzellen - ausgeprägte Hepatozytencholestase - intrazelluläre Cholestase diffus in Leberläppchen - Mib-1-aktive reguläre kleine Gallegängen - CK-7 disseminiert in Leberläppchen - CK-7 positive Strukturen in Pseudolobuli - CD10 positive Gallekanälchen - CEACAM1 gleichmäßig im Leberläppchen

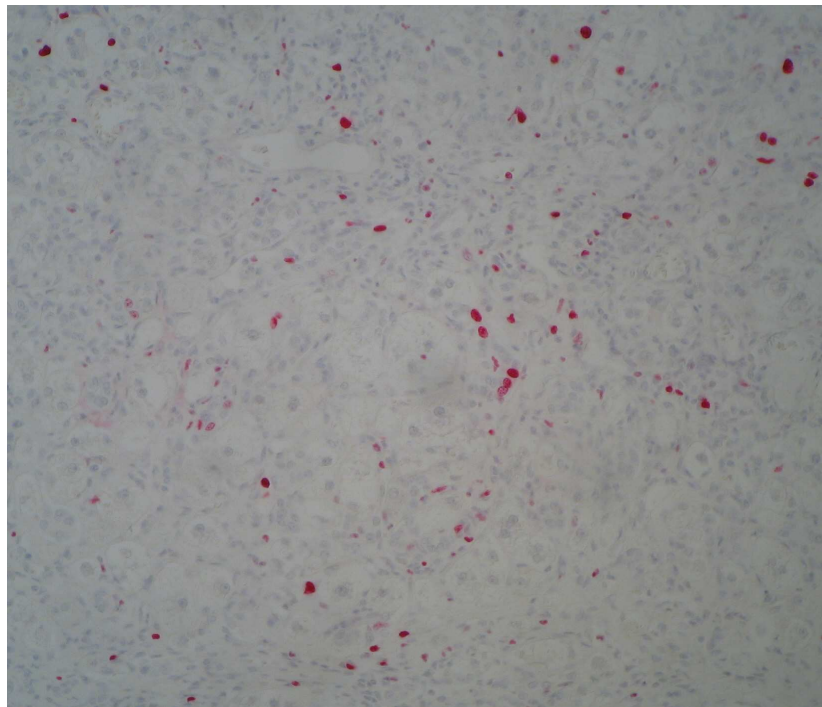


Abbildung 4: PFIC 2. Männlich, Alter: Zwei Jahre und vier Monate. Mib-1-aktive reguläre Gallegänge ohne Cholestase. Mib-1, Vergr. 150fach.

4.3. Differentialdiagnose Morbus Wilson vs. primäre Galletransportstörung .

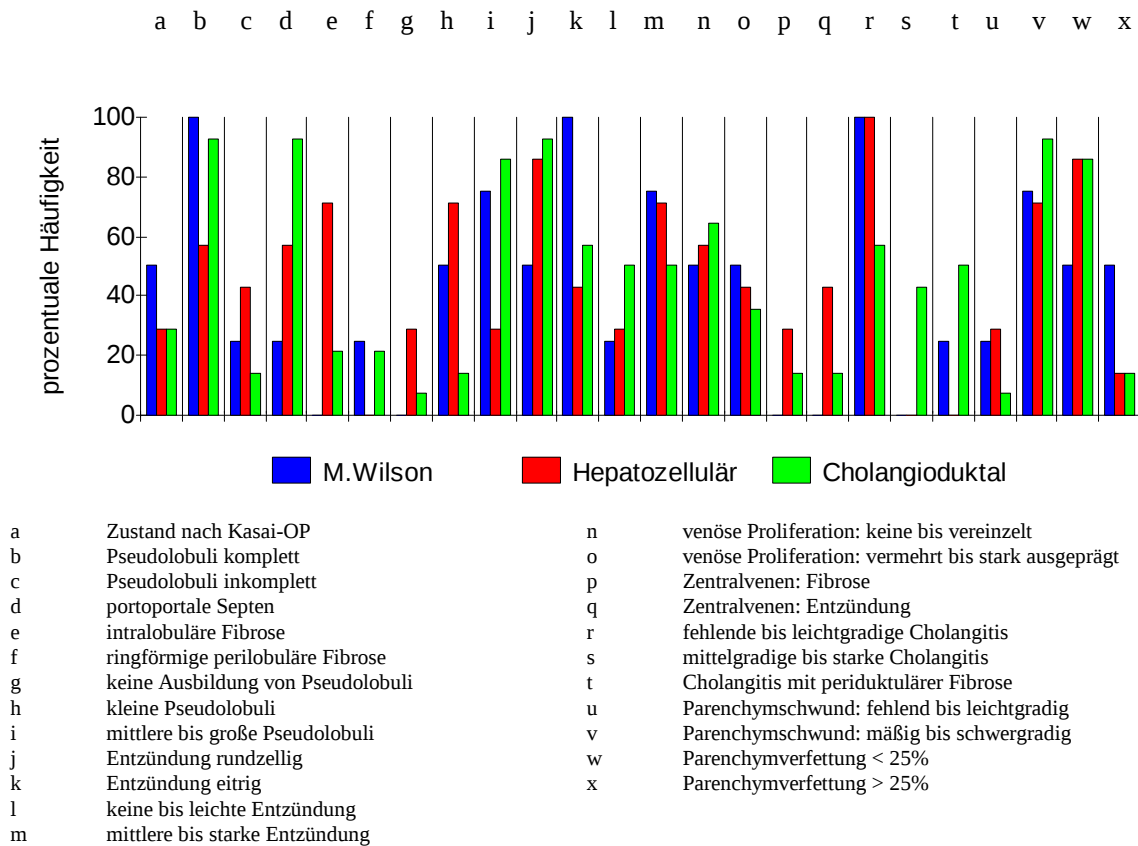
Vier cholestatische Fälle eines Morbus Wilson zeigten im Vergleich zu den primär cholestatischen Erkrankung (*PHZC* und *PCDC*) einen geringen und fokal unterschiedlich intensiven Gallenstau. Außerdem ist neben einer Leberzellverfettung eine Diskrepanz zwischen einer ausgeprägten neoduktuläre Proliferation und einer geringen hepato- und cholangiozellulärer Mib-1-Aktivität bei der Abgrenzung zu den primären Cholestasen erkennbar. Auch die läppchenperipher betonte Cholestase und Mib-1-Aktivität grenzt diese Erkrankung von den primär cholestatischen Erkrankungen ab.

Ansonsten zeigt sich beim Morbus Wilson ein Mischbild zwischen den cholestatischen Merkmalsmustern der *PHZC* und *PCDC*.

So ähneln die bindegewebigen Veränderungen, das Fehlen von Riesenzellen, die ausgeprägte neoduktuläre Proliferation und eine läppchenperiphere Betonung CK7-positiver Hepatozyten den Veränderungen des *PCDC*-Typs.

Auf Schädigungen des *PHZC*-Typs weisen eine fehlende Entzündung der Gallengänge ohne Reduktion von deren Anzahl, geringer Parenchymschwund, geschwollene Epithelien, unauffällige Hilusgänge, eine gering beeinträchtigte CD10-Expression und eine gleichmäßige Läppchenverteilung von Hepatozyten mit einer CEACAM1-Akkumulation im Zytoplasma hin.

Tabelle10. M.Wilson: Bindegewebige, portale und inflammatorische Veränderungen.



4.3.1. Histologie mittels konventioneller Methoden.

Die starke Tendenz zur Ausbildung von Pseudolobuli ähnelt dem histologische Bild der *PCDC* (Tab.10b). Die Größe der Parenchyminseln ist stärker variabel als bei den oben genannten cholestatischen Erkrankungen (Tab.10 h,i). Septenbildungen, intra- und perilobuläre Fibrosen sind kaum zu sehen (Tab.10d,e,f). Ödematöse Auflockerungen in den Portalfeldern und venöse Gefäßvermehrungen sind vereinzelt zu sehen und zeigen keine Merkmals-tendenz (Tab.10 n,o). Zentralvenenveränderungen wurden nicht beobachtet (Tab.10 p,q).

Entzündung.

Die Entzündungsreaktion in den Portalfeldern ist vornehmlich uncharakteristisch gemischtzellig, mäßig bis stark ausgeprägt und unterscheidet sich hierbei kaum von den primären cholestatischen Lebererkrankungen. Wie bei den PHZC gibt es allenfalls nur eine geringe Entzündungsreaktion, die sich auf die Gallengänge konzentriert (Tab.10r s). Periduktiläre Fibrosen konnten bei einem Fall gesehen werden (Tab.10t).

Parenchymveränderungen.

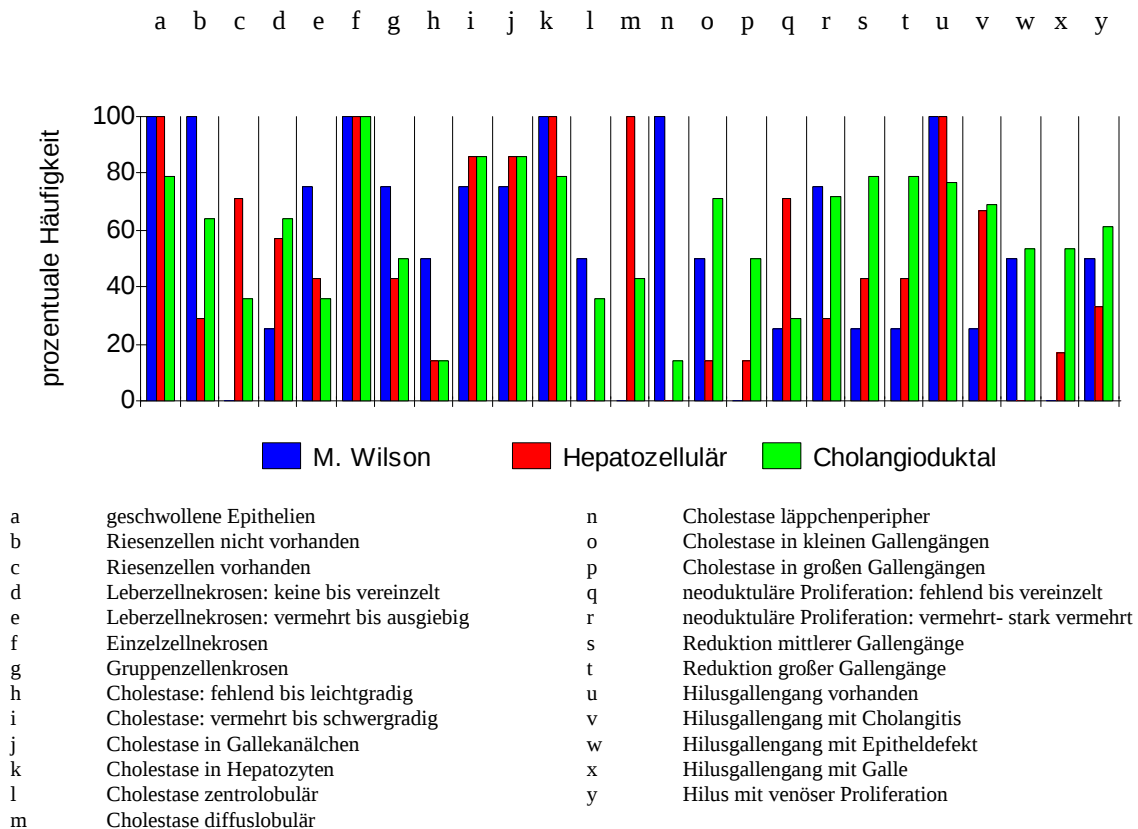
Das Ausmaß des Parenchymschwundes ähnelt den PHZC, er ist also etwas geringer als bei den cholangioduktilären Cholestasen ausgebildet (Tab.10 u,v).

Eine Leberzellverfettung scheint häufiger als bei den primär cholestatischen Erkrankungen aufzutreten (Tab.10 w,x).

Eine Schwellung der Leberepithelien ist wie bei den PHZC regelmäßig zu sehen (Tab.11a).

Riesenzellen sind in dem Kollektiv hingegen nie auszumachen (Tab.11b,c). Nekrosen treten in variablen Ausmaßen und Verteilungen auf (Tab.11d-g).

**Tabelle 11. M. Wilson: Cholestase, Gallengänge und Leberepithel-
veränderungen.**



Cholestase.

Eine hepatozelluläre Cholestase tritt in einem variablen Ausmaß auf, und kann auch innerhalb eines Präparates stark variieren. Gallepigmentfreie Areale sind aber häufiger als bei den oben genannten cholestatischen Erkrankungstypen (*PHZC* und *PCDC*) zu sehen (Tab.11h-k).

Die Lokalisation ist auffallend läppchenperipher betont, was den Morbus Wilson sowohl von der *PHZC*, als auch von der *PCDC* abhebt. Es gibt aber interessanterweise auch Areale mit einer zentralen Cholestasebetonung, nur gleichmäßig in einem (Pseudo-) Leberläppchen verteilt ist sie nicht anzutreffen (Tab. 11 l-n). Der Gallenstau setzt sich auch in der Hälfte der Fälle in die kleinen Gallengänge fort, was bei der *PHZC* selten zu sehen ist. Die großen Gallengänge zeigen keinen Gallestau (Tab.11o,p).

Die Gallengänge.

Eine Verminderung von Gallengängen lässt sich nur vereinzelt und regional feststellen und ist deutlich geringer als bei der *PCDC* ausgeprägt (Tab.11s,t). Die neoduktuläre Proliferation ähnelt in ihrem Ausmaß am ehesten der *PCDC*-Erkrankungsgruppe (Tab.11 q,r, Abb.5). Der Hilusgallengang lässt sich immer nachweisen, ist gallenfrei und zeigt vereinzelt Epitheldefekte mit oder ohne Cholangitis (Tab.11 u-x).

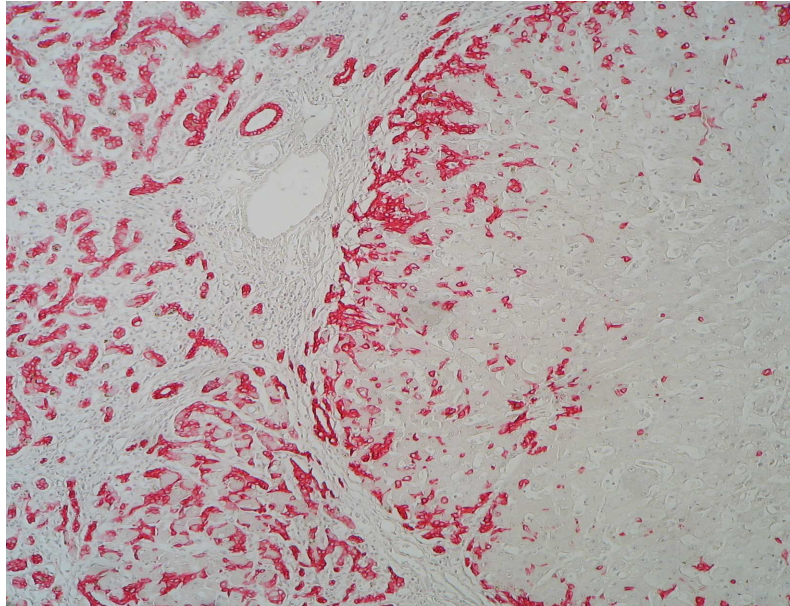


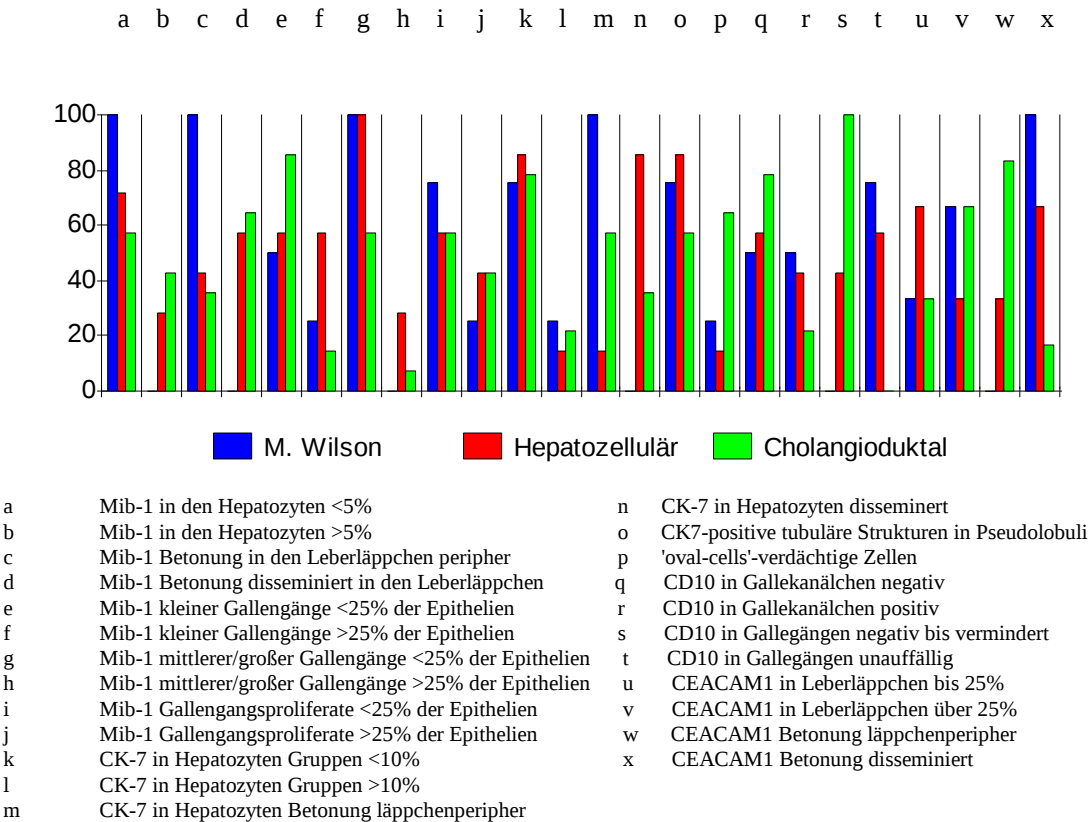
Abbildung 5: M.Wilson. Acht Jahre, weiblich. Ausgeprägte neoduktuläre Proliferation bei geringer bis mäßiger Cholestase. CK7, Vergr. 100fach.

4.3.2. Immunhistochemische Parameter.

Die durch Mib-1 festzustellende Proliferation der Leberepithelien beim M.Wilson fällt gering aus und zeigt eine läppchenperiphere Betonung. Eine starke oder dissemierte Mib-1-Expression, wie sie bei einem großen Teil der untersuchten primären Cholestaseerkrankungen auffällt, war hier nicht zu sehen (Tab.12 a-d). Eine intensive Mib-1-Ausprägung bei den Gallengängen lässt einen M.Wilson unwahrscheinlich erscheinen (s.Abb.6). So zeigen die Gangepithelien der kleinen Gallenbaumäste eine gemischte und tendenziell geringe Proliferationsrate. Die Epithelien der großen Gallengänge weisen keine Vermehrungstendenz auf (Tab.12e-h). Auch die bestehenden Gallengangsproliferate befinden sich in eher geringeren Vermehrungsaktivität als bei den *PHZC* und den *PCDC* (Tab.12 i-j). Der Anteil der CK7-positiven Leberepithelien zeigt keine Auffälligkeiten. Die läppchenperiphere

Betonung ist hingegen auffällig und grenzt sich von der *PHZC*-Gruppe ab, die ein vornehmlich gleichmäßiges Läppchen-Bild aufweist (Tab.12 k-n). 'Oval-cells' wurden selten gesehen (Tab.12 p). Die CD-10-Ausprägung grenzt sich hauptsächlich von den *PCDC* ab. So sind vor allem die Gallengänge, aber auch die Gallenkanälchen beim M.Wilson auffallend häufiger für dieses Protein positiv (Tab.12 q-t, Abb.7). Auf CEACAM1 wurden drei Fälle untersucht. Während die Rate der zellpolaritätsgestörten Hepatozyten schwankt, zeigt sich im Gegensatz zu den *PCDC* beim M.Wilson eine disseminierte Verteilung (Tab.12 v-x).

Tabelle 12. M. Wilson: Immunhistochemische Parameter.



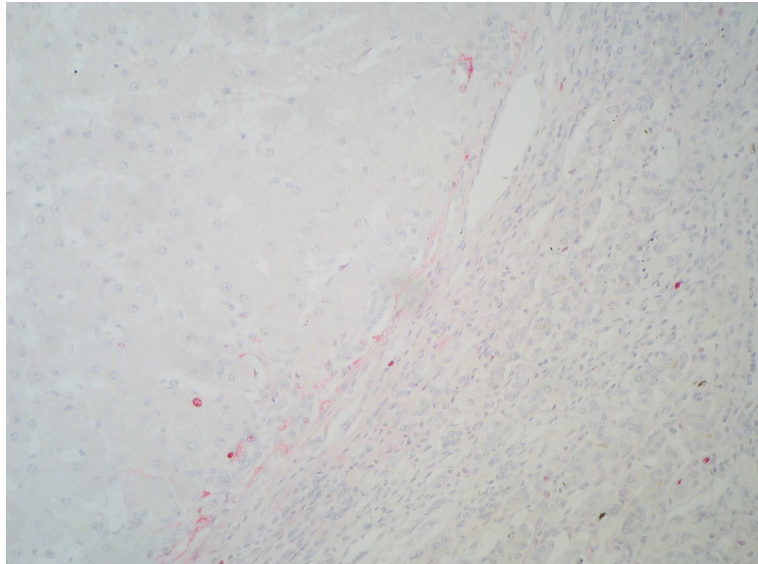


Abbildung 6: M.Wilson. Acht Jahre, weiblich. Geringe hepatozelluläre und cholangioduktale Proliferationsrate bei zahlreichen neoduktulären Gängen (siehe Abb.5): Indiz für eine langsame Proliferation. Mib-1, Vergr. 150.

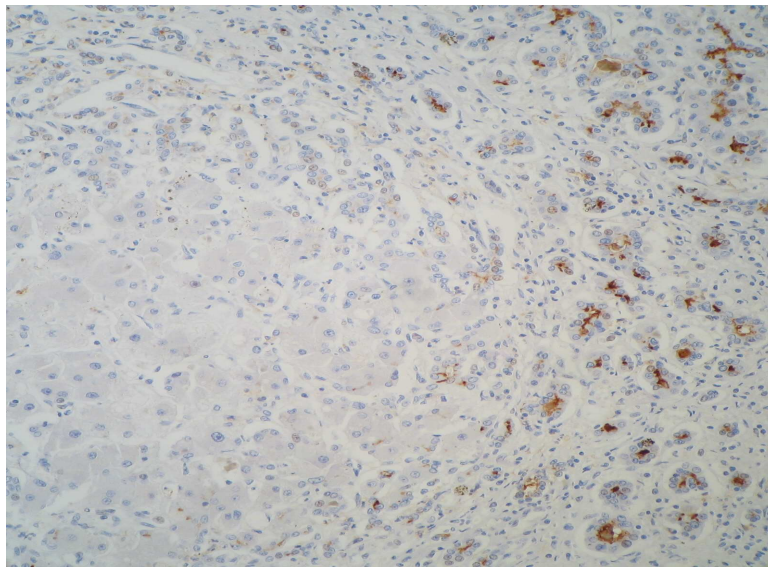


Abbildung 7a: Acht Jahre altes Mädchen mit M.Wilson. . Positive Gallegänge bei negativen intralobulären Gallepolen. Hinweis auf einen fortgeschrittenen hepatozellulären Schaden. CD 10, Vergr. 150fach.

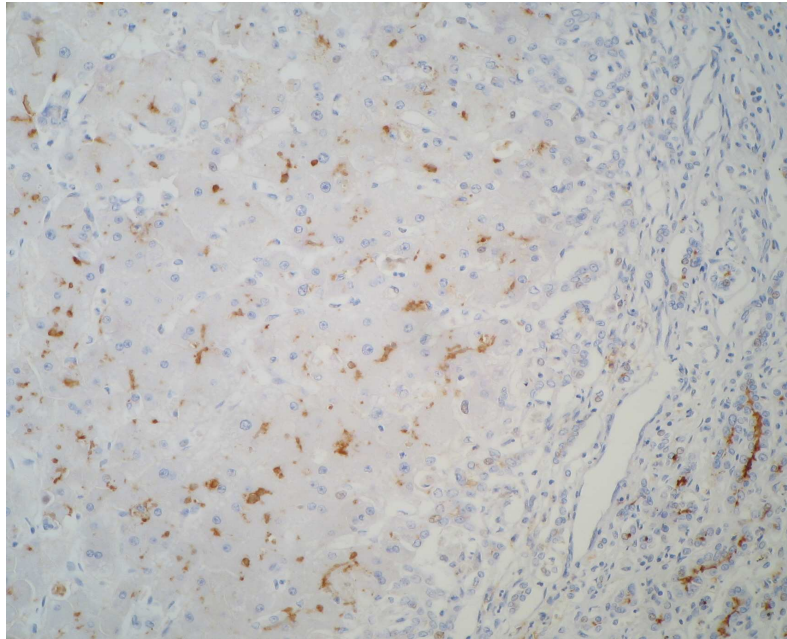


Abbildung 7b: Fall siehe 7a). Benachbartes Areal von Abb. 7a. Hier positive Gallekanälchen. Der hepatozelluläre Schaden ist noch nicht so ausgeprägt wie in Abb.7a. CD10, Vergr. 150fach.

4.4. Applikation der Merkmalsparameter auf Beispiele für cholestatische und cholestasefreie Erkrankungen.

Im folgenden Abschnitt werden die histopathologischen und immunhistochemischen Merkmale zur Unterscheidung primär hepatozellulärer Cholestasen (*PHZC*) von primär cholangioduktalen Cholestasen (*PCDC*) an unterschiedlichen Erkrankungen exemplarisch angewendet. Hierbei wird zwischen cholestatischen und cholestasefreien Erkrankungen unterschieden.

I. Cholestatische Erkrankungen.

Alagille-Syndrom.

Von den Merkmalen der *PCDC* präsentiert das Alagille-Syndrom eine Gallengangscholestase mit einer Reduktion mittlerer und großer Gallengänge. Das CD 10 ist in diesen Gängen nicht nachweisbar. Zudem exprimieren die Leberepithelien das CK7 -Protein läppchenperipher (Abb.8). An dieser Lokalisation ist auch eine CEACAM1- Ausprägung vermehrt festzustellen. Als Merkmale der *PHZC* zeigen sich im vorliegenden Fall eine fehlende Entzündungsreaktion der Gallengänge, eine intralobuläre Septenbildung bei geringem Parenchymschwund und eine ausgeprägte diffuse, z.T. aber auch peripher betonte, Hepatozytencholestase.

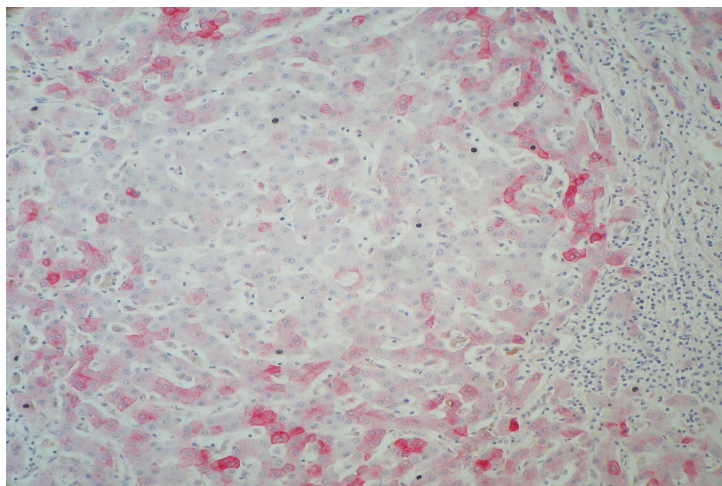


Abbildung 8. Alagille-Syndrom: Zwei Jahre alter Junge. CK7-Betonung läppchenperipher. CK7, Vergr.150fach.

Tabelle 13: Zusammenfassende Darstellung der hepatozellulären Differenzierungsmerkmale bei einer Erkrankungsauswahl (Abschnitt 4.4).

		Alagille-Syndrom	Crigler-Najjar-Syndrom	chron. skl. Cholangitis	kurzdarm-Syndrom	äthrythoxische Leberzirrhose	Tyrosinämie	Budd-Chiari-Syndrom	Oxalose
		-	-	-	+	+	+	-	-
Primär cholangio- duktale Schädigung	Volständige Pseudotumör	-	-	+	-	-	-	-	-
	Peridukuläre Fibrose	-	-	+	-	-	-	-	-
	starker Parenchymschwund	-	-	+	+	+	-	+	-
	In ihrer Leptodermialisierung variable Cholestase	+ld	+IZ	+ld	+ld	+ld	-	-	-
	Gallengangschleuse	+	-	+	+	+	-	-	-
	Reduktion mittlerer bzw. großer Gallengänge	+	-	-	-	-	-	-	-
	ausgeprägte neoproliferäre Proliferation	-	-	+	+	+	-	-	-
	Plus mit Epitheldefekt, Galle oder Entzündung	-	-	+	-	-	-	-	-
	Ck-7: Betonung läppchenperipher	+	-	+	(+)lokal	-	-	(+)lokal	-
	CD10 in Gallengängen stark reduziert bis negativ	+	-	+	-	-	-	-	-
Primär hepatozelluläre Schädigung	CEACAM1: Betonung läppchenperipher	+	?	-	?	?	-	-	-
	vielerorts starke Cholangiogenentzündung	-	-	+	-	-	-	-	-
	peridukuläre Fibrose	-	-	-	-	-	-	-	-
Primär hepatozelluläre Schädigung	wenn komplette Pseudotumör, dann Neigung zu kleinhobulären Knoten	-	-	+	+	+	-	-	-
	Intraobuläre Septenbildung	+	+	-	+	-	-	+	-
	keine Entzündung der Gallengänge	+	+	-	+	+	+	+	+
	Vergleichsweise geringer Parenchymschwund	+	+	-	-	-	+	-	+
	Zellschwellung	-	-	+	+	+	-	-	-
	Hepatozelluläre Riesenzellen	-	-	-	+	+	-	-	-
	ausgeprägte Hepatozytendystasie	+	+	+	+	+	-	-	-
	Hepatozelluläre Cholestase diffus im Leberläppchen verteilt	+	-	+	+	+	-	-	-
	Mit-1-aktive reguläre kleine Gallengänge	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ck-7: disseminiert im Leberläppchen verteilt	-	+	-	-	+	+	-	-
	Ck-7: positive Strukturen in Pseudotumör ausgeprägt	-	+	-	-	-	-	+	-
	CD10 positive Gallengänge und/oder Gallekanälchen	-	+	+	-	+	+	+	-
	CEACAM1 gleichmäßig im Leberläppchen verteilt	-	?	+	?	?	+	+	+

Crigler-Najjar-Syndrom.

Das Crigler-Najjar-Syndrom zeigt bis auf eine fokal peripher lokalisierte Cholestase keine Merkmale, die gehäuft bei den *PCDC* auftreten. Interessanterweise kann der Gallenstau in einigen Arealen auch zentrolobulär festgestellt werden. Diagnostisch wichtig ist, dass sich diese Galleablagerungen von anderen Cholestasen durch ihre gelblich-orange Farbe unterscheiden, was ihrer abnormalen chemischen Zusammensetzung bei dieser Erkrankung entspricht.

Für eine hepatozelluläre Störung spricht die fehlende Gallengangsentzündung, eine intralobuläre Septenbildung bei einem geringen Parenchymschwund und eine ausgeprägte Hepatozytencholestase. CD10 lässt sich in den Gallenkanälchen und Gallengängen nachweisen. CK7 ist disseminiert und zum Teil in Rosettenform in den Pseudolobuli vorzufinden (Abb.9).

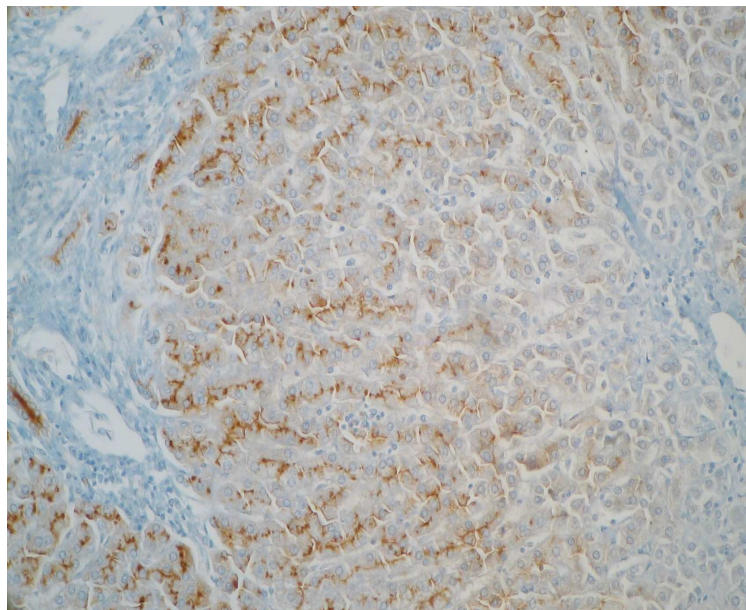


Abbildung 9. Crigler-Najjar-Syndrom. Männlich, 13 Jahre. Die Gallengänge sind CD10-positiv, Gallekanälchen zentrolobulär negativ: Ein Indiz dafür, dass die hepatozelluläre Schädigung hier beginnt. CD10, Vergr.150fach.

Chronisch Sklerosierende Cholangitis.

Hier sind Gallengangssklerosen (mit Schwerpunkt in größeren Gallengängen) und Gallengangswandentzündungen zu sehen. Die Sklerose kann vornehmlich in der Leberbiopsiebiopsie nicht enthaltenen großen Gallengänge betreffen, so dass die Diagnosestellung an kleinen Gewebeproben häufig schwierig ist. Die Cholestase erstreckt sich von den Gallengängen bis in das Leberparenchym hinein, die neoduktuläre Proliferation ist ausgeprägt. Das CD10 lässt sich in den Gallengängen nicht nachweisen (Abb. 10b). CK7 ist läppchenperipher betont (Abb.10a). Der Hilusgallengang ist defekt, cholestatisch und das umliegende Gewebe ödematös aufgelockert. Diese Merkmale weisen auf eine Cholestase vom Typ der *PCDC* hin.

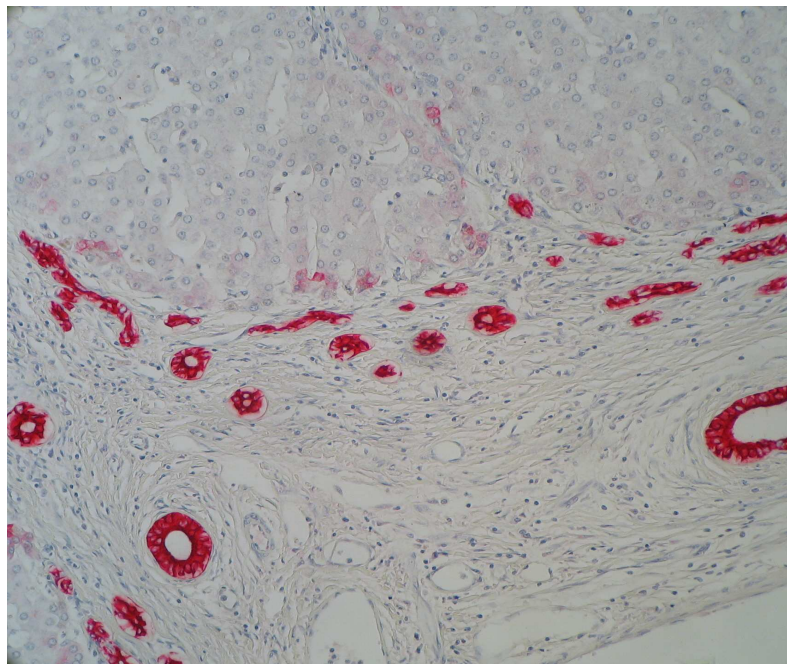


Abbildung 10a. Chronisch Sklerosierende Cholangitis: 14 Jahre alter Junge. CK 7 läppchenperipher betont. Periduktuläre Fibrose. CK7, Vergr. 150fach.

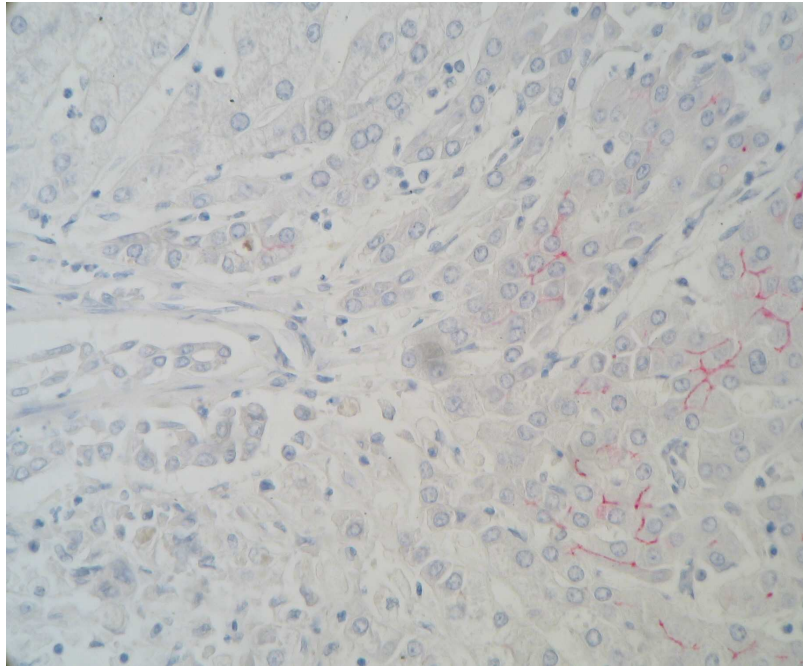


Abbildung 10b. siehe 10a. Die Gallengänge zeigen sich für CD10 negativ. rechts CD10-positive Gallekanälchen. CD10, Vergr. 200fach.

Kurzdarm-Syndrom.

Das Kurzdarm-Syndrom repräsentiert eine durch die Kurzdarm-Situation induzierte chronische toxische und stadienabhängige Schädigung des Leberparenchyms. In dem hier vorliegenden Fall zeigt sich eine vorwiegend hepatozelluläre Schädigung mit eher kleinlobulären Pseudolobuli und einer intralobulären Septenbildung. Die Epithelien sind nicht nur geschwollen und cholestatisch, sondern können auch mehrkernige Riesenzellen bilden. CD 10 ist zwar in den Gallengängen, nicht aber in den intralobulären Gallekanälchen nachweisbar (Abb. 11).

Daneben finden sich auch Hinweise auf eine sekundäre duktale Schädigung bis hin zu einem vollständigen pseudolobulären Umbau bei einem starken Parenchymschwund mit diffuser hepatozellulärer und cholangioduktulärer Cholestase. Reaktiv kann sich, wie im vorliegenden Fall, eine neoduktuläre Proliferation finden.

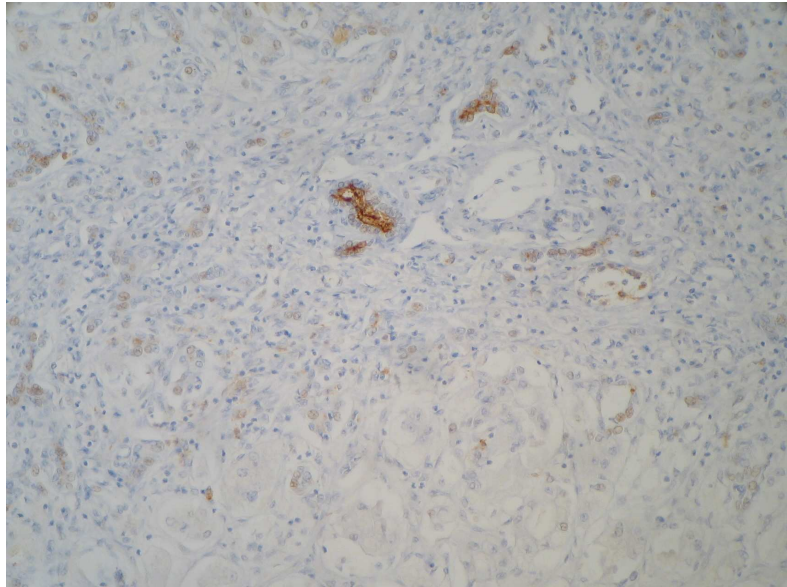


Abbildung 11. Kurzdarmsyndrom: 10 Monate alter Junge. Die Gallengänge sind CD 10-positiv, an den Gallepolen der Leberepithelien ist CD 10 vermindert. CD10, Vergr.150fach.

Äthyltoxische Leberzirrhose.

Hier liegt ätiopathologisch eine hepatozelluläre Schädigung vor. Passend findet sich eine kleinlobuläre Zirrhose mit entzündungsfreien Gallengänge mit geschwollenen cholestatischen Epithelien und eingestreute Riesenzellen bei diffuser Cholestase. CD10 wird in allen galleableitenden Strukturen angetroffen (Abb.12b). Das CK7 weist ein disseminierte Verteilungsmuster auf (Abb.12a).

Zusätzlich lässt sich sowohl eine sekundär entstandene Gallengangscholestase als auch eine neoduktuläre Proliferation nachweisen.

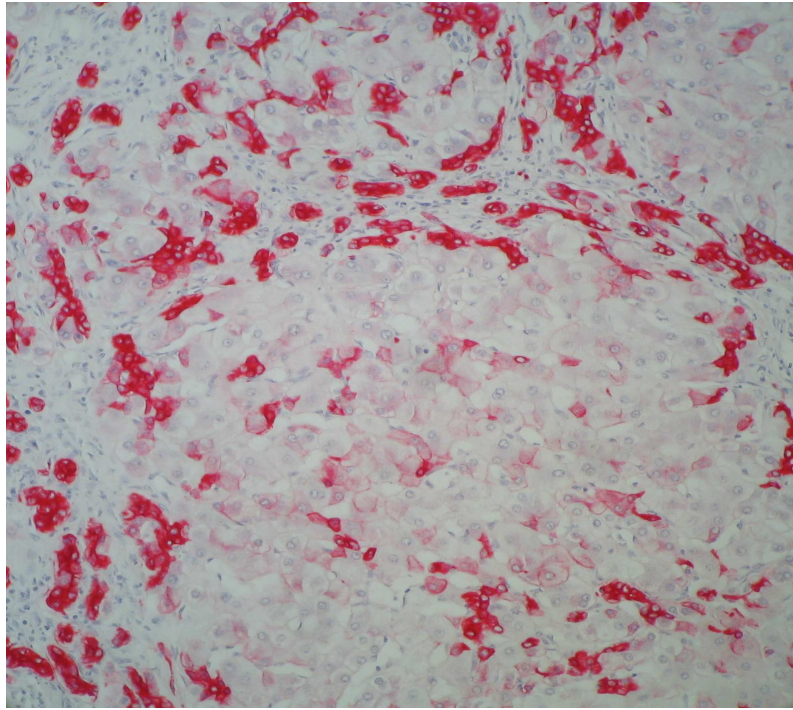


Abbildung 12a. Äthyltoxische Leberzirrhose. 34jährige Frau. Reichlich neoduktuläre Proliferation. CK7 ist disseminiert über die Leberläppchen verteilt. CK7, Vergr. 150fach.

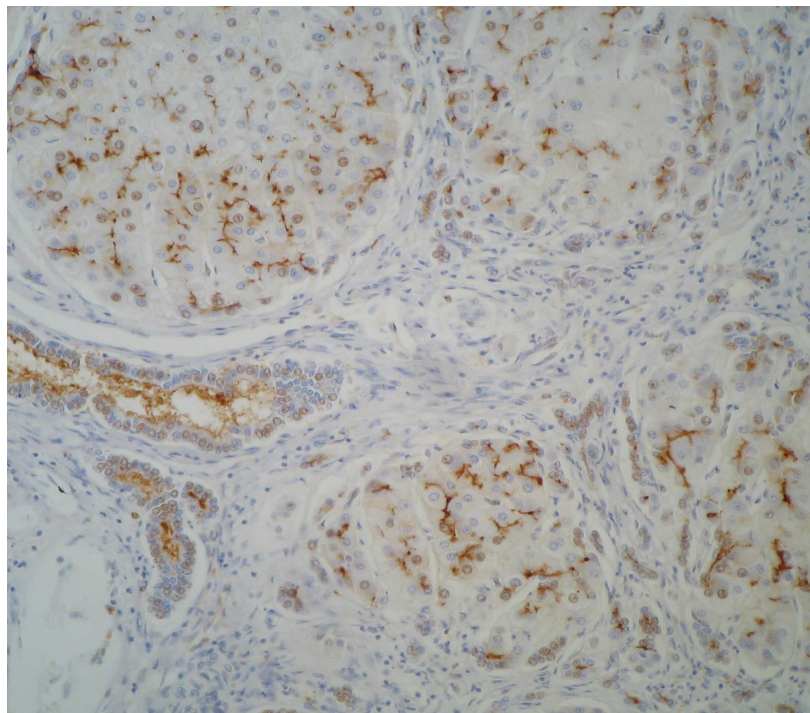


Abbildung 12b. Äthyltoxische Leberzirrhose. 34jährige Frau, CD10 x5000. CD10-positive Gallegänge und Gallekanälchen. CD10, Vergr.150fach.

II. Cholestasefreie Erkrankungen.

Auch nicht-cholestatische Erkrankungen können Schädigungen und Umbauvorgänge in der Leber induzieren. In wieweit sich auch hier Merkmale der hepatozellulären und cholangioduktalen Cholestase finden können, zeigen die folgenden Beispiele.

Tyrosinämie.

Ein ödematöser Hilus und eine vollständige Pseudolobulibildung sind die einzigen Merkmale des Typs der *PCDC*, die bei fortgeschrittenen Stadien der Tyrosinämie gesehen werden können.

Die Gallengänge sind stauungs- und entzündungsfrei, der Parenchymschwund ist gering. Unauffällige Hepatozyten und Gallepole sowohl in den Gängen als auch in den Kanälchen mit nachweisbarem CD-10 bieten nicht das Bild einer cholestatischen Leber (Abb.13 b,c). In verfetteten Arealen ist das CD-10 reduziert. Dahingegen finden sich hier vermehrt CK-7-positive Hepatozyten (Abb.13a). CEACAM1-auffällige Zellen liegen disseminiert verstreut in den Pseudolobuli.

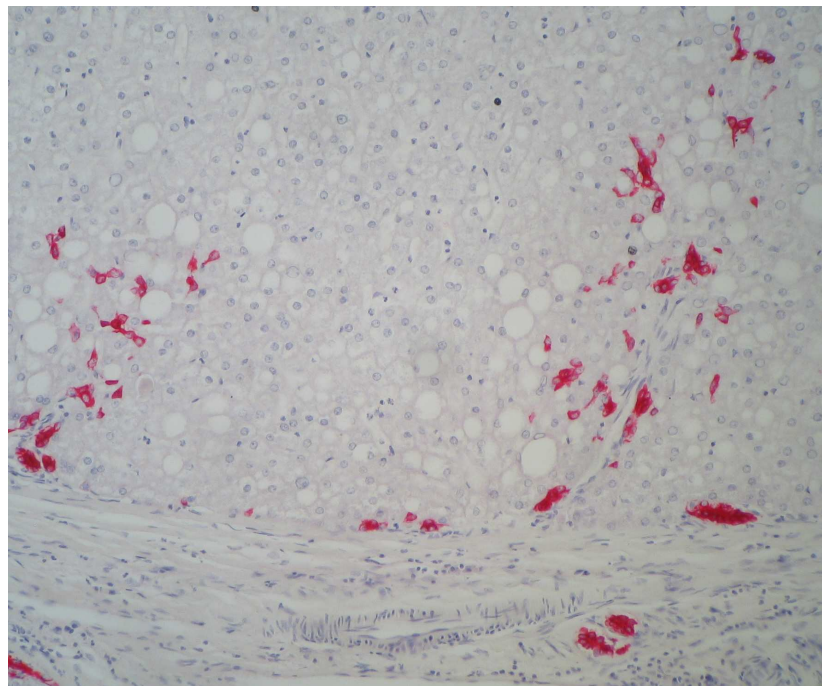


Abbildung 13a. Tyrosinämie. Sechs Jahre altes Mädchen. In verfetteten Arealen Bildung neoduktulärer Proliferate mit CK7-positiven Hepatozyten.

CK7, Vergr.150fach

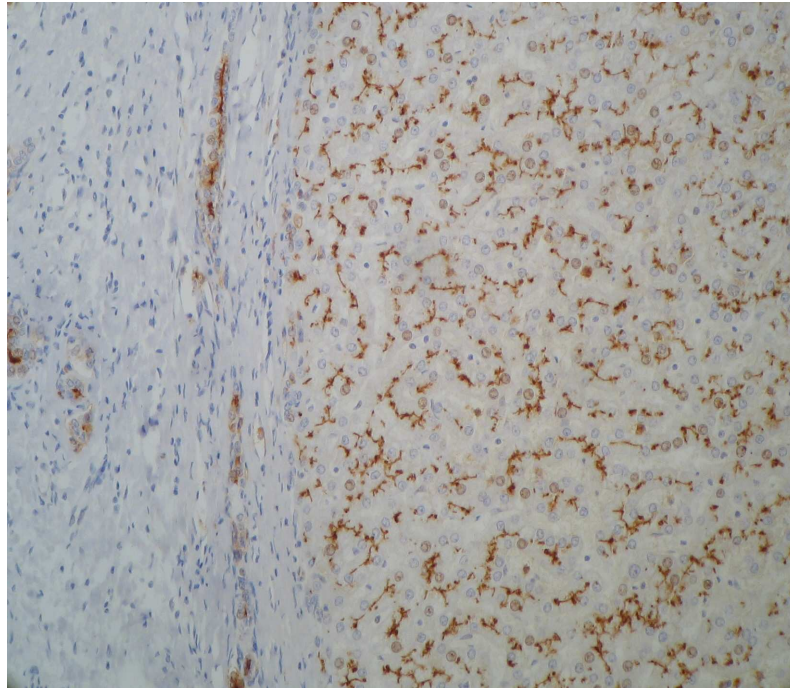


Abbildung 13b. Tyrosinämie siehe 13a. Gallegänge und Gallekanälchen sind CD10-positiv. CD10, Vergr.150fach.

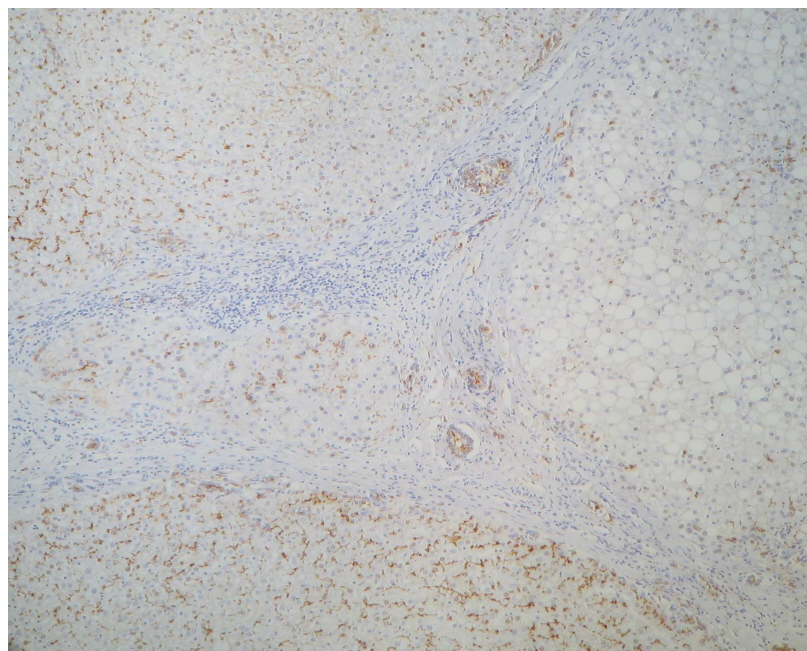


Abbildung 13c. Tyrosinämie siehe 13b. CD10-Reduktion in verfetteten Arealen (rechte Bildhälfte). CD10, Vergr.100fach.

Budd-Chiari-Syndrom.

Das Budd-Chiari-Syndrom gehört nicht zu den cholestatischen Lebererkrankungen. Dennoch lassen sich allgemeine Veränderungen, wie ein starker Parenchymschwund und intralobuläre Septenbildung, sehen (Abb.14a). Die Gallengänge und das Parenchym sind reizlos. Auffallend sind vermehrt CK-7 reaktive Hepatozyten, die disseminiert in den Läppchen verteilt liegen und dort vereinzelt tubuläre Strukturen ausbilden. Homogene CEACAM1-Zellen liegen gleichmäßig im Parenchym verteilt. Das CD-10 ist in Gallengängen und an den Gallepolen nachweisbar (Abb.14b). Es zeigt sich aber eine zentrolobuläre Reduktion, was darauf hindeutet, dass das CD-10 nicht ausschließlich als ein Cholestasemarker dienlich ist, sondern sehr wahrscheinlich auch einen hepatozellulären Schaden im Allgemeinen mit Einbeziehung des Gallepoles anzeigt.

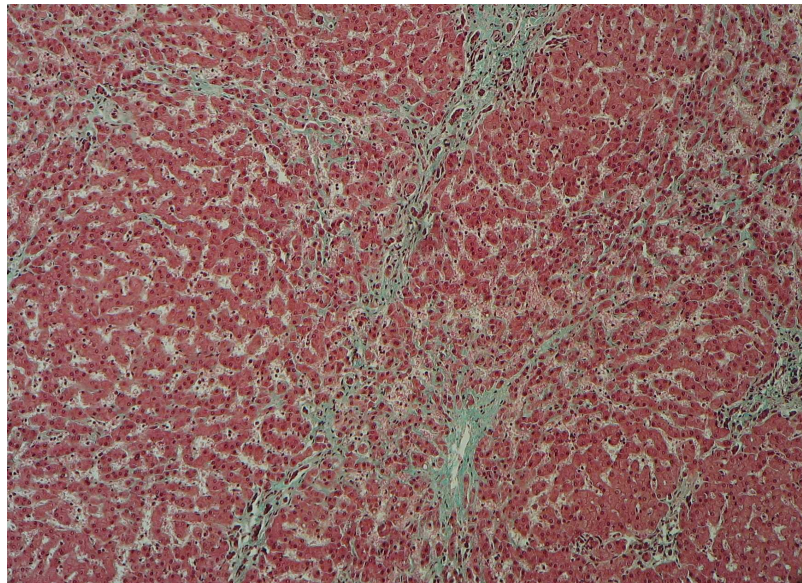


Abbildung 14a. Budd-Chiari-Syndrom: Ein elf Jahre altes Mädchen. Intralobuläre Septenbildung und zentrolobuläre Fibrose. Masson-Goldner, Vergr.100fach.

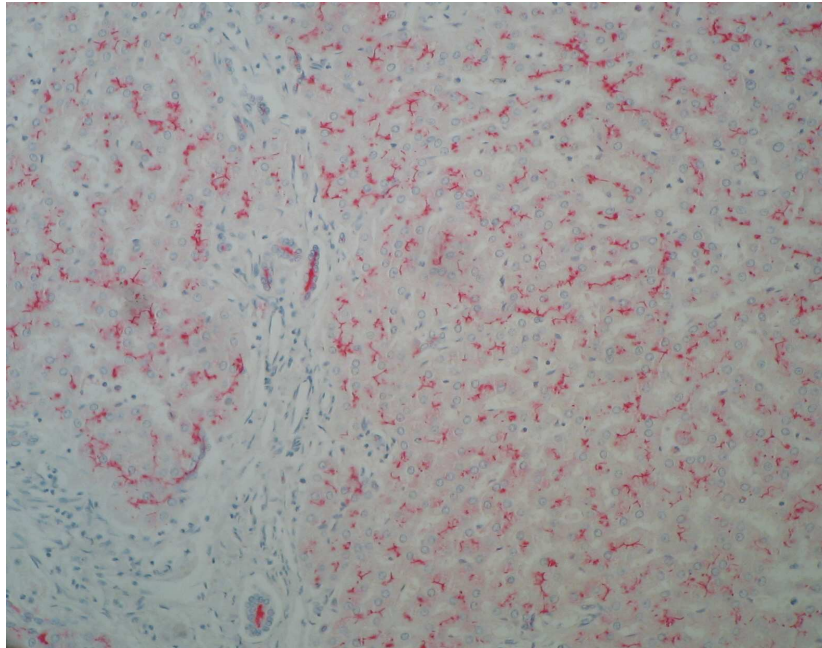


Abbildung 14b. Budd-Chiari-Syndrom, siehe 14a. CD-10 positive Gallegänge und Gallekanälchen. CD10, Vergr.150fach.

Oxalose.

Das Lebergewebe dieser Erkrankung erweist sich erwartungsgemäß als unauffällig und dient dem Vergleich zu pathologisch veränderten Organen.

Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung der hepatozellulären Differenzierungsmerkmale bei einer Gruppe unklarer Cholestasen.

	E-11458/01	E-21036/01	E-12717/01	E-16487/01	E-24296/01
primär cholangio- duktale Schädigung	Vollständige Pseudobubli	-	-	+	+
	Peridukuläre Fibrose	-	+	-	-
	starker Parenchymschwund	+	+	+	+
	in ihrer Läpochenkalisation variable Cholestase	-	+	+	-
	Gallengangscholestase	-	-	+	-
	Reduktion mittlerer bzw. großer Gallengänge	-	-	-	+
	ausgeprägte neoplastische Proliferation	-	-	+	+
	Hilus mit Epitheldefekt, Galle oder Entzündung	-	-	-	-
	CK-7 Betonung läpochenperipher	-	-	+	+
	CD10 in Gallengängen stark reduziert bis negativ	-	+	-	-
	CEACAM1-Betonung läpochenperipher	?	?	?	?
	vermehrte/steile Gallengangsentzündung	-	-	-	-
	peridukuläre Fibrose	+	-	-	+
	wenn komplette Pseudobubli, dann Neigung zu kleinkubulären Knoten	-	-	+	-
	intraobuläre Septenbildung	-	-	+	-
primär hepato- zelluläre Schädigung	keine Entzündung der Gallengänge	+	+	+	+
	Vergleichsweise geringer Parenchymschwund	-	-	-	-
	Zellschwellung	+	-	+	-
	Hepatozelluläre Riesenzellen	-	-	-	-
	ausgeprägte Hepatozytencholestase	-	+	+	-
	Hepatozelluläre Cholestase diffus im Leberläpchen verteilt	-	+	-	-
	Mib-1-aktive reguläre kleine Gallengänge	+	-	-	+
	CK-7 disseminiert im Leberläpchen verteilt	-	-	-	-
	CK-7 positive Strukturen in Pseudobubli ausgeprägt	-	-	+	-
	CD10 positive Gallengänge und/oder Gallekanälchen	+	+	+	+
	CEACAM1 gleichmäßig in Leberläpchen verteilt	?	?	?	?

4.5. MDR3- Versuche

Es folgen die Ergebnisse der Versuche, die das MDR3-Protein an mit unterschiedlichen Methoden fixierten Geweben nachzuweisen sollten (Versuche 1,2,4).

Es gelang an dem Fallkollektiv nicht, das MDR3-Protein mit dem hauseigenen Ziegen-Antikörper darzustellen. Jedoch ließ es sich exemplarisch mit dem kommerziell erworbenen Maus-Antikörper an normalem menschlichen Lebergewebe (Versuch 3), aber auch im Fall einer untersuchten PFIC3- Erkrankung darstellen (Versuche 5,6,7).

Versuch 1.

Im formalinfixierten Oxalose-Präparat (E-21501/96, SäF 8656) zeigte sich keine kanalikuläre Zeichnung mit dem hauseigenen Ziegen-Antikörper gegen MDR3.

Versuch 2.

Nach Vorbehandlung mit TEC-Puffer, Bor-Säure, Citrat-Puffer und Pronase1 zeigte sich bei beiden Antikörper an dem formalinfixierten Lebergewebe (E-21126/02, SäF 13457) nur eine unspezifische Färbung. Es war aber keine Markierung der Kanalikuli, wie es bei dem MDR3 zu erwarten gewesen wäre, erkennbar.

MDR-3 Ziege (an formalinfixiertem Gewebe)

Vorbehandlung	Kanalikuli positiv
TEC	nein
Bor	nein
Citrat	nein
P1	nein

MDR-3 Maus (an formalinfixiertem Gewebe)

Vorbehandlung	Kanalikuli positiv
TEC	nein
Bor	nein
Citrat	nein
P1	nein

Versuch 3.

An der nativ eingefrorenen und Aceton-fixierten Lebergewebsprobe aus der Umgebung einer Lebermetastase ergab sich eine positive MDR3- Markierung. Sie zeigte eine diskontinuierliche Darstellung in den Gallengangsepithelien und am Gallepol der Hepatozyten. Zusammenfassend lieferte der Versuch ein in der folgenden Tabelle dargestelltes Ergebnis. (siehe auch Abbildung 15 a+b).

MDR-3 Maus (Färbung ohne Vorbehandlung)

Fixationsform	Kanalikuli positiv
Kryostat	ja
Zink	nein
Hope	nein

Eine Verdünnung des Antikörpers auf 1:20 erschien optimal.

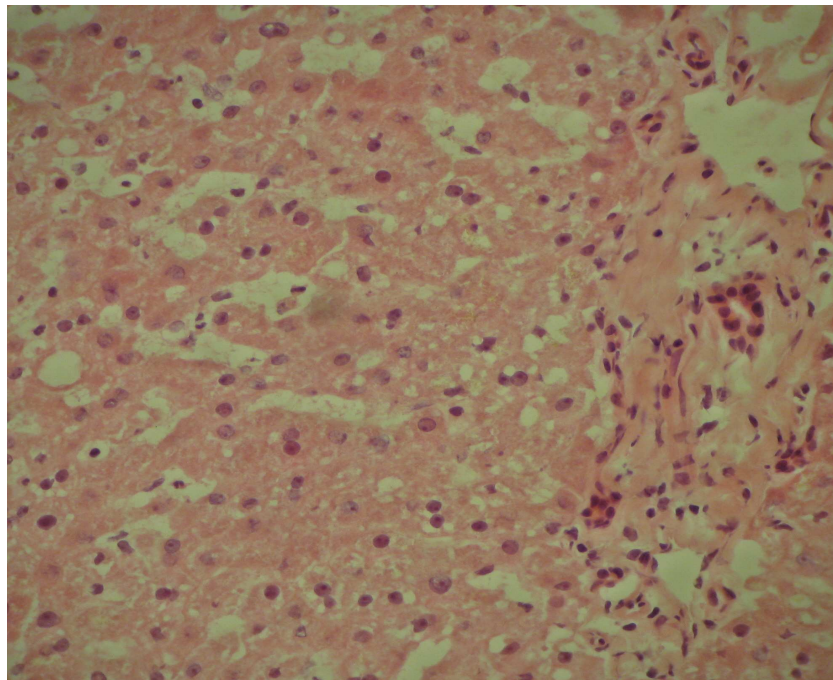


Abbildung 15a. H.E.- Präparat des Aceton-fixierten Lebergewebes aus der Umgebung einer Sigmakarzinommetastase (E -12511/03, SäF 13535, siehe **Versuch 3**).
Vergr. 200fach.

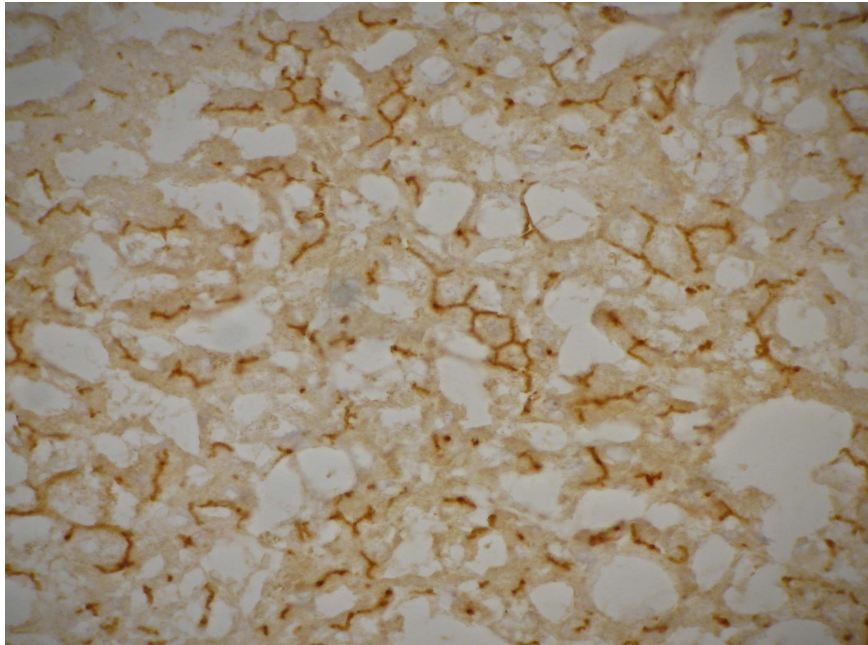


Abbildung 15b. MDR 3 an einem Aceton-fixierten Lebergewebe (E -12511/03,SäF 13535, siehe **Versuch 3**). Man erkennt die kanalikuläre Färbung des MDR3.
Vergr. 200fach.

Versuch 4.

In der Hoffnung, dass mit einer Vorbehandlung der HOPE-Fixierung ein Färbungserfolg eintreten würde, führten wir diesen Versuch durch. Er erbrachte keine Ergebnisbesserung, d.h. überall einen negativen Befund.

MDR-3 Maus (an HOPE-fixiertem Gewebe)

Vorbehandlung	Kanalikuli positiv
TEC	nein
DAKO	nein
Bor	nein

Versuch 5.

Der hier durchgeführte Vergleich zwischen einer PFIC3-Erkrankung und einem Kontrollschnitt von normalem Lebergewebe mit dem Ziegen-Antikörper gegen das MDR-3-Antigen ergab in beiden Proben eine negative Reaktion. Der andere bisher nur an Aceton-fixierten Gewebsproben empfohlene Antikörper wies an unseren Kryostat-Schnitten auch bei der PFIC3-Erkrankung eine partiell erhaltene kanalikuläre Zeichnung auf. Bei der CD10 -Markierung stellten sich Defekte durch cholestatisch bedingte

sekundäre Schädigungen des Gallepols dar.

An dem Kontrollgewebe ließen sich wie zu erwarten sowohl MDR-3 als auch CD10 nachweisen (siehe Abbildung 16). Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

MDR-3-Antikörper (AK) von Maus/Ziege und CD 10 (Kryostat-präpariertes Gewebe)

Fall	MDR-3 AK-Maus	MDR-3 AK-Ziege	CD 10
PFIC 3	ca. 80% der Kanalikuli positiv, Betonung läppchen-peripher.	keine kanalikuläre Färbung	keine kanalikuläre Zeichnung
Kontrolle	ca. 90 % der kanalikulären Membranen positiv.	keine kanalikuläre Färbung	ca.90% der Kanalikuli positiv

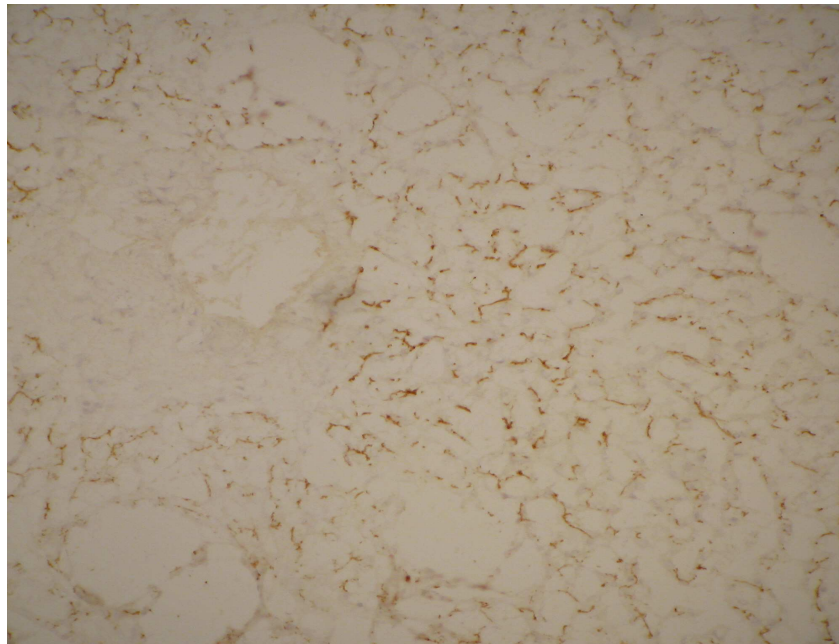


Abbildung 16. Aceton-fixiertes Präparat aus der Umgebung einer Sigmakarzinommetastase (E -12511/03, Säf 13535, siehe **Versuch 5**). Kanalikuläre Anordnung des CD 10. Vergr.150fach.

Versuch 6.

Die auf den Maus-Antikörper gegen MDR3 angewandte ABC-Methode zeigte eine stärkere Hintergrundfärbung als bei der APAAP-Prozedur.

MDR-3 Maus und ohne 1. Antikörper

Fall	MDR-3 AK-Maus	Inkubation ohne 1. Antikörper
PFIC 3 und Kontrolle	kanalikuläre Färbung schwer von der zytoplasmatischen abzugrenzen.	keine kanalikuläre Zeichnung

Eine Verdünnung des MDR 3- Antikörpers von 1:50 erschien ausreichend für die entsprechende kanalikuläre Markierung.

Versuch 7.

Hier wurden die Färbungen entsprechend dem vorangegangenen Versuch am DAKO-Gerät durchgeführt. Wie bei Versuch 5 zeigte die APAAP-Färbung eine deutliche kanalikuläre Markierung bei beiden Fällen (PFIC3 und Kontrolle). Die Hintergrundfärbung fiel sehr schwach aus. Die Inkubation ohne den 1. Antikörper zeigt nur fokal eine dezente fein-granuläre unspezifische Zeichnung.

Auch hier war eine Antikörperversdünnung von 1:50 ausreichend.

Fazit.

Es gelang nicht, das MDR-3-Antigen an Formalin-, Zink- oder HOPE- fixierten menschlichen Lebergeweben nachzuweisen. Auch nach variablen Vorbehandlungen und dem Ausweichen auf einen hauseigenen Ziegen-Antikörper gelang es nicht, den kanalikulären MDR3-Transporter darzustellen.

Der Nachweis scheint nur mittels des handelsüblichen Maus-Antikörper an schockgefrorenem und Aceton-fixiertem Lebergewebe möglich zu sein. Die diagnostische Wertigkeit des immunhistochemischen MDR-3-Nachweises sollte an weiteren Fällen untersucht werden, da auch bei einigen Fällen der Progressiven Familiären Intrahepatischen Cholestase Typ3 (PFIC 3) trotz MDR3-Mutation die

Epitop-Bindung des MDR3-Antikörpers möglich sein kann. In diesen Fällen bleibt die Gen-Sequenz-Analyse die richtungsweisende Untersuchung zur Diagnosestellung einer PFIC 3 [55].

5. DISKUSSION

Die Arbeit befasst sich mit den Grundtypen der Gewebsveränderungen bei Cholestasen. Die Unterscheidung einer primär cholangioduktal bedingten (*PCDC*) von einer primär hepatozellulär bedingten Cholestase (*PHZC*) ist eine wichtige und häufige Aufgabe in der histopathologischen Diagnostik. Eine Einschätzung allgemeiner Veränderungen erfolgt im Abschnitt 5.1..

Eine grobe Differenzierung der *PCDC* von einer *PHZC* kann mittels der konventionellen Histologie erfolgen (Abschnitt 5.2.1.). Den ergänzenden Einblick in Funktion, Schaden und Umdifferenzierung der Leber erlangt man erst durch den zusätzlichen Einsatz der Immunhistochemie (Abschnitt 5.2.2.).

Der Morbus Wilson zeigt Merkmale beider Cholestasegruppen (Abschnitt 5.3.). Die erarbeitete Merkmalstabelle zur Abgrenzung primär hepatozellulärer von primär cholangioduktalen Cholestasen erweist sich an ausgewählten Beispielen als nachvollziehbar und hilfreich (Abschnitt 5.4.).

Die histopathologische Differentialdiagnose zwischen *PHZC* und *PCDC* ist schwierig, da sich die hepatozellulären Umbau- und Adaptationsvorgänge in beiden Gruppen stark ähneln und viele Überschneidungen in ihrem Muster aufweisen. Insofern sind die hier ausgearbeiteten Merkmale einzeln nicht als spezifische Diagnoseparameter zu verstehen. Sie können jedoch in ihrer Synopsis willkommene Hinweise auf die Schädigungsebene im Gallefluss liefern.

5.1. Die Cholestase und Gewebsveränderungen im Allgemeinen.

5.1.1. Histologie mittels konventioneller Methoden.

Die Trennung vom ursprünglichen Funktionsgewebe durch Bindegewebe und die Aufhebung der Läppchenstruktur erschwert die Versorgung der Leberepithelien mit Nährstoffen. Ein Hinweis hierfür kann eine Zellballonierung sein, die um so deutlicher auftritt je kleiner die Parenchyminseln werden (Tab.1, I, II, Abbildung 1). Die Schwellung der Hepatozyten ist ein Zeichen für einen beginnenden Zellschaden, der auch bei zunehmendem Cholestasegrad zu sehen war (Tab. 1, VI).

Zusätzlich zu dieser Zellschwellung lassen sich in den Pseudolobuli - besonders beim

Kleinkind - mehrkernige Hepatozyten beobachten, und zwar vor allen Dingen in Präparaten mit kleinen Pseudolobuli (Tab.1, III) und einem starken Parenchymschwund (Tab. 1, IV).

Die Cholestase führt zu einer Entzündungs- und Abräumreaktion, die gut mit dem Ausmaß der Cholestase korreliert: je stärker der Gallestau, desto ausgeprägter ist die Entzündungsreaktion (Tab.1, V). Durch eine Interaktion von Mesenchym, Epithel- und Entzündungszellen in Form der 'ductular reaction' kommt es zu Regenerations- und Umbauvorgängen, die auch zu einer portalen Bindegewebsvermehrung führen kann [106].

5.1.2. Immunhistochemische Parameter.

Funktion und Umdifferenzierung der Gallengänge.

Gallensalze in den kleinen Gallengängen stellen einen direkten Proliferationsreiz der Cholangiozyten dar [134], der sich möglicherweise auch in einer gesteigerten Mib-1 – Aktivität der Epithelien neoduktulärer Proliferate widerspiegelt (Tab.2.II, Tab.5.I, Abbildung 17.a+b). Diese stellen sich lichtmikroskopisch gallefrei dar. Ein kausaler Zusammenhang zwischen den ursprünglichen und den neoduktulären Gallengängen bei Cholestase könnte darin gesehen werden, dass ein Gallestau in den Gallengängen mit einer vermehrten neoduktulären Proliferation einhergeht (Tab.4. II, Tab.5. I.).

Interessanterweise ist aber kein klarer Zusammenhang zwischen der starken Mib-1-Aktivität neoduktulärer Proliferatepithelien und der Mib-1-Aktivität kleiner Gallengänge zu sehen. Eine starke Mib-1-Expression der neoduktulären Proliferate geht ebenso häufig mit inaktiven Nuklei der Gallengänge wie mit aktiven Nuklei einher (Tab.2.II). Hierfür kämen zwei Gründe in Betracht:

- Gallengänge und neoduktuläre Gänge proliferieren bei Cholestase unabhängig voneinander
- eine andauernde Cholestase in den regulären Gallengängen führt als Noxe zu einem funktionellen Epithelschaden, während die angestoßene Mib-1-Aktivität in den neoduktulären Proliferaten aktiv bleibt.

Neoduktulären Gänge können sich vermutlich sowohl aus bipotenten Vorläuferzellen ('oval cells') [62], als auch aus einer biliären Umdifferenzierung von Hepatozyten ('duktale Metaplasie') entwickeln [79]. Eine Interaktion zwischen neoduktulären

Gallengängen und ursprünglichen Gallengängen ist wahrscheinlich. Es gibt Hinweise dafür, dass Gallengangsepithelien durch parakrine Sekretion von Wachstumsfaktoren und Peptiden mit anderen Zellen in der Leber, inklusive Hepatozyten und Entzündungszellen, in Verbindung stehen [106]. Somit wäre umgekehrt auch eine Einflussnahme von Hepatozyten auf die Gallengangsproliferation vorstellbar.

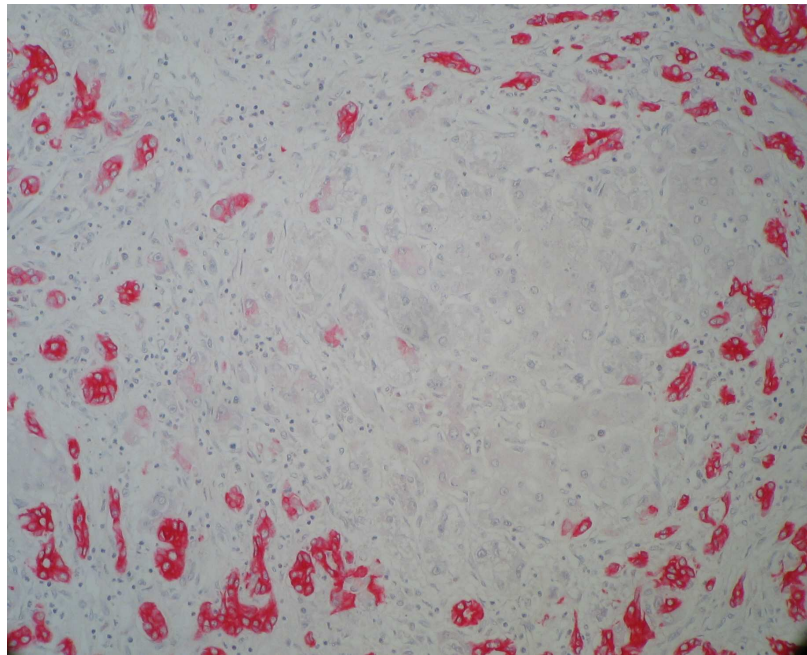


Abbildung 17a. M.Wilson: Sieben Jahre alter Junge. Gallefreie neoduktuläre Proliferate und CK7-positive Hepatozyten: ein Hinweis dafür, dass die neuen Gallegänge von den Hepatozyten abstammen könnten. CK7, Vergr. 150fach.

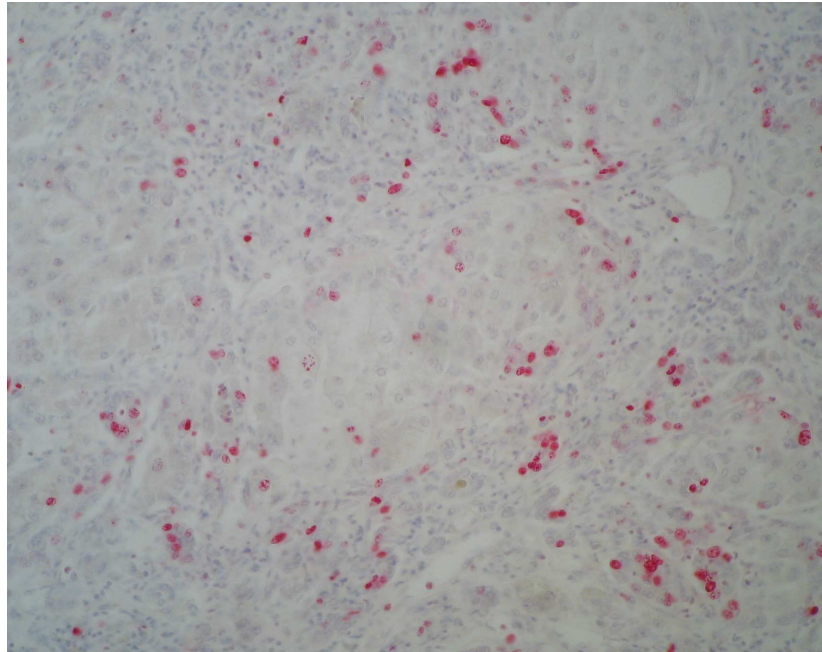


Abbildung 17b. M.Wilson siehe Abb.15a. Mib-1 aktive neoduktuläre Gänge und Hepatozyten: Zusammen mit der CK7-Expression (Abb.15a) ein Hinweis auf die wichtige Rolle der Hepatozyten bei der Ausbildung neuer Gallegänge.
Mib-1, Vergr. 150fach.

Funktion und Umdifferenzierung der Leberläppchen.

In den Leberläppchen ist eine läppchenperiphere Cholestase mit einer dort lokalisierten erhöhten Mib-1-Aktivität verbunden. Dies weist auf eine durch Galle angestoßene Zellproliferation hin (Tab.3.I, Abbildung 2). Hierbei war nicht von Interesse, ob es sich um 'hepatic progenitor cells', 'intermediate hepatobiliary cells' oder gar schon um 'reactive ductular cells' handelt [89]. Dass eine läppchenperiphere Mib-1-Betonung in der cholestatischen Leber nicht immer mit einer läppchenperipher betonten Cholestase einhergeht (Tab.3, I), könnte auf einen fortgeschrittenen Parenchymschaden in Mib-1-inaktiven cholestatischen Arealen zurückgeführt werden. Die Cholestase ist häufig diffus in den Läppchen verteilt. Die Mib-1 -Aktivität zeigt in diesen Fällen eine Tendenz zu einer diffusen Ausprägung, was den Zusammenhang zwischen Cholestase und der Proliferation betroffener Hepatozyten unterstreicht (Tab.3 II).

Auch das CK7-Protein ist wie Mib-1 gehäuft in den gallegestauten Leberarealen anzutreffen. Beide Marker verhalten sich in der Läppchenverteilung ähnlich (Tab3. V, Abb.3a+b). So geht eine läppchenperiphere Cholestase mit einer läppchenperipheren CK7-Expression der Leberepithelien einher. Allerdings ist diese Reaktion, wie Mib-1, nicht spezifisch für eine histologisch sichtbare Cholestase (Tab.3. I,II). Dies könnte auf

eine frühe hepatozelluläre Metaplasie in noch nicht lichtmikroskopisch sichtbar cholestatischen Arealen hinweisen. Die betont periphere Lage lässt sich gut damit erklären, dass die Ausgangszellen der Metaplasie wahrscheinlich von Stammzellen abstammen, die in einem engen Kontakt mit den Hering-Kanälen stehen [119].

Stärker als Mib-1 ist der Zusammenhang zwischen diffuser Cholestase und disseminierter CK7-Verteilung, was diesen Antikörper als Hinweis für eine hepatozelluläre Metaplasie auf Cholestasereize einsetzen lässt [30]. Die Tatsache, dass CK7 das typische Zytokeratin der Gallengänge ist, lässt vermuten, dass hier eine Umdifferenzierung in galleleitende Strukturen stattfindet. Dies würde auch die rosettenförmige Anordnung CK7-positiver Zellen innerhalb der Pseudolobuli cholestatischer Lebern erklären. Dies lässt sich mit der Vermutung von Clotman et al. erklären, dass die Proliferate von umdifferenzierten Hepatoblasten ausgehen [14]. Diese Gallengangsstrukturen erscheinen mit einem gallefreien und kollabierten Lumen häufig unreif, was auch in vorangegangenen Untersuchungen schon vermutet wurde [89].

Ein Zusammenhang zwischen einer intralobulärer Cholestase und einer vermehrten neoduktulären Proliferation kann klar gezeigt werden (Tab.5 I). Ob die Cholestase in den Leberläppchen den entscheidenden neoduktulären Proliferationsreiz darstellt, ist dabei aber nicht deutlich, da nebenbei auch häufig eine Gallengangscholestase besteht. Auf die damit verbundene neoduktuläre Wucherung wird weiter oben eingegangen (Tab.4. I und II).

Schädigung der Gallengänge und Hepatozyten.

Die Cholestase ruft eine Funktionsstörung der Gallengangsepithelien hervor [134]. Dies könnte auch durch das Fehlen einer CD10-Expression in den betroffenen Arealen angezeigt werden (Tab.2. III). Dass ein Gallestau aber nicht die einzige Ursache für diesen Defekt ist, zeigt sich daran, dass auch nicht-cholestatistische Strukturen für CD10 negativ sein können. Gründe dafür könnten neben eventuellen Fixationsmängeln der Gewebeproben ein länger bestehender cholestatischer Leberschaden sein, der indirekt auch lichtmikroskopisch gallefreie Areale beeinträchtigt. Das CD10 kann prinzipiell bei allen Störungen des Gallepoles im Rahmen einer strukturellen Bürstensaumdegeneration reduziert sein. Im Gegensatz dazu ist eine verminderte Ausprägung des MDR3 ein Hinweis auf einen primären spezifischen Defekt der Bürstensaumfunktion und geht nicht zwingend mit einer CD10-Reduktion einher. Eine Studie konnte zudem zeigen,

dass in der frühen Kindheit ein physiologischer Mangel an immunhistochemisch nachweisbaren CD10 an den Hepatozyten besteht [11]. Somit ist bei jungen Patienten dieser Marker nur eingeschränkt als histologischer Cholestasemarker verwertbar.

5.2. Der cholangioduktale und der hepatozelluläre Typ der Cholestase: pathophysiologische Überlegungen.

Wohl wissend, dass eine statistische Auswertung durch die geringe Fallzahl der untersuchten primär hepatozellulären Cholestasen begrenzt ist, zeigt die Untersuchung Tendenzen morphologischer Unterschiede. Die histologischen Fälle wurden auf sehr viele Merkmale untersucht. 47 morphologische Merkmale inklusive 13 immunhistochemische Parameter sorgten für ein weit gefächertes Spektrum, bei dem man auf etliche Unterschiede zwischen den einzelnen Erkrankungsgruppen stieß.

5.2.1. Histologie mittels konventioneller Methoden.

Pseudolobuli.

Extrahepatische Gallengangsverschlüsse, also primär cholangioduktale Cholestasen (*PCDC*), führen über pathophysiologischen Veränderungen in den Cholangiozyten zügig zu einer Leberfibrose [106]. In dem vorliegenden Kollektiv zeigte sich ein gehäuftes Auftreten von vollständigen nach außen scharf begrenzten Pseudolobuli bei cholangioduktalen Galletransportstörung. Die schon exkretierte und kanalisierte Galle könnte zunächst zu einer lokalisierten Entzündungsreaktion primär in den Portalfeldern führen. Erst im Verlauf wird das Parenchym zunehmend durch den Rückstau geschädigt. Die durch die Entzündung getriggerte Fibrose schreitet entgegengesetzt dem Gallenfluss fort und manifestiert sich zunächst durch eine portale Bindegewebsvermehrung und führt erst im weiteren Verlauf zu einer intralobulären Septenbildung. Die bei den *PCDC* im Vergleich zur den primär hepatozellulären Cholestasen (*PHZC*) gehäuft zu sehende perilobuläre Fibrose (Abbildung 2b) könnte ein Zeichen für die in dieser Defektebene auftretende Bindegewebsneubildung sein. Der Anteil der intralobulär startenden Fibrose wäre hier zu vernachlässigen.

Die netzartige intralobuläre Septenbildung entsteht dahingegen primär bei den *PHZC*, wo sie häufiger als bei den *PCDC* gesehen wurde (Abb. 18 und Abb. 19). Die Entzündung startet auf Parenchymebene und führt zu einem Zerfallen der Leberläppchenstruktur, was zunächst keine vollständigen Parenchyminseln wie bei der Gallengangsatriesie hervorbringt, aber im Endstadium zu einer kleinlobulären Leberzirrhose führt. Diese Inseln sind insofern kleiner, als dass die Leberläppchenstruktur durch die diffuse cholestaseinduzierte Entzündung von innen aufbricht und die Bindegewebsvermehrung nicht primär von den Portalfeldern ausgeht. An dieser parenchymalen Kollagensynthese scheinen sinusoidale HSP47-positive Endothelzellen beteiligt zu sein [25]. Mischformen der Fibrosetypen im weiteren Verlauf zeigen sich insofern, als dass auch bei den *PHZC* vereinzelt ein Gallestau in den Gallengängen zu sehen war, und die Entzündungszellen auch hier tätig werden.

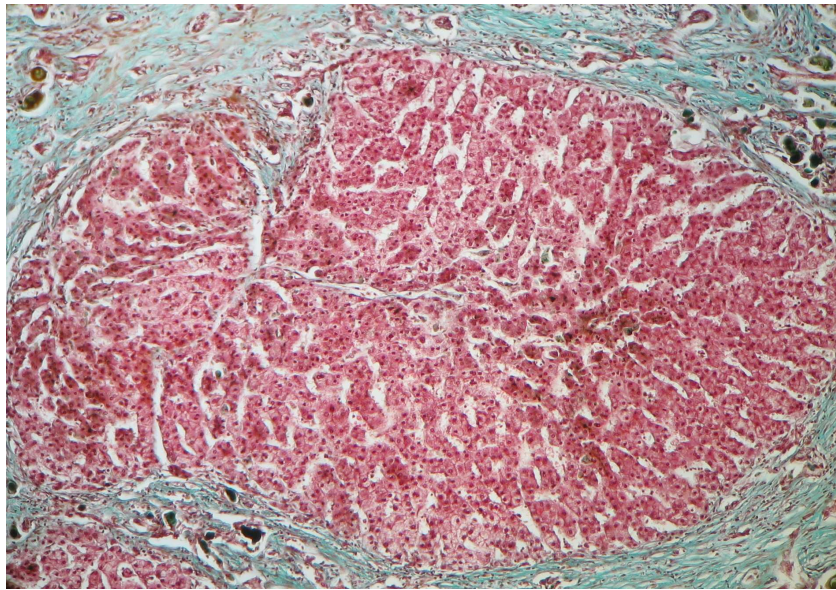


Abbildung 18. Gallengangsatriesie: männlich, Alter: sieben Monate. Bei der *PCDC* ist typischerweise eine glatte Abgrenzung der Pseudolobuli zu sehen. Masson-Goldner, Vergr. 100fach.

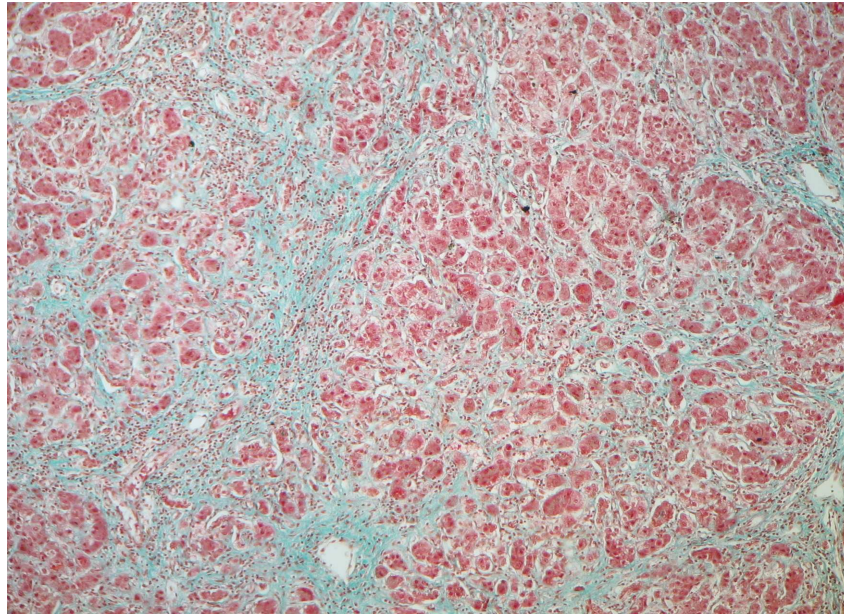


Abbildung 19. PFIC2: männlich, Alter : drei Jahre. Der hepatozelluläre Schaden einer *PHZC* am Beispiel der PFIC2: intralobuläre netzartige Fibrose mit Aufbruch der Pseudolobuli. Masson-Goldner, Vergr. 100fach.

Parenchymveränderungen.

Der Schwund von Läppchengewebe bezogen auf das septale Bindegewebe fällt bei den *PHZC* geringer als bei den Gallengangsatresien aus. Dies spiegelt die oben genannte Beobachtung der unterschiedlichen Pseudolobulusbildung wider. Dies deckt sich mit den Untersuchungen in den letzten Jahren, in denen gezeigt wurde, dass Duktalzellen aktiv an der Leberentzündung bei Cholestase teilhaben, indem sie proinflammatorische und fibrogenetisch wirkende Chemokine und Wachstumsfaktoren freigegeben [106]. Diese Studien zeigten auch, dass das Ausmaß der neoduktalen Reaktion mit dem histologischen Fibrosegrad korreliert ohne jedoch einen ursächlichen Zusammenhang zeigen zu können [106]. Zudem verdichten sich die Hinweise auf eine 'epithelial to mesenchym transition' (EMT) cholangioduktulärer Zellen mit Verlust epithelialer Marker und der Ausbildung mesenchymaler Merkmale als Reaktion auf eine cholestaseinduzierte neoduktuläre Proliferation [25]. Auch im vorliegenden Kollektiv zeigte der Cholestasetyp der *PCDC* im Gegensatz zu den *PHZC* eine ausgeprägtere neoduktuläre Proliferation, die mit einer vermehrten Fibrose und erheblichen Parenchymschwund einherging (Tab.6 b,g,i., Tab. 7 q,r). Eine weitere Erklärung des unterschiedlichen Fibroseausmaßes und der Fibroseverteilung könnte darin gesehen werden, dass bei den *PHZC* die Cholestase diffus in den Leberläppchen verteilt ist und

die Toxizität der Galle punktuell in den Parenchymzellen wirkt, während bei den *PCDC* eine starke Galleakkumulation, mit Ausbildung von Galle-Seen, eine konzentrierte Entzündungszellansammlung hervorruft. Beides, die Konzentration der Noxe mit folgender chronischer Entzündung, hätte eine verstärkte Bindegewebsvermehrung und Parenchymuntergang bei der *PCDC* zur Folge.

Eine *PHZC* führt zu einer langsamen Schädigung des Parenchyms, erkennbar an der in dieser Gruppe mit kleinen Pseudolobuli einhergehenden Zellballonierung (siehe Abb. 1.+ Tab. 1 I,II., Tab.6h.). Ein weiterer Hinweis auf eine primär hepatozelluläre Schädigung ist die Bildung von hepatozellulären Riesenzellen. Diese sind wahrscheinlich regenerativen Ursprungs und entstehen möglicherweise durch die Fusion von Hepatozyten [60]. Solche hepatozelluläre Riesenzellen sind bei den *PCDC* selten zu sehen. Wahrscheinlich tritt bei der Letzteren die Schädigung akuter und stärker auf als bei den *PHZC*. Die bis in die Gallenkanälchen gestaute Galle wirkt zum einen extrazellulär zytotoxisch auf die kanälchenbildenden Epithelien, zum anderen pfpopt sich sekundär eine intrazelluläre Cholestase auf. Pathogenetisch könnte hier eine Schädigung perikanalikulärer Mikrofilamente beteiligt sein, deren Schädigung zu einer Kontraktionsschwäche von Gallenkapillaren führen könnte [130]. Die Hepatozyten würden schneller zu Grunde gehen, und es käme somit bei einem Defekt im distalen Bereich des Galletransportes nicht erst zu einer Zellballonierung.

Hinzu kommt, dass bei der *PHZC* eine lokalisierte Abräumreaktion mittels Granulozyten und Makrophagen und Zellregeneration besser zu bewältigen ist als bei extrazellulären Ansammlungen größerer Gallemengen, wie sie häufig bei der *PCDC* zu sehen sind. Hier könnte eine vermehrte, zum Teil frustrane und länger andauernde Entzündungsreaktion zu einer stärkeren Bindegewebsvermehrung in den Portalfeldern führen. Somit könnte der im Vergleich zu der *PHZC* stärkere Parenchymschwund der *PCDC* unter anderem auch durch die verstärkte Ausprägung multifokaler intra- und extrazellulärer Gallenoxen erklärt werden. Dahingegen zeigt die *PHZC* Zeichen einer schleichenden, disseminierten und vor allem intrazellulären Cholestase, die von der Leber besser zu bewältigen ist (siehe Abb.18+19).

Die Lokalisation der Cholestase.

Die Schwierigkeit einer Unterscheidung zwischen der *PHZC* und der *PCDC* zeigt sich in der Lokalisation der Cholestase, die in beiden Gruppen keine klaren Abgrenzungen

zulässt. So kann sich die Gallenreicherung bei der *PHZC* bis in die Gallengänge fortsetzen. Umgekehrt zeigen auch die *PCDC* sehr häufig eine hepatozelluläre Cholestase. Dass bei der *PHZC* auch distal des Defektes eine Flussstörung auftritt, könnte an der gestörten Gallenzusammensetzung mit Veränderungen der Viskosität zusammenhängen. Auch zirrrosebedingte Stenosen und Entzündungen oder Motilitätsstörungen der Gallenkanälchen können einen Gallestau begünstigen. Dass die *PCDC* eine sekundäre Schädigung der Hepatozyten mit konsekutiver intrazellulärer Cholestase nach sich ziehen kann, wurde bereits weiter oben angeführt. Trotzdem ist die Lokalisation der Cholestase bei der histologischen Differenzierung zwischen einer *PCDC* und einer *PHZC* richtungsweisend. Die unterschiedlich ausgeprägte Verteilung der Cholestase bei den *PCDC* kann mit dem ungleichmäßigen sekundären Rückstau erklärt werden, entsprechend dem Leberareal, das durch einen stenosierte Gang drainiert wird. Bei der *PHZC* ist die Verteilung der hepatozellulären Cholestase hingegen gleichmäßig, da auch der Transporterdefekt homogen über die Leberepithelien verteilt ist.

Die Gallengänge.

Sowohl die Reduktion mittlerer und großer Gallengänge, als auch die neoduktuläre Proliferation sind bei der *PCDC* eine Folge des Gallestaus und einer damit einhergehenden Entzündungsreaktion. Diese Veränderungen sind in beiden Erkrankungsgruppen vorzufinden, bei den *PCDC* jedoch etwas häufiger als bei der *PHZC*. Zunächst scheint die cholestatische Leber einem toxischen Schaden durch retinierte Gallensalze mittels einer Stimulation des 'cholehepatic shunt pathway' vorzubeugen [134]. Unter diesem Nebenweg des Gallensalztransportes wird die Wiederverwertung von reabsorbierten duktalem Gallensalzen verstanden. Die über einen selektiven Transporter der apikalen Cholangiozyten-Membran, den ASBT (Apical Sodium Bile Acid Cotransporter), resorbierten Gallensalze gelangen über vier basolaterale Transportsysteme aus den Gallengangsepithelien über den peribiliären Venenplexus in die Hepatozyten, um anschließend erneut über die Galle ausgeschieden zu werden. Neuere Studien weisen darauf hin, dass der 'cholehepatic shunt pathway' eine Aufrechterhaltung des Gallensalztransportes bei chronischer Cholestase, insbesondere bei Gallengangsverschlüssen ermöglicht [134]. Im weiteren Verlauf scheint es aber zu einer Dekompensation dieses adaptiven Systems bei der *PCDC* zu

kommen, da in dieser Erkrankungsgruppe häufiger als bei der *PHZC* Epitheldefekte der Gallengänge und Galleseen zu sehen sind. Ein mechanischer Verschluss fehlt bei der *PHZC*. Es ist denkbar, dass ein dezentler Fluss in den gallegestauten Gängen einen Strukturschaden der Gangepithelien zeitlich verzögert, während eine Funktionsstörung des Parenchyms bereits eingetreten ist.

5.2.2. Immunhistochemische Parameter.

Funktion und Umdifferenzierung.

Die im Vergleich zu den *PCDC* vermehrte **Epithelproliferation** der kleinen Gallengänge in der Gruppe der *PHZC* ist überraschend, wenn man bedenkt, dass der auslösende Reiz die vor Ort statische Galle ist. Möglicherweise wird die Proliferation der Gallegänge von den cholestatischen Hepatozyten mitangestoßen, da sich die **Mib-1** aktiven Gallegänge der Präparate mit einer *PHZC* überwiegend als gallefrei erweisen (siehe Abb. 4). Dass die Proliferation hier auch intensiver ist, könnte an einer fehlenden Ansprechbarkeit der cholestatischen Gallengangsepithelien der *PCDC* auf den Proliferationsreiz liegen. Als Ursache käme ein toxisch bedingter cholangiozellulärer Rezeptordefekt oder eine weiter fortgeschrittene metabolische Zellschädigung in Betracht, die die Proliferationsfähigkeit cholangioduktaler Epithelzellen bei einer *PCDC* einschränkt. Hier könnte somit eine Störung des sogenannten 'hepatischen Reperaturkomplexes' im Bereich der Endothelzellen vorliegen [106]. Dies würde erklären, warum sich bei den *PHZC* und den *PCDC* die Mib-1-Aktivität neoduktulärer Gänge nicht unterscheidet. Diese neu entstandenen Gänge sind, wenn sie überhaupt in der Lage sind Galle abzuleiten, noch nicht soweit geschädigt, dass eine Funktionseinschränkung daraus resultieren würde. Clotman et al sahen in der geringen Mib-1-Aktivität der Gallengangsproliferate bei *Hnf6*^{-/-} Mäusen eine Bestätigung darin, dass diese Zellen postmitotisch seien und wahrscheinlich aus umdifferenzierten Hepatoblasten hervorgehen [14]. Diese Beobachtung lässt sich bei uns in einem Großteil der *PHZC* und *PCDC* nachvollziehen. Jedoch befinden sich darunter auch Präparate mit einer deutlich verstärkten Mib-1-Expression der neoduktulären Gallengänge. Dies lässt darauf schließen, dass neben Hepatoblasten wohl auch die dukталen Epithelzellen aus sich heraus proliferieren können (siehe Abb.20.a,b + Abb.4).

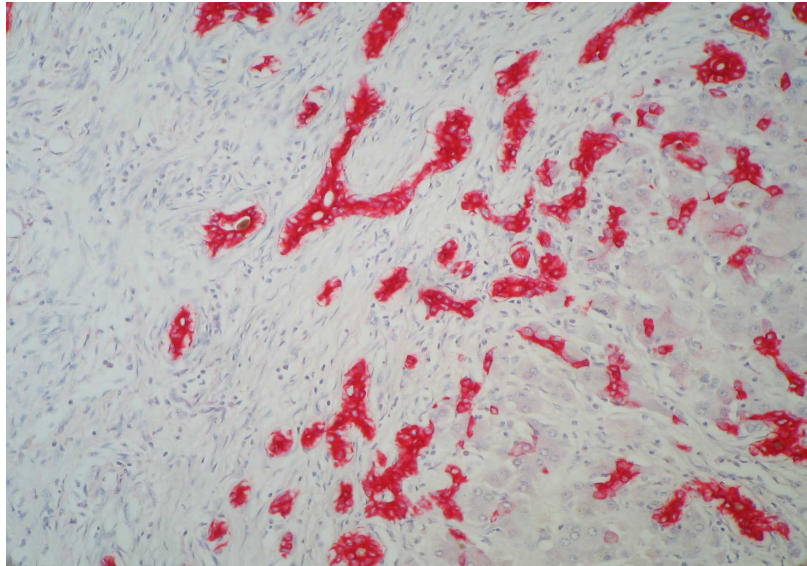


Abbildung 20a. Beispiel einer *PCDC* (Gallengangsatresie, Acht Monate altes Mädchen). Reichlich neoduktuläre Proliferation, zum Teil auch innerhalb der Pseudolobuli zu sehen. CK7, Vergr. 150fach.

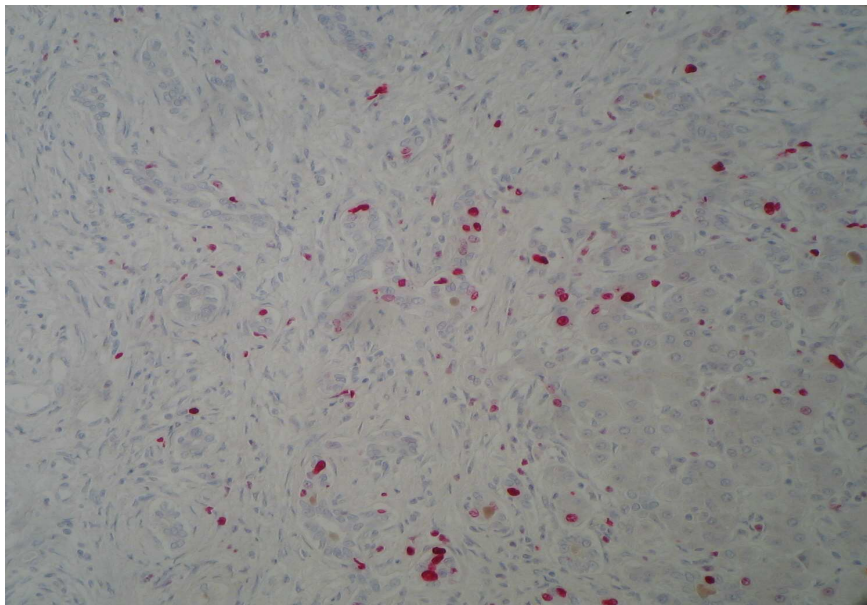


Abbildung 20b. Beispiel einer *PCDC* (Gallengangsatresie. siehe 18a. Kommentar siehe Abb. 20c.) Mib-1, Vergr. 150fach.

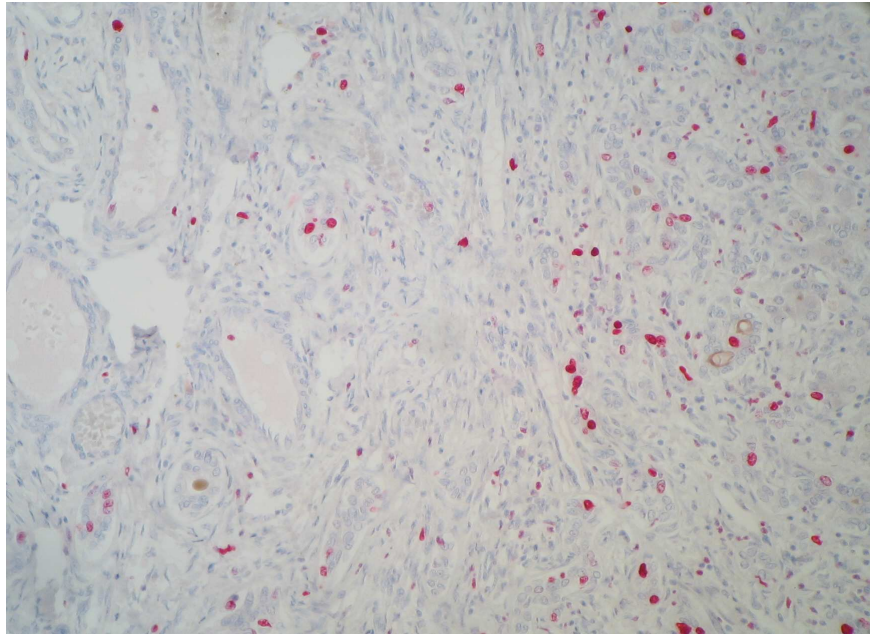


Abbildung 20c. Beispiel einer PCDC (Gallengangsatresie, siehe 20a.): Proliferierende reguläre und neoduktuläre Gallegänge. Darunter cholestatische Gallegänge ohne Mib-1-Expression: möglicherweise Hinweis auf einen funktionellen Schaden.

Mib-1, Vergr. 150fach.

Die **Expression von CK7** in den Hepatozyten cholestatischer Lebern zeigt eine zelluläre Strukturänderung und wird als eine hepatozelluläre Umdifferenzierung gewertet [30]. Die Umdifferenzierung von Hepatoblasten und sogar reifen Hepatozyten in duktuläre Strukturen mit Basalmembran inklusive der Ausbildung von Gallengangsmarkern ist in vitro bei Hepatozyten von Ratten gelungen [79].

In dem vorliegenden Kollektiv sind Anzeichen einer hepatozellulären Umdifferenzierung in tubuläre Strukturen innerhalb der Leberläppchen zu erkennen. So erinnern zirkuläre Anordnungen CK7-positiver Hepatozyten an Querschnitte von neoduktulären Proliferaten (siehe Abb.21a+b). Die Lokalisationsbeschreibung des CK7 erweist sich als schwer, da selbst innerhalb eines Gewebsschnittes fokale Unterschiede zu sehen sind.

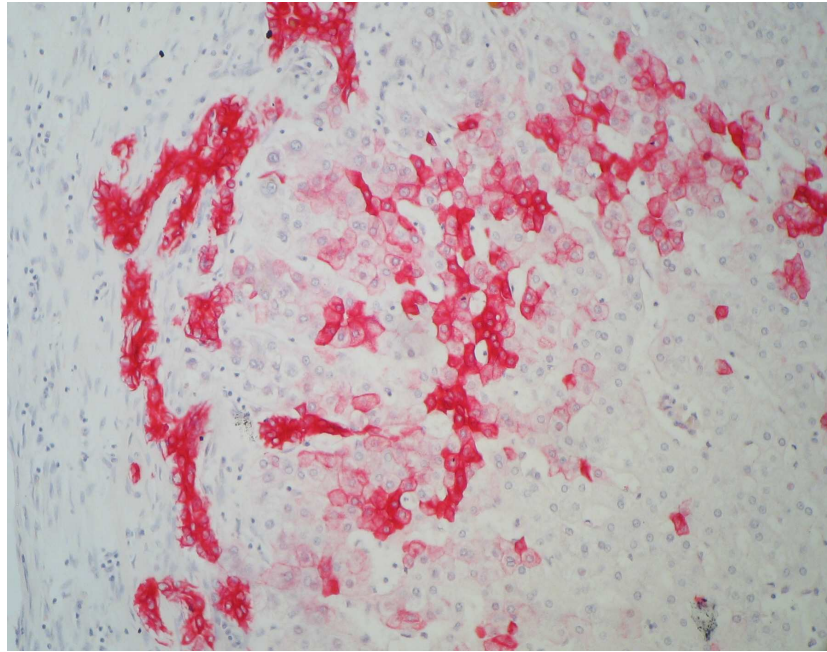


Abbildung 21a. Beispiel einer *PCDC* (Gallengangsatresie, 21 Monate alter Junge): CK-7 positive Hepatozyten mit zum Teil tubulärer Anordnung. CK7, Vergr. 150fach.

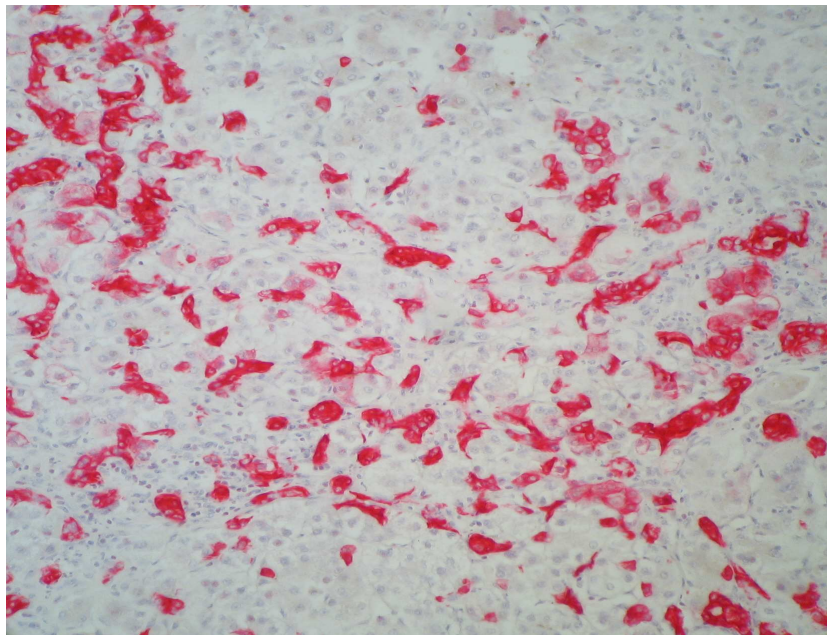


Abbildung 21b. Beispiel einer *PHZC* (PFIC2: Drei Jahre alter Junge): Wie bei der *PCDC* sind CK7-positive Hepatozyten in zum Teil tubulärer Formation zu sehen. CK7, Vergr. 150fach.

Schädigung der Gallengänge und Hepatozyten.

Das **CD10** dient als Marker für einen intakten Bürstensaum am apikalen Gallepol. Es kann insofern zur Differenzierung zwischen einer *PHZC* und einer *PCDC* eingesetzt werden, als dass CD10-positive Gallengänge in dem untersuchten Kollektiv ausschließlich bei den *PHZC* zu sehen waren. CD10-positive Gallekanälchen waren bei der *PHZC* häufiger als bei der *PCDC* nachweisbar (Abb.22).

Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der retrograd aufsteigenden Cholestase bei der *PCDC*. Die Galle führt zu einer Schädigung der anliegenden Zellstrukturen, und somit der Gallengangsepithelien mit einem hieraus resultierenden Verlust des CD10-Proteins im Rahmen der Destruktion des Bürstensaumes. Ein weiterer Grund ein der CD10-Reduktion wird in einer cholestasebedingten reduzierten Transkription des CD10-Proteins durch eine Methylierung der Promotorregion des MME (Mendelian Inheritance in Man) gesehen [11,122]. Bei der *PHZC* gesellt sich die Gallengangscholestase erst später im Verlauf der Erkrankung sekundär hinzu. Dies kann die hier häufigere Nachweisbarkeit von cholangiozellulärem CD10, als Hinweis auf einen intakten Funktionsstoffwechsel der entsprechenden Zellen, erklären. Eine weiterführende toxisch bedingte Beeinträchtigung des Funktions- und später des Strukturstoffwechsels kann in beiden Erkrankungsgruppen zu einem Mikrovilli- oder Transkriptionsdefekt mit einer Verminderung der CD10- Expression führen. Obwohl sowohl bei der *PHZC*, als auch bei der *PCDC* nahezu regelmäßig Galle in den Gallenkapillaren zu sehen war, ist das CD10 bei der *PCDC* seltener als bei der *PHZC* anzutreffen. Möglicherweise spielt auch ein erhöhter Stauungsdruck, wie der bei den *PCDC* wohl eher als bei der *PHZC* vorliegt, eine zusätzliche Rolle bei der Schädigung von Mikrovilli an den Gallenpolen. Interessanterweise sahen Byrne *et al.* eine CD10-Reduktion nur im Allagille-Syndrom und bei Kindern im Alter <24 Monate eine Reduktion der CD10-Expression [11]. In den vorliegenden Fällen ist aber auch eine Reduktion der CD10-Expresion bei Kindern in höheren Lebensalter zu sehen. Eine Berücksichtigung des Alters bei der CD10-Beurteilung ist sicher sinnvoll.

Diese stärkere funktionelle Parenchymschädigung bei der *PCDC* lässt sich tendenziell auch bei der **CEACAM1**-Färbung beobachten. In der Gruppe der *PCDC* sind Anzeichen einer stärkeren Polarisationsstörung zu sehen. Diese hängt wahrscheinlich auch mit einer gestörten Mikrovillimotilität zusammen [107]. In Abschnitt 5.2 wurde

schon auf die ungünstige Wechselwirkung zwischen Cholestase und Mikrofilamentdefekten eingegangen. Insofern würde sich die stärkere CEACAM1-Alteration bei *PCDC* mit einer stärkeren und akuterer Schädigung der Leberepithelien erklären lassen.

Eine Untersuchung mit höheren Fallzahlen würde diesbezüglich mehr Aufschluss bringen.

Eine Subgruppe der *PHZC* kann mit Hilfe des **MDR3-Transporters** am apikalen Gallepol differenziert werden. Bei der *PFIC3* ist dieser Marker von eingeschränktem Wert, da in einigen Fällen trotz MDR3-Mutation der Transporternachweis immunhistochemisch gelingen kann [55]. Dies unterstreicht einmal mehr die Komplexität der Differenzierung cholestatischer Lebererkrankungen, die eine gute Zusammenarbeit mehrerer medizinischer Fachgebiete erfordert.

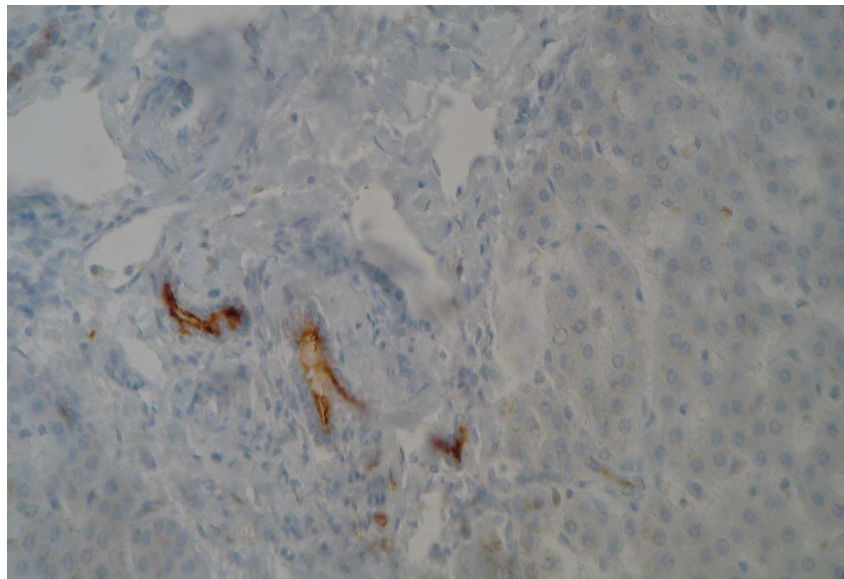


Abbildung 22. Beispiel einer *PHZC* (*PFIC2*, Drei Jahre altes Mädchen):
CD10-positive Gallengänge. Hier ist auch eine fokale CD10-Reduktion an den
Gallepolen zu sehen. CD10, Vergr. 200fach.

5.3. Der Morbus Wilson im Vergleich zur primär cholangioduktalen und primär hepatozellulären Cholestase.

Im Gegensatz zu dem fibrotisch bedingten pseudolobulären Umbau scheinen intralobuläre bindegewebige Veränderungen beim Morbus Wilson eine untergeordnete Rolle zu spielen. Hierbei sind aber auch die assoziierten sekundären Cholestasen häufigmäßiger als bei den primären cholestatischen Erkrankungen ausgeprägt. Möglicherweise liegt hierin ein Grund für die eher geringe intra- und perilobuläre Bindegewebsvermehrung. Die sekundär zu Stande kommende Cholestase spiegelt sich auch in der Verteilung der parenchymatösen Veränderungen wieder. Der Gallestau in den Präparaten des M.Wilson variiert stark in der Lokalisation und im Ausmaß. Auch die Pseudolobuli sind je nach Areal klein- bis großknotig und zum Teil inkomplett (siehe Abb.23). Ausmaß und Zusammensetzung der Entzündungsreaktion sind differentialdiagnostisch wenig richtungsweisend. Dass diese wie bei den PHZC kaum in den Gallengängen zu sehen ist, erklärt sich durch den dort mangelnden Gallereiz. Interessanterweise konnte bei einem Wilson-Fall eine periduktuläre Fibrose bei fehlender Gallengangscholestase und Cholangitis gesehen werden (siehe Abb.23). Hierfür kämen hereditäre, metabolische oder toxische Gründe infrage, die hier nicht weiter geklärt wurden.

Geringer Parenchymschwund und Leberepithelschwellung ähneln der PHZC und weisen auf eine Problematik ohne primär extrazelluläre Noxen hin. Die besonders im frühen Lebensalter auftretenden Riesenzellen finden sich nicht beim M.Wilson. Dahingegen lassen sich hier häufiger als bei den primär cholestatischen Erkrankungen Epithelverfettungen als Hinweis auf eine kupfervermittelte mitochondriale Schädigung durch freie Radikale nachweisen [35]. Die unregelmäßige Verteilung der Cholestase gründet sich wohl auf die unterschiedliche Ausprägung dieser Schädigung. Der Grund, dass sich die Cholestase auch in die kleinen Gallenkanälchen fortsetzt, ist wahrscheinlich funktioneller oder konsistenzieller Natur, da primär keine Gangverschlüsse auftreten.

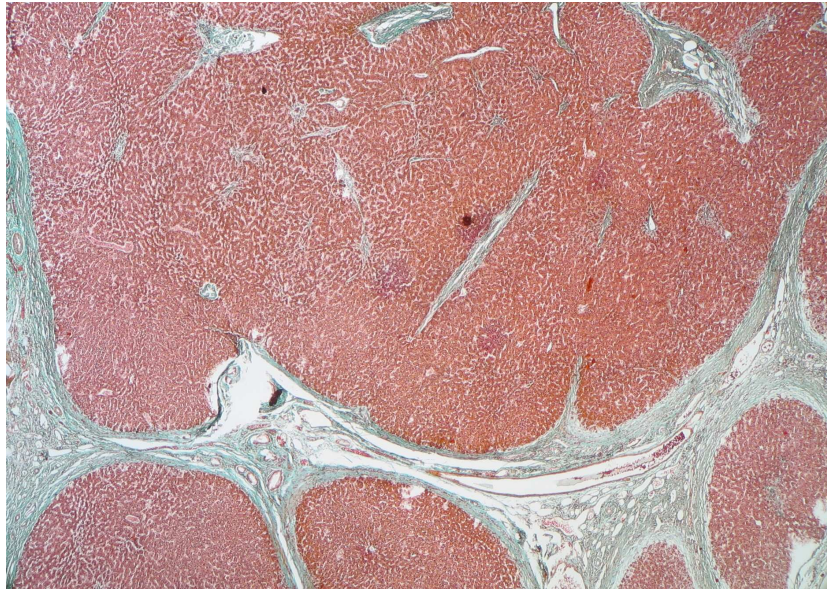


Abbildung 23. M.Wilson: Sechs Jahre altes Mädchen. Variabler Fibrosegrad. Masson-Goldner, Vergr. 40fach.

Die starke Ausprägung der neoduktulären Proliferation bei eher mäßiger Cholestase bietet Raum für Spekulationen (Tabelle 11,r. Abb.5,6). Stärker als bei den *PHZC* lässt sie sich entweder auf einen stärkeren Proliferationsreiz oder auf eine vermehrte Proliferationsumsetzung zurückführen. Warum sollte eine vergleichsweise milde Cholestase beim Morbus Wilson eine stärkere Bildung von Gallengangsproliferaten als die *PHZC* hervorrufen? Der Grund liegt wohl eher nicht an dem 'Hilferuf' der cholestatisch bedrohten Zellen als vielmehr an der Übermittlung der Umsetzung der neoduktulären Proliferationsanweisung. Somit könnte die starke Gallengangsproliferation beim Morbus Wilson für eine im Durchschnitt bessere Parenchymfunktion und -interaktion als bei der *PHZC* sprechen. Dass die neoduktuläre Proliferation beim Morbus Wilson in ihrem Ausmaß sehr stark an jene bei schwer cholestatischen Gallengangsatresien erinnert, könnte an der ausgiebigeren parallelen Aktivierung eines zweiten Induktionsarmes für Proliferation liegen: möglicherweise den cholestatischen Gallengängen.

Die ausgeprägte neoduktuläre Proliferation beim Morbus Wilson steht im Kontrast zu einer gleichzeitig eher geringen hepatozellulären und cholangiozellulären Mib-1-Proliferationsaktivität (Tabelle 12 a-h und Abb.6). Dies könnte daran liegen, dass die Wucherung der Gallengänge beim Morbus Wilson in der Regel schon abgeschlossen ist, während bei den *PCDC* eine erhöhte Mib-1-Aktivität den fortbestehenden Proliferationsreiz anzeigt.

Diese Diskrepanz zwischen Gangvermehrung und Mib-1-Aktivität kann als Kriterium für eine Abgrenzung des Morbus Wilson von primären cholestatischen Erkrankungen herangezogen werden. Das CD10 kann zur Abgrenzung des M.Wilson von der *PCDC* beitragen, da es bei der *PCDC* viel stärker reduziert ist (Tabelle 12 q-t und Abb.7 a+b). Die oben besprochene Kombination zwischen läppchenperipherer Cholestase mit beteiligter CK7- und Mib-1- Expression lässt sich an den Morbus Wilson-Fällen gut nachvollziehen.

5.4. Anwendung der Merkmalstabelle anhand ausgewählter Beispiele.

Obwohl der Defekt beim **Alagille-Syndrom** auf der Ebene der Gallengänge liegt, findet man abweichend von einem Großteil der *PCDC* trotz einer Gallengangscholestase weder eine Cholangitis noch eine neodukuläre Proliferation. Letztere wird laut Literatur auch nicht zwingend erwartet [53]. Dahingegen finden sich im vorliegenden Alagille-Fall die typischerweise in der Gruppe der *PHZC* zu findenden Merkmale wie netzartige intralobuläre Septenbildung und eine diffuse Hepatozytencholestase bei einem geringem Parenchymschwund. Dies unterstreicht, dass die herausgearbeiteten Merkmale nur als Indizien für eine *PHZC* gewertet werden können und auch bei *PCDC* gefunden werden können.

Die immunhistochemisch an *PCDC* erinnernde Konstellation mit einer läppchenperipheren Betonung des CK7 bei CD10-negativen Gallengängen lässt sich sehr gut mit der in den Gallengängen liegenden Defektebene vereinbaren [67] (Abb.8).

Im untersuchten Fall des **Crigler-Najjar-Syndroms** lässt sich ein Großteil der ausgewählten Kriterien zur Bestimmung der Cholestase hervorrufenden Defektebene anwenden. Es gibt keine Indizien für eine *PCDC*. Zu beachten sind auch die passenden immunhistochemischen Merkmale mit disseminiertem CK7 und CD10-positiven Gallengängen (Abb.9).

Auch bei der **Chronisch Sklerosierenden Cholangitis** überwiegen und überzeugen die Merkmale der *PCDC*. Die Defektebene auf der Höhe der Gallengänge lässt sich gut nachvollziehen. So ist beispielsweise CK7 läppchenperipher angesiedelt und das Gallengangs-CD10 negativ (Abb.10.a+b).

Bei der **äthyltoxischen Leberzirrhose** finden sich Merkmale sowohl für eine *PCDC*, als auch für eine *PHZC*. Die in unserem Fall gesehene Gallengangsproliferation [127], als auch die schwere Cholestase [69] wurden im Zusammenhang mit der alkoholtoxischen Lebererkrankung in der Literatur beschrieben (Abb.12 a+b) .

Trotzdem überwiegen die Indizien für eine hepatozelluläre Genese der Erkrankung. Insbesondere können die immunhistochemischen Parameter der *PHZC* für eine hepatozelluläre Genese der Cholestase sprechen. So entsprechen CD10-positive cholangioduktale Strukturen und disseminierte CK7 in den Leberläppchen der erwiesenen hepatozellulären Entstehung der Galleakkumulation bei der äthyltoxischen Leberzirrhose .

Das **Kurzdarmsyndrom** kann in einigen Fällen aufgrund metabolischer und nutritiver Störungen mit einer Leberparenchymschädigung einhergehen [5]. In unserem Fall ergibt sich ein Bild, das stark der äthyltoxischen Leberzirrhose ähnelt. Allerdings helfen hier die immunhistochemischen Merkmale bei der Differenzierung nur bedingt weiter. Es zeigen sich CD10-positive Gallengänge, was eher an eine primär hepatozelluläre Genese der Cholestase denken lässt (Abb.11). Aber auch cholangioduktale Veränderungen wären denkbar, wenn man bedenkt, dass das Kurzdarmsyndrom durch einen Gallensäureverlust zur Gallensteinbildung prädestiniert [38]. Womöglich liegt bei uns ein Mischbild zwischen einer *PHZC* und einer *PCDC* vor.

Bei der **Tyrosinämie Typ 1 (hereditäre Tyrosinämie)** können toxische Stoffwechselprodukte in der Leber zu Steatose, neoduktulären Proliferaten mit Cholestase, Zirrhose und eventuellen Leberzelldysplasien führen [69]. In unserem cholestasefreien Fall überwiegen eindeutig die hepatozellulären Schädigungszeichen. Die galleableitenden Strukturen sind für CD10 positiv bei disseminierte CK7 in den Leberläppchen (Abb.13 a-c), also auch hier entsprechen die immunhistochemischen Marker sehr gut der pathophysiologischen Schädigungsebene .

Das **Budd-Chiari-Syndrom** geht mit Leberfunktionsstörung mit Fibrose und Leberzellatrophie einher [69]. Die Schädigung bei dieser Erkrankung führt somit zu einer Hepatozytenschädigung ohne Cholestase, die auch mit den erarbeiteten Merkmalen erkennbar ist. So zeigen sich unter anderem eine intralobuläre Septenbildung sowie Gallenkanälchen und -gänge mit nachweisbaren CD10 (Abb.14 a+b). Allerdings handelt es sich um einen unauffälligeren Befund als bei toxisch hervorgerufene Parenchymschädigung mit Cholestase.

Bei der **Oxalose-Erkrankung** lassen sich erwartungsgemäß keine wesentlichen Veränderungen beobachten.

5.5. Fazit.

Die Kombination von konventionellen und immunhistochemischen Histologieverfahren bei cholestatischen Lebererkrankungen liefert wertvolle Informationen über den Funktionszustand von Hepatozyten und cholangioduktalen Strukturen und bietet zugleich die Grundlage für pathophysiologische Überlegungen zu dynamischen Umbauvorgängen in der cholestatischen Leber.

Im klinischen Alltag können durch die Interpretation der erarbeiteten konventionellen und immunhistochemischen Parameterkombinationen bei fehlender Patientenanamnese oder ausstehender humangenetischer Befunde tendenzielle Aussagen zur Defektlokalisation im Sinne einer primär hepatozellulären Cholestase (*PHZC*) oder einer primär cholangioduktalen Cholestase (*PCDC*) getroffen werden. Die lichtmikroskopisch sichtbaren dynamischen Veränderungen in der cholestatischen Leber sind vielfältig und hängen unter anderem vom Alter des Patienten ab, da die Leberentwicklung auch nach der Geburt nicht vollständig abgeschlossen ist.

In Kenntnis der Tatsache, dass eine reduzierte Expression von hepatobiliären Transportsystemen eine Cholestase hervorrufen kann, ist der selektive Nachweis mittels spezifischer Marker für MDR3 und BSEP weiterhin eine wegweisend diagnostische Stütze, um eine primär hepatozellulär bedingte PFIC von einer *PCDC* abzugrenzen. Während in allen Fällen der PFIC2-Patienten eine fehlende BSEP (bile salt export pump, siehe Abschnitt 2.3.)-Immunreaktivität an der kanalikulären Membran vorliegt, kann in einigen Fällen der PFIC3-Erkrankung eine kanalikuläre MDR3-Immunreaktivität vorgefunden werden [55]. In solchen Fällen können weiterführende histologische Indizien zur Unterscheidung zwischen *PHZC* und *PCDC* hilfreich sein.

Sowohl die konventionelle Histologie als auch die Immunhistochemie sind für sich alleine genommen von nur eingeschränktem diagnostischen Nutzen. Sie können jedoch in der Synopsis Wahrscheinlichkeitskriterien für die genauere Zuordnung der

Cholestasen liefern. Bei der Differentialdiagnose cholestatischer Lebererkrankungen bei Kindern wird in Zukunft aber weiterhin eine enge Zusammenarbeit zwischen Klinikern, den Humangenetikern und den Pathologen essentiell bleiben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand von 38 Leberpräparaten wurden allgemeine und immunhistochemische Merkmale der Cholestase und insbesondere die Aussagefähigkeit histopathologischer Kriterien zur Differenzierung primärer hepatozellulärer Cholestasen (*PHZC*) von primär cholangioduktalen Cholestasen (*PCDC*) bei Kindern untersucht. Hierfür wurde die Progressive Intrahepatische Cholestase (PFIC, 7 Fälle) als Beispiel einer *PHZC*, mit der Gallengangsatresie (14 Fälle) als Beispiel für eine *PCDC* verglichen. Die konventionellen histologischen Kriterien wurden um die immunhistochemischen Marker CD10, Mib-1, CK7 und CEACAM1 erweitert und semiquantitativ analysiert. Ein Nachweisversuch des MDR3-Proteins erfolgte exemplarisch an der PFIC3 bei unterschiedlichen Gewebefixierungen. Die konventionelle Histologie liefert bereits zielführende diagnostische Kriterien zur Unterscheidung einer *PHZC* von einer *PCDC*. Die Immunhistochemie erleichtert mit differentialdiagnostischen Informationen bezüglich Funktion, Schaden und Umdifferenzierungsprozessen die Abgrenzung der hepatozellulären von der cholangioduktalen Defektebene. Beispielsweise ist der Nachweis von CD10 in den Gallekanälchen und Gallegängen ein Indikator für die Unversehrtheit des Bürstensaumes galleleitender Strukturen und gelingt bei einer *PHZC* häufiger als bei den *PCDC*. Das CK7 ist ein empfindlicher Indikator für hepatozelluläre Schäden und bringt die cholangiozelluläre Umdifferenzierung der Hepatozyten zur Darstellung. Die hepatozelluläre CK7-Expression ist bei der *PCDC* läppchenperipher betont, während eine disseminierte Verteilung des CK7 als Indiz für eine *PHZC* gewertet werden kann. Das CEACAM1 scheint als Marker für eine gestörte polare Differenzierung cholestatischer Hepatozyten hilfreich zu sein. Durch die Kombination von konventionellen mit immunhistochemischen Histologieverfahren kann die histologische Unterscheidung der untersuchten Krankheitsbilder an kleinen Gewebeproben erleichtert werden. Die Grenzen der Immunhistochemie zeigen sich am Beispiel des MDR3, das nur für eine Untergruppe der PFIC-Erkrankungen bei Kryostat-Fixation diagnostisch anwendbar ist. Außerdem kann bei molekularbiologisch gesicherter PFIC3 eine immunhistochemisch sichtbare MDR3-Expression vorliegen, so dass eine positive Immunhistochemie eine PFIC3 nicht ausschließt. Eine enge Zusammenarbeit mit der Humangenetik und Klinik bleibt zur Diagnosestellung cholestatischer Lebererkrankungen bei Kindern essentiell.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alonso EM, Snover DC, Montag A, Freese DK, Whittington PF (1994). Histologic pathology of the liver in progressive intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterology Nutr* 18:128-133.
2. Andrews HG, Shermeta DW, White JJ, Haller JA (1970). Hepatic artery interruption in fetal and neonatal miniature pigs: studies in the pathogenesis of biliary atresia. *Surg Forum* 21:384-385.
3. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Schlossman SF (1984). In *Leukocyte typing.*, Berlin: Springer-Verlag 1-814.
4. W.Böcker, H.Denk, Ph.U. Heitz. In: *Pathologie*, 2.Auflage, 2001. Urban & Fischer, S. 730.
5. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Edition, Vol.2, 2001.
6. Brent RL (1962). Persistent jaundice in infancy. *J Pediatr* 61:111-144.
7. Brough AJ, Bernstein J (1969). Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics* 43:519-526.
8. Brown WR, Sokol RJ, Levin MR, et al (1988). Lack of correlation between infection with reovirus 3 and extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. *J Pediatr* 113:670-676.
9. Brox AG, Lavellee MC, Arseneua J, Langleben A, Major PP (1986). Expression of common acute lymphoblastic leukaemia-associated antigen on germ cell tumor. *Am J Med* 80:1249-52.
10. Bull LN, van Eijk MJT, Pawlikowska L, de Young JA, Juijn JA, Liao M, et al (1998). A gene encoding a P-Type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 18:219-224.
11. Byrne JA, Rayner AC, Thompson RJ, Knisely AS (2007). Lack of hepatocellular CD10 along bile canaliculi is physiologic in early childhood and persistent in Alagille syndrome. *Lab Invest* 87(11): 1138-1148.
12. Carrel S, Schmidt-Kessen A, Mach J-P, Haumann D, Girardet C (1983). Expression of CALLA on human malignant melanoma cell lines. *J Immunol* 130: 2456-60.
13. Chiba T, Kasai M, Suzuki T (1987). Variations in the course of vessels in the vicinity of the hepatic port in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 22:963-966.
14. Clotman F, Lannoy VJ, Reber M, Cereghini S, Cassiman D, Jacquemin P, Roskams T, Rousseau GG, Lemaigre FP (2002). The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* 129:1819-1828.
15. Coffinier C, Barra J, Babinet C, Yaniv M (1999). Expression of the vHNF1/HNF1 α homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech Dev* 89:211-213.
16. Coffinier C, Gresh L, Fiette L, Tronche F, Schütz G, Babinet C, Pontoglio M, Yaniv M, Barra J (2002). Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1 α . *Development* 129:1829-1838.
17. Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S, Bernard O, Hadchouel M (1996). Defekt of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 23:904-908.
18. Desmet VJ (1985). Intrahepatic bile ducts under the lens. *J Hepatol* 1:445-559.
19. Desmet VJ (1987). Cholangiopathies: past, present and future. *Semin Liver Dis* 7:67-76.
20. Desmet VJ, Van Eyken P, Sciort R (1990). Cytokeratins for probing cell lineage relationships in developing liver. *Hepatology* 12:1249-1251.
21. Desmet VJ (1991). Embryologie of the liver and intrahepatic biliary tract, and an overview of malformations of the bile duct. In: McIntyre N, Benhamou J-P, Bircher J, Rizzetto M, Rodés J, (eds). *The Oxford textbook of clinical hepatology*. Vol 1. Oxford University Press, S.497-519.
22. Desmet VJ (1992). Congenital Diseases of Intrahepatic Bile ducts: Variations on the Theme 'Ductal Plate Malformation'. *Hepatology*, 16: 1069-1083.
23. Deutsch GH, Sokol RJ, Stathos TH, et al (2001). Proliferation to paucity: evolution of bile duct abnormalities in a case of Alagille syndrome. *Pediatr Dev Pathol* 4:559-563.
24. De Vree JML, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, et al (1998). Mutation in the MDR 3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:282-287.
25. Diaz R, Kim JW, Hui JJ, Li Z, Swain GP, Fong KS, Csiszar K, Russo PA, Rand EB, Furth EE, Wells RG (2008): Evidence of the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Hum Pathol* 39:102-115.
26. Di Sant'Agnese PA, Blanc WA (1976). Infarction of the common bile duct in an infant after surgical exploration for jaundice: a possible cause of extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg* 11:543-545.

27. Draberova L, Cerna H, Brodska H, Boubelik M, Watt SM, Stanners CP (2000). Soluble isoforms of CEACAM1 containing the A2 domain: increased serum levels in patients with obstructive jaundice and differences in 3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine moiety. *Immunology* 101:279-287.
28. Dragovic T, Deddish PA, Tan F, Weber G, Erdos EG (1994). Increased expression of neprilysin (neutral endopeptidase 24.11) in rat and human hepatocellular carcinomas. *Lab Invest* 70(1):107-13.
29. Emerick KM, Rand EB, Goldmuntz E et al (1999). Features of Alagille syndrome in 93 patients: Frequency and relation to prognosis. *Hepatology* 29:822-829.
30. Ernst LM, Spinner NB, Piccoli DA, Mauger J, Russo O (2007). Interlobular bile duct loss in pediatric cholestatic disease is associated with aberrant cytokeratin 7 expression by hepatocytes. *Pediatr Dev Pathol* 10: 383-390.
31. Farrant JM, Doherty DG, Donaldson PT et al (1992). Amino acid substitutions at position 38 of the DR polypeptide confer susceptibility to and protection from primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 16:390-395.
32. Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M (2007). Principles of hepatic organic anion transporters regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim-Biophys-Acta* 1773(3):283-308.
33. Greaves MF, Hariri G, Newman RA, Sutherland DR, Ritter MA, Ritz J (1983). Selective expression of the common acute lymphoblastic leukaemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* 61:628-39.
34. Greenholz SK, Lilly JR, Shikes R, et al (1986). Biliary atresia in the newborn. *J Pediatr Surg*, 21: 1147-1148.
35. Gu M, Cooper JM, Butler P et al (2000). Oxidative phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet* 356:469- 474.
36. Guldutuna S, Langenbeck U, Bock KW, Sieg A, Leuschner U (1995). Crigler-Najjar syndrome Typ II. New observation of possible autosomal recessive inheritance. *Dig Dis Sci*, 40:28-32.
37. Hammar JA (1926). Über die erste Entstehung der nicht kapillaren intrahepatischen Gallengänge beim Menschen. *Z Mikrosk Anat Forsch* 5:59-89.
38. G. Herold et al (2002). *Innere Medizin*, S. 398.
39. Ho C-W, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S, Tokimatsu S, Maeda K (1993). The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *J Ped Gastroent Nutr* 16:53-60.
40. Hofman AF (2007). Biliary secretion and excretion in health and disease: Current concepts. *Annals of Hepatology* 6:15-27.
41. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O et al (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor -1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17:384-385.
42. Howard ER (1991). Biliary Atresia. Aetiology, management and complications. In: Howard ER (ed): *Surgery of liver disease in children*. Oxford, England, Butterworth-Heinemann, S. 39-59 (chap 4).
43. Ishida Y, Smith S, Wallace L, Takaharu S, Okamoto M, Auth M, Strazzabosco M, Fabris L, Medina J, Prieto J, Strain A, Neuberger J, Joplin R (2001). Ductular morphogenesis and functional polarization of normal human biliary epithelial cells in three-dimensional culture. *Journal of Hepatology* 35:2-9.
44. Jackson MR, McCarthy LR, Harding D, Wilson S, Coughtrie MW, Burchell B (1987). Cloning of a human liver microsomal UDP-glucuronyltransferase cDNA. *Biochem J* 242:581-588.
45. Jacquemin E, Hadchouel M (1999). Genetic basis of progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Hepatol* 31:377-381.
46. Jacquemin E, de Vree ML, Cresteil D, Sokal E, Sturm E, Dumont M, Scheffer GL, Burdelski M, et al (2001). The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* 120:1448-1458.
47. Jaffe R (1998). Liver transplant pathology in pediatric metabolic disorders. *Pediatr Develop Pathol* 1: 102-117.
48. Jansen PLM, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GEJJ, Koning JH, et al (1999). Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 117:1370-1379.
49. Jones AL, Schmuckler DL, Renston RH, Murakami T (1980). The architecture of bile secretion. A morphological perspective of physiology. *Dig Dis Sci* 25:609-628.

50. Jorgensen MJ (1976). The ductal plate malformation. A study of the intrahepatic bile-duct lesion in infantile polycystic disease and congenital hepatic fibrosis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 257 (Suppl.):33-44.
51. Kagawa T, Watanabe N, Mochizuki K, Numari A, Ikeno Y, Itoh J, Tanaka H, Arias IM, Mine T (2008). Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant BSEP and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells. *Am-J-Physiol-Gastrointest-Liver-Physiol* 294(1): G58-67.
52. Kage M, Arakawa M, Kojiro M, Okuda K (1992). Histopathology of membranous obstruction of the inferior vena cava in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 102: 2081-2090.
53. Kahn EL, Daum F, Markowitz J et al (1983). Arteriohepatic dysplasia. II. Hepatobiliary morphology. *Hepatology* 3: 77-84.
54. Karakucuk I, Dilly SA, Maxwell JD (1989). Portal tract macrophages are increased in alcoholic liver injury. *Histopathology* 14: 245-253.
55. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kühlkamp T, Keppler D, Häussinger D, Kubitz R (2005). Expression and Localization of Hepatobiliary Transport Proteins in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Hepatology* 41:1160-1172.
56. Klippel CH (1972). A new theory of biliary atresia. *J pediatr Surg* 7:651-654.
57. Knisly AS. Feeble cholangiocytes, toxic bile, and nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts (2003). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37(5):531-532.
58. Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Shiba T (2004). The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* 127: 1775-1786.
59. Koga A (1971). Morphogenesis of intrahepatic bile ducts of the human fetus. Light and electron microscopic study. *Z Anat Entwickl Gesch* 135:156-184.
60. Koukoulis G, Mieli-Vergani G, Portmann B (1999). Infantile liver giant cells: immunohistological study of their proliferative state and possible mechanism of formation. *Pediatr-Dev-Pathol* 2 (4): 353-359.
61. Letarte M, Vera S, Tran R, et al (1988). Common acute lymphocyt leukaemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 168:1247-53.
62. Libbrecht L, Roskams T (2002). Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Biol* 13: 389-396.
63. Lilly JR, Colorado D, Chandra RS (1974). Surgical hazards of coexisting anomalies in biliary atresia. *Surg Gynecol Obstet* 139:49-54.
64. Lilly JR, Starzl TE (1974). Liver transplantation in children with biliary atresia and vascular anomalies. *J Pediatr Surg* 9:707-713.
65. Lindner TH, Nijolstad PR, Horikawa Y, Bostad L, Bell GI, Sovik O (1999). A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum Mol. Genet* 8:2001-2008.
66. Loke SL, Leung CY, Chiu KY, Yau WL, Cheung KN, Ma L (1990). Localisation of CD10 to biliary canaliculi by immunoelectron microscopical examination. *J Clin Pathol* 43:654.
67. Loomes KM, Spinner NB, Piccoli DA, Oakev RJ (1998). JAGGED 1 expression in the developing liver: Correlation with histologic features in Alagille syndrome. *Hepatology* 28:317A.
68. Ludwig J, MacCarty RL, LaRusso NF, Krom RAF, Wiesner RH (1986). Intrahepatic cholangiectatases and large-duct obliteration in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 6:560-568.
69. MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP (2002). In Pathology of the liver. 4th edition, Churchill Livingstone, London.
70. McDaniell R, Warren DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli PA, Spinner MB (2006): NOTCH2 mutations cause Alagille Syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet*, 79: 169-173.
71. McFarlane IG, Wojcicka BM, Tsantoulas DC, Portmann B, Eddleston ALWF, Williams R (1979). Leucocyte migration inhibition in response to biliary antigens in primary biliary cirrhosis, sclerosing cholangitis, and other chronic liver disease. *Gastroenterology* 76:1333-1340.
72. Miyamoto M, Kajimoto T (1983). Associated anomalies in biliary atresia patients. In: Kasai M (ed): Biliary atresia and its related disorders. Amsterdam, The Netherlands, Excerpta Medica, pp 13-19.
73. Moll R, Franke WW, Schiller DA, Geiger B, Krepler R (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24.
74. Moore KL (1988). The developing human- clinically orientated embryology (ed 4). Philadelphia, PA, Saunders, 1988; pp 217-245 (chap 12).
75. Morecki R, Glaser JH, Horwitz MS (1983). Etiology of biliary atresia: The role of reo 3 virus. In Daum F (ed): Extrahepatic biliary atresia. New York, NY, Dekker, pp 1-9.

76. Morgan WW, Rosenkranz JG, Hill RB (1966). Hepatic arterial interruption in the fetus: an attempt to stimulate biliary atresia. *J Pediatr Surg*, 1:342-346.
77. Nagula S, Jain D, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G (2006). Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis- a histological classification of the severity of cirrhosis. *J Hepatol* 44: 111-117.
78. Nijjar SS, Crosby HA, Wallace L, et al (2001). Notch receptor expression in adult human liver: a possible role in bile duct formation and hepatic neovascularization. *Hepatology* 34:1184-1192.
79. Nishikawa Y, Doi Y, Watanebe H, Tokairin T, Omori Y, Su M, Yoshioka T, Enomoto K (2005). Transdifferentiation of mature rat hepatocytes into bile duct-like cells in vitro. *Am J Pathol* 166: 1077-1088.
80. O'Rahilly R, Müller F (1987). Stage 16. The digestive system. In: O'Rahilly R, Müller F (eds) Carnegie Institution of Washington Publication 637, Washington, pp 196-198.
81. O'Rahilly R, Müller F (1987). Stage 17. Liver. In: O'Rahilly R, Müller F (eds) Carnegie Institution of Washington Publication 637, Washington, pp 214-215.
82. Ortiz D, Arias IM (2001). MDR3 mutations: a glimpse into Pandora's box and the future of canalicular pathophysiology. *Gastroenterology* 120:1549-1552.
83. Perrault J (1981). Paucity of interlobular bile ducts: getting to know it better. *Dig Dis Sci* 26: 481-484.
84. Pesando JM, Tomaselli KJ, Lazarus H, Schlossman SF (1983). Distribution and modulation of a human leukaemia-associated antigen (CALLA). *J Immunol* 131:2038-45.
85. Phillips MJ, Oda M, Mak E, Fisher MM, Jeejeebhoy KN (1975). Microfilaments dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 69:48-58.
86. Pickett LK, Briggs HC (1969). Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep. *J Pediatr Surg* 4:95-101.
87. Quackenbush EJ, Gougos A, Baumal R, Letarte M (1986). Differential localisation within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukaemia cells. *J Immunol* 136:118-24.
88. Roberts EA, Cox DW (1998). Wilson disease. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 12:237-256.
89. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C *et al.* (2004): Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39:1739-1745.
90. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R (2001). MDR3 gene defect in adults with Symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 120:1459-1467.
91. Scheffer GL, Kool, Heijn M, de Haas M *et al* (2000). Specific Detection of Multidrug Resistance Proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5 and MDR3 P-Glycoprotein with a Panel of Monoclonal Antibodies. *Cancer Research* 60: 5269-5277.
92. Schumann D, Chen CJ, Kaplan B, Shively JE (2001). Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *The Journal of Biological Chemistry* 276:4741-4743.
93. Schweizer P, Petersen M, Drews U (2005). Pathogenesis of extrahepatic bile duct atresia (EHBA): comprehension from a surgical point of view. *European journal of pediatric surgery official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery* 15(4): 248-57.
94. Severn CB (1971). A morphological study of the development of the human liver. I. Development of the human liver. *Am J Anat* 131:133-158.
95. Severn CB (1972). A morphological study of the development of the human liver. II. Establishment of liver parenchyma, extrahepatic ducts and associated venous channels. *Am. J. Anat* 133: 85-108.
96. Shiojiri N (1984). The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse. *J Embryol Exp Morph* 79:25-39.
97. Shiojiri N, Nagai Y (1992). Preferential differentiation of the bile ducts along the portal vein in the development of the mouse liver. *Anat Embryol* 185:17-24.
98. Shiojiri N, Koike T (1997). Differentiation of biliary epithelial cells from mouse hepatic endodermal cells in vitro. *Tohoku J Exp Med* 181:1-8.
99. Shiojiri N, Inujima S, Ishikawa K, Terada K, Mori M. *Cell* (2001). Lineage Analysis during Development Using the *spflash* -Heterozygous Mouse. *Laboratory Investigation* 81:17-25.
100. Shipp MA, Richardson NE, Sayse PH, *et al* (1988). Molecular cloning of the CALLA identifies a type II intermembrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4819-23.
101. Snook JA, Chapman RW, Sachdev GK *et al* (1989). Peripheral blood and portal tract lymphocyte populations in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 9:36-40.
102. Stieger B, Meier Y, Meier PJ (2007). The bile salt export pump. *Pflugers Arch* 453(5):611-620.
103. Stosiek P, Kaspar M, Karsten U (1990). Expression of Cytokeratin 19 during human liver organogenesis. *Liver* 10:59-63.

104. Stowens D (1959). Congenital biliary atresia. *Am J Gastroenterol* 32:577-590.
105. Stowens D (1963). Congenital biliary atresia. *Ann NY Acad Sci* 111(Art 1):337-351.
106. Strazzabosco M, Fabris L, Spirli C(2005). Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterology* 39: 90-120.
107. Sundberg U, Öbrink B (2002). CEACAM1 isoforms with different cytoplasmatic domains Show different localization, Organization and adhesive properties in polarized epithelial cells. *Journal of Cell Science* 115:1273-1284.
108. Svenberg T (1976). Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int J Cancer*,1976 17:588-596.
109. Swain MG, Vergalla J, Jones A (1993). Plasma Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) activity is markedly increased in cholestatic liver disease. *Hepatology* Vol.8,No.3 557:556-558.
110. Szabo L, Kovacs S, Ebrey P (1962). Congenital non-haemolytic jaundice. *Lancet* 1:322.
111. W. Tackmann (1991). In: *Repetitorium der Entwicklungsgeschichte*. Robert Tackmann Verlag, Berlin, S.37.
112. Tan CEL, Driver M, Howard ER, Moscoso GJ (1994). Extrahepatic biliary atresia: a first trimester event? Clues from light microscopy and immunohistochemistry. *J Pediatr Surg* 29:808-814.
113. Tan CEL, Moscoso GJ (1994). The developing human biliary system at the porta hepatis level between 29 days and 8 weeks of gestation: a way to understand biliary atresia. Part 1. *Pathol Int* 44:587-599.
114. Tan CEL, Moscoso GJ (1994). The developing human biliary system at the porta hepatis level between 11 and 25 weeks of gestation: a way to understand biliary atresia. Part 2. *Pathol Int* 44:600-610.
115. Tan CEL, Chan SVW, Yong RYY, Vijayan V, Tan WL, Fook Chong SMC, Ho JMS, Cheng HH (1995). Distortion in TGF alpha 1 peptide immunolocalization in biliary atresia: Comparison with the normal pattern in the developing human intrahepatic bile duct system. *Pathol Int* 45:814-824.
116. Tan CEL, Vijayan V (2001). New clues for the developing human biliary system at the porta hepatis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8:295-302.
117. Tanaka M, Wanless IR (1998). Pathology of the liver in Budd-Chiari syndrome: portal vein thrombosis and the histogenesis of veno-centric cirrhosis, veno-portal cirrhosis, and large regenerative nodules. *Hepatology* 27: 488-496.
118. Terada T, Nakanuma Y (1995). Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 146:67-74.
119. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, et al (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30: 1425-1433.
120. Tsukada N, Ackerley CA, Phillips MJ (1995). The structure and organization of the bile canicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins. *Hepatology* 21:1106-1113.
121. Tzakis AG, Reyes J, Tepetes K et al (1993). Liver transplantation of Alagille's syndrome. *Arch Surg* 128: 337-339.
122. Uematsu F, Takahashi M, Yoshida M, et al (2006). Methylation of neutral endopeptidase 24.11 promoter in rat hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 97: 611-617.
123. Vacanti JP, Shamberger RC, Eraklis A, Lillehei CW (1990). The therapy of biliary atresia combining the Kasai portoenterostomy with liver transplantation: a single center experience. *Journal of Pediatric Surgery* 25(1): 140-145.
124. Valencia-Mayoral P, Weber J, Cutz E et al (1984). Possible defect in the bile secretory apparatus in arteriohepatic dysplasia (Alagille's syndrome): A review with observations on the ultrastructure of the liver. *Hepatology* 4: 691-698.
125. Van Eyken P, Sciort P, Callea F, Van Damme B, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ (1987). Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts and acinar gradient. *Virchows Arch A Anat Histopathol* 412:63-72.
126. Van Eyken P, Sciort R, Callea F, Van der Steen K, Moerman P, Desmet VJ (1988). The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology* 8:1586-1595.
127. Van Eyken P, Sciort R, Desmet VJ (1988). A cytokeratin immunohistochemical study of alcoholic liver disease: evidence that hepatocytes can express 'bile-duct-type' cytokeratins. *Histopathology* 13: 605-617.
128. Vijayan V, Tan CEL (1997). Developing human biliary system in three dimensions. *Anat Rec* 249:389-398.
129. Voigt JJ, Vinel JP, Caveriviere P et al (1989). Immunochemical diagnosis of hepatic localizations in malignant lymphoid hematologic diseases. Study of 80 cases (1989). *Gastroenterol*

Clin Biol 13:343-52.

130. Watanabe N, Tsukada N, Smith CR, Phillips MJ (1991). Motility of bile canaliculi in the living animal: implications of bile flow. *J Cell Biology* 113:1069-1079.
131. Whittington PF, Freese DK, Alonso EM, Swarzenberg SJ, Sharp HL (1994). Clinical and biochemical findings in progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 18:134-141.
132. Wilson JW, Groat CS, Leluc EH (1963). Histogenesis of the Liver. In: Whipple HE(ed) *Fetal and infant liver function and structure*. Ann NY Acad Sci, New York. pp 8-24.
133. Woolf GM, Vierling JM (1993). Disappearing intrahepatic bile ducts: the syndromes and their mechanism. *Sem Liver Dis* 13:261-275.
134. Xuefeng X, Heather F, Shannon G (2006). Bile acid interactions with cholangiocytes. *World Journal of Gastroenterology* 12(22):3553-3563.
135. Zaret KS (2000). Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 92:83-88.

8. ANHANG

8.1. Abkürzungsverzeichnis

μ	micro (10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex
APAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
BSEP	Bile Salt Export pump
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CEACAM	Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule
CK	Zytokeratin
DP	Duktalplatte
E	Eingangsnummer des Präparates im Pathologischen Institut des UKE
EBA	Extraheptische Biliäre Atresie
EHGG	Extrahepatischer Gallengang
ERCP	Endoskopisch Retrograde Cholangio-Pankreatikographie
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Färbung mit Hämatoxilin-Eosin
hHGF	human hepatocyte growth factor
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
IHGG	Intraheptische Gallengänge
l	Liter
M	1 Molar = 1 mol/l
M.	Morbus
MDR	Multidrug-Resistant Protein
Mib-1	Antikörper der Proliferationsfraktion
min	Minuten

MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
PCDC	primär cholangioduktale Cholestase
PFIC	Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase
PHZC	primär hepatozelluläre Cholestase
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
SäF	Fallnummer der Kinderpathologie im Pathologischen Institut des UKE
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TBS- Puffer	Tris-buffered saline
Verg.	Vergrößerung

8.2. p-Wert-Tabellen der 2-seitige Signifikanz nach Fischers exaktem Test

Tabelle 1: Allgemeine morphologische Beobachtungen

	keine Pseudolobuli	Pseudolobuli klein	Pseudolobuli mittel bis groß	Cholestase leichtgradig bis fehlend	Cholestase vermehrt-ausgiebig	Parenchymschwund fehlend-leichtgradig	Parenchymschwund mäßig-schwer	Entzündung fehlend bis leichtgradig	Entzündung mittel-schwer	geschwollene Epithelien	Riesenzellen	Leberzellnekrosen vereinzelt- fehlend	Leberzellnekrosen vermehrt-ausgiebig
keine Pseudolobuli		0,016	0,000	0,423	0,401	0,001	0,001	0,450	0,450	0,009	0,126	0,476	0,476
Pseudolobuli klein	0,016		0,178	0,486	0,714	0,222	0,222	0,490	0,490	0,006	0,028	1,000	1,000
Pseudolobuli mittel bis groß	0,000	0,178		1,000	1,000	0,107	0,107	0,521	0,521	0,491	0,502	0,752	0,752
Cholestase leichtgradig-fehlend	0,423	0,486	1,000		0,000	0,232	0,232	0,075	0,068	0,158	0,486	0,486	0,158
Cholestase vermehrt bis ausgiebig	0,401	0,714	1,000	0,000		0,196	0,195	0,028	0,028	0,047	0,268	0,282	0,282
Parenchymschwund fehlend-leichtgradig	0,001	0,222	0,107	0,232	0,196		0,000	0,050	0,050	0,031	0,034	0,005	0,005
Parenchymschwund mäßig-schwer	0,001	0,222	0,107	0,232	0,195	0,000		0,050	0,050	0,031	0,034	0,005	0,005
Entzündung fehlend bis leichtgradig	0,450	0,490	0,521	0,075	0,028	0,050	0,050		0,000	0,471	0,165	0,197	0,197
Entzündung mittel-schwer	0,450	0,490	0,521	0,068	0,028	0,050	0,050	0,000		0,471	0,165	0,197	0,197
geschwollene Epithelien	0,009	0,006	0,491	0,158	0,047	0,031	0,031	0,471	0,471		0,060	0,282	0,282
Riesenzellen	0,126	0,028	0,502	0,486	0,268	0,034	0,034	0,165	0,165	0,060		0,502	0,502
Leberzellnekrosen vereinzelt bis fehlend	0,476	1,000	0,752	0,486	0,282	0,005	0,005	0,197	0,197	0,282	0,502		0,000
Leberzellnekrosen vermehrt - ausgiebig	0,476	1,000	0,752	0,158	0,282	0,005	0,005	0,197	0,197	0,282	0,502	0,000	

Tabelle 2: Die Gallengänge: Cholestase und Ausprägung von Mib-1 und CD 10

	Mib-1 kleine Gallengänge <1/4 der Epithelien	Mib-1 kleine Gallengänge >1/4 der Epithelien	Mib-1 Gallengangsproliferate <1/4 der Epithelien	Mib-1 Gallengangsproliferate >1/4 der Epithelien	CD 10 in Gallengängen unauffällig	CD 10 in Gallengängen negativ bis vermindert	Cholestase in den kleinen Gallengängen	Cholestase in den großen Gallengängen
Mib-1 kleine Gallengänge <1/4 der Epithelien		0,000	0,002	0,002	1,000	1,000	0,476	0,411
Mib-1 kleine Gallengänge >1/4 der Epithelien	0,000		0,002	0,002	1,000	1,000	0,148	0,411
Mib-1 Gallengangsproliferate <1/4 der Epithelien	0,002	0,002		0,000	0,735	0,735	0,324	0,706
Mib-1 Gallengangsproliferate >1/4 der Epithelien	0,002	0,002	0,000		0,735	0,735	0,324	0,706
CD 10 in Gallengängen unauffällig	1,000	1,000	0,735	0,735		0,000	0,181	0,014
CD 10 in Gallengängen negativ bis vermindert	1,000	1,000	0,735	0,735	0,000		0,181	0,014
Cholestase in den kleinen Gallengängen	0,476	0,148	0,324	0,324	0,181	0,181		0,005
Cholestase in den großen Gallengängen	0,411	0,411	0,706	0,706	0,014	0,014	0,005	

Tabelle 3: Die Leberläppchen: Lokalisation von Cholestase, CEACAM1, Mib-1, und CK7

	CEACAM1 Betonung läppchenperipher	CEACAM1 disseminiert im Leberläppchen	Cholestase Betonung läppchenperipher	Cholestase diffus im Leberläppchen	Mib-1 Betonung läppchenperipher	Mib-1 disseminiert im Leberläppchen	CK7 Betonung läppchenperipher	CK7 disseminiert im Leberläppchen
CEACAM1 Betonung läppchenperipher		0,000	0,245	1,000	1,000	0,630	1,000	0,627
CEACAM1 disseminiert im Leberläppchen	0,000		0,245	1,000	1,000	0,630	1,000	0,627
Cholestase Betonung läppchenperipher	0,245	0,245		0,009	0,003	0,009	0,009	0,033
Cholestase diffus im Leberläppchen	1,000	1,000	0,009		0,119	0,050	0,050	0,006
Mib-1 Betonung läppchenperipher	1,000	1,000	0,003	0,119		0,000	0,004	0,101
Mib-1 disseminiert im Leberläppchen	0,630	0,630	0,009	0,050	0,000		0,050	0,042
CK7 Betonung läppchenperipher	1,000	1,000	0,009	0,050	0,004	0,050		0,000
CK7 disseminiert im Leberläppchen	0,627	0,627	0,033	0,006	0,101	0,042	0,000	

Tabelle 4: Die Cholestase und die Proliferation bzw. Reduktion der Gallengänge

	neoduktuläre Proliferate: keine bis vereinzelt	neoduktuläre Proliferate : vermehrt- stark ausgeprägt	Reduktion mittlerer Gallengänge	Reduktion großer Gallengänge	Cholestase leichtgradig bis fehlend	Cholestase vermehrt bis ausgiebig	Cholestase in den kleinen Gallegängen	Cholestase in den großen Gallegängen	CK7-positive tubuläre Strukturen in den Pseudolobuli
neoduktuläre Proliferate: keine bis vereinzelt		0,000	0,745	0,745	0,164	0,074	0,000	0,001	0,193
neoduktuläre Proliferate: vermehrt bis stark ausgeprägt	0,000		0,745	0,745	0,164	0,074	0,000	0,001	0,193
Reduktion mittlerer Gallengänge	0,745	0,745		0,000	0,486	0,721	1,000	1,000	0,745
Reduktion großer Gallengänge	0,745	0,745	0,000		0,486	0,721	1,000	1,000	0,745
Cholestase leichtgradig bis fehlend	0,164	0,164	0,486	0,486		0,000	0,034	0,036	0,164
Cholestase vermehrt bis ausgiebig	0,074	0,074	0,721	0,721	0,000		0,010	0,038	0,074
Cholestase in den kleinen Gallegängen	0,000	0,000	1,000	1,000	0,034	0,010		0,005	0,532
Cholestase in den großen Gallegängen	0,001	0,001	1,000	1,000	0,036	0,038	0,005		0,454
CK7-positive tubuläre Strukturen in den Pseudolobuli	0,193	0,193	0,745	0,745	0,164	0,074	0,532	0,454	

Tabelle 5: Die Lokalisation der Cholestase und die
Gallengangsproliferation

	neoduktuläre Proliferate: keine bis vereinzelt	neoduktuläre Proliferate : vermehrt- stark ausgeprägt	Cholestase in den Gallekanälchen	Cholestase in den Hepatozyten	CK7-positive tubuläre Strukturen in den Pseudolobuli
neoduktuläre Proliferate: keine bis vereinzelt		0,000	0,011	0,058	0,193
neoduktuläre Proliferate: vermehrt bis stark ausgeprägt	0,000		0,011	0,058	0,193
Cholestase in den Gallekanälchen	0,011	0,011		0,000	0,074
Cholestase in den Hepatozyten	0,058	0,058	0,000		0,058
CK7-positive tubuläre Strukturen in den Pseudolobuli	0,193	0,193	0,074	0,058	

8.3. Die untersuchten Parameter

SPSS-Kürzel	Bezeichnung	Gruppendetails
znK	Zustand nach Kasai-Operation	
PsLkompl	Pseudolobuli komplett	klein mittel bis groß
PsLinkpl	Pseudolobuli inkomplett	
ppSept	portoportale Septen	
ilFibr	intralobuläre Fibrose	
p-lFibr	perilobuläre Fibrose	
PsLnon	keine Ausbildung von Pseudolobuli	
PsLGr1	Pseudolobuli Größe 1	
PsLGr23	Pseudolobuli Größe 2-3	
Inflr	Entzündung rundzellig	keine bis leichte Entzündung mittel bis schwere Entzündung
Infle	Entzündung eitrig	
Infl01	Entzündung Stärke 0-1	
Infl23	Entzündung Stärke 2-3	
VPro101	venöse Proliferation Stärke 0-1	keine bis vereinzelt vermehrt bis stark ausgeprägt
VPro123	venöse Proliferation Stärke 2-3	
ZVFibr	Fibrose der Zentralvenen	
ZVInfl	Entzündung der Zentralvenen	
CAng01	Cholangitis Stärke 0-1	keine bis leichte Cholangitis mittelmäßig bis starke Cholangitis
CAng23	Cholangitis Stärke 2-3	
CAngpdFb	Cholangitis mit periduktulärer Fibrose	
ParSd01	Parenchymschwund Ausmaß 0-1	fehlender bis leichter mäßig bis schwerer unter 25% über 25%
ParSd23	Parenchymschwund Ausmaß 2-3	
ParFt01	Parenchymverfettung Ausmaß 0-1	
ParFt23	Parenchymverfettung Ausmaß 2-3	
gesEP	geschwollene Epithelien	
RZ0	Riesenzellen nicht vorhanden	
RZ13	Riesenzellen vorhanden	
LZNek01	Leberzellnekrosen Ausmaß 0-1	keine bis vereinzelt vermehrt bis ausgiebig
LZNek23	Leberzellnekrosen Ausmaß 2-3	
LZNeke	Einzellzellnekrosen	
LZNekg	Gruppenzellnekrosen	
ChS01	Cholestase Ausmaß 0-1	keine bis leichte vermehrte bis schwere
ChS23	Cholestase Ausmaß 2-3	
ChSGk	Cholestase in Gallekanälchen	
ChSHpz	Cholestase in Hepatozyten	
ChSzl	Cholestase zentrolobulär	
ChSdl	Cholestase diffuslobulär	
ChSlp	Cholestase läppchenperipher	
ChSkGG	Cholestase in kleinen Gallekanälchen	
ChSgGG	Cholestase in großen Gallekanälchen	
neoPr01	neoduktuläre Proliferate Ausmaß 0-1	keine bis vereinzelt vermehrt bis stark vermehrt
neoPr23	neoduktuläre Proliferate Ausmaß 2-3	
RedmGG	Reduktion mittlerer Gallegänge	
RedgGG	Reduktion großer Gallegänge	
HilusGG	Hilusgallegang vorhanden	
HilCholang	Hilusgallegang mit Cholangitis	
HilEpDef	Hilusgallegang mit Epitheldefekt	
HilGalle	Hilusgallegang mit Galle	
HilVenPr	Hilus mit venösen Proliferaten	

MiH12	Mib-1 in Hepatozyten Gruppen 1-2	weniger als 5%
MiH23	Mib-1 in Hepatozyten Gruppen 2-3	mehr als 5%
MiHper	Mib-1 Betonung im Leberläppchen peripher	
MiHdisse	Mib-1 disseminiert im Leberläppchen	
MkGG01	Mib-1 kleiner Gallengänge Gruppen 0-1	0 - 1/4 der Epithelien
MkGG23	Mib-1 kleiner Gallengänge Gruppen 2-3	1/4 und mehr der Epithelien
MmgrGG01	Mib-1 mittlerer/großer Gallengänge Gruppen 0-1	0 - 1/4 der Epithelien
MmgrGG23	Mib-1 mittlerer/großer Gallengänge Gruppen 2-3	1/4 und mehr der Epithelien
MGPr01	Mib-1 Gallengangsproliferate Grupeen 0-1	0 - 1/4 der Epithelien
MGPr23	Mib-1 Gallengangsproliferate Grupeen 2-3	1/4 und mehr der Epithelien
CDGk1	CD10 in Gallekanälchen Gruppe 1	weniger als 25%
CDGk2345	CD10 in Gallekanälchen Gruppe 2-5	mehr als 25 %
CDGG01	CD10 in Gallengängen Gruppen 0-1	negativ bis vermindert
CDGG2	CD10 in Gallengängen Gruppe 2	unauffällig
CKH12	CK7 in Hepatozyten Gruppen 1-2	weniger als 10% positiv
CKH34	CK7 in Hepatozyten Gruppen 3-4	mehr als 10% positiv
CKHperi	CK7 in Hepatozyten Betonung läppchenperipher	
CKHdis	CK7 in Hepatozyten disseminiert im Leberläppchen	
CKinPsL	CK7-positive tubuläre Strukturen in Pseudolobuli	
ovalcells	ocal cells'-verdächtige Zellen	
CCam12	CEACAM in Leberläppchen Gruppen 1-2	bis 25%
CCam34	CEACAM in Leberläppchen Gruppen 3-4	über 25%
Ccamperi	CEACAM Betonung peripher	
Ccamdisse	CEACAM disseminiert im Leberläppchen	

8.4. Patiententabellen

Primär hepatozelluläre Cholestasen		
E-Nummer	SäF-Nummer	Erkrankung
13714/03	13566	PFIC 2
10162/02	12898	PFIC 2
08633/02	12849	PFIC 2
06930/02	12783	PFIC ?
11857/03	13526	PFIC 3
11544/92	5283	PFIC ?
20338/01	12520	PFIC 3

Primär cholangioduktale Cholestasen		
E-Nummer	SäF-Nummer	Erkrankung
10968/01	12267	Gallengangsatresie
16135/01	12419	Gallengangsatresie
11846/01	12279	Gallengangsatresie
11068/01	12270	Gallengangsatresie
07899/01	12252	Gallengangsatresie
16050/01	12410	Gallengangsatresie
26049/00	12243	Gallengangsatresie
10417/01	12256	Gallengangsatresie
25922/01	12642	Gallengangsatresie
15215/01	12363	Gallengangsatresie
19775/01	12550	Gallengangsatresie
13658/01	12324	Gallengangsatresie
16074/01	12399	Gallengangsatresie
16049/01	12409	Gallengangsatresie

Morbus Wilson		
E-Nummer	SäF-Nummer	Erkrankung
25927/01	12643	M.Wilson
26069/96	8834	M.Wilson
03128/02	12722	M.Wilson
11111/97	9225	M.Wilson

Sonstige Lebererkrankungen		
E-Nummer	SäF-Nummer	Erkrankung
12006/01	12309	Alagille-Syndrom
25926/01	12630	Crigler-Najjar-Syndrom
25924/01	12627	Kurzdarmsyndrom
15578/01	12371	Äthyltoxische Leberzirrhose
10967/01	12284	Chronisch Sklerosierende Cholangitis
25921/01	12629	Budd-Chiari-Syndrom
05974/01	12150	Tyrosinämie
11458/01	12277	Leberdystrophie
21036/01	12556	arterielle Thrombosen
12717/01	12310	Leberzirrhose unklarer Genese
16487/01	12421	unklare Hepathopathie
24296/01	12602	Leberdystrophie
21501/96	8656	Oxalose

8.5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Hansjörg Schäfer für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung bei der Erstellung der Arbeit. Weiterhin gilt mein Dank Frau Sandra Schmidt für ihre große Unterstützung und Anleitung in der laborchemischen Arbeit. Für die Einführung und Unterstützung in den statistischen Auswertungsverfahren danke ich Michael Bubenheim vom Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie. Den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danke ich für ihre vielfältige Hilfsbereitschaft.

8.6. Lebenslauf

Name: Wohlleben

Vorname: Jörg

Geburtsdatum: 17.09.1977

Geburtsort: Quedlinburg

Beruflicher Werdegang:

seit Aug.2007

Assistenzarzt in der Neurologischen Abteilung der
Asklepios-Klinik Hamburg-Harburg

Feb. 2007- Juli 2007

Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik der
Universität Erlangen

Studium:

Nov. 2006

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Erteilung der
Ärztlichen Approbation

Sep. 2003 - Juli 2004

Studium der Humanmedizin an der Universität
Victor Segalen in Bordeaux, Frankreich

Aug. 1999 – Nov. 2006

Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

Schulbildung:

Jun.1998

Allgemeine Hochschulreife, Pinneberg

Forschungserfahrung:

Sep. 2001 – Nov. 2006

Dissertation im Institut für Pathologie am
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Direktor
Professor Dr. med. Guido Sauter.

8.7. Erklärung

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

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