

Aus der Abteilung für Allgemeinchirurgie des
Universitätskrankenhauses Eppendorf
der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. C.E. Broelsch

Immunhistologische Untersuchungen zur p53-Expression in primären und sekundären malignen Lebertumoren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Universität Hamburg

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Justus Gille
aus Hannover

Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 15. Februar 2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. Dr. Ch. Broelsch

Koreferent: Prof. Dr. J. Izbicki

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
1. Einleitung	
1.1. Kanzerogenese	
1.1.1. Grundlagen der Kanzerogenese	7
1.1.2. Das p53-Tumor-Suppressor-Gen	9
1.1.3. Die Rolle des p53-Tumor-Suppressor-Gens	13
1.2. Primäre Leberkarzinome	
1.2.1. Inzidenz	17
1.2.2. Geschlecht	17
1.2.3. Alter	18
1.2.4. Rasse	18
1.2.5. Ätiologie	19
1.2.6. Pathologie	
1.2.6.1. Hepatozelluläres Karzinom	21
1.2.6.2. Cholangiozelluläres Karzinom	22
1.2.6.3. Mischtumoren	22
1.3. Lebermetastasen	
1.3.1. Inzidenz	22
1.3.2. Metastasierungswege	22
1.3.3. Alter	23
1.3.4. Primärtumoren	23
1.3.5. Geschlecht	23
1.3.6. Lebermetastasen bei Zirrhose	23
1.3.7. Pathologie	24
1.4. p53 und maligne Lebertumoren	24

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Probenmaterial	27
2.2. Methoden	
2.2.1. Histologische Präparate	28
2.2.2. Reagenzien	28
2.2.3. Grundlagen der immunhistochemischen Färbemethode	
2.2.3.1. Antigene und Antikörper	30
2.2.3.2. Monoklonale Antikörper	31
2.2.3.3. Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode	31
2.2.3.4. Mikrowellen-unterstützter Antigennachweis	32
2.2.4. Technik der Färbung	33
2.3. Auswertung	37

3. Ergebnisse

3.1. Daten der Untersuchungsgruppe	
3.1.1. Patienten mit hepatozellulärem Karzinom	38
3.1.2. Patienten mit cholangiozellulärem Karzinom	41
3.1.3. Patienten mit Lebermetastasen	44
3.2. Immunhistochemische Untersuchung	
3.2.1. Färbung mit dem p53-Antikörper 1801	46
3.2.2. Färbung mit dem p53-Antikörper DO-1	48
3.2.3. Vergleich der p53-Expression mit dem p53-1801- und p53-DO-1 - Antikörper	50
3.2.4. Beziehung der p53-Expression zu den Tumortypen und den Patientendaten	51

4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung	62
6. Anlage	64
7. Literaturverzeichnis	66
8. Danksagung	75
9. Curriculum vitae	76
10. Erklärung	77

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	aqua destillata
bp	Basenpaare
CAC	engl.: cholangiocellular carcinoma dtsch.: Cholangiozelluläres Karzinom syn.: Intrahepatisches Gallengangskarzinom
cdk	engl.: cyclin dependent protein kinase
DNA / DNS	engl.: desoxyribonucleidacid dtsch.: Desoxyribonukleinsäure
HCC	engl.: hepatocellular carcinoma dtsch.: Hepatozelluläres Karzinom syn.: Leberzellkarzinom
kD	kilo Dalton
LM	engl.: liver metastasis dtsch.: Lebermetastasen syn.: Sekundäre Lebertumoren
PBS	engl.: phosphat buffered saline
PLC	engl.: primary liver cancer dtsch.: Primäres Leberzellkarzinom
RNA	engl.: ribonucleidacid dtsch.: Ribonukleinsäure
SV40	engl.: siminian virus 40

1. Einleitung

1.1. KANZEROGENESE

1.1.1. Grundlagen der Kanzerogenese

Das Gleichgewicht bei physiologischen Vorgängen der Zelle wird durch viele verschiedene Faktoren aufrechterhalten. Kommt es zu einer Störung dieses Gleichgewichtes, basiert dies auf einem in mehreren Schritten verlaufenden Prozeß, wie dies bei der malignen Entartung von Zellen der Fall ist („Mehrstufenentstehung des Krebses“).

Der erste Schritt in Richtung Malignität (Initiation) besteht in Mutationen an Protoonkogenen und / oder Antionkogenen mit Bildung von Onkogenen und / oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z. B. p53). Neben Zellkommunikationsstörungen, Differenzierungsstörungen und immunologischen Störungen kommt es zur Proliferationsenthemmung der Zelle.

Krebs als eine genetische Erkrankung beruht letztlich auf einer Dysregulation der ansonsten exakt gesteuerten Entwicklung und Vermehrung von Zellen. Die prinzipiellen Reduplikations- und Synthesevorgänge wiederholen sich während jedes Zellzyklus, sei die proliferierende Zelle normal oder maligne entartet. Diese Vorgänge sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Während eines solchen Generationszyklus werden zwei Phasen durchlaufen (Abb.1):

Der Interphase, in der sich die Verdopplung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) als Träger der Erbinformation vollzieht, steht die Phase der eigentlichen Zellteilung, der Mitose (M), gegenüber.

Die Replikationsphase wird als S- (Synthese-) Phase bezeichnet. Die ihr vor- und nachgeschalteten G₁- und G₂- Phasen dienen der Synthese von Proteinen, RNA (Ribonukleinsäure) und Enzymen.

Nicht alle Zellen proliferieren ständig, ein wechselnd großer Teil befindet sich in der Ruhephase (G₀). Diese Zellen können jederzeit wieder in den Zellzyklus eingeschleust werden (recruitment) oder aber absterben (Apoptose).

Der Ablauf des Zellzyklus, und damit der Übergang der einzelnen Zellzyklusphasen ineinander, wird durch Komplexe aus Cyclinen, cyclin-abhängigen Kinasen (cdk) und / oder sogenannten Zellteilungs-Kontroll-Proteinen (cdc = cell-division-control) in Bewegung gehalten (positive Kontrolle). Diese cyclin-gesteuerten Signale des Zellzyklus werden von einer Reihe von Kontrollmechanismen überwacht und geregelt, die auf externe Reize wie zum Beispiel DNA-Schäden reagierend die Progression stoppen (negative Kontrolle). Zu diesen Mechanismen zählt man das p53-Tumorsuppressor-Gen und sein Proteinprodukt p53.

Tumorsuppressorgene stellen eine Gruppe rezessiver Gene dar, die unter physiologischen Bedingungen das Zellwachstum unterbrechen können. In über 50 Genloci konnten beim Menschen Allelverluste nachgewiesen werden, die Sitz eines Suppressorgens sind. Von diesen konnte das Retinoblastomgen (RB-Gen), das Wilms-Tumor-Gen (WT1-Gen und WT2-Gen), das Neurofibromatose Typ-1-Gen (NF1-Gen), das Familiäre Adenomatöse Polyposegen (FAP-Gen) und das p53-Gen isoliert und identifiziert werden.

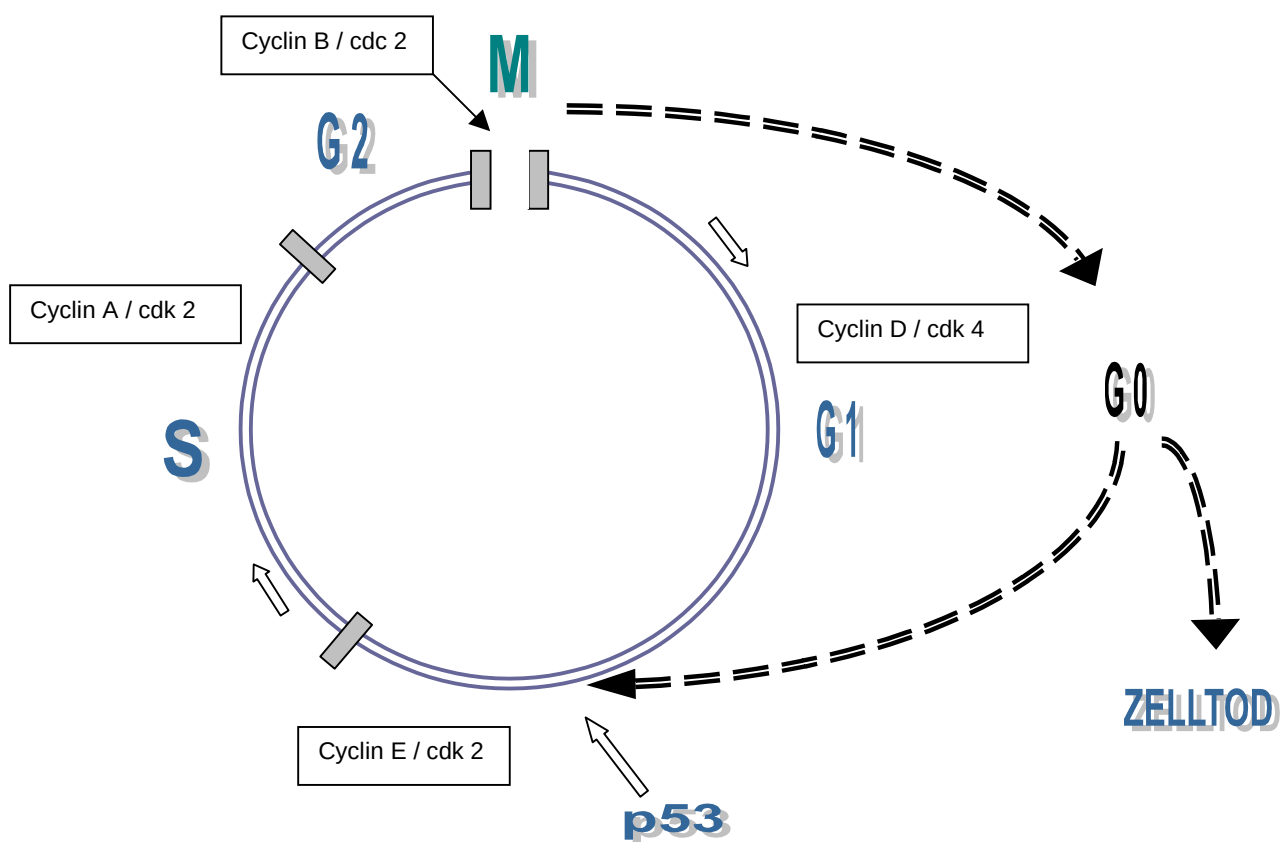


Abb. 1: Abfolge und Regulation des Zellzyklus

Zeichenerklärung: cdk = Cyclin-abhängige Kinase
cdc = Zellteilungs-Kontroll-Protein
● = Interphase
◆ = Mitose

1.1.2. Das p53-Tumorsuppressorgen

Das p53-Tumorsuppressorgen wurde im Jahre 1979 im Rahmen der Erforschung des tumorinduzierenden SV40 (simian virus 40) entdeckt (LINZER et LEVINE 1979). Es stellte sich als ein zelluläres 53-kD (kilo Dalton) Phosphoprotein dar, welches an das T-Antigen des SV40-Virus gebunden vorlag (LANE 1979). Das p53-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 in der Position 17p13.1. lokalisiert und besteht aus 11 Exons, die ein Proteinprodukt aus 393 Aminosäuren codieren (Abb.2).

Der TP53-Locus besteht aus 12500 Basenpaaren (bp), wobei im Mausmodell das 536 bp große, kodierende Exon 1 und das 83 bp große Exon 2 durch ein 6100 bp großes Intron 1 getrennt sind (CORDON-CARDO 1995). Die folgenden Exons 3 bis 11 unterscheiden sich in der Größe der Abschnitte. Exon 3 besteht aus 22 bp, Exon 4 aus 261 bp, Exon 5 aus 184 bp, Exon 6 aus 113 bp, Exon 7 aus 110 bp, Exon 8 aus 137 bp, Exon 9 aus 74 bp, Exon 10 aus 107 und Exon 11 aus 522 bp. Die einzelnen kodierenden Abschnitte (= Exons) sind jeweils durch Introns (= nicht-kodierende Abschnitte) voneinander getrennt.

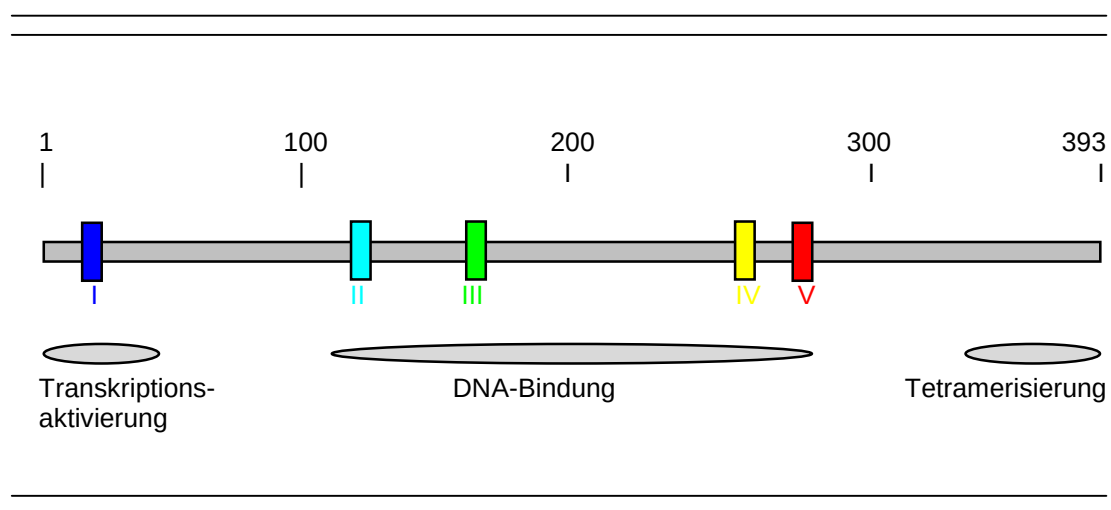


Abb. 2: Primärstruktur des p53-Genabschnittes

Das p53 - Protein ist in drei Abschnitte untergliedert, die sich in Struktur und Funktion voneinander unterscheiden. Bei Untersuchungen an verschiedenen Spezies zeigten sich diese Domänen im Verlauf der Evolution als unverändert („konserviert“) (SOUSSI 1994). Die am N-terminalen Ende des Genabschnitts gelegene Domäne zwischen den Aminosäuren 1 und 42 wurde als Aktivator der Transkription identifiziert (FIELDS et JANG 1990). Zwischen den Aminosäuren 120 und 290 befindet sich der DNA-bindende Anteil des p53-Proteins, der durch Auffaltungen eine dreidimensionale Struktur bildet (CHO 1994). Die dritte Domäne des

p53-Proteins liegt zwischen den Aminosäuren 310 und 393, die für die Tetramerisierung der Proteinstruktur sorgt, um so eine optimale Funktion des Proteins als Transkriptionsfaktor zu gewährleisten. Die Form des Tetramers erlaubt es dem p53-Protein, an vier gleichartige DNA-Sequenzen im regulatorischen Abschnitt von p53-regulierten Genen zu binden (STENGER 1992). Obwohl auch monomeres p53 an DNA bindet, als Transkriptionsfaktor wirken und Zellwachstum hemmen kann (SINGERLAND 1993), funktioniert und bindet wild-type-p53 wesentlich effektiver in der Form als Tetramer (ARROWSMITH 1996). Der Tetramerisierungsbereich beherbergt an Position 312 eine cdk-Phosphorylase, die mit den cdk interagiert.

Somit kann p53 die Expression multipler Proteine aktivieren, die ihrerseits in den Zellzyklus eingreifen können (FINLAY 1989; FIELDS et JANG 1990; VOGELSTEIN 1992; SELIVANOVA 1995).

Dies kann einerseits zu einem reversiblen Zellzyklusarrest führen, damit Reparaturmechanismen den DNA-Defekt ausbessern können. Andererseits kann das Apoptose-Programm aktiviert werden, was in einem irreversiblen Zelluntergang endet (YONISH 1991). Diese Vorgänge sollen zunächst in der folgenden Abbildung 3 dargestellt und anschließend erläutert werden.

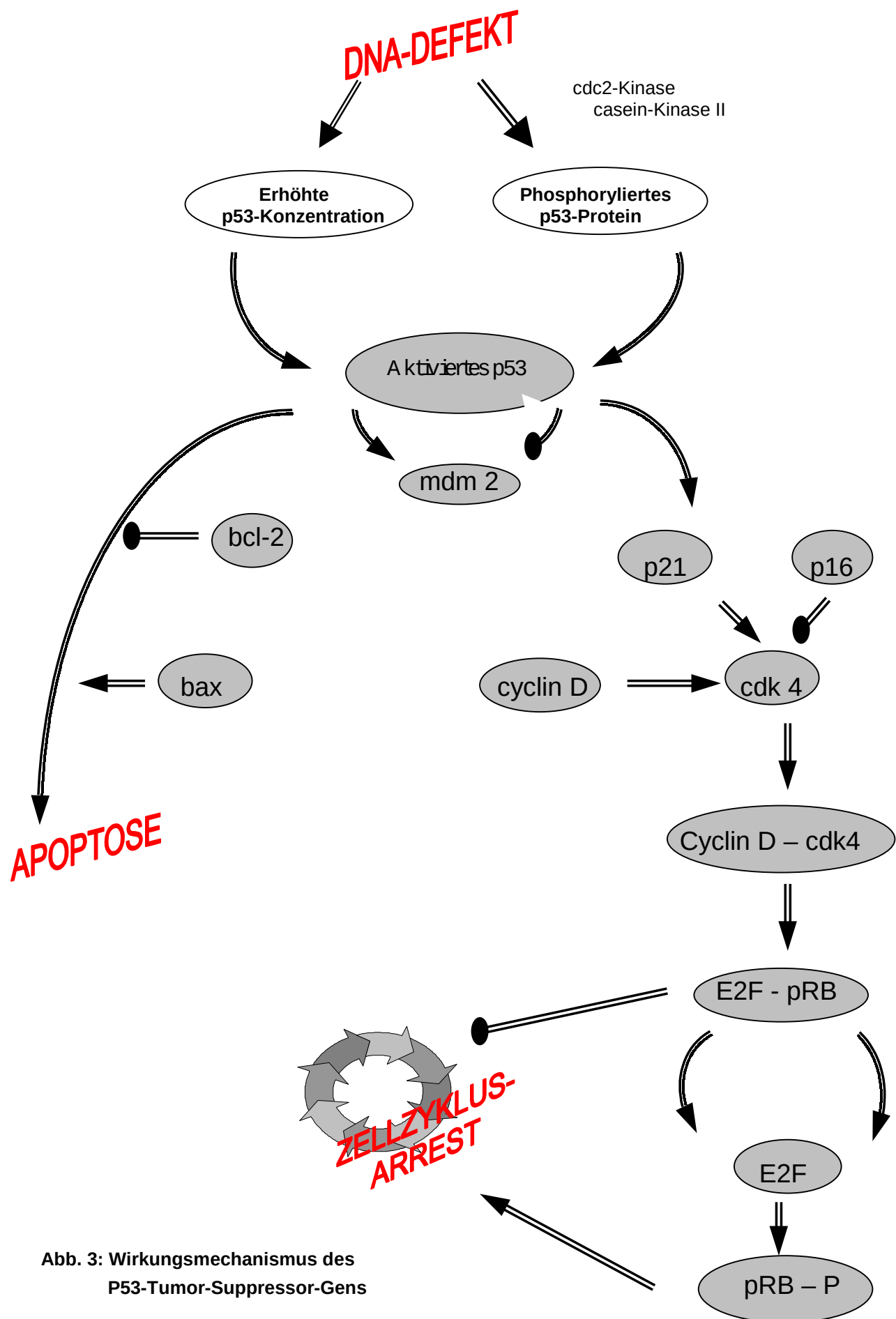


Abb. 3: Wirkungsmechanismus des
P53-Tumor-Suppressor-Gens

Signale, so zum Beispiel die Schädigungen der DNA, führen zu einer Aktivierung von p53 (NELSON 1994).

Dies geschieht einerseits über eine erhöhte Konzentration von p53 in der Zelle, indem die Halbwertszeit des aktivierten p53-Proteins verlängert ist (LANE 1992). Andererseits wird das Protein phosphoryliert und somit aktiviert. Diese Phosphorylierung spielt sich in der S-Phase des Zellzyklus ab (BISCHOFF 1990) und wird sowohl durch die cdc2 kinase (BISCHOFF 1990) als auch durch die casein kinase II (MEEK 1988) vollzogen.

Die Regulation des p53 auf Proteinebene vollzieht sich unter anderem über einen Rückkopplungsmechanismus mit dem mdm2 (= mouse double minute 2)-Protein. Das mdm2-Phosphoprotein ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 auf dem Locus 12q13-q14 lokalisiert und hat, bestehend aus bis zu 491 Aminosäuren, ein Molekulargewicht von 90000 Dalton (LANE 1992; BARAK 1994). Einerseits wird mdm2 durch p53 induziert (GRAND 1995), andererseits wird das p53-Protein in seiner Funktion abgeblockt, indem das mdm2-Protein an dieses bindet (HAINES 1997; THUT 1997).

Am Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase befindet sich der sogenannte Kontrollpunkt des p53-Tumorsuppressorgens, an dem das aktivierte p53-Protein auf zweierlei Weise wirken kann (KASTAN 1991):

Zum einen induziert das aktivierte p53 als Transkriptionsfaktor die Expression von Bax, das die hemmende Wirkung auf die Apoptose insbesondere des Bcl-2 (B cell lymphoma-2) Proteins antagonisiert. Das Resultat ist ein „Selbstmord“ dieser Zelle (Apoptose).

Untersuchungen an der p53-defizienten myeloischen Leukämiezelllinie M1 zeigen, daß eine Überexpression des p53-Proteins zu einer Induktion der Apoptose führt (YONISH 1991).

Zum anderen kommt es zu einer gesteigerten Expression von p21 (=wild- type-p53-activated-fragment-1 (waf1)), das ein Protein mit einer Molekülmasse von 21000 Dalton aus 164 Aminosäuren darstellt und auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 auf dem Locus 6p21.1 oder 6p21.2 lokalisiert ist (EL-DEIRY 1993; CORDON-CARDO 1995).

Dieses Protein inaktiviert die cdk4, indem es an dieses Enzym bindet (EL-DEIRY 1993; XIONG 1993). Dies hat den Funktionsverlust des cdk-4-Enzyms zur Folge, so daß die Phosphorylierung des Tumor-Suppressor-Proteins p110_{Rb1} unterbleibt (BEACH 1991).

P110_{Rb1} stellt das Proteinprodukt des Retinoblastom-Gens dar, das die Bezeichnung RB1 trägt. Es ist ein Protein, dessen Genabschnitt auf dem lange Arm des Chromosoms 13 auf der chromosomalen Bande 13q 14.2 lokalisiert ist. Je nach Ausmaß der Phosphorylierung hat dieses Protein ein Molekulargewicht von 110 KD bis 116 KD.

Das Protein p16 wirkt mit dem Protein p110_{Rb1} synergistisch und fungiert ebenfalls als Inaktivator von cdk-4.

Das Fortschreiten im Zellzyklus wird von p110_{Rb1} kontrolliert, das aufgrund der ausbleibenden Phosphorylierung aber in inaktiver Form vorliegt. Hypophosphoryliertes p110_{Rb1} bewirkt über eine Komplexbildung mit dem Transkriptionsfaktor E2F eine Expressionshemmung von Proteinen, die zu einem Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase führen würden.

Der Ablauf dieser Kaskade führt letztendlich zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase, so daß dann Zeit für die Reparatur des Schadens im Genom gegeben ist.

Somit scheint wild-type p53 als Wächter über die genomische Integrität der Mutabilität des Erbguts Grenzen zu setzen („guardian of the genome“ LANE 1979) und die klonale Ausbreitung einer genetisch veränderten Zelle zu verhindern (LANE 1992; SCHINDLER 1996).

Auch auf einer anderen Ebene, die in der Abbildung 40 nicht berücksichtigt ist, wirkt p53 als Tumor-Suppressor, denn es hemmt die Angiogenese, indem es die für das Tumorstadium notwendige Neovaskularisation kontrolliert. Dies geschieht, indem p53 die Expression von VEGF (= vascular endothelial growth factor), einem Angiogeneseinduktor hemmt und von TSP-1(= thrombospondin - 1), einem Inhibitor der Neovaskularisation fördert (DAMERON 1994). Hierdurch kann p53 ungehemmtem Tumorstadium und -ausbreitung Einhalt gebieten (ALMOG 1997).

1.1.3. Die Rolle des p53-Tumorsuppressorgens in der Kanzerogenese

Die ersten Beobachtungen, daß von Onkogenen codierte Proteine an das p53-Protein binden und dieses inaktivieren, ließ schon sehr früh den Verdacht auf einen Zusammenhang zwischen Fehlfunktionen des p53-Proteins und der Entstehung maligner Erkrankungen vermuten (LEVINE 1992).

Der Dysfunktion des p53-Proteins können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen: So wird berichtet, daß das SV40 T-Antigen, welches eine tumorinduzierende Wirkung hat, an den Abschnitt zwischen den Aminosäuren 120 bis 290 des p53-Proteins bindet und damit seine Wirkung als Transkriptionsfaktor abblockt.

Auch andere von DNA-Tumorstadium codierte Proteine gehen diese Bindung mit dem p53-Protein ein: E1B der Adenoviren (SARNOW 1986) und E6 von HPV (= humanes Papilloma Virus) - 16 und - 18, die bei 90 % der humanen Zervixkarzinome nachzuweisen sind (BECK 1995).

Als weitere Ursache wird diskutiert, daß das normale Gen für ein Protein mit anderen Eigenschaften codiert, als sie das Produkt des mutierten Gens zeigen (MARSHALL 1991).

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß Mäuse mit defektem p53-Tumorsuppressor in einem Zeitraum zwischen 3 - 6 Monaten Malignome entwickeln (DONEHOWER 1992).

Werden diesen syngenesis Mäusen wild-type p53 produzierende Zellen injiziert, so treten Tumoren seltener und in geringerer Größe auf. Erfolgt die Injektion mit Zellklonen, die mutiertes p53-Protein exprimieren, so werden Malignome induziert (ALMOG 1997).

Eine „nonsense“-Mutation, die das Fehlen eines Bausteins im Proteinprodukt verursacht, oder eine Mutation im Bereich der Oligomerisationszone des p53-Gens führen zu einem Genprodukt, das seine Fähigkeit zur Bildung eines Tetramers verloren hat. Eine „nonsense“-Mutation in einem Allel ist häufig mit einer Deletion des anderen Allels vergesellschaftet, so daß ein Funktionsverlust resultiert (LEVINE 1991; BERNIS 1994). Bei einer „missense“-Mutation, bei der es zum Einbau funktionsunfähiger Bausteine in das Protein kommt, ist für einen Funktionsverlust des wild-type p53-Proteins nicht die Deletion des nicht-mutierten Allels notwendig. Man schreibt dem mutierten Allel des p53-Gens eine dominant-negative Wirkungsweise zu, die sich durch ein Abblocken der Funktion des wild-type-Allels zeigt (HERSKOWITZ 1987; GREEN 1989). So wurde in malignen Tumorzellen eine Koexpression sowohl eines mutierten als auch eines wild-type-Allels beobachtet (NIGRO 1989).

Das Li-Fraumeni Syndrom (LFS) ist eine Erkrankung, in deren Verlauf sich bereits in jungen Jahren multiple maligne Tumoren entwickeln. Es konnte gezeigt werden, daß in den Familien dieser Patienten* eine konstitutionelle Mutation des p53-Gens vererbt wird (MALKIN 1990). In einer Studie konnte in 71% der untersuchten Familien, deren Mitglieder an einem LFS erkrankten, eine Mutation des p53-Gens nachgewiesen werden, die sich in der Mehrzahl als "missense"-Mutationen darstellten (VARLEY 1997).

Am weitaus häufigsten liegen Mutationen des p53-Proteins im Bereich der DNA-Bindungsstelle zwischen den Aminosäuren 102 und 292 (NIGRO 1989; WANG 1994; LEVINE 1995; ARROWSMITH 1996). Diese im Laufe der Evolution konservierten Genabschnitte werden als hotspots bezeichnet (NIGRO 1989; LEVINE 1995). Durch Mutationen in dieser Domäne wird die Affinität zwischen p53 und DNA vermindert (ARROWSMITH 1996). Als Ursache wird eine inkomplett aufgefaltete Proteinstruktur des mutierten Genprodukts vermutet (CHO 1994).

In verschiedenen Tumorgeweben finden sich Mutationen, die in fast allen Geweben mit etwa der gleichen Häufigkeit auftreten (175, 248, 273, 282) (Abb. 4).

Im Gegensatz hierzu sind Mutationen beschrieben, die in einzelnen Gewebearten besonders häufig vorkommen. So finden sich bei Gen-Analysen an Leberkarzinomen im südostasiatischen und zentralafrikanischen Raum Mutationen im Codon 249, bei denen die Aminosäure Guanin durch Thymin ersetzt ist, in einer besonderen Häufigkeit (Abb.5). Bei Patienten mit erhöhter nutritiver Exposition mit Aflatoxin B₁, einem Gift des Pilzes *Aspergillus flavus*, konnte in den PLC signifikant häufiger eine Mutation des p53-Gens nachgewiesen werden (LASKY 1997).

* Soweit nicht anders angegeben, bezieht sich der männliche Plural sowohl auf männliche als auch auf weibliche Personen.

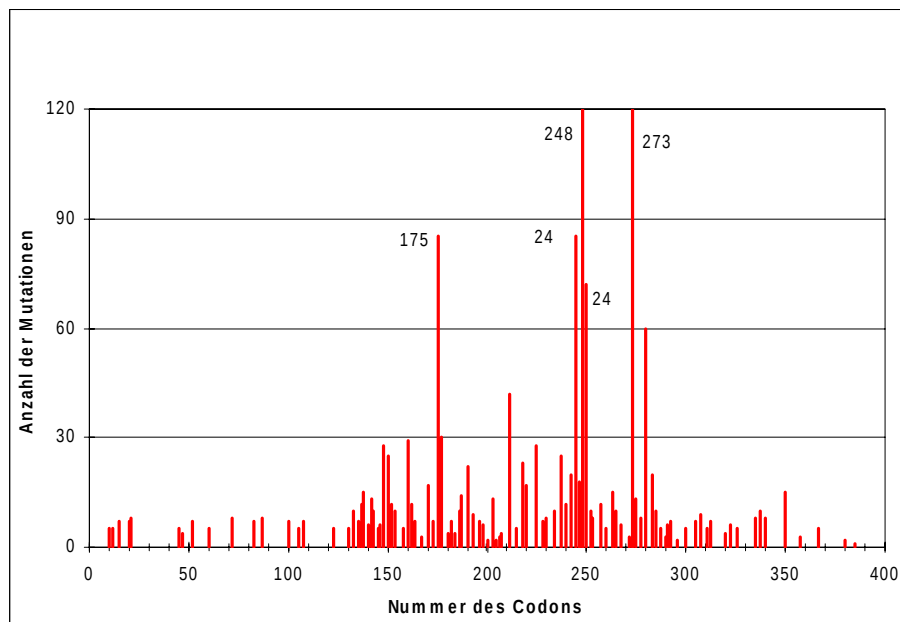


Abb. 4: Häufigkeitsverteilung der Mutationen in der DNA-Sequenz des p53-Gens bei malignen Neoplasien (nach LEVINE 1995)

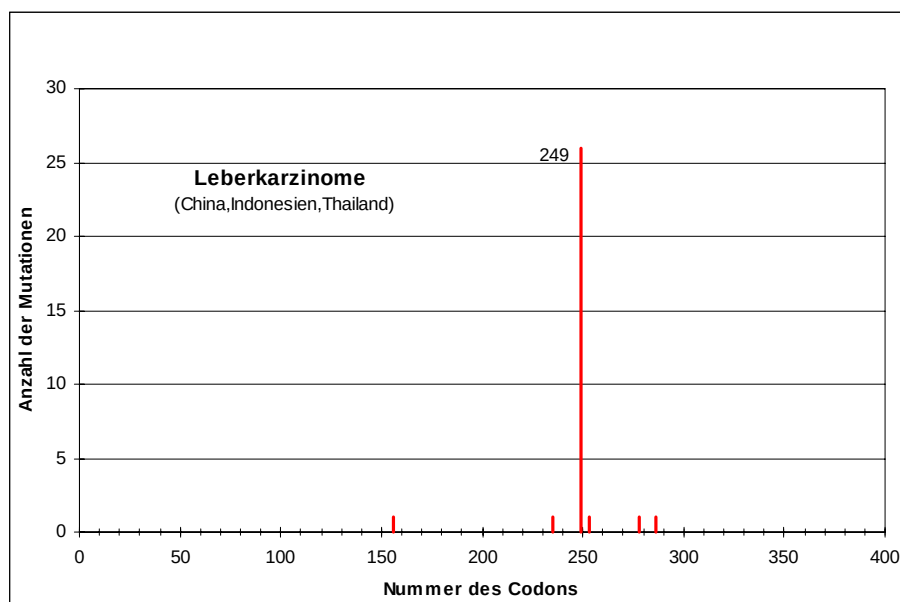


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der Mutationen in der DNA-Sequenz des p53-Gens bei Leberkarzinomen von Personen im südostasiatischen und zentralafrikanischen Raum (nach LEVINE 1995)

Der Zusammenhang zwischen Aflatoxin B₁-Exposition, Kodon 249 G>T Transversion und PLC kann bis dato weder quantifiziert noch lückenlos beschrieben werden (LASKY 1997). Welche Rolle Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus als Auslöser einer G>T Punktmutation spielt, wird zum aktuellen Zeitpunkt diskutiert (SCORSONE 1992; GOLDBLUM 1993). Untersuchungen in Deutschland, Japan, den U.S.A. und Taiwan zeigen, daß Punktmutationen des Kodon 249 weniger häufig sind (Abb. 6).

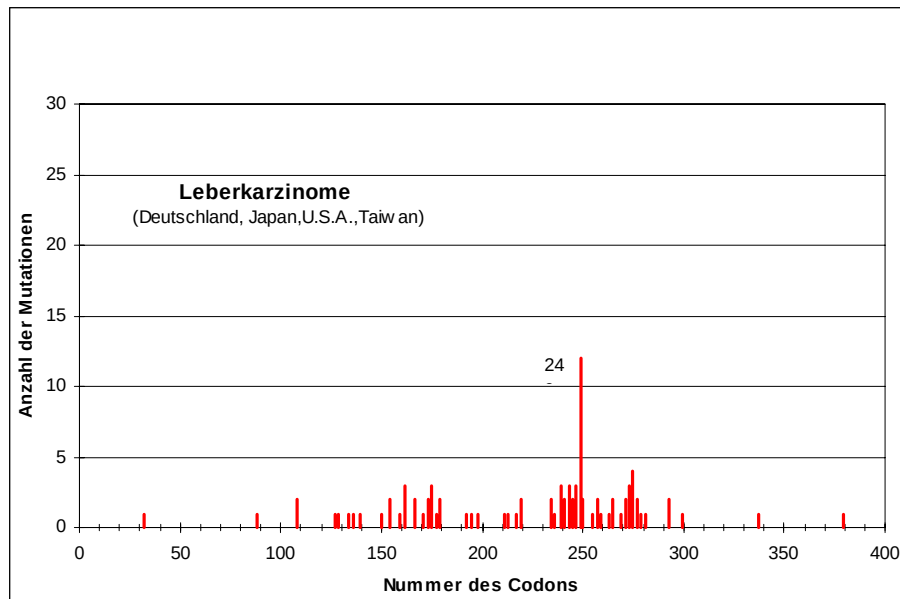


Abb. 6: Häufigkeitsverteilung der Mutationen in der DNA-Sequenz des p53-Gens bei Leberkarzinomen von Personen aus Europa, U.S.A., Japan und Taiwan
(nach LEVINE 1995)

1.2. PRIMÄRE LEBERKARZINOME

Das primäre Leberkarzinom (engl.: primary liver cancer = PLC) ist eines der weltweit häufigsten Karzinome (COOK 1985). Da das primäre Leberkarzinom zu etwa 80 bis 90 % histologisch als hepatozelluläres Karzinom (engl.: hepatocellular carcinoma = HCC) imponiert, beziehen sich die im folgenden angegebenen Daten zumeist auf das HCC (Kapitel 1.2.6.). In allen Fällen, in denen eine differenzierte Betrachtung möglich ist, werden die Daten aufgeschlüsselt nach histologischen Subtypen angegeben.

1.2.1. Inzidenz

Betrachtet man die Anzahl der Neuerkrankungen im Verlauf des letzten Jahrhunderts, so stellt man eine global steigende Tendenz der Erkrankungen am primären Lebermalignom fest (SARACCI et REPETTO 1980).

Die Inzidenz des PLC unterliegt sehr starken geographischen Schwankungen. Es werden drei Gruppen von Ländern unterschieden, die sich jeweils in den Inzidenzraten gleichen. Die Gruppen werden als High-Intermediate-und Low-Incidence-Area bezeichnet und sind durch die folgenden Grenzen definiert:

■ High-Incidence-Area:	20 - 150 / 100 000
■ Intermediate-Incidence-Area:	5 - 20 / 100 000
■ Low-Incidence-Area:	< 5 / 100 000

Es soll an dieser Stelle angemerkt werden, daß diese Einteilung aufgrund der Daten vorgenommen wurden, die in den Krebsregistern der jeweiligen Länder veröffentlicht sind. Da aber besonders in den High-Incidence-Areas die Krebsregister sich teilweise noch im Aufbau befinden, müssen die Daten als nicht vollständig und als eher zu gering gelten (ANTHONY 1994). Die unterschiedlichen Inzidenzraten in den verschiedenen Teilen der Welt werden hauptsächlich durch den histologisch häufigsten Typen des PLC, nämlich das HCC bestimmt (LANIER 1987; FUJIMOTO 1993; PETERS 1994; KACZYNSKI 1996).

Im Gegensatz hierzu tritt das CAC, das den zweithäufigsten Typen darstellt, mit Ausnahme von Südostasien weltweit mit etwa der gleichen Inzidenz auf (ANTHONY 1987).

Die anderen histologischen Formen kommen nur sehr selten vor und stellen somit nur einen sehr geringen Anteil am Gesamt der primären Leberkarzinome dar (ANTHONY 1987).

1.2.2. Geschlechterverteilung

Das CAC läßt nur eine schwache weibliche Geschlechterdominanz erkennen (KAWARADA 1984; TAKEUCHI 1984; KACZYNSKI 1996). Im Gegensatz dazu ist die Ratio Männer : Frauen bei dem HCC deutlich auf die Seite des männlichen Geschlechts verschoben, so daß Männer bis zu achtfach häufiger als Frauen erkranken (NAGARATNAM 1984; LANIER 1987; JOHNSON 1991; TSAO 1994; KACZYNSKI 1996).

1.2.3. Alter

Das PLC stellt in Deutschland einen Tumor des mittleren und höheren Lebensalters dar. In den letzten Jahrzehnten zeichnete sich der Trend ab, daß sich eine Umverteilung des Patientengutes auf die jüngeren Altersgruppen vollzieht (NAGARATNAM 1984).

Schlüsselt man die Angaben zur Altersverteilung genauer auf, so fallen weltweite Unterschiede nach geographischen Regionen und histologischen Subtypen des PLC auf. In Gegenden mit niedriger Morbidität stellt das PLC in seiner adulten Form eine Erkrankung des mittleren und höheren Lebensalters dar, das selten vor dem 40. Lebensjahr auftritt und einen Altersgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr aufweist (TAKEUCHI 1984; HEY 1985; JOHNSON 1991; TSAO 1994; KACZYNSKI 1996). Gegensätzliches gilt für Regionen, in denen das PLC eine hohe Morbidität in der Bevölkerung zeigt. Dort sind die Patienten im Durchschnitt jünger als in Gegenden mit niedriger Erkrankungshäufigkeit (KAWARADA 1984; NAGARATNAM 1984; LANIER 1987). In High-Incidence-Areas des PLC sind die Hälfte der Erkrankten jünger als 30 Jahre (MUIR 1987; LANIER 1987).

Das CAC entsteht ebenfalls zumeist im mittleren und höheren Lebensalter. Im Vergleich zum HCC entsteht es im Durchschnitt zwischen zwei und acht Lebensjahre später (KAWARADA 1984; OKUDA 1984; KACZYNSKI 1996). In der Literatur schwanken die Angaben über das durchschnittliche Erkrankungsalter der CAC-Patienten zwischen Werten von 51 Jahren (KAWARADA 1984) und 70 Jahren (KACZYNSKI 1996).

1.2.4. Rasse

Die weltweiten Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit des PLC lassen vermuten, daß Herkunft und Lebensgewohnheiten in der Kanzerogenese der PLC eine Rolle spielen. Sowohl ausgewanderte Asiaten als auch Mexikaner nehmen die niedrigere Inzidenz ihrer Gastländer an, obwohl sie weiterhin eine höhere Morbidität des PLC als die einheimische Bevölkerung zeigen (MUNOZ 1987; SUAREZ 1987). Es wird vermutet, daß Einwanderer, indem sie die Lebensgewohnheiten ihrer Gastländer annehmen, sich durch präventives Verhalten (z. B. geringere Ingestion von Aflatoxin B₁) schützen (ANTHONY 1994). Als Ursache einer vergleichsweise erhöhten Erkrankungshäufigkeit der Einwanderer gegenüber der einheimischen Bevölkerung wird eine erhöhte Durchseuchung mit der Hepatitis-B-Infektion als Ursache vermutet (SUAREZ 1987).

1.2.5. Ätiologie

Die Mechanismen bei der Entstehung maligner Lebertumoren sind bisher nicht lückenlos geklärt, da die Hepatokarzinogenese sich als ein ausgesprochen komplexer Vorgang darstellt.

Der zirrhotische Umbau der Leber, der als eine Entwicklungsstufe multipler chronischer Lebererkrankungen eine Präkanzerose darstellt, prädisponiert in besonderem Maße für das HCC (TSUKUMA 1993). In 80% der HCC-Erkrankungen läßt sich eine Koexistenz von HCC und Leberzirrhose feststellen (ZAMAN 1985). Einige Autoren sehen die Leberzirrhose, unabhängig von ihrer Genese, als den Hauptrisikofaktor bei der Entstehung des PLC an (ARRIGONI 1985; ZAMAN 1985).

Zu den häufigsten Ursachen der Zirrhose wird die chronische Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) und dem Hepatitis-C-Virus (HCV) gerechnet, die beide eigenständig den zirrhotischen Umbau der Leber verursachen können. Die Serummarker von Patienten mit HCC zeigen in 30% (COLOMBO 1991) bzw. in 60% (GASHAU 1990) eine chronische Infektion mit dem HBV an. Das Risiko des PLC ist bei positiver HBV-Serologie auf das Siebenfache der Norm erhöht (TSUKUMA 1993). Die Integration von viraler DNA führt möglicherweise zu einer genomischen Instabilität und somit zu gehäuften Alterationen der zellulären DNA (BLUM 1994).

HDV benötigt die Infektion mit dem HBV, um virulent wirken zu können. Durch die notwendige Symbiose von HBV und HDV ist es sehr schwierig, die Rolle der HDV-Infektion in der Hepatokarzinogenese getrennt zu bewerten.

Bei einem Großteil der HCC-Patienten, die eine negative HBV-Serologie aufweisen, kann ein anti-HCV positiver Nachweis geführt werden. Aber auch ein signifikanter Anteil der anti-HB_sAg positiven Patienten zeigen serologische Hinweise auf eine HCV-Infektion, so daß eine Koinfektion mit HBV und HCV wahrscheinlich ist (BLUM 1994). Die chronische HCV-Infektion steht in einem engen Zusammenhang mit der Entstehung von Lebermalignomen (DI BISCEGLIE 1995). Besonders in Gegenden mit einem hohen Durchseuchungsgrad der Bevölkerung, so zum Beispiel in Südeuropa und Japan (BRUIX 1989), stellt die HCV-Infektion eine der Hauptrisikofaktoren dar (DI BISCEGLIE 1995). Die Infektion mit dem HCV birgt für einen Menschen ein vierfach höheres Risiko gegenüber der Norm, ein PLC zu entwickeln (TSUKUMA 1993).

In Deutschland liegt einer Leberzirrhose zumeist chronischer Alkoholabusus als Ursache zugrunde (SCHUBERT 1982; KRESS 1992). Auf dem Boden einer äthyltoxisch bedingten Leberzirrhose entwickelt sich jedoch nur selten ein Malignom. Der Grund hierfür kann in einer zu niedrigen Lebenserwartung von Alkoholikern gesehen werden, als daß ausreichend Zeit für die Entstehung eines PLC vorhanden wäre (ARICO 1994). Alkoholabusus ohne Zirrhose geht mit einem nur leicht erhöhten Risiko einher, während bei Alkoholikern mit Leberzirrhose das Risiko der Entwicklung eines PLC um das Zehnfache gesteigert ist (ADAMI 1992).

Für das CAC konnte ein Zusammenhang mit dem parasitären Befall der Gallengänge mit dem chinesischen Leberegel (*Clonorchis sinensis*) und dem Katzenleberegel (*Opisthorchis viverrini*) aufgezeigt werden (ANTHONY 1994). Weitere Risikofaktoren des CAC stellen Gallengangsektasien, Steinleiden der Gallengänge (Cholelithiasis) und die sklerosierende Cholangitis dar (AKAI 1994; RINGE 1994).

Es wird von einer Vielzahl von angeborenen Mißbildungen und hereditären metabolischen Dysfunktionen berichtet, die mit einem erhöhten Risiko eines PLC einhergehen sollen. In diesem Zusammenhang stehen der α_1 -Proteinase-Inhibitor-Mangel (GOETZ 1972; ERIKSSON 1986; BUETOW 1989; RABINOVITZ 1992), die primäre Hämochromatose (DEUGNIER 1991; BRADBAER 1992; HSING 1995), der Morbus Wilson (POLIO 1989), die primär sklerosierende Cholangitis und die primär biliäre Zirrhose (SCHRUMPF 1989) in der Diskussion. Daß die Koinzidenz einiger angeborener Mißbildungen und hereditärer Dysfunktionen mit der Entstehung von Lebermalignomen nur zufällig ist, kann nicht ausgeschlossen werden (ANTHONY 1994).

Das Schimmelpilzgift Aflatoxin steht in dem Verdacht, die Entstehung primärer Leberkarzinome zu fördern. Betrachtet man die Ernährungsgewohnheiten von Individuen, so kann kein Zusammenhang zwischen Aflatoxin und dem PLC hergestellt werden (QUIAN 1994).

Der lange geäußerte Verdacht, daß ein Zusammenhang zwischen der Einnahme oraler Kontrazeptiva und der Genese des PLC besteht (WANLESS 1982; HENDERSON 1983; NEUBERGER 1986; MANT 1995; WAETJEN 1996), scheint nur sehr schwach ausgeprägt, wenn nicht zu vernachlässigen zu sein (LA VECCHIA 1996).

Dagegen wird dem Stoff Vinylchlorid eine Rolle in der Hepatokanzerogenese zugeordnet (POPPER 1977; IARC MONOGRAPH 1993). Er stellt eines der wenigen industriell eingesetzten Agentien dar, das in seltenen Fällen HCC (mit)verursachen kann (EVANS 1983).

Das Röntgenkontrastmittel Thorotrast ist zweifelsfrei an der Entstehung des PLC beteiligt (VAN KAIK 1991; ANDERSSON 1994; MORI 1991).

1.2.6. Pathologie primärer Lebertumoren

In der Leber sind vier Zellarten bekannt, die als Hepatozyten, Zellen des Gallengangsepithels, Zellen des sinusoidalen Epithels sowie perisinusoidalen Zellen bezeichnet werden. Jede der genannten Zellarten kann maligne entarten und manifestiert sich dann als HCC und CAC sowie als Angiosarkom und Hämangioperizytom.

In der Entstehung dieser Neoplasien konnten stufenweise Veränderungen beobachtet werden (Abb. 7).

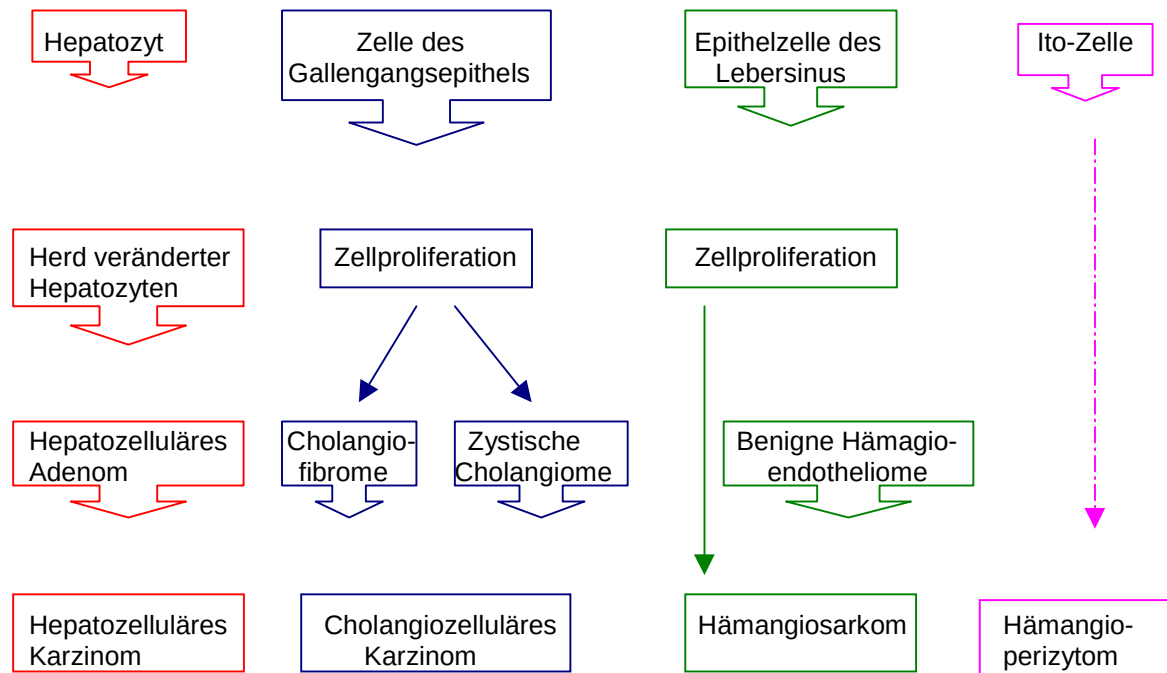


Abb. 7: Sequentielle Veränderungen in der Genese des PLC

1.2.6.1. Hepatozelluläres Karzinom

Das HCC mit einem Anteil von 80 – 90 % der häufigste Vertreter des PLC (NAGARATNAM 1984; OKUDA 1984; TAKEUCHI 1984; HEY 1985; KACZYNSKI 1996).

Makroskopisch lassen sich bei dem HCC drei Varianten unterscheiden (HEY 1985): Es werden ein großknotiges, ein multizentrisches und das selten vorkommende diffuse Wachstumsmuster der Karzinome voneinander abgegrenzt.

Histologisch werden vier Wachstumsformen unterschieden (RIEDE et SCHÄFER 1993), die als trabekulärer, pseudoglandulärer, szirrhöser und als solider Typ bezeichnet werden.

1.2.6.2. Cholangiozelluläres Karzinom

Der zweithäufigste histologische Subtyp in dieser Altersklasse ist mit 3 bis 10% das CAC (NAGARATNAM 1984; OKUDA 1984; TAKEUCHI 1984; HEY 1985; KACZYNSKI 1996).

Das CAC geht von intrahepatischen Gallengängen aus (syn.: intrahepatisches Gallengangskarzinom). Davon abgegrenzt wird das extrahepatische Gallengangskarzinom. Makroskopisch läßt der Tumor ein knotiges oder diffuses Wachstumsmuster erkennen. In der Histologie stellt sich das CAC meist als ein gut differenziertes sklerosierendes Adenokarzinom dar. Die kubisch-zylindrischen Tumorzellen sind tubulär angeordnet und in ein gefäßarmes Stroma eingebettet.

1.2.6.3. Mischtumoren

Die Angaben über die Häufigkeit von Mischtumoren, die aus Anteilen eines HCC und eines CAC aufgebaut sind, variieren zwar geringfügig, zeigen dennoch übereinstimmend, daß es sich um seltene Tumoren handelt (OKUDA 1984; TAKEUCHI 1984; HEY 1985; KACZYNSKI 1996).

Die anderen Subtypen des PLC, wie zum Beispiel Hämangiosarkome und Hämangio-perizytome, kommen ausgesprochen selten vor.

Die Klassifikation primärer Lebertumoren erfolgt nach den Richtlinien der UICC (vgl. Anhang).

1.3. Lebermetastasen

1.3.1. Inzidenz

Karzinommetastasen stellen die häufigsten bösartigen Tumoren der Leber dar (SAUL 1994).

Die Relation der Häufigkeiten von PLC und LM schwankt zwischen 1:10 im Autopsiematerial und 1:3 im zytologischen Untersuchungsgut (NIZZE 1995).

Die Leber stellt das häufigste Zielorgan für Metastasen dar. Zum Zeitpunkt der Autopsie hatten Primärtumoren in 36,7% (SILVESTRI 1988), 36,0% (NIZZE 1995) und 46,0% (VANBOCKRIJCK 1992) der Fälle Metastasen in der Leber ausgebildet.

1.3.2. Metastasierungswege

In der Mehrzahl der Fälle erfolgt die Metastasierung in die Leber hämatogen nach dem Pfortadertyp, worunter eine Verschleppung von Tumorzellen aus dem Zuflußgebiet der Pfortader in die Leber verstanden wird. In der Literatur wird berichtet, daß LM ihrer Herkunft nach von Tumoren des Pfortadertyps (57%), des Hohlvenentyps (30%) und des Lungentyps (13%) stammen (WALTHER 1948).

In die Leber lymphangisch metastasierende Tumoren gehen von den großen Gallengängen und von der Bauchspeicheldrüse aus, sind aber selten (BOLCK 1978).

Auch im Rahmen maligner Systemerkrankungen, so unter anderem bei Leukämien und malignen Lymphomen, kann es zu einer Affektion der Leber kommen.

1.3.3. Alter

In der Literatur wird der metastatische Befall der Leber als ein Ereignis beschrieben, das zumeist um das 50. und 60. Lebensjahr auftritt (SCHEELE 1995).

1.3.4. Primärtumor

In der Literatur wird von Lungen-, Dickdarm-, Pankreas-, Magen-, Brust- und Prostatakarzinomen als häufigste Primärtumoren bei LM berichtet (SILVESTRI 1988; NIZZE 1995). In Abhängigkeit der Literaturangaben werden diesen Tumoren unterschiedliche Plätze in der Häufigkeit zugeordnet.

Für alle diese Karzinome gilt, daß die Häufigkeit der Metastasierungen im höheren und hohen Lebensalter abnimmt. Während bei einigen malignen Tumoren (z. B. Prostata und Uterus) diese Tendenz nur wenig ausgeprägt ist, zeigt sich bei anderem Karzinomen (z. B. Pankreas, Magen-, Dickdarm- und Brustkrebs) diese Entwicklung deutlicher.

1.3.5. Geschlecht

Im Vergleich beider Geschlechter werden bei Autopsien maligne Neoplasien häufiger bei Männern als bei Frauen, mit einem prozentualen Anteil von 36,1% bzw. 27,1% am Gesamt aller Fälle, gefunden (SILVESTRI 1988). Primärtumoren bilden bei Frauen (38,7%) häufiger Metastasen in der Leber als bei Männern (35,4%) aus (SILVESTRI 1988).

Zu den am häufigsten in die Leber metastasierenden Tumoren des Mannes zählt man in absteigender Reihenfolge das Pankreas-, Dickdarm-, Magen- und Lungenkarzinom. Für das Dickdarmkarzinom gilt, daß es im Verlauf der Erkrankung in $\frac{1}{3}$ der Fälle LM ausbildet (HUGHES 1992). Obwohl das Prostatakarzinom den dritthäufigsten Krebs der Männer darstellt, spielt es in der Gruppe der LM eine untergeordnete Rolle, da es nur in 10,2% der Fälle in die Leber absiedelt (SILVESTRI 1988).

LM bei der Frau haben ihren Primarius in den vier häufigsten Fällen im Pankreas, der Gallenblase, der Mamma und dem Dickdarm lokalisiert. Für das Mammakarzinom gilt, daß es bei sehr alten Frauen (ab der 8. Lebensdekade) eine niedrigere Inzidenz und Metastasierungshäufigkeit als bei jungen und älteren Frauen aufweist (SILVESTRI 1988). LM beim Mammakarzinom zeigen eine gleiche Verteilung auf östrogenrezeptorpositive und -negative Patientinnen, sind aber bei progesteronrezeptorpositiven häufiger als bei -negativen Mammakarzinomen (BARKHAUSEN 1993).

1.3.6. Lebermetastasen bei Zirrhose

Metastasen extrahepatischer Neoplasien finden sich seltener in der zirrhotischen als in der nichtzirrhotischen Leber (33,3% versus 46,4%) (VANBOCKKRIJCK 1992). Außerdem ist die Inzidenz extrahepatischer Neoplasien und deren hämatogener Metastasen bei Zirrhosepatienten geringer als bei Patienten ohne Zirrhose (VANBOCKKRIJCK 1992).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß aufgrund der kürzeren Lebenserwartung Zirrhotiker seltener extrahepatische Neoplasien und LM entwickeln als Patienten ohne Zirrhose (VANBOCKRIJCK 1992).

1.3.7. Pathologie

Aufgrund des makroskopischen Befundes kann eine diffuse von einer knotigen Metastasierung abgegrenzt werden. Die Knoten können sowohl singulär als auch multipel vorliegen, und die Metastasierung kann subtotal bzw. total sein (BOLCK 1978).

LM mit mehr als drei Herden zeigen eine besonders schlechte Prognose und eine kurzes Überleben (HUGH 1997).

In der Histologie stellen sich die meisten LM als Adenokarzinome dar. Gleichmaßen selten sind LM von Plattenepithelkarzinomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen und neuroendokrinen Tumoren.

1.4. P53 und maligne Lebertumoren

Die Suche nach Alterationen in wachstumsregulierenden Genen hat in den letzten Jahren immens zugenommen. Die überwiegende Mehrzahl aller menschlichen Gewebe- und Tumorarten sind auf mögliche genetische Läsionen in den für Onkoproteine und Tumorsuppressorproteine kodierenden Sequenzen untersucht worden. Dabei konnten große Unterschiede im Expressionsmuster einzelner potentiell tumorfördernder Gene festgestellt werden.

Beispielsweise ist das ras-Onkogen in 90% aller pankreatischen Adenokarzinome, in 50% der Kolonkarzinome, in 30% aller Adenokarzinome der Lunge und in 30% der akuten myeloischen Leukämien verändert.

Die Mutation des p53-Gens ist die am häufigsten nachgewiesene genetische Veränderung in verschiedenen Tumoren (HOLLSTEIN 1991; LEVINE 1995). Wie bereits erwähnt, weisen beispielsweise ca. 70% der Kolorektalkarzinome, 60% aller malignen Blasentumoren und 40% der Ösophagealkarzinome Veränderungen des p53 Proteins auf (HOLLSTEIN 1991). Es berichten mehr als 4500 Veröffentlichungen von somatischen Mutationen des wild-type p53-Gens (HOLLSTEIN 1991). Nachdem das p53-Gen im Jahre 1979 identifiziert werden konnte, wurde es der Gruppe der dominant wirkenden Krebsgene (=Onkogene) zugeordnet. Erst später wurde deutlich, daß die dem wild-type p53-Gen zugerechneten onkogenen Eigenschaften auf der Mutation des Gens beruhen. Neuere Untersuchungen zeigen, daß p53 nicht mit Onkogenen kooperiert, im Gegensatz dazu sogar deren Wirkung abblocken kann (FINLAY 1989). Man rechnet das p53-Gen nun den Tumorsuppressorgenen zu, aufgrund seiner kontrollierenden Funktion im Zellzyklus wird es als "guardian of the genom" bezeichnet (LANE 1979).

Auch die Entstehung primärer und sekundärer Leberkarzinome scheint mit Mutationen des p53-Gens assoziiert zu sein, da auch bei diesen Tumoren von Veränderungen des p53-Gens berichtet wird (COHEN 1994; TERADA 1994; ZHAO 1994).

Sowohl der Mutationsnachweis des p53-Gens als auch die immunhistochemische Darstellung der p53-Expression in malignen Lebertumoren sind beschrieben worden (KRESS 1992; COLLIER 1994; LAURENT-PING 1992). Die Veröffentlichungen weisen widersprüchliche Ergebnisse auf. So kommt die Arbeitsgruppe von TERADA et al. (1994) zu keinem immunhistochemisch positiven Färberesultat bei der Untersuchung von 42 CAC, während KIBA et al. (1993) in annähernd der Hälfte der Fälle von CAC ein positives Ergebnis erhalten. Untersuchungen der p53-Expression in LM liegen in großer Anzahl vor (KASTRINAKIS 1995; NAGAI 1994). In Abhängigkeit des Primärtumors werden sehr unterschiedliche Angaben über den immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins gemacht. Diese reichen bei in die Leber metastasierten Karzinoiden von keinem einzigen immunhistochemisch positiven Fall bis hin zu Metastasen kolorektaler Karzinome mit einem positiven Färberesultat von 80 bis 90% (KASTRINAKIS 1995).

Trotz der Widersprüchlichkeit der Ergebnisse zeigen die Untersuchungen den Trend, daß p53-Alterationen eine Rolle in der Entstehung maligner Lebererkrankungen zu spielen scheinen. Würde sich der Trend verfestigen, daß p53-Veränderungen in der Genese von Lebermalignomen einen zentralen Schritt induzieren, so würde dies einen entscheidenden Impuls für weitere, sich mit der Hepatokarzinogenese beschäftigende Arbeiten darstellen. Es könnte dann möglich werden, die Interaktion des p53-Gens mit Kanzerogenen im Rahmen der Karzinogenese kennenzulernen und eventuell die Gründe für die weltweit unterschiedliche Inzidenz der Lebermalignome besser zu verstehen. Die Tumorigenese und Ätiologie der Lebermalignome ist bis heute wenig verstanden und bedarf weiterer Klärung. Die Untersuchungsergebnisse von HOFMANN et al. (1993) zeigen eine Korrelation der p53-Expression mit einer gesteigerten Tumorzellproliferation. Um abzuklären, ob dies, wie von LAURENT-PING (1992) vermutet, zu einer schlechten Prognose des Tumorleidens und einer gesteigerten Metastasierungsfrequenz (KASTRINAKIS 1995) führt, bedarf es weiterer Untersuchungsergebnisse. Würde sich dieser Trend verfestigen, so könnte die Relevanz der immunhistochemisch nachgewiesenen p53-Akkumulation als Prognosefaktor des Tumorleidens diskutiert werden.

Die hier vorliegende Untersuchung betrachtet eine Anzahl von 74 primären und sekundären malignen Lebertumoren.

Gegenstand der Untersuchung war der immunhistochemische Nachweis, die Bewertung und der Vergleich der Färbereaktionen des p53-Nachweises mittels der p53-Antikörper 1801 (Calbiochem) und DO 1 (Calbiochem).

Ferner sollten an unserem Material von Leberkarzinomen die Häufigkeit und Charakteristik der p53-Akkumulation beschrieben werden, um so die voneinander differierenden und zum Teil widersprüchlichen Angaben der Literatur vor dem Hintergrund der Ergebnisse des in hoher Fallzahl vorliegenden eigenen Untersuchungsmaterials diskutieren zu können.

Ziel unserer Untersuchung war darüberhinaus, die prognostische Wertigkeit der p53-Bestimmung für die Leberkarzinomerkrankung auch im Vergleich mit anderen Prognosefaktoren zu beurteilen.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Probenmaterial

Es wurde Gewebe von 114 Patienten untersucht, die an einem Lebertumor erkrankt waren. Die Operationspräparate wurden in den Jahren 1988 bis 1995 in der Abteilung für Abdominalchirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf gewonnen.

Um in die Studie aufgenommen zu werden, mußte jedes Präparat genügend adäquates histologisches Material aufweisen, Tumorgewebe enthalten und von ausreichender Qualität sein. Aufgrund dieser Kriterien verringerte sich das Patientengut auf eine Anzahl von 74. Bei zwei Patienten lag neben dem in Paraffin eingebetteten Material ebenfalls tiefgefrorenes Frischgewebe vor.

Unter den PLC fanden sich 28 HCC und 21 CAC.

LM wurden von 25 Patienten untersucht, von denen 21 einem kolorektalen Primärtumor zugeordnet werden konnten. Als weitere Primarii fanden sich in zwei Fällen ein anaplastisches Mammakarzinom und in jeweils einem Fall ein klarzelliges Nierenkarzinom sowie ein Karzinom der Glandula submandibularis (Abb. 8).

Erkrankung	Anzahl der Patienten/-innen	Geschlecht		Durchschnittsalter (in Jahren)
		weiblich	männlich	
HCC	28	8	20	57,9
CAC	21	15	6	53,1
LM				
Gesamtanzahl	25	9	16	60,8
- kolorektales Ca.	21	6	15	62,0
- Mammaca.	2	2	0	51,0
- Nierenca.	1	0	1	46,0
- glanduläres Ca.	1	1	0	71,0

HCC: Hepatozelluläres Karzinom

CAC: Cholangiozelluläres Karzinom

LM : Lebermetastase

Abb. 8: Verteilung der Patientengesamtzahl auf die verschiedenen Untergruppen und deren Durchschnittsalter

2.2. Methoden

2.2.1. Histologische Präparate

Histologische Diagnosen wurden aus Patientenverzeichnissen der Jahre 1988 bis 1995 herausgesucht und anschließend durch HE-Färbungen in einer second-look-Diagnostik nachbefundet.

Das Operationsmaterial war direkt postoperativ in wässriger 10%-Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet worden. Von den Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf silanisierte Objektträger aufgezogen und auf der Heizplatte für 25 Minuten getrocknet wurden.

2.2.2. Reagenzien

■ Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 0,01 M-pH 7,2

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat	1.48 g
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat	0,43 g
NaCl	Natriumchlorid	7,2 g
add 1000 ml Aqua dest.		
pH = 7,6		

■ Citratpuffer (10mM)

A: (COOH) ₃ - C ₃ H ₅ O	Zitronensäure	21,08 g add 1000 ml Aqua dest.
B: ((COOH) ₃ - C ₃ H ₅ O))Na	Natriumcitrat	29,41 g add 1000 ml Aqua dest.

10fach Stock: 9 ml Reagenz A + 41 ml Reagenz B add 450 ml Aqua dest.

1fach Zitronenpuffer: Verdünnen des 10fach Stock im Verhältnis 1 : 10 mit Aqua dest.

pH = 6,0

■ Wasserstoffperoxidlösung

H ₂ O ₂ 30%	Wasserstoffperoxid	1,5 ml
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline	185,0 ml

■ Normalserum

	Normalserum (Vector/ABC Maus Elite Kit)	15 µl
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline	1 ml
+ 1% BSA	Bovines Serum Albumin	

■ Primärantikörperserum

	Primärantikörper (Clone DO1; Calbiochem Clone Pab 1801; Calbiochem)	20 µl
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline	1 ml
+ 1% BSA	Bovines Serum Albumin	

■ Biotiniliertes Antikörperserum

	Biotiniliertes Antikörperserum	5 µl
PBS - Puffer	Phosphate Buffered Saline	1 ml
+ 1% BSA	Bovines Serum Albumin	

■ Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin (AB)-Komplex

	AB-Komplex-Serum	10 µl A
		10 µl B
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline	1 ml

■ DAB (3,3'-Diaminobenzidin) Färbelösung

	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	320 mg
H ₂ O	Aqua dest.	200 ml
H ₂ O ₂ 30%	Wasserstoffperoxid	200 µl

■ Gill's Hämatoxylin Färbelösung

	Hämatoxylin-Lösung , Gill Nr.1	150 ml
H ₂ O	Aqua dest.	150 ml

2.2.3. Grundlagen der immunhistochemischen Färbemethode

Im folgenden soll kurz auf die Grundlagen der immunhistochemischen Färbemethode eingegangen werden.

2.2.3.1. Antigene und Antikörper

Ein Antigen stellt für den Wirtsorganismus einen Fremdstoff dar, der eine Antikörperbildung hervorruft. Die so entstandenen spezifischen Antikörper binden an die Antigene und bilden Immunkomplexe, die als Präzipitate immunhistochemisch nachgewiesen werden können. Die entscheidenden Eigenschaften der Antigene sind zum einen die Immunogenität, zum anderen die spezifische Reaktivität:

Immunogenität bezeichnet die Fähigkeit, die Antikörperbildung zu induzieren.

Spezifische Reaktivität bedeutet, daß das Antigen, das die Antikörperbildung hervorruft, mit diesem Antikörper eine spezifische Bindung eingeht.

Antikörper werden auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet, da sie in der Gammaglobulinfraktion des Serums enthalten sind.

Die Antikörperstruktur setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, die als leichte und als schwere Ketten bezeichnet werden. In Abb. 10 findet sich eine schematische Darstellung dieser Antikörperstruktur. Die Einteilung und Benennung der Antikörper erfolgt nach den schweren Ketten, so daß sich fünf Gruppen unterscheiden lassen:

■ IgG-Molekül	schwere Ketten vom Typ Gamma
■ IgA-Molekül	schwere Ketten vom Typ Alpha
■ IgD-Molekül	schwere Ketten vom Typ Delta
■ IgE-Molekül	schwere Ketten vom Typ Epsilon
■ IgM-Molekül	schwere Ketten vom Typ My

Für diese fünf Immunglobulinklassen existieren nur zwei Leichtketten-Typen, die als Kappa- und Lambdaketten bezeichnet werden. Ein einzelner Antikörper besitzt immer nur zwei gleichartige leichte Ketten, so daß niemals Kappa- und Lambdaketten gemeinsam enthalten sind.

Die beiden schweren Ketten bilden zusammen eine Y-ähnliche Struktur, die im mittleren Teil durch zwei Disulfid-(S-S)-Brücken verbunden sind. An einem Ende der schweren Kette ist jeweils eine leichte Kette gebunden. Diese symmetrische Struktur bildet spezialisierte Domänen. Die Enden der schweren und leichten Ketten bilden die V-Domäne, die die direkte Antigen-Bindungsstelle darstellt. Im mittleren Abschnitt der schweren Ketten liegt die Domäne, die für die Komplementbindung verantwortlich ist. Das Ende der schweren Ketten bildet die Domäne, die für die Bindung an Makrophagen notwendig ist.

Mit proteolytischen Enzymen kann das Antikörpermolekül in Fragmente zerlegt werden, so daß der Stamm das Fc-Fragment (fragment crystalline) und die beiden Schenkel jeweils ein Fab-Fragment (fragment antigen binding) bilden.

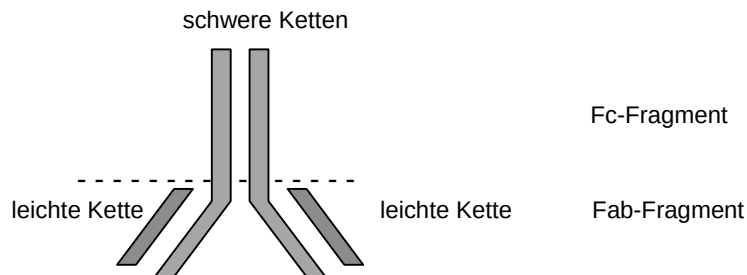


Abb. 10: IgG-Molekül mit zwei schweren Ketten vom Gamma-Typ und zwei leichten Ketten.

2.2.3.2. Monoklonale Antikörper

Bei der immunhistochemischen Anfärbung der Gewebsschnitte wurden monoklonale Antikörper der Klone DO1 und 1801 verwendet.

Auf die Theorie der Herstellung monoklonalen Antikörpern soll im folgenden kurz eingegangen werden.

Da ein einzelnes Antigenmolekül mehrere charakteristische Antigen determinanten besitzt, bilden bei der Immunantwort mehrere B-Lymphozyten Antikörper gegen dieses Antigen, da ein B-Lymphozyt nur Antikörper gegen ein Epitop erstellen kann. Auf diese Weise entsteht ein polyklonaler (d. h. gebildet durch viele Zellen) Antikörper.

Um einen spezifischen, gegen nur ein Epitop des Antigens gerichteten Antikörper zu erhalten, darf die Antikörperproduktion von nur einer einzigen B-Zell-Linie erfolgen. Man spricht deshalb von einem monoklonalen (Einzelzell-) Antikörper.

Nach der Selektion des B-Zell-Klons werden diese B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert, um die Fähigkeit des Klons zur Antikörperproduktion zu erhalten. Diese Hybrid-Myelom-Zelle (Hybridom) kann in einer Zellkultur gezüchtet werden und produziert weiterhin den von den B-Zellen stammenden Antikörper.

2.2.3.3. Avidin-Biotin-Peroxidase Methode

Bei der immunhistochemischen Färbung wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-(ABC)-Methode eingesetzt (GUESDON 1992). Die ABC-Methode beruht auf der hohen Affinität des Eiweißglykoproteins Avidin zu dem Vitamin Biotin, die mit einer Affinitätskonstanten von 10^{15} M^{-1} eine fast irreversible Bindung eingehen. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, die jedoch aufgrund der molekularen Konfiguration nicht vollständig besetzt werden. Diese Färbemethode basiert auf drei aufeinanderfolgenden Schritten, die in Abb. 11 schematisch dargestellt sind:

1. Der aus Blutserum eines Kaninchens gewonnene Antikörper, der gegen ein menschliches Protein (hier: p53) gerichtet ist, wird als Primärantikörper über den histologischen Schnitt geschichtet; die entstehende Antigen-Antikörper-Verbindung ist unsichtbar.
2. Der Sekundärantikörper, der sich an den ersten binden kann, ist mit Biotin konjugiert; der Komplex ist weiterhin nicht sichtbar.
3. Als drittes Reagenz wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex über das Präparat geschichtet. Die freien Stellen des Avidin-Moleküls binden an das Biotin des Sekundärantikörpers.
Das an diesen Komplex gebundene Enzym Peroxidase wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht.

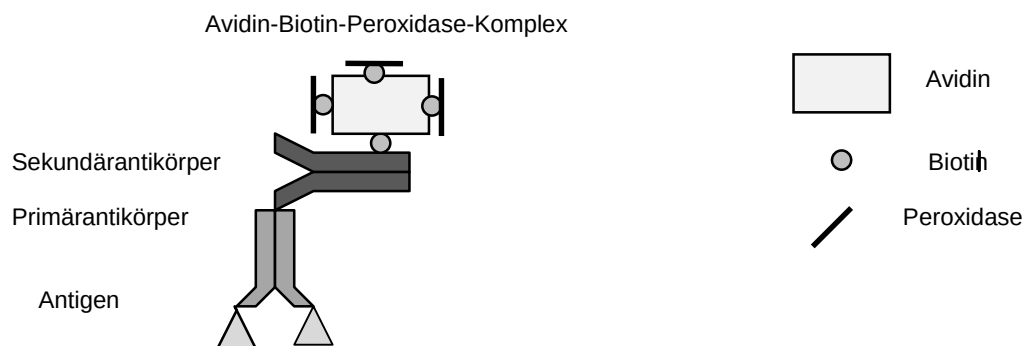


Abb.11: Avidin-Biotin-Methode

2.2.3.4. Mikrowellen-unterstützter Antigennachweis

SAINTE MARIE folgerte im Jahre 1962 aus ihren Forschungsergebnissen, daß durch die routinemäßige Formalinfixierung und Paraffineinbettung von Gewebe Antigene und Antikörper inaktiviert werden, so daß ein immunhistochemischer Antigennachweis in diesen Geweben nicht mehr möglich sei. Die Fixierung von Gewebe in Formalin führt zu einer Veränderung der Tertiärstruktur von Proteinen.

SHI et al. konnte 1991 den Gegenbeweis antreten, indem er die Vorbehandlung der Gewebsschnitte in der Mikrowelle einführte. Durch das Erhitzen der Gewebsschnitte auf über 100°C konnte bei 39 der 52 getesteten Antikörper eine deutlich verbesserte Anfärbung der Gewebsschnitte erreicht werden. Ein unverändertes Färbeverhalten wurde trotz Vorbehandlung bei neun, eine verringerte Anfärbung bei vier der 52 Antikörper beobachtet (SHI et al. 1991).

Wir führten diesen Arbeitsschritt 25 Minuten lang in der Mikrowelle (650 W) durch. Hierbei wurden die Gewebsschnitte ständig mit Citratpuffer (pH-Wert 6) umspült. Durch das Aufspalten der Quervernetzungen wird das Auffalten der Tertiärstruktur erreicht, so daß die Epitope wieder mit Antikörpern interagieren können.

Aus dem direkten Vergleich der immunhistochemischen Anfärbung von Frischgewebe zum einen und formalinfixierten, in Paraffin eingebettetem Gewebe zum anderen wurde von CAMPANI (1993) eindeutig gezeigt, daß die Vorbehandlung der Gewebsschnitte in der Mikrowelle den Nachweis des p53-Tumorsuppressorgens in archiviertem Material erlaubt.

2.2.4. Technik der Färbungen

Zunächst wurde von allen vorliegenden Gewebsschnitten eine Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung angefertigt, um Aussagen über die Qualität des Materials und über das Vorhandensein von Tumorgewebe treffen zu können.

Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Färbung eines zweiten und dritten Gewebsschnittes desselben Materials.

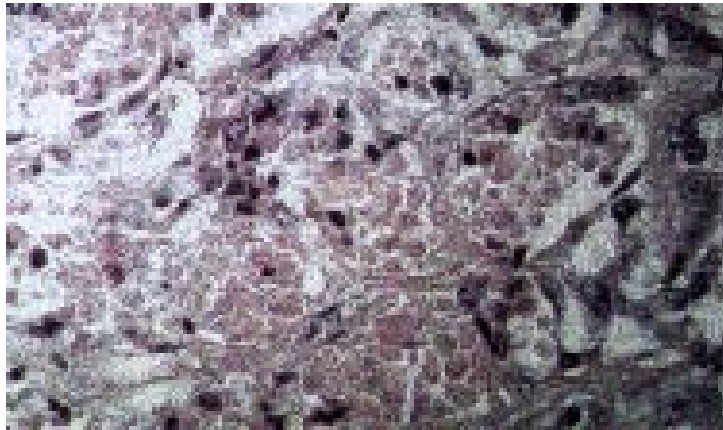
Hierbei wurden zwei unterschiedliche Primärantikörper (p53-DO-1 und p53-1801) verwendet. Als Beispiel sind in den Abbildungen 2a bis 2c Färbungen eines in die Leber metastasierten kolorektalen Karzinoms aufgeführt.

Bei der Auswahl der Antikörperklone nahmen wir Bezug auf die Veröffentlichung von RESNICK et al. aus dem Jahre 1995, in der Färberesultate unterschiedlicher Primärantikörper an Frischgewebe und archiviertem Material derselben Operationspräparate miteinander verglichen wurden.

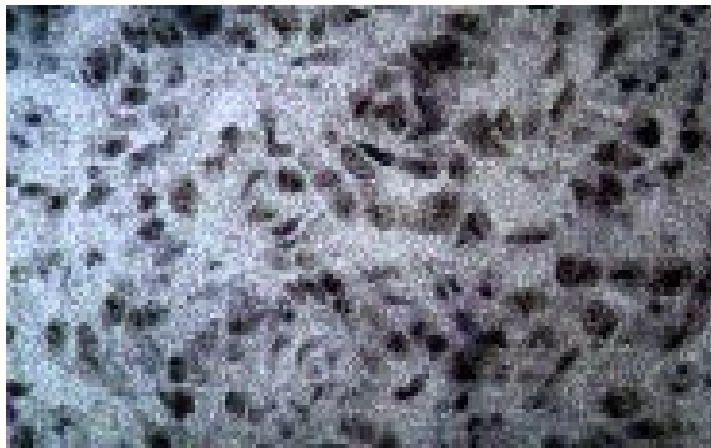
Wir entschieden uns für die folgenden Antikörperklone, um die in der Veröffentlichung propagierte erhöhte Sensitivität des Klons 1801 gegenüber des Klons DO-1 zu überprüfen:

- a) Clone DO 1 / Cat #43; Calbiochem
- b) Clone 1801 / Cat OP # 09; Calbiochem

12a)



12b)



12c)



Abb. 12: Gewebsschnitte eines hepatogen metastasierten kolorektalen Karzinoms
a) HE-Färbung
b) immunhistochemische Färbung (Ak p53-1801)
c) immunhistochemische Färbung (Ak p53-DO 1)

Der Primärantikörper des Klon DO-1 stellt einen gereinigten monoklonalen IgG_{2a} Antikörper der Maus dar. Er bindet an das Epitop zwischen den Aminosäuren 21 und 25 des humanen p53-Proteins und bindet sowohl an wild-type als auch an mutiertes p53-Protein.

Der zweite von uns verwendete Primärantikörper bestand aus gereinigten monoklonalen IgG₁ Antikörpern, die ebenfalls sowohl an wild-type als auch an mutiertes humanes p53-Protein binden. Als Bindungsstelle dient das Epitop, das zwischen den Aminosäuren 46 und 55 des Proteins liegt.

Beide Primärantikörper hatten bereits in früheren Untersuchungen ihre Eignung, auch bei archiviertem Gewebe (formalfixiert und paraffineingebettet) eingesetzt werden zu können, bewiesen (LANE 1979; KASTAN 1991).

Die Primärantikörper wurden in der angegebenen, in eigenen Vorversuchen bestimmten Verdünnung in PBS-Puffer unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin (BSA) eingesetzt. Die von uns durchgeführten Verdünnungsreihen zeigten bei den eingesetzten Primärantikörpern in einer Verdünnung von 1 : 50 die deutlichsten Färbeergebnisse, ohne dabei unspezifische Färberesultate zu erzeugen.

Alle Schritte der beschriebenen Färbungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Hämatoxylin-Eosin-(HE)- Färbemethode

1. Entparaffinieren der Schnitte 2 x 5 Minuten in Rotihistol
2. Dehydrieren in absteigender Alkoholreihe
3. Waschen in Aqua dest.
4. Anfärben der Zellkerne für 2 Minuten mit Hämaun nach „Mayer-Neu“
Hämaun im Verhältnis 1 : 1 mit Aqua dest. verdünnt
5. Wässern der Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser
6. Anfärben des Zytoplasmas für 3 Minuten mit Eosin (0,1%)
7. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
8. Klären 2 x 2 Minuten in Rotihistol
9. Eindeckeln der Präparate mit Entelan

Die immunhistochemische Färbemethode

- 1.) Entparaffinieren der Schnitte 2 x 5 Minuten in Rotihistol
- 2.) Dehydrieren der Präparate in absteigender Alkoholreihe
- 3.) Waschen in Aqua dest.
- 4.) Kochen in der Mikrowelle (650 W) für 25 Minuten in Citratpuffer (pH 6,0)
- 5.) Abkühlen der Präparate auf Raumtemperatur
- 6.) 2 x 3minütiges Waschen mit PBS (phosphate buffered saline)
- 7.) Hemmen der Gewebssperoxidase durch 30 minütiges Bad in einem Gemisch aus 200 ml PBS und 3 ml 30% H_2O_2 (Wasserstoffperoxid)
- 8.) 2 x 3minütiges Waschen mit PBS
- 9.) Applikation des Normalserums (Vectastain / ABC Maus Elite Kit) in einer Verdünnung von 1,5 : 100 mit PBS + 1% BSA (Bovines Serum Albumin) und 10minütige Inkubation bei 37°C im Wasserbad
- 10.) Inkubation der Schnitte mit Primärantikörper (p53-Ak: 1: Clone DO-1; Calbiochem, 2: Clone 1801; Calbiochem) in einer Verdünnung von 1 : 50 mit PBS + 1% BSA für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad
- 11.) 2 x 3minütiges Waschen mit PBS
- 12.) Inkubation der Schnitte mit biotiniliertem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 200 mit PBS + 1% BSA für 30 Minuten bei 37°C in Wasserbad
- 13.) 2 x 3minütiges Waschen mit PBS
- 14.) Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex für 30 Minuten bei 37°C (für 10 Schnitte : 1ml PBS + 10µl A (Avidin) + 10µl B (biotiniliertes Enzym))
- 15.) 2 x 3minütiges Waschen mit PBS
- 16.) Anfärben mit einer Lösung aus 200ml Wasser + 10 Tabletten DAB (à 10 mg) + 200 µl Wasserstoffperoxid 30% für 5 Sekunden bei Raumtemperatur
- 17.) Waschen der Schnitte für 2 Minuten in Leitungswasser
- 18.) Waschen der Schnitte für 4 Minuten in Aqua dest.
- 19.) Gegenfärben mit Gill's Hämalun in einer Verdünnung von 1 : 1 mit Aqua dest. für 25 Sekunden
- 20.) Waschen der Schnitte für 4 Minuten in Aqua dest.
- 21.) Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
- 22.) Klären 2 x 5 Minuten in Rotihistol
- 23.) Eindeckeln der Präparate mit Entelan

2.3. Auswertung

Bei jeder Färbereihe wurde sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierzu wurden Gewebsschnitte desselben Schilddrüsenkarzinoms verwendet, dessen Mutation des p53-Gens molekularbiologisch und dessen p53-Expression immunhistochemisch bereits nachgewiesen war. Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch die gleiche Menge an Aqua dest. ersetzt. Eindeutige Ergebnisse dieser beiden Kontrollen waren die Voraussetzung für die Auswertung der jeweiligen Versuchsreihe.

Die Bewertung der Schnitte erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Zunächst wurde bei Lupenvergrößerung (25fach) das Tumorgewebe aufgesucht und anschließend dieses Areal bei stärkerer Vergrößerung (100fach) beurteilt.

Die Auswertung der Färbungen erfolgte nach den von DOWELL et OGDEN 1996 veröffentlichten Richtlinien. Die Beurteilung der immunhistochemischen Färberesultate erfolgte semiquantitativ in 4 Gruppen, wobei eine Auszählung immunhistochemisch positiver Zellkerne in repräsentativen Anteilen des Tumors durchgeführt wurde:

- **R1:** negatives Färberesultat ohne Nachweis spezifischer immunhistochemischer Färbereaktion
- **R2:** schwach positive Färbereaktion mit nukleärer Anfärbung von 1 bis 10 Zellkernen pro histologischen Gewebsschnitt
- **R3:** positive Färbereaktion bei Nachweis von Tumorzellkernfärbungen in weniger als 5 % der Tumorzellkerne
- **R4:** positive Färbereaktion bei mehr als 5% der Tumorzellkerne bei gleichen Kriterien

Zur späteren Auswertung wurden die zu den Gruppen R1 und R2 gehörigen Schnitte als negativ, die Färbungen der Gruppen R3 und R4 als positiv definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Daten der Untersuchungsgruppe

Es wurden in der Gruppe der PLC insgesamt 49 Fälle untersucht, die sich aus 28 Fällen von HCC und 21 Fällen von CAC zusammensetzen.

Der Beobachtungszeitraum zum Erheben der posttherapeutischen Ergebnisse erstreckte sich bis März 1997.

Bis zu diesem Zeitpunkt waren 45 der 49 Fälle (91%) von PLC verstorben. Über den Krankheitsverlauf der anderen 4 Fälle (9 %) lagen keine Daten vor.

3.1.1. Patienten mit hepatozellulärem Karzinom

Von den Patienten mit HCC waren 8 weiblich und 20 männlich. Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von 1:2,5 (Abb. 12).

Das Patientenalter reichte von 36 bis 78 Jahren, mit einem Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 57,1 +/- 2,53 Jahren. Der Median lag bei 61. Am häufigsten traten die Tumoren im Alter von 60 bis 69 Jahren auf (Abb.13).

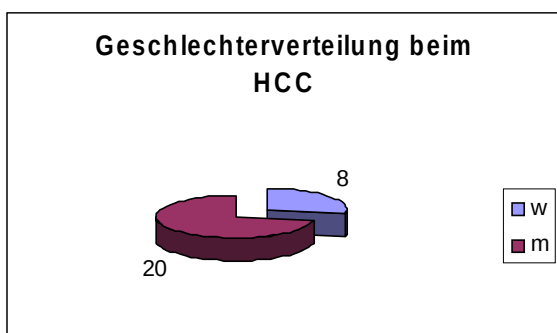


Abb. 12: Geschlechterverteilung der Patienten mit HCC (n=28)

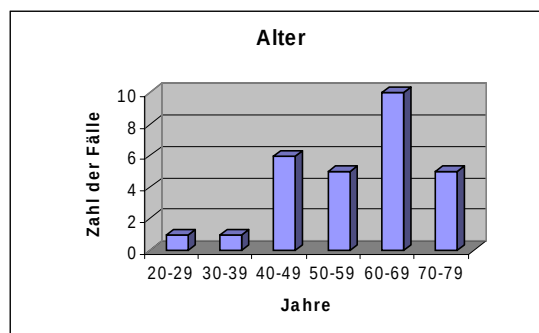


Abb.13: Altersverteilung der Patienten mit HCC (n=28)

Die in dieser Studie untersuchten HCC wurden mittels der TNM-Klassifikation beurteilt (vgl. Anhang).

In zwei Fällen standen keine Daten zur Verfügung, so daß hier nur Aussagen über 26 Fälle gemacht werden konnten (Abb. 14).

Die Hälfte (13 Fälle; 50%) der untersuchten HCC wurden in das Stadium T3 eingestuft. 5 der HCC (19,2%) zeigten einen maximalen Durchmesser von weniger als 2 cm mit vaskulärer Invasion und wurden folglich dem Stadium T2 zugeordnet. Weitere 5 Tumoren (19,2%) wurden aufgrund ihres fortgeschrittenen Wachstums mit T4 klassifiziert. Tumoren, die im Durchmesser geringer als 2 cm und keinen Einbruch ins Gefäßbett zeigten, waren in dem Patientengut selten (3 Fälle; 11,5%).

Bei den meisten Patienten (16 Fälle; 61,5%) war es zum Operationszeitpunkt noch nicht zu Tumorabsiedelungen in die regionalen Lymphknoten gekommen (N0). In 8 Fällen (30,7%) konnte der Lymphknotenstatus nicht beurteilt werden (NX). In nur 2 Fällen (7,7%) wurde ein Befall der regionären Lymphknoten aufgezeigt (N1).

Fernmetastasen waren bei den Patienten dieser Studie, die primär chirurgisch und kurativ therapiert wurden, nicht vorhanden (M1). In fast einem Drittel der Fälle (7; 26,9%) konnte der Status der Fernmetastasierung nicht beurteilt werden (MX). Eine Metastasierung wurde in keinem Fall nachgewiesen (M1).

TNM – Klassifikation HCC (n=26)	N	%
T1	3	11,5
T2	5	19,2
T3	13	50,0
T4	5	19,2
N0	16	61,5
N1	2	7,7
N2	0	0
NX	8	30,8
M0	19	73,1
M1	0	0
MX	7	26,9

Abb. 14: Einteilung der untersuchten Leberzellkarzinome (n=26) nach der TNM-Klassifikation

Die HCC wurden nach dem unterschiedlichen histopathologischen Differenzierungsgrad der Tumoren (Grading) den Stadien G1-G4 zugeordnet (vgl. Anhang) (Abb. 15). Dies war in 5 Fällen nicht möglich.

Die größte Gruppe umfaßte 14 Fälle (60,9%) mit dem Grading G2. Es wurden 5 Fälle (21,7%) dem Grading G1 und 4 Fälle (17,4%) dem Grading G3 zugeordnet. Kein Fall zeigte das Grading G4.

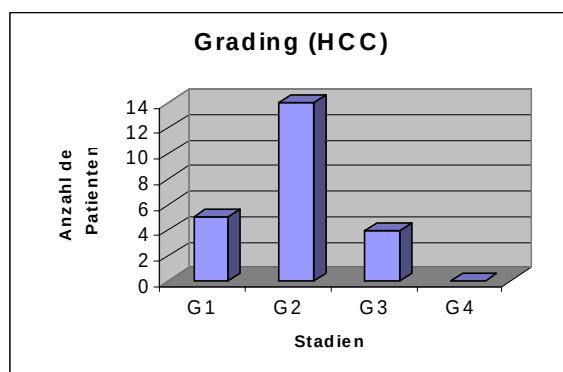


Abb.15: Verteilung der untersuchten HCC (n=23) nach dem Differenzierungsgrad

Der Großteil der HCC (18 Fälle; 75,0%) lag als solitärer Knoten vor (Abb. 16). In den übrigen 6 Fällen, die ausgewertet wurden, zeigte sich das Tumorwachstum in 2 Fällen (8,3%) in 2 Knoten, in 3 Fällen (12,5%) in 3 Herden und in nur 1 Fall (4,2%) in multiplen Foci. Zu dem Wachstumsmuster und der Größe des Tumors konnten in 4 Fällen keine Daten gewonnen werden.

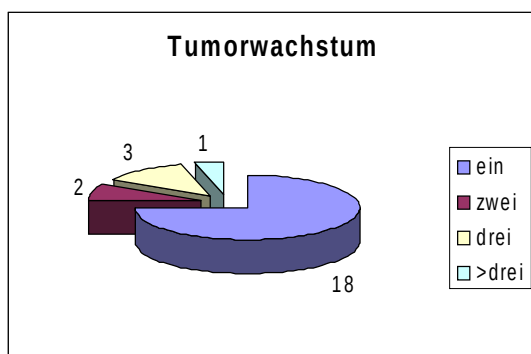


Abb. 16: Verteilung nach der Anzahl der Tumorherde (n=24)

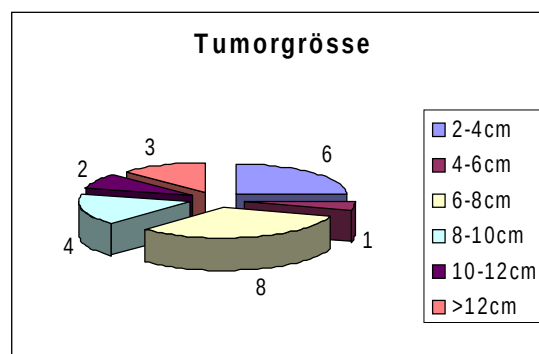


Abb. 17: Verteilung nach dem Durchmesser der Tumorherde (n=24)

Die Tumorknoten wiesen in einem Drittel der Fälle (8 Patienten; 33,3%) einen Durchmesser von 6-8 cm auf (Abb.17). Relativ häufig (6 Fälle; 25,0%) zeigten sich kleine Tumoren mit einem Querschnitt von 2 bis 4 cm. Tumoren von 8 bis 10 cm traten in 4 Fällen (16,7%) auf. Selten waren Tumoren mit einem Durchmesser von 4 bis 6 cm (1 Fall; 4,2%), 10 bis 12 cm (2 Fälle; 8,3%) und größer als 12 cm (3 Fälle; 12,5%) . Lagen multiple Knotenbildungen vor, so wurde der größte vorhandene Querschnitt zur Auswertung herangezogen.

Die untersuchten HCC zeigten histologisch in der Hälfte der Fälle (12 Fälle) ein trabekuläres Wachstumsmuster (Abb.18). In weiteren 8 Fällen (33,3%) wuchsen die Tumoren solide. Pseudoglanduläre Strukturen hatten 3 (12,5%) und szirrhöse Strukturen 1 Fall (4,2%) ausgebildet.

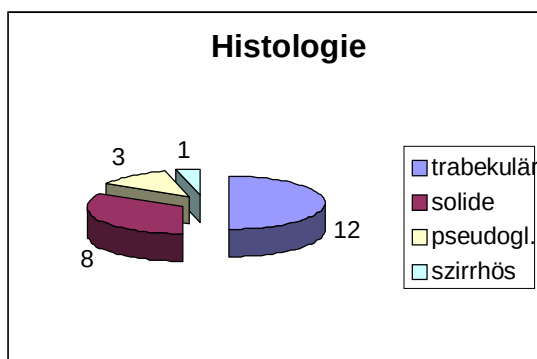


Abb. 18: Aufteilung der HCC (n=24) nach der histologischen Diagnose

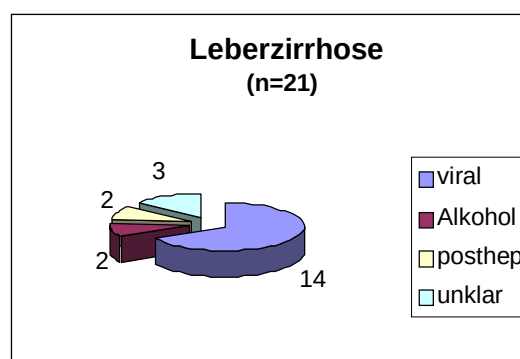


Abb. 19: Aufteilung der Leberzirrhosen bei HCC nach der Ursache (n=21)

21 der insgesamt 28 HCC (75,0%) waren in zirrhotischen Lebern entstanden (Abb.19). In den verbleibenden 7 Fällen (25,0%) zeigte die Leber keinen Umbau der Textur.

Als Ursache für den zirrhotischen Umbau der Leber wurde in 14 Fällen (50%) eine chronische virale Hepatitis eruiert, die durch die alleinige Infektion mit dem HBV in 7 Fällen (50%) und mit dem HCV in 4 Fällen (28,6%) verursacht war. Mischinfektionen in der Konstellation HBV+HCV lagen in 2 Fällen (14,3%) und HBV+HDV in einem Fall (7,1%) vor. In einem Fall wurde HBV-Antigen serologisch nachgewiesen, ohne daß es zu einer Zirrhose geführt hatte. Die nicht viral bedingten 7 Fälle (25,0%) von Leberzirrhose waren in jeweils 2 Fällen (28,6%) einerseits durch chronischen Alkoholabusus und andererseits posthepatisch verursacht. In 3 Fällen (42,9%) blieb der Grund für den Umbauprozess der Leber ungeklärt.

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren 25 der 28 Patienten (89,3%) bereits verstorben.

Über den Verlauf der Erkrankung der restlichen 3 Patienten (10,7%) standen keine Daten zur Verfügung. Die durchschnittliche postoperative Überlebenszeit (+/- Standardabweichung) betrug 12,8 (+/- 10,9) Monate, wobei 6 Fälle (24,0%) bereits im ersten postoperativen Monat verstarben, und der längste Überlebenszeitraum 42 Monate war. Dies entspricht einem Median von 12. Das Einjahresüberleben lag bei 52,0 % der Fälle.

3.1.2. Patienten mit cholangiozellulärem Karzinom

Die 21 untersuchten CAC traten in 15 Fällen (71,4%) bei Frauen und in 6 Fällen (28,6%) bei Männern auf, was einem Geschlechterverhältnis von 2,5:1 entspricht (Abb.20).

Die Altersverteilung reichte von 33 bis 79 Jahren mit einem Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 56,5 (+/- 2,61) Jahren. Der Median liegt bei 55. Ein Verteilungsgipfel zeigte sich zwischen dem 50. und dem 59. Lebensjahr (Abb.21).

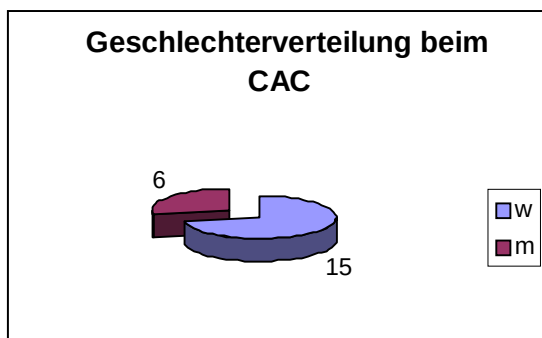


Abb. 20: Geschlechterverteilung der Patienten mit CAC (n=21)

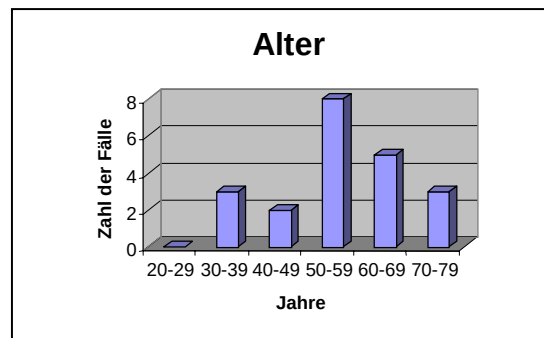


Abb. 21: Altersverteilung der Patienten mit CAC (n=21)

Zur weiteren statistischen Auswertung lagen in 3 Fällen (14,3%) der insgesamt 21 Fälle von CAC keine Angaben vor.

Bei der Aufteilung der verbleibenden 18 Fälle wurde in 7 Fällen (38,9%) das Tumorstadium mit T3 klassifiziert (Abb. 22). Mit absteigender Häufigkeit wurden 5 Fälle (27,8%) dem Stadium T4, 4 Fälle (22,2%) dem Stadium T3 und 2 Fälle (11,1%) dem Stadium T1 zugeordnet.

Bei der Beurteilung des Lymphknotenstatus (N) konnte in 8 Fällen (44,4%) kein Urteil abgegeben werden (NX). Während in 6 Fällen (33,3%) der Befall der Lymphknoten positiv war (N1), zeigten 4 Fälle (22,2%) keine Lymphknotenbeteiligung (N0).

Über eine zum Zeitpunkt der Operation eventuell vorliegende Metastasierung (M) konnte in 12 (66,6%) der 18 Fälle keine Aussage getroffen werden (MX). In weiteren 6 Fällen (33,3%) wurde eine Fernmetastasierung ausgeschlossen (M0). In keinem Fall hatte der Primärtumor bereits in andere Organe gestreut (M1).

TNM – Klassifikation CAC (n=18)	n	%
T1	2	11,1
T2	4	22,2
T3	7	38,9
T4	5	27,8
N0	4	22,2
N1	6	33,3
N2	0	0
Nx	8	44,4
M0	6	33,3
M1	0	0
MX	12	66,6

Abb. 22: Einteilung der untersuchten cholangiozellulären Karzinome (n=18) nach der TNM-Klassifikation

Die Verteilung nach dem histopathologischen Differenzierungsgrad (G) zeigte die meisten (12 von 18 Fällen; 66,6%) CAC in der Gruppe G2 (Abb. 23). 5 Fälle (27,8%) wiesen ein niedrig differenziertes Wachstumsmuster auf (G3). Ein Karzinom wurde mit G1 klassifiziert.

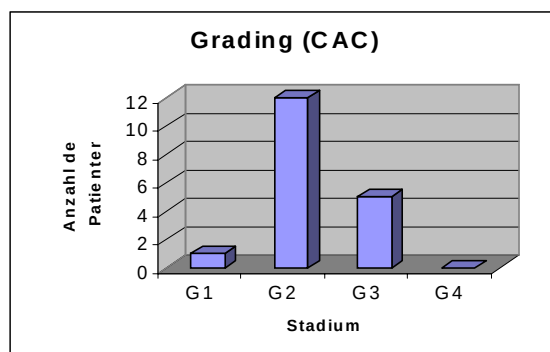


Abb. 23: Verteilung der untersuchten CAC (n=18) nach dem Differenzierungsgrad

Die CAC wuchsen in 9 der 18 Fälle (50%) solitär (Abb.24). In 5 Fällen (27,8%) zeigte sich der Tumor in 2 und in einem Fall (5,5%) in 3 Foci. Ein multiples Auftreten des Tumors wurde in 3 Fällen (16,7%) beobachtet.

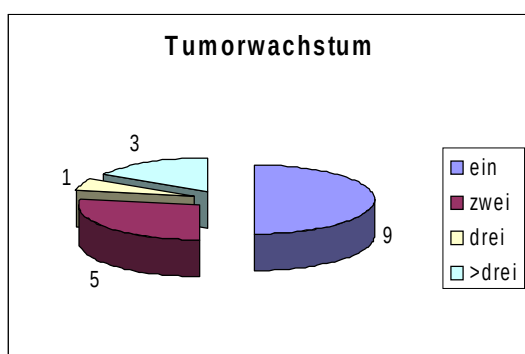


Abb. 24: Verteilung nach der Anzahl der Tumorherde bei CAC (n=18)

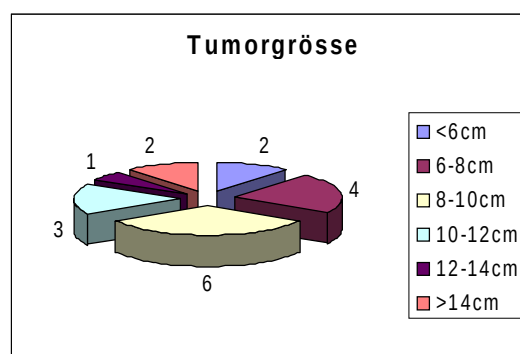


Abb. 25: Verteilung nach dem Durchmesser der Tumorherde bei CAC (n=18)

Die Ausdehnung der Tumoren lag im Durchschnitt bei 9,8 cm, wobei der Durchmesser des kleinsten 2,5 cm und des größten Knotens 18 cm betrug (Abb. 25). Am häufigsten traten Tumoren (6 Fälle; 33,3%) mit einem Querschnitt von 8 bis 10 cm auf. Kleinere Tumoren mit einem Durchmesser von 6 bis 8 cm traten in 4 Fällen (22,2%), mit einem Durchmesser von weniger als 6 cm in 2 Fällen (11,1%) auf. Überdurchschnittlich große Tumoren hatten eine Häufigkeit der Fälle von 3 (16,7%) (10 bis 12 cm), 1 (5,5%) (12 bis 14 cm) und 2 (11,1%) (>14 cm). Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren 20 (95,2%) der 21 Fälle von CAC bereits verstorben. In einem Fall lagen hierzu keine Daten vor. Die postoperative Überlebenszeit der Patienten mit CAC wies einen Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 13,7 (+/- 6,0) Monaten auf.

Die postoperativ verlebten Monate schwankten in einem Bereich zwischen 1 und 48, und der Median lag bei 14. Nach einem Jahr postoperativ lebten noch 60,0% der Fälle.

3.1.3. Patienten mit Lebermetastasen

In der Gruppe der LM wurden 25 Fälle untersucht.

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung war von 14 (56,0%) der 25 Patienten ein aktueller Gesundheitszustand zu eruieren. Von den uns bekannten 14 Patienten lebten 9, und 5 waren bereits verstorben.

Von den Patienten waren 9 weiblich und 16 männlich, was einem Geschlechterverhältnis von 1:1,7 entspricht (Abb.26).

Das Durchschnittsalter betrug zum Operationszeitpunkt 60,8 Jahre mit einer Standardabweichung von 2,55 Jahren und einem Median von 65 (Abb.27). Der jüngste Patient war 29 Jahre und der älteste 75 Jahre alt.

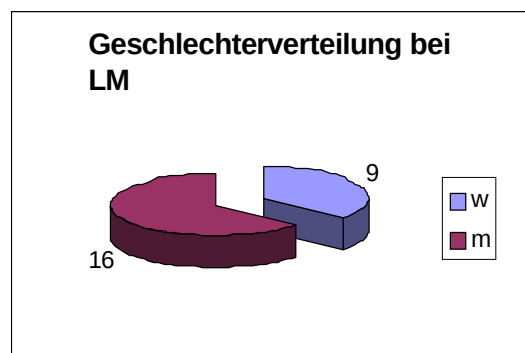


Abb. 26: Geschlechterverteilung der Patienten mit LM

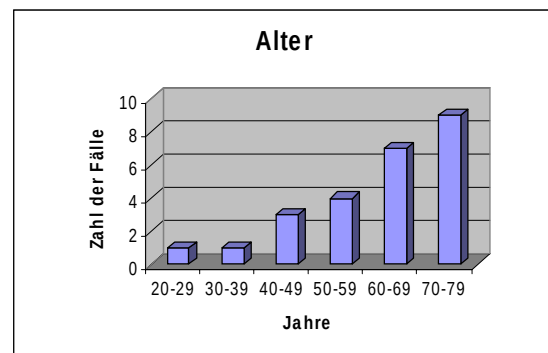


Abb. 27: Altersverteilung der Patienten mit LM

In 21 (84,0%) der 25 Fälle war der Primärtumor, der in die Leber metastasiert hatte, im Bereich von Kolon und Rektum lokalisiert (Abb. 28). Bei 2 Patientinnen (8,0%) kam es zur hepatogenen Filiarisierung eines Mammakarzinoms. In jeweils einem Fall (4,0%) war die Leberbeteiligung auf dem Boden eines klarzelligen Nierenkarzinoms und Karzinoms der Glandula submandibularis entstanden.

Zur weiteren Auswertung standen in 23 Fällen Daten zur Verfügung.

Das histopathologische Grading (G) zeigte in 17 (73,9%) der ausgewerteten 23 Fälle das Stadium G2 (Abb. 29). Sowohl das Grading G1 als auch das Grading G3 umfaßten jeweils 3 Fälle (jeweils 13,0%). Es lag kein Fall mit dem Grading G4 vor.

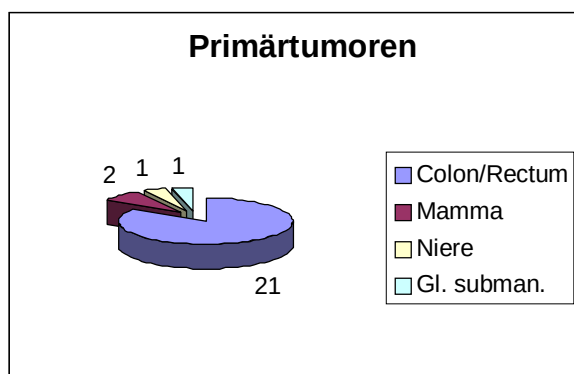


Abb. 28: Verteilung der LM nach der Lokalisation der Primärtumoren (n=25)

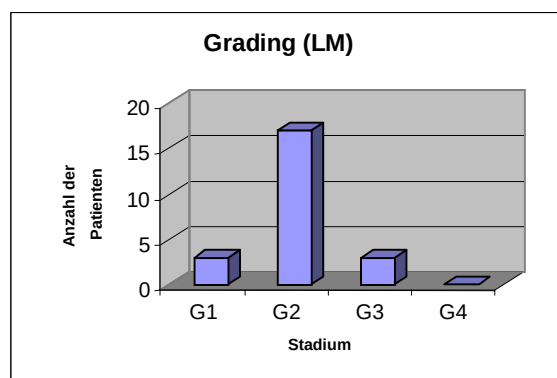


Abb. 29: Verteilung der LM nach dem Differenzierungsgrad (n=23)

Die LM lagen in 14 Fällen (60,9%) als solitary Herde vor (Abb.30). 4 Fälle (17,4%) zeigten 2 Herde und 2 Fälle (8,7%) wiesen 3 Herde auf. Multiple Infiltrationen (>3 Herde) stellten sich in 3 Fällen (13,0%) dar.

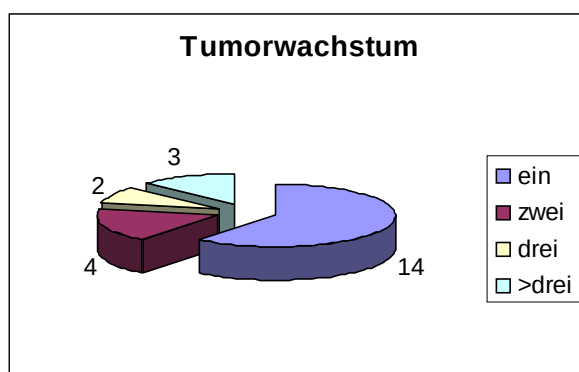


Abb. 30: Verteilung der LM (n=23) nach der Anzahl der Tumorerde

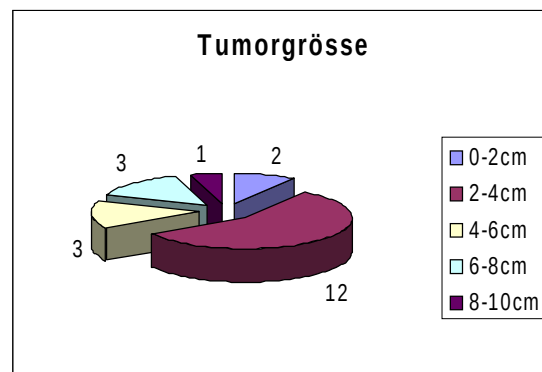


Abb.31: Verteilung der LM (n=23) nach der Grösse der Tumorerde

Die Herde zeigten am häufigsten (12 Fälle; 52,2%) einen Durchmesser von 2 bis 4 cm (Abb. 31). In jeweils 3 Fällen (jeweils 13,0%) lag der Durchmesser bei 4 bis 6 cm bzw. 6 bis 8 cm. Kleine Tumoren (0 bis 2 cm) waren mit 2 Fällen (8,7%) und große Tumoren (8 bis 10 cm) mit 1 Fall (4,3%) selten. Kein Tumor zeigte einen Querschnitt von mehr als 10 cm.

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren 11 (44,0%) der 25 Patienten bereits verstorben. Bei den anderen 14 Fällen, die noch lebten, betrug die Nachbeobachtungszeit im Durchschnitt 33,5 Monate mit einem Minimum von 21 Monaten, einem Maximum von 46 Monaten und einem Median von 28 Monaten.

3.2. Immunhistologische Untersuchungen

Es wurden insgesamt 114 Präparate mit jeweils zwei verschiedenen Primärantikörpern (Klon 1801; Klon DO-1) untersucht.

Bei der Auswertung reduzierte sich die Anzahl der Präparate auf 74.

Die Auswertung der p53-Expression wurde, mit besonderem Augenmerk auf das Färbeverhalten der Zellkerne, semiquantitativ mit einer Beurteilung von R1 bis R4 vorgenommen (vgl. Kapitel: Material und Methoden).

Die Gewebsschnitte der Abb. 32 geben für jede Kategorie (R1-R4) ein Beispiel.

3.2.1. Färbung mit p53-Antikörper-1801

Tumor	R1	R2	R3	R4	Mittelwert (+/- Standardabweichung)
HCC	10	7	7	4	2,18
CAC	6	4	8	3	2,38
LM	7	1	5	12	2,88

Abb. 33: Ergebnistabelle der p53-Expression nach immunhistochemischer Färbung mit dem Antikörper 1801

In der Gruppe der HCC waren 10 Fälle (35,7%) komplett negativ (R1) (Abb. 33 und 34). Die Ergebnisse zeigten 7 Fälle (25,0%) mit einer schwach positiven Färbereaktion (R2) und weitere 7 Fälle (25,0%) mit positivem Färbeverhalten, das weniger als 5% der Tumorzellkerne betraf (R3). Ein Nachweis der p53-Expression in mehr als 5% der Zellkerne war in 4 Fällen (14,3%) zu führen (R4).

Die HCC-Präparate zeigten Färbungen mit dem Reaktionsgrad (R) von 1 bis 4. Der Mittelwert (+/- Standardabweichung) betrug 2,18 (+/- 1,0).

Die CAC-Präparate zeigten nach Reaktion mit dem p53-Antikörper-1801 in 8 Fällen (38,1%) ein positives Färbeverhalten des Grades R3. In 6 Fällen (28,6%) stellten die Kerne keine Expression des p53- Proteins dar (R1).

Eine schwache Anfärbung der Gewebsschnitte war in 4 Fällen (19,0%) feststellbar (R2). Eine starke Expression von p53 hatten 3 (14,3%) der untersuchten Fälle (R4).

Hieraus ergab sich ein Mittelwert (+/- Standardabweichung) der Anfärbbarkeit (R) der CAC-Präparate von 2,38 (+/- 1,1).

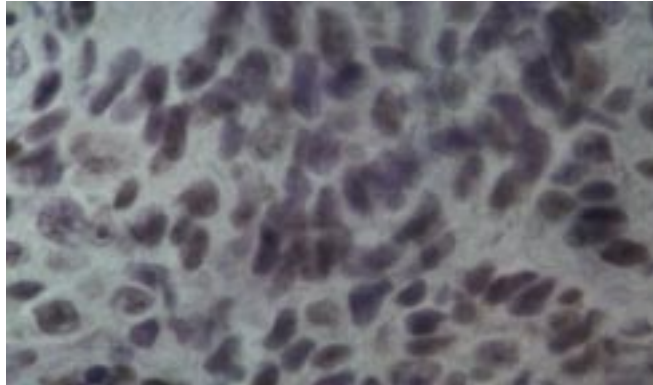


Abb.: 32a



Abb.: 32b

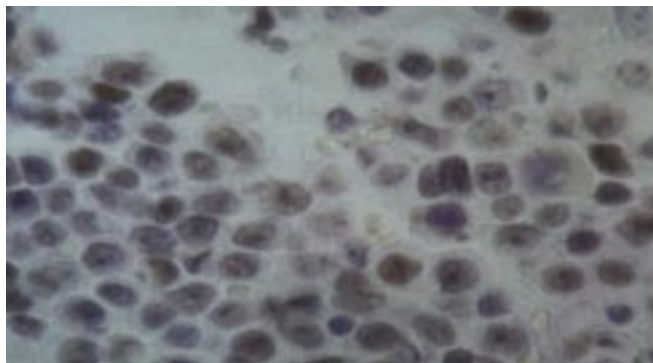


Abb.: 32c

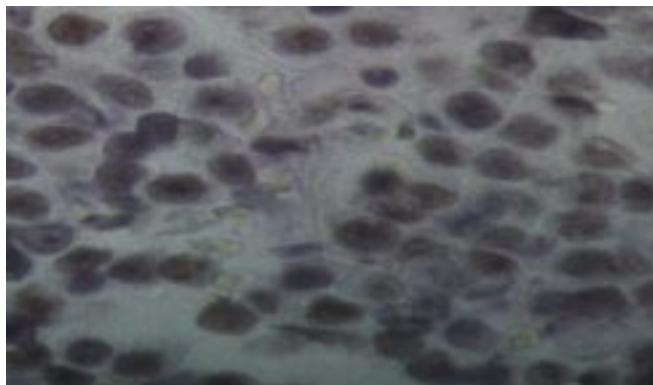


Abb.: 32d

Abb. 32a bis d: Immunhistologischer Nachweis des p53 - Proteins in Tumorgewebe
a, R1 b, R2 c, R3 d, R4

Bei den 25 Fällen von LM waren 12 Fälle (48,0%) mit starker Färbereaktion der Zellkerne vorhanden (R4). In 7 Fällen (28,0%) zeigten die Kerne keine p53-Expression (R1). Ein positives Färbeverhalten des Grades R3 wurde in 5 Fällen (20,0%) beobachtet. Eine schwache Kernexpression von p53 war mit einem Fall (4,0%) selten (R2). In der Gruppe der LM konnte ein Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung) für den Reaktionsgrad R von 2,88 ($\pm$ 1,3) errechnet werden.

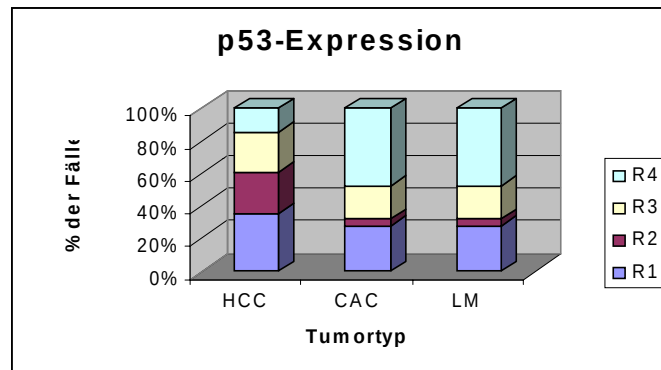


Abb. 34: Auftreten der p53-Expression nach der Reaktion mit p53-Antikörper 1801

3.2.2. Färbungen mit p53-Antikörper DO-1

Tumor	R1	R2	R3	R4	Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung)
HCC	15	5	6	2	1,82
CAC	9	3	7	2	2,09
LM	7	2	12	4	2,52

Abb. 35: Ergebnistabelle der p53-Expression nach immunhistochemischer Färbung mit dem Antikörper DO-1

Die HCC-Präparate zeigten bei der Verwendung des p53-Primärantikörpers (Klon DO-1) in den meisten Fällen (15 Fälle; 53,6%) keine Expression (R1) (Abb. 35 und 36). Bei 6 Fällen (21,4%) zeigte sich ein positives Färbeverhalten in weniger als 5% der Zellkerne (R3). In 5 Fällen (17,9%) war p53-Protein nur in geringen Mengen nachweisbar (R2). Ein deutlicher Nachweis der p53-Expression gelang in 2 Fällen (7,1%) (R4). Hieraus ergibt sich ein Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung) des R-Wertes von 1,82 ($\pm$ 1,09). Die Färbung der CAC zeigte 9 Fällen (42,9%), bei welchen die Zellkerne keine Reaktion vorwiesen (R1). In 7 Fällen (33,3%) lag eine positive Färbung des Reaktionsgrades R3 vor. Sowohl Präparate mit schwacher Färbung (R2) (3 Fälle; 14,3%) als auch Fälle mit deutlicher Expression (R4) (2 Fälle; 9,5%) waren eher selten.

CAC-Präparate zeigten im Mittel einen Reaktionsgrad (R) der Färbung von 2,09 ($\pm 1,0$ Standardabweichung).

Die Gruppe der LM enthielt 12 Fälle (48,0%) mit einem Reaktionsgrad R3. 7 Fälle (28,0%) waren komplett negativ (R1). Bei 4 Fällen (16,0%) waren mehr als 5% der Tumorzellkerne immunhistochemisch stark positiv (R4). Selten (2 Fälle; 8,0%) lag eine schwache p53-Expression vor (R2).

Die Kerne zeigten im Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung) eine p53-Expression (R) von 2,52 ($\pm 1,1$).

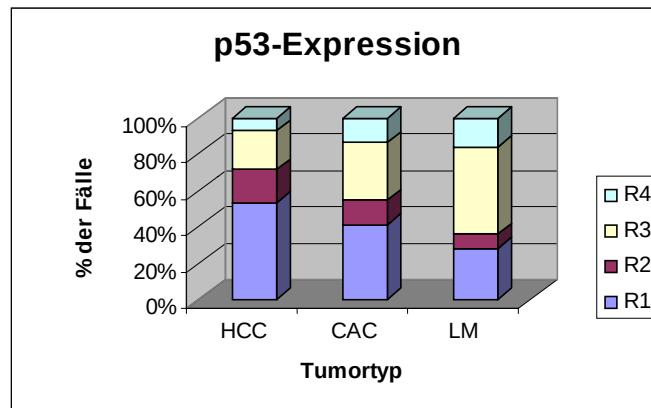


Abb. 36: Auftreten der p53-Expression nach der Reaktion mit dem p53-Antikörper DO-1

Unterschiedliche Anteile eines Tumors zeigten eine voneinander differierende p53-Expression. Bevorzugt in den peripheren Zellschichten des Tumorareals war regelmäßig eine verstärkte immunhistologische Anfärbung für p53 erkennbar.

Diese quantitativen Ergebnisse lassen sich in der Tendenz auch in den Gewebsschnitten bestätigen, die für eine quantitative Bestimmung von p53 aufgrund schlechter Qualität nicht ausgewertet werden konnten.

3.2.3. Vergleich der p53-Expression mit dem p53-1801- und p53-DO-1-Antikörper

Die Antikörper p53-1801 und p53-DO-1 zeigten zumeist gleiche Färberesultate. Wie in Abb. 30 dargestellt, trifft dies in 60 von 74 Fällen zu. In 29 Gewebsschnitten waren bei beiden Antikörpern die Ergebnisse positiv, während in 31 Fällen die Färbungen negativ waren. Differenzen ergaben sich in insgesamt 14 Gewebsschnitten. Die Ergebnisse, die mit dem Antikörper p53-1801 erzielt wurden, waren in 10 Fällen positiv, in denen der Antikörper p53-DO-1 keine Anfärbung zeigte. In 4 Fällen war das Färbeverhalten des Antikörpers DO-1 positiv, wogegen der Antikörper 1801 negative Ergebnisse zeigte. Somit waren im Vergleich die Ergebnisse des p53-1801-Antikörpers häufiger positiv als bei dem Antikörper DO-1. Die große Übereinstimmung der Färberesultate wird auch im Ergebnis des McNemer-Tests deutlich.

		AK 1801	
		pos.	neg.
AK DO-1	pos.	29	4
	neg.	10	31

Abb. 37: Darstellung der Färberesultate bei Verwendung der Antikörper 1801 und DO-1

Auch im quantitativen Nachweis zeigte sich dieser Trend, denn positive Schnitte bekamen nach Reaktion mit dem Antikörper 1801 im Vergleich zu den Färberesultaten mit dem Antikörper DO-1 häufiger die Bewertung R4. Dies wird aus der Abb. 38 ersichtlich. In der Gruppe der negativen Färberesultate zeigten Gewebeschnitte nach Reaktion mit dem Antikörper p53-DO-1 häufiger keine Anfärbung (R1) im Gegensatz zum Antikörper p53-1801, dessen negative Färbungen zumeist der Gruppe R2 zugeordnet wurden. Diese Unterschiede im Färbeverhalten zeigten keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$).

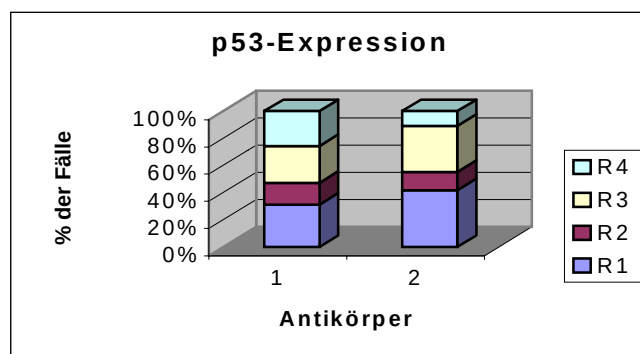


Abb. 38: Vergleich des Färbeverhaltens (1= AK 1801 ; 2= AK DO-1)

3.2.4. Beziehung der p53-Expression zu den Tumortypen und den Patientendaten

Alle untersuchten Lebertumoren zeigten beim weiblichen Geschlecht häufiger einen positiven p53-Protein-Nachweis als in der Gruppe der Männer.

Dies wird besonders bei den CAC deutlich, was in der Abbildung 39 graphisch dargestellt ist.

82% der positiven Gewebsschnitte stammten von Frauen und nur 18% von Männern. Bei den negativen Ergebnissen war das prozentuale Verhältnis Frauen:Männer dagegen 60:40.

In keiner der Gruppen (HCC,CAC,LM) stellte sich eine signifikante Geschlechterdominanz bei den immunhistochemischen Resultaten dar ($p > 0,05$).

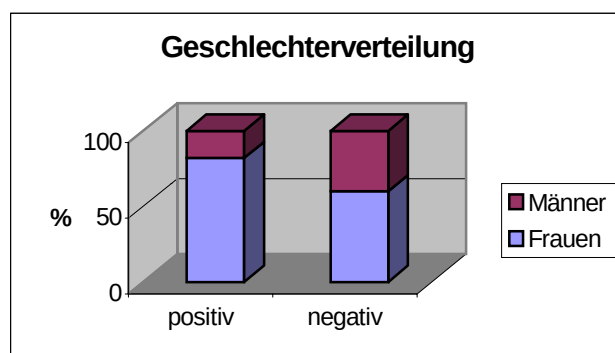


Abb. 39: Geschlechterverteilung in der Gruppe der CAC in Abhängigkeit des immunhistochemischen Färbeverhaltens

Eine statistische Abhängigkeit der p53-Expression vom Lebensalter des Patienten besteht sowohl bei HCC als auch bei CAC ($p=0,001$ bzw. $p=0,035$).

Patienten mit positivem Färberesultat waren sowohl in der Gruppe der CAC als auch der HCC im Durchschnitt 20 Jahre jünger als die Fälle mit negativem Ergebnis.

In der Gruppe der LM wurde keine Beziehung zwischen Lebensalter und p53-Expression gesehen ($p>0,05$).

Die Auswertung des Tumorwachstums zeigte bei LM mit multiplen Tumorherden signifikant häufiger eine p53-Expression als bei solitärem Focus ($p=0,04$).

Bei negativem p53-Protein-Nachweis liegt in der Mehrzahl der Fälle ein singulärer Tumorherd vor. Tumoren mit multiplen Foci zeigten häufiger eine p53-Expression.

Sowohl bei HCC als auch CAC konnte dieser Zusammenhang nicht gesehen werden ($p>0,05$).

Bei den HCC zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Größe des Tumors bzw. des größten Tumors bei multipler Metastasierung und dem immunhistochemischen Nachweis (Abb.40). Bei Tumoren mit großem Durchmesser waren statistisch häufiger positive Fäberesultate zu verzeichnen ($p=0,04$).

Bei keinem der beiden anderen untersuchten Tumorentitäten war dies der Fall.

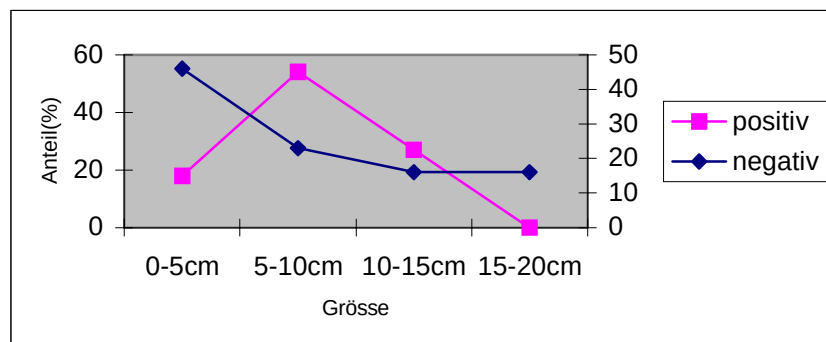


Abb. 40: Größenverteilung bei HCC (in %), aufgeschlüsselt nach immunhistochemischem Ergebnis

Bei der Auswertung der p53-Expression bei HCC-Patienten zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem histologischen Wachstumsmuster ($p=0,023$).

Die Tumoren des szirrhösen und soliden Typs zeigten signifikant häufiger eine p53-Expression als Tumoren des trabekulären und pseudoglandulären Typs ($p=0,02$).

Es wurde nur in der Gruppe der HCC die Abhängigkeit der p53-Expression und der postoperativen Überlebenszeit von der Existenz einer Leberzirrhose untersucht.

Die Reaktion beider p53-Primärantikörper war unabhängig von einer Leberzirrhose ($p>0,05$).

Der zirrhotische Umbau der Leber war in unserer Studie ohne Beziehung zum postoperativen Überleben ($p>0,05$).

Die Betrachtung der p53-Expression bei den HCC-Patienten mit unterschiedlichem Grading ergab keine statistisch signifikante Beziehung der Tumordifferenzierung mit dem Fäberesultat ($p>0,05$) (Abb. 34). Diesen Zusammenhang zeigten auch nicht die

Untersuchungen an CAC und LM ($p > 0,05$). In der Abbildung 41 addieren sich die Daten der einzelnen Gruppen (z.B. HCC pos.) zu jeweils 100%.

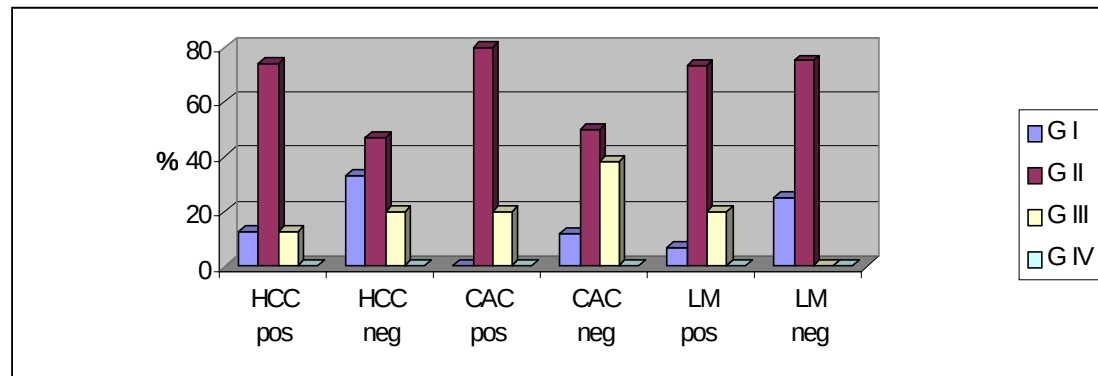


Abb. 41: Darstellung der Tumorentitäten, aufgeschlüsselt nach Grading-Stadien (G 1 bis 4) und immunhistochemischem Färberesultat

Bei den HCC bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium (T) und der p53-Expression ($p = 0,01$) (Abb.34). Ein positives Färberesultat steht mit einem höheren Tumorstadium nach den TNM-Klassifikation (siehe Anhang) in Zusammenhang et vice versa. Beispielhaft steht hierfür die Abb. 42, aus der dieser Zusammenhang bei HCC ersichtlich wird. Die Daten, aufgeschlüsselt nach positivem und negativem Färberesultat, addieren sich jeweils zu 100%.

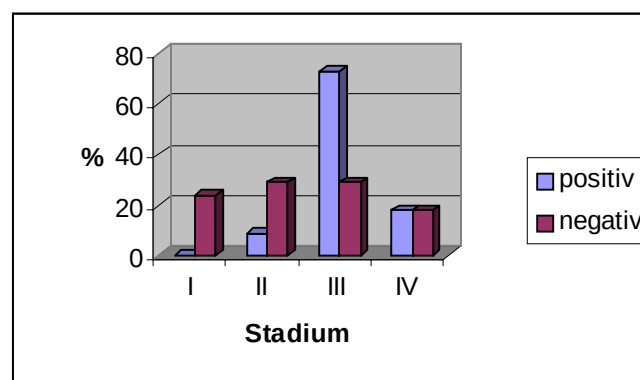


Abb. 42: Tumorstadium bei HCC aufgeschlüsselt nach immunhistochemischem Ergebnis

In der Gruppe der LM und CAC war diese Beziehung nicht ersichtlich ($p > 0,05$). Sowohl die Lymphknotenmetastasierung (N) als auch der Status der Fernmetastasierung (M) stand bei keinem der untersuchten Tumorentitäten in einem signifikanten Zusammenhang mit der p53-Expression, unabhängig davon, mit welchem Antikörper diese nachgewiesen wurde ($P > 0,05$).

Bei allen untersuchten Tumorentitäten (HCC, CAC, LM) zeichnete sich der Trend ab, daß ein positives Färberesultat mit einem kürzeren postoperativen Überleben in Beziehung zu stehen scheint (et vice versa).

Der Nachweis der p53-Expression korrelierte signifikant mit dem Überleben der Patienten in der Gruppe der HCC und CAC ($p=0,04$) (Abb. 36 und 37).

Bei LM konnte nur ein Trend, nicht aber eine statistische Signifikanz für den Zusammenhang des Überlebenszeitraums mit dem immunhistochemischen Färberesultat aufgezeigt werden ($p>0,05$) (Abb. 38).

Die univariante Analyse der Überlebenskurven nach Kaplan und Meier ergab eine signifikante Korrelation für die immunhistologische Reaktion mit dem Überleben der Patienten mit PLC, nicht aber bei LM (Abb. 43, 44 und 45).

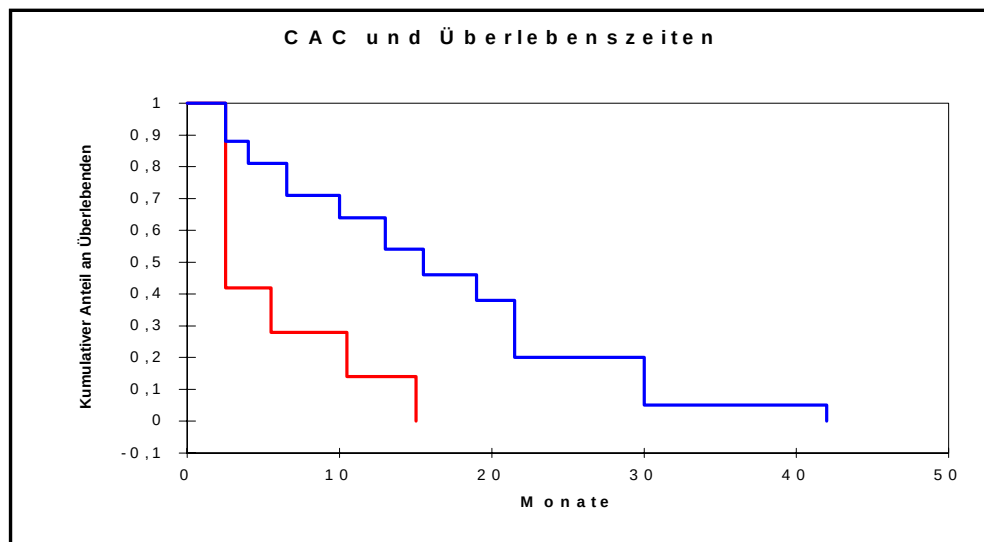


Abb. 43: Überlebenskurven, aufgeschlüsselt nach dem immunhistochemischen Färbeergebnis bei CAC (x=positiv ; x=negativ)

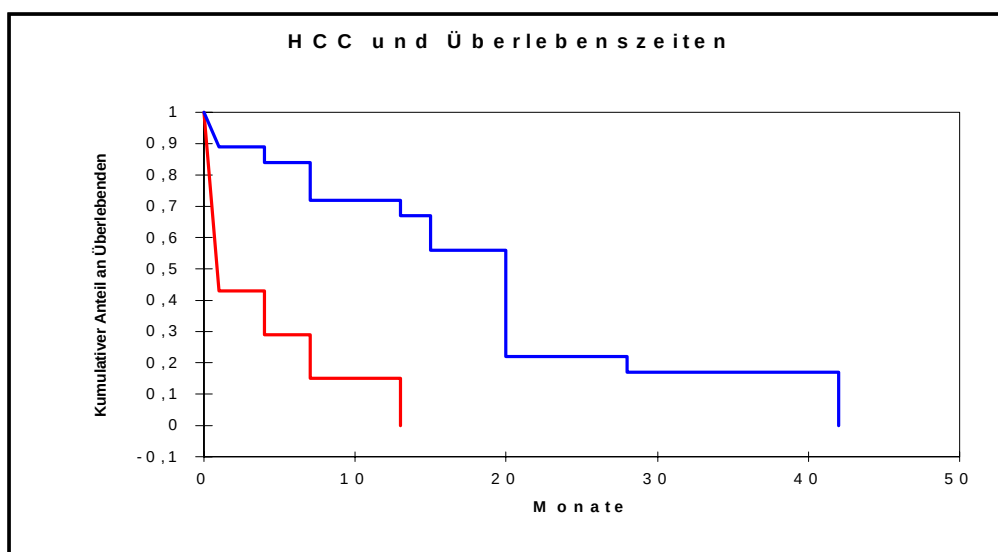


Abb. 44: Überlebenskurven, aufgeschlüsselt nach dem immunhistochemischen Färbeargebnis bei HCC (**x=positiv**; **x=negativ**)

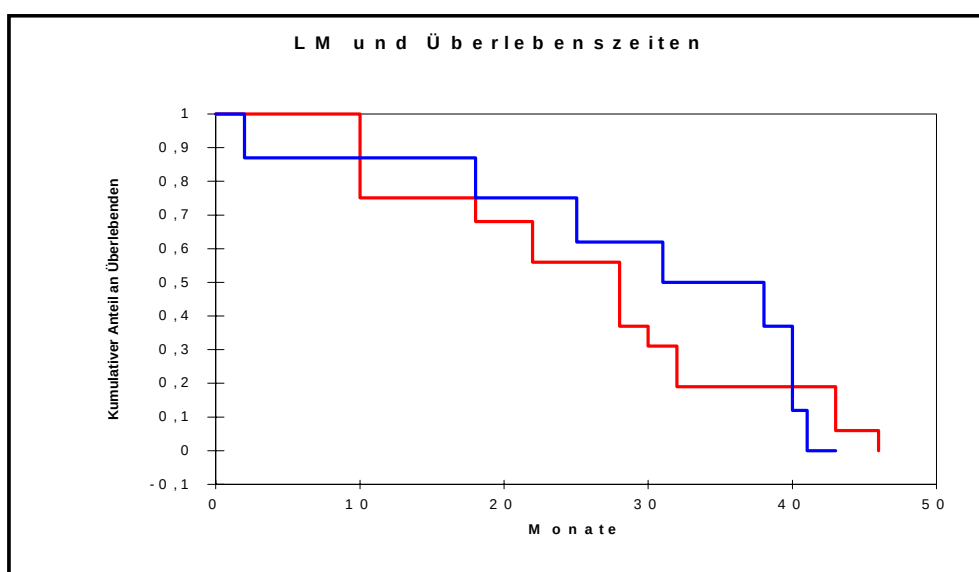


Abb. 45: Überlebenskurven, aufgeschlüsselt nach dem immunhistochemischen Färbeargebnis bei LM (**x=positiv**; **x=negativ**)

4. DISKUSSION

Die Mutation des p53-Gens ist die am häufigsten nachgewiesene genetische Veränderung in Tumoren (HOLLSTEIN 1991; LEVINE 1995) und wurde auch bei primären und sekundären Leberkarzinomen beschrieben (COHEN 1994; TERADA 1994; ZHAO 1994).

In der vorliegenden Studie wurde Gewebe von 74 Lebertumoren (CAC, HCC, LM) auf eine immunhistochemisch nachweisbare p53-Expression untersucht.

Das Probenmaterial der PLC stammt von 26 männlichen und 23 weiblichen Patienten. Die Verteilung der Patienten mit HCC entsprach den Angaben in der Literatur, denn in unserem Kollektiv waren die männlichen im Vergleich zu den weiblichen Fällen mit einer Ratio von 5:2 deutlich in der Überzahl (NAGARATNAM 1984; LANIER 1987; JOHNSON 1991; TSAO 1994; KACZYNSKI 1996).

Die Aufteilung der untersuchten Fälle von CAC widersprach den Literaturangaben, welche eine annähernd gleiche Verteilung auf beide Geschlechter beschrieben. Wir fanden in unserem Patientengut eine Ratio Frauen:Männer von 2,5:1, womit das Krankengut deutlich mehr Patientinnen enthielt, als dies in vergleichbaren Studien der Fall war (KAWARADA 1984; TAKEUCHI 1984; KACZYNSKI 1996). Eine Ursache für diese Diskrepanz ist aus den vorliegenden Unterlagen nicht ersichtlich.

Die Geschlechterverteilung der Fälle mit LM weist eine Ratio Frauen:Männer von 1:1,7 auf, was sich mit den Angaben der Literatur deckt (SILVESTRI 1988).

Das PLC stellt in Deutschland einen Tumor des mittleren und höheren Lebensalters dar. In dem von uns untersuchten Patientengut lag der Altersdurchschnitt der am HCC erkrankten Patienten bei 57,9 Jahren (25 bis 78 Jahre). Dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur, die in Gegenden mit niedriger Morbidität das HCC in seiner adulten Form als eine Erkrankung des mittleren und höheren Lebensalters sehen, das selten vor dem 40. Lebensjahr auftritt und einen Altersgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr aufweist (TAKEUCHI 1984; HEY 1985; JOHNSON 1991; TSAO 1994; KACZYNSKI 1996). Gegensätzliches gilt für Regionen, in denen das PLC eine hohe Morbidität in der Bevölkerung zeigt. Dort sind die Patienten im Durchschnitt jünger als in Gegenden mit niedriger Erkrankungshäufigkeit (KAWARADA 1984; NAGARATNAM 1984; LANIER 1987). In High-Incidence-Areas des PLC sind die Hälfte der Erkrankten jünger als 30 Jahre (LANIER 1987; MUIR 1987).

Das CAC entsteht zumeist im mittleren und höheren Lebensalter.

Im Vergleich zum HCC entsteht es im Durchschnitt zwischen 2 und 8 Lebensjahre später (KAWARADA 1984; OKUDA 1984; KACZYNSKI 1996). In der Literatur schwanken die Angaben über das durchschnittliche Erkrankungsalter der CAC-Patienten zwischen Werten von 51 Jahren (KAWARADA 1984) und 70 Jahren (KACZYNSKI 1996). Unser Patientengut war mit einem Durchschnittsalter von 53,1 Jahren (33 bis 79 Jahre) vergleichsweise jung. Wie die Abweichungen des Erkrankungsalters unserer CAC-Fälle von den Angaben in der Literatur zu begründen sind, kann nur vermutet werden. Möglicherweise sind aufgrund der methodischen Voraussetzungen aus dem großen Operationsgut überzufällig häufig Gewebe jüngerer Patienten ausgewählt worden.

In dieser Studie waren Patienten mit CAC im Durchschnitt fast 5 Jahre jünger als HCC-Patienten, was ebenfalls von den Literaturangaben abweicht. Der Grund für diese Abweichung ist ungeklärt.

Unsere Daten zeigen den metastatischen Befall der Leber als ein Ereignis des mittleren und höheren Lebensalters. Patienten mit LM waren im Durchschnitt 60,8 Jahre alt, wobei der jüngste 33 Jahre und der älteste Erkrankungsfall 75 Jahre alt war. Auch in der Literatur wird der metastatische Befall der Leber als ein Ereignis beschrieben, das zumeist um das 50. und 60. Lebensjahr auftritt (SCHEELE 1995).

Herkunft und Lebensgewohnheiten scheinen in der Genese des PLC eine Rolle zu spielen. Dies mag als ein Erklärungsansatz für die weltweiten Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit des PLC angesehen werden. Die uns vorliegenden, eigenen Krankendaten erlauben keine Aufschlüsselung des Patientengutes nach Nationalitäten bzw. Bevölkerungsgruppen, so daß wir aus den uns vorliegenden Daten den beschriebenen Sachverhalt nicht kommentieren können.

Es wird berichtet, daß sowohl ausgewanderte Asiaten als auch Mexikaner die niedrigere Leberkarzinominzidenz ihrer Gastländer annehmen, obwohl sie weiterhin eine höhere Morbidität des PLC als die einheimische weiße Bevölkerung zeigen (MUNOZ 1987; SUAREZ 1987). Dem liegt zugrunde, daß Einwanderer, indem sie die Lebensgewohnheiten ihrer Gastländer annehmen, sich durch präventives Verhalten (z. B. geringere Ingestion von Aflatoxin B₁) selber schützen (ANTHONY 1994). Als Ursache einer vergleichsweise erhöhten Erkrankungshäufigkeit der Einwanderer gegenüber der einheimischen Bevölkerung wird eine erhöhte Durchseuchung mit viralen Hepatitisinfektionen als Ursache vermutet (SUAREZ 1987). Auch unsere Daten bestätigen den Zusammenhang zwischen viralen Hepatitiden und der Entwicklung von Malignomen der Leber, die sich zumeist über den zirrhotischen Umbau der Leber als Präkanzerose manifestieren. In 75% der HCC-Fälle wurde eine Zirrhose festgestellt, die in über der Hälfte der Fälle (66%) viraler Genese (HBV 50%; HCV 29%; HBV+HCV 14%; HBV+HDV 7% der Fälle) war. Der zirrhotische Umbau der Leber, unabhängig seiner Ätiologie, prädisponiert in besonderem Maße für das HCC (TSUKUMA 1993) und wird von einigen Autoren als Hauptrisikofaktor für die Entstehung maligner Lebertumoren angesehen (ARRIGONI 1985; ZAMAN 1985). Dieser Zusammenhang kann auch aus den Daten unseres Patientenkollektivs vermutet werden, denn 21 der von uns untersuchten 28 HCC hatten sich auf dem Boden einer Leberzirrhose entwickelt. In der Gruppe der untersuchten Fälle von CAC wird dieser Zusammenhang nicht deutlich, da nur in 2 von 21 Fällen eine Zirrhose vorlag.

Der Anteil der Zirrhosen viraler Genese in unserem Kollektiv liegt deutlich über unseren Erwartungen, da in Deutschland der Leberzirrhose zumeist chronischer Alkoholabusus zugrunde liegt (SCHUBERT 1982; KRESS 1992). In unserem Patientenkollektiv war in nur 2 Fällen die Zirrhose äthyltoxisch bedingt. Der Grund hierfür kann in einer zu niedrigen Lebenserwartung von Alkoholikern gesehen werden, als daß ausreichend Zeit für die Entstehung eines Leberkarzinoms vorhanden wäre (ARICO 1994). Alkoholabusus ohne

Zirrhose geht mit einem nur leicht erhöhten Risiko einher, während bei Alkoholikern mit Leberzirrhose das Risiko der Entwicklung eines Leberkarzinoms um das Zehnfache gesteigert ist (ADAMI 1992).

Der parasitäre Befall der Gallengänge mit dem chinesischen Leberegel (*Clonorchis sinensis*) sowie dem Katzenleberegel (*Opisthorchis viverrini*) (ANTHONY 1994), Gallengangsektasien, Cholelithiasis und die sklerosierende Cholangitis (AKAI 1994; RINGE 1994) werden als Risikofaktoren bei der Entstehung des CAC angesehen. Wir konnten in keinem Fall von CAC einen dieser Risikofaktoren eruieren.

In Übereinstimmung mit der Literatur (HEY 1985) verteilen sich die von uns untersuchten Fälle von HCC auf die makroskopisch zu differenzierenden Tumorvarianten wie folgt:

In unserem Patientenkollektiv zeigten 18 Fälle (75%) makroskopisch ein solitäres, großknotiges Wachstumsmuster (großknotiges Karzinom), das am häufigsten zu finden ist. In dieser Studie untersuchte Tumoren wuchsen in 5 Fällen (20,8%) multizentrisch (multizentrisches Karzinom). Nur in einem Fall (4,2%) konnte ein diffuses Wachstumsmuster beobachtet werden (diffuses Karzinom). In Übereinstimmung mit der Literatur stellte dieser Subtyp die seltenste dieser drei Karzinomvarianten dar (HEY 1985).

Mikroskopisch werden beim HCC vier Wachstumsformen unterschieden (RIEDE et SCHÄFER 1993). In der Histologie zeigte die Hälfte der Gewebsschnitte (12 Fälle) das Bild eines hochdifferenzierten Karzinoms mit Ausbildung trabekulärer Strukturen (trabekulärer Typ). Die Ausbildung drüsiger Strukturen von meist hochdifferenzierten Tumorzellen wurde in 3 Fällen (12,5%) beobachtet (pseudoglandulärer Typ). Der szirrhöse Wachstumstyp mit mäßig differenzierten Tumorzellen kam in dem Untersuchungsgut nur einmal (4,2%) vor. In 8 Fällen (33,3%) waren die Tumorzellen niedrig differenziert und wiesen eine erhebliche Zellpolymorphie auf. Das trabekuläre Gewebsmuster ging dabei völlig verloren (solider Typ). Makroskopisch läßt das CAC ein knotiges oder diffuses Wachstumsmuster erkennen. In der Histologie stellt sich das CAC meist als ein gut differenziertes sklerosierendes Adenokarzinom dar. Weder eine makroskopische noch mikroskopische Zuordnung unserer Gewebsschnitte von CAC war mit den vorliegenden Daten durchführbar.

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Metastasierung in die Leber am häufigsten nach dem Pfortadertyp, während eine Verschleppung von Tumorzellen nach dem Hohlvenen- bzw. Lungentyp seltener zu beobachten ist. Auch in dem von uns untersuchten Patientengut erfolgte die Metastasierung am häufigsten nach dem Pfortadertyp. Allerdings lag sein Anteil mit 84% gegenüber anderen Metastasierungswegen im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen höher. So findet sich in der Literatur eine Verteilung in 57% der Fälle nach dem Pfortadertyp, in 30% der Fälle nach dem Hohlvenentyp und in 13% der Fälle nach dem Lungentyp (WALTHER 1948). Eine Begründung für die Diskrepanz der eigenen Ergebnisse von den Angaben in der Literatur ist uns aus den vorliegenden Unterlagen nicht ersichtlich. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten in der Gruppe der HCC in 39,3% der Fälle bei der Verwendung des Primärantikörpers p53-1801 und in 28,6% der Fälle bei Einsatz des p53-Antikörpers DO-1 einen immunhistochemisch positiven Nachweis der

p53-Expression im Zellkern. Diese Ergebnisse liegen etwas unter den in der Literatur gemachten Angaben über Untersuchungen an HCC-Fällen (COHEN 1992; KRESS 1992; WEE 1995; ZHAO 1994). Ein Grund dafür mag die jahrelange Archivierung der Gewebsschnitte sein, die zu einer verminderten Anfärbbarkeit führen kann, da das ursprünglich im Gewebe vorhandene p53-Protein über die Zeit denaturiert wird (BARTEK 1993). Das in dieser Studie untersuchte Gewebe hatte zum Teil eine Archivierungszeit von bis zu 8 Jahren. Andererseits finden sich Studien, bei denen im Vergleich unserer Daten deutlich seltener positive Ergebnisse der Immunhistochemie beobachtet wurden (COLLIER 1994). Um die Diskrepanz dieser Ergebnisse besser verstehen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen.

In unseren Fällen von CAC konnte mit dem Antikörper 1801 in 52,4% der Fälle und mit dem Antikörper-DO-1 in 42,9% der Fälle eine Expression des p53-Proteins nachgewiesen werden. Die wenigen mit CAC-Präparaten durchgeführten Untersuchungen zeigen im Durchschnitt weniger häufig ein positives Färberesultat (KIBA 1993; TERADA 1994). So wird berichtet, daß in keinem der untersuchten Fälle von CAC mit dem Antikörper 1801 eine p53-Expression aufgezeigt werden konnte (TERADA 1994). Die in dieser Veröffentlichung dargestellten Ergebnisse wurden ohne Vorbehandlung der Gewebsschnitte vor der Färbung erzielt. Dies läßt vermuten, daß die Präparate nach Vorbehandlung in der Mikrowelle, wie sie in dem von uns verwendeten Versuchsprotokoll nach SHI et al. (1991) vorgesehen ist, ein verstärktes Färbeverhalten zeigen. Veröffentlichungen mit dem Primärantikörper DO-1 bei CAC existieren in der Literatur nicht.

Untersuchungen der p53-Expression in LM liegen in großer Anzahl vor (NAGAI 1994; KASTRINAKIS 1995). In Abhängigkeit des Primärtumors werden sehr unterschiedliche und sich zum Teil widersprechende Angaben über den immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins gemacht. Diese reichen bei in die Leber metastasierten Karzinoiden von keinem einzigen immunhistochemisch positiven Fall bis hin zu Metastasen kolorektaler Karzinome mit einem positiven Färberesultat von 80-90% (KASTRINAKIS 1995). Unsere Ergebnisse zeigen in 68,0% (Antikörper 1801) bzw. in 64,0% (Antikörper DO-1) der untersuchten LM ein positives immunhistochemisches Färberesultat. Dies deckt sich mit den bei anderen Studien beobachteten Mutationsraten des p53-Gens bei LM (NAGAI 1994).

Die Auswahl der beiden von uns verwendeten Primärantikörper erfolgte aufgrund der Angaben in der Literatur (LANE 1979; KASTAN 1991; EI-DEIRY 1993). Beide Antikörper stellen monoklonale p53-Antikörper dar, die an unterschiedliche Epitope des humanen p53-Proteins binden.

Unsere Ergebnisse bestätigen den in der Literatur bereits beschriebenen Trend, daß der p53-Antikörper des Klon 1801 im Vergleich zum p53-Antikörper des Klon DO-1 eine höhere Sensitivität und Spezifität aufzeigt (RESNICK 1995). Während der Antikörper 1801 bei 39 der 74 Präparate (52,7%) eine p53-Expression im Zellkern nachwies, waren dies beim Primärantikörper p53-DO-1 weniger (33; 44,6%). Eine statistische Verbindung dieser Werte konnte mittels des McNemer-Tests dargestellt werden.

Eigene Untersuchungen zeigten keine statistisch signifikante Beziehung zwischen p53-Expression und Geschlecht der Patienten, obwohl das von Frauen stammende Gewebe häufiger eine p53-Expression als das der Männer aufwies.

Ein positives immunhistochemisches Färberesultat stand bei CAC und HCC in einem statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Lebensalter. In Tumoren älterer Patienten konnte signifikant häufiger eine p53-Expression nachgewiesen werden als in Neoplasien jüngerer Patienten. Hierüber lagen uns keine Angaben aus der Literatur vor.

In einer Studie wird von einem Zusammenhang der p53-Expression und der Tumorgroße (T) bei Leberkarzinomen berichtet (COHEN 1992; HSU 1994). Diese Verknüpfung konnten wir nur bei den von uns untersuchten HCC feststellen. Bei diesen Tumoren waren positive immunhistochemische Ergebnisse statistisch signifikant mit einem grossen Durchmesser korreliert et vice versa. Im Gegensatz dazu konnten die Untersuchungen an CAC und LM diesen Zusammenhang nicht herstellen.

Der Lymphknotenstatus (N) der untersuchten Tumorerkrankungen stand in keinem Zusammenhang mit dem immunhistochemischen Ergebnis. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß das Patientengut stark selektiert war, da ein Lymphknotenbefall eine Operationskontraindikation dargestellt hätte.

Dies gilt ebenfalls für die Fernmetastasierung (M) des Tumors, so daß sich auch hier kein Zusammenhang mit der immunhistochemischen Färbung darstellte.

In der Literatur wird beschrieben, daß in Tumoren, die in multiplen Foci wachsen, häufiger eine p53-Expression zu beobachten ist (KASTRINAKIS 1995). Diese Aussage unterstützen unsere über LM gewonnenen Daten. Aus den Angaben über HCC und CAC wurde dieser Zusammenhang in unserem Patientengut nicht ersichtlich.

Bei der Auswertung der HCC-Patienten zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen p53-Expression und dem histologischen Wachstumsmuster. Die Tumoren des zirrhrösen und soliden Typs zeigten signifikant häufiger eine p53-Expression als Tumoren des trabekulären und pseudoglandulären Typs.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der p53-Expression und dem Grading der Tumoren aufgezeigt werden. Dies verwundert, weil in der Literatur bereits beschrieben wurde, daß mit zunehmender Entartung eines Tumors die Mutationshäufigkeit des p53-Gens zunimmt, vermehrt p53-Protein exprimiert wird und somit auch nachgewiesen werden kann (YONEMURA 1990; ITO 1992). Diese Ergebnisse stammen von Untersuchungen an Schilddrüsenkarzinomen. Warum sich diese Beziehung bei den in dieser Studie untersuchten Leberkarzinomen nicht herstellen ließ, ist für uns nicht ersichtlich und bedarf weiterer Untersuchungen.

In der Literatur ist beschrieben, daß p53-positive Tumoren ein kürzeres rezidivfreies Intervall sowie ein kürzeres Gesamtüberleben aufweisen. Diese Beziehung konnte bereits bei Karzinomen der Mamma, des Kolon, der Harnblase, der Lunge, bei Lymphomen und Weichteilsarkomen nachgewiesen werden (SARKIS 1993; BECK 1995; KASTRINAKIS 1995). In unserer Studie war die durchschnittliche Überlebenszeit des PLC bei nachgewiesener

p53-Expression 75% kürzer als bei negativem Ergebnis. Dieser statistisch signifikante Zusammenhang stellte sich sowohl in der Gruppe der CAC als auch der HCC dar. Während in der Literatur Studien die p53-Expression als Prognosefaktor bei PLC nur vermuten (COLLIER 1994) oder sogar komplett in Frage stellen (TERRIS 1997), wird von anderen Autoren der positive p53-Protein-Nachweis in direktem Zusammenhang mit einer kurzen Überlebenszeit gesehen (LAURENT-PING 1992). Unsere Ergebnisse unterstützen für das PLC die zuletzt gemachte Aussage. In der Untersuchung von p53-Antikörpern bei HCC-Patienten im Serum zeigte sich ein signifikant kürzeres postoperatives Überleben bei positivem Antikörpernachweis (SHIOTA 1997).

Im Gegensatz hierzu hat das immunhistochemische Färberesultat bei sekundären Lebermalignomen keinen prognostischen Aussagewert. Die uns zur Verfügung stehenden Daten zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Diese Aussage steht im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur, die einen progressiven Verlauf der Karzinomkrankung bei nachgewiesener p53-Expression für LM beschreiben (KASTRINAKIS 1995).

Eine Begründung hierfür ist aus den vorliegenden Daten nicht abzuleiten. Bei unseren Untersuchungen zeigt sich somit eine prognostisch signifikante Bedeutung für die Voraussage des rezidivfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens beim primären, nicht jedoch beim sekundären Leberkarzinom. Der prognostische Stellenwert der p53-Akkumulation muß jedoch auch in der Beziehung zu anderen Prognoseparametern betrachtet werden. Hier hat sich in unserer Untersuchung gezeigt, daß eine Korrelation zwischen etablierten Prognoseparametern, wie Tumorwachstum (T), Lymphknotenstatus (N), Fernmetastasierung (M) und Grading (G) nur teilweise herzustellen ist, wie dies bereits detailliert dargestellt wurde. Es stellt sich die Frage, inwieweit der immunhistochemische Nachweis der p53-Akkumulation einen unabhängigen Prognosefaktor der Leberkarzinome darstellt. Unserer Ansicht nach kann aus den Ergebnissen dieser Untersuchung geschlußfolgert werden, daß der Nachweis des p53-Proteins beim PLC eine wichtige Hilfe bei der Abschätzung der Prognose sein kann. Diese aus einer retrospektiven Studie zum prognostischen Stellenwert des p53-Nachweises in Leberkarzinomen stammenden Daten müssen jedoch durch prospektive Untersuchungsreihen weiter evaluiert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Tumorsuppressorgen p53 spielt bei der Kontrolle des Zellzyklus eine zentrale Rolle. Das p53-Protein zeigt eine tumorsuppressive Wirkung und verhindert die Transformation und ungehemmte Vermehrung von Tumorzellen, indem es in seiner Funktion als „Wächter des Genoms“ in den Zellzyklus hemmend eingreift.

Der immunhistochemische Nachweis von p53 in den Tumorzellkernen zahlreicher Tumoren läßt auf den Funktionszustand des Proteins (nicht mutiert versus mutiert) schließen und hat sich als brauchbarer Prognosefaktor verschiedener Tumorleiden (u. a.: Mammakarzinom, kolorektales Karzinom) erwiesen.

Leberkarzinome zählen weltweit zu den häufigsten Karzinomen. LM stellen den Großteil der malignen Neoplasien der Leber dar. PLC treten in ihrer Häufigkeit mit starken geographischen Schwankungen auf. Global zeigt die Inzidenz des PLC eine steigende Tendenz.

Die durchgeführte Untersuchung beschäftigte sich mit der immunhistochemisch nachweisbaren p53-Expression in Zellkernen primärer und sekundärer Lebermalignome. Es wurde das Ziel verfolgt, die voneinander differierenden und teilweise widersprüchlichen Angaben in der Literatur mit den Untersuchungsergebnissen am eigenen Patientengut besser bewerten zu können.

Die Untersuchung wurde an insgesamt 114 archivierten Präparaten der Leber durchgeführt, von denen 74 zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse herangezogen wurden. Es wurden zwei monoklonale Primärantikörper verwendet, die an unterschiedliche Epitope des p53-Proteins binden.

Dabei konnte in etwa einem Drittel der Fälle von HCC ein positives immunhistochemisches Ergebnis verzeichnet werden (p53-Ak 1801=39%; p53-Ak DO-1=28%). In den restlichen Fällen war kein p53-Protein in dem Tumorgewebe erkennbar.

In der Gruppe der CAC zeigten etwa die Hälfte der Fälle (p53-Ak 1801=52%; p53-Ak DO-1=42%) eine nukleäre Expression des p53-Proteins. In allen anderen Fällen traf dies nicht zu.

Die untersuchten LM zeigten in etwa zwei Drittel der Fälle (p53-Ak 1801=68%; p53 Ak DO-1=64%) ein positives immunhistologisches Färbereultat.

In den anderen Fällen konnte keine Anfärbung der Tumorzellkerne beobachtet werden.

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der Malignitäts-Wertung (Grading) des Lebertumors und der Expression des p53-Proteins aufzeigen. Hiermit widersprechen wir den in anderen Studien bereits dargelegten Aussagen.

Eine positive immunhistochemische Färbereaktion stand beim PLC mit einem kürzeren Gesamtüberleben in Beziehung. Diese Arbeit verfestigte mit ihren Ergebnissen den Trend, daß p53-Veränderungen in der Genese und Progression des PLC einen zentralen Schritt induzieren.

Dieser Zusammenhang wurde aus unseren Daten bei LM nicht ersichtlich. Es scheint, daß noch mehr Faktoren neben der Mutation des p53-Gens, die in dieser Untersuchung nicht überschaubare Einflüsse darstellen, die Prognose von LM mitbestimmen.

Unserer Ansicht nach kann aus den Ergebnissen geschlußfolgert werden, daß der Nachweis der p53-Expression eine Hilfe bei der Beurteilung der Prognose des PLC sein kann und als prognostischer und prädiktiver Parameter brauchbar ist.

Es werden noch weitere Untersuchungsreihen notwendig sein, um in prospektiven Studien den prognostischen Stellenwert des p53-Nachweises in Leberkarzinomen zu evaluieren, und um auf die noch offenen Fragen zur Rolle des p53-Gens in der Entstehung von Lebermalignomen eine Antwort geben zu können.

6. ANLAGE

TNM-Klassifikation (UICC)

Im folgenden soll auf die einzelnen Bewertungskriterien, die im Rahmen der TNM-Klassifikation Anwendung finden, näher eingegangen werden:

Charakterisierung des Primärtumors (T):

T X	Tumor nicht beurteilbar
T 0	Kein Tumor nachweisbar
T 1	Solitärer Tumor (< 3 cm) auf einen Leberlappen begrenzt
T 2	Tumor (> 3 cm) auf einen Leberlappen begrenzt
T 2a	Solitärer Tumorknoten
T 2b	Multiple Tumorknoten
T 3	Tumorinfiltration beider Leberlappen
T 3a	Solitärer Tumorknoten mit Infiltration des Nachbarlappens
T 3b	Multiple Tumorknoten in beiden Leberlappen
T 4	Tumorinvasion in Nachbarorgane

Lymphknoten (N):

N X	Lymphknotenstatus nicht beurteilbar
N 0	Keine histologisch nachweisbaren Lymphknotenmetastasen
N 1	Histologisch nachgewiesene, regionäre Lymphknotenmetastasen in der Leberpforte
N 2	Histologisch nachgewiesene Lymphknotenmetastasen jenseits der Leberpforte

Fernmetastasen (M):

M X	Fernmetastasenstatus nicht beurteilbar
M 0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M 1	Fernmetastasen gesichert

Hieraus ergeben sich die folgenden klinischen Stadieneinteilungen der PLC:

Stadium I	T1, N0, M0
Stadium II	T2, N0, M0
Stadium III	T2, N0 bis N1, M0
Stadium IV	T4, N0 bis N2, M0 bis M1

Grading-Klassifikation

Im folgenden soll auf die Kriterien der histologischen und zytologischen Malignitäts-Wertung (Grading) bösartiger Tumoren näher eingegangen werden:

<u>Grading</u>	<u>Kriterien</u>
G1	Hoch differenzierter Tumor mit meist niedriger Malignität
G2	Mittelgradig differenzierter Tumor mit ebenfalls mittlerem Malignitätsgrad
G3	Wenig differenzierte Geschwulst mit meist hoher Malignität
G4	Völlig undifferenzierte, anaplastische Geschwulst mit höchster Malignität
GX	Grading nicht sicher möglich

(nach E. Grundmann)

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adami H**, Hsing AW, McLaughlin JK et al.: Alcoholism and liver cirrhosis in the etiology of primary liver cancer. *Int J Cancer* 1992; 51: 898-902
- Adson M.A**, Beart R.W: Elective hepatic resection. *Surg Clin North Am* 1977; 57: 339-360
- Akai PS**, Pungpak S, Chaicumpa W et al.: Serum antibody response to *Opisthorchis viverrini* antigen as a marker for opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 471-474
- Almog N**, Rotter V: Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochimica Biophys Acta* 1997; 1333(1): F1 - 27
- Andersson M**, Vyberg M, Visfeldt J: Primary liver tumors among Danish patients exposed to Thorotrast. *Radiation Res* 1994; 137: 262-273
- Anthony P.P**: Tumours and tumour - like lesions of the liver and biliary tract, in: MacSween, Anthony, Scheuer, Burt, Portmann (eds.): *Pathology of the liver*. Churchill Livingstone, 3. edition, (1994): 297 - 316
- Arico S**, Galatola G, Tabone M et al.: Amount and duration of alcohol intake in patients with chronic liver disease: an Italian multicentre study. *Ital J Gastroenterol* 1994; 26(2): 59 - 65
- Arrigoni A**, Zago P, Mazzucco D et al.: Cirrhosis and liver cancer. *Lancet* 1985; 2(8449): 277
- Arrowsmith C.H**, Morin P: New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene* 1996; 12: 1379 - 1385
- Baker S.J**, Fearon ER, Nigro JM et al.: Chromosom 17 deletions and p53 mutations in colorectal cancer. *Science* 1989; 244: 217 - 221
- Bannasch P**, Zerban H: Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. *IARC Sci Publ* 1992; 116: 389 - 427
- Barak Y**, Gottlieb E, Juven-Gershon T et al.: Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 1994; 8(15): 1739 - 1749
- Barkhausen S**: Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim Mammakarzinom: Eine Studie von 127 Mammakarzinompatienten der Universitäts-Frauenklinik Rostock. *Med Inaug-Diss.* Universität Rostock
- Bàrtek J**: Immunohistochemical analysis of the p53 oncoprotein on paraffin sections using a series of novel monoclonal antibodies. *J Pathol* 1993; 169: 27-34
- Bassendine MF**: Etiological factors in hepatocellular cancer. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1987; 1(1): 1 - 16
- Battifora H**: p53 immunohistochemistry: A word of caution. *Hum Pathol* 1994; 25(5): 435 - 437
- Beach D**: The cell cycle. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology* 1991; 56: 12 - 17

- Beck T**, Weller E, Weikel W et al.: Immunohistochemical detection and prognostic significance of p53 in the primary tumor of breast carcinoma patients. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1995; 55(5): 252-257
- Berg van der F**, Baas IO, Polak IM: Detection of p53 overexpression in routinely paraffin-embedded tissue of human carcinomas using a novel target unmasking fluid. *Am J Pathol* 1993; 142: 381 - 385
- Berns A**: Is p53 the only real tumor suppressor gene? *Curr Biol* 1994; 4(2): 137 - 139
- Blum HE**: Hepatocellular carcinoma: molecular biology aspects. *Zentralbl Chir* 1994; 119(11): 759 - 763
- Bolck F**: Leber und Gallenwege, in: *Spezielle pathologische Anatomie* (1978). Springer, Berlin Heidelberg New York: 123 - 134
- Bradbear R.A**: Hepatocellular carcinoma in hemochromatosis, in : *Iron and human disease* (ed.: Lauffer, RB.) CRC Press, Boca Raton 1992: 89-197
- Bruix J**: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989; 4: 1004-1006
- Bruner JM**, Connelly JH, Saya H: p53 protein immunostaining in routinely processed paraffin-embedded sections. *Mod Pathol* 1993; 6(2): 189-194
- Buetow KH**, Murray JC, Israel JL et al.: Loss of heterozygosity suggests tumor suppressor gene responsible for primary hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(22): 8852-8856
- Campani D**, Cecchetti D, Bevilacqua G: Immunocytochemical p53 detection by microwave oven heating of routinely formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1993; 171(2): 151-152
- Challen C**, Lunec J, Warren W et al.: Analysis of the p53 tumor-suppressor gene in hepatocellular carcinomas from Britain. *Hepatology* 1992; 16(6): 1362-1366
- Cho TK**, Gorina S, Jeffrey PD: Crystal structure of p53 tumour suppressor DNA complex: understanding tumourigenic mutations. *Science* 1994; 265: 346-355
- Choi TK**, Edward CS, Fan ST et al.: Results of surgical resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1990; 37(2): 172-175
- Cohen C**, DeRose PB: Immunohistochemical p53 in hepatocellular carcinoma and liver cell dysplasia. *Mod Pathol* 1994; 7(5): 536-539
- Cohen L.A.**: Ernährung und Krebs, in: *Krebs-Forschung, Diagnostik, Therapie*. Spectrum Akademischer Verlag 1992; 166-172
- Collier JD**, Carpenter M, Burt AD et al.: Expression of mutant p53 protein in hepatocellular carcinoma. *Gut* 1994; 35(1): 98-100
- Colombo M**, Cambieri R, Rumi MG et al.: Long-term delta superinfection in hepatitis B surface antigen carriers and its relationship to the course of chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1983; 85(2): 235-239
- Colombo M**, de Franchis R, Del Ninno E: Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 325(10): 675-680

- Cook GC:** Hepatocellular carcinoma: one of the world most common malignancies. *J Med* 1985; 233: 705-708
- Cordon-Cardo C:** Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147(3): 545-560
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA et al.:** Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265(5178): 1582-1584
- Deugnier Y, Battistelli D, Jouanolle H:** Hepatitis B virus infection markers in genetic haemochromatosis. A study of 272 patients. *J Hepatol* 1991; 13(3): 286-290
- Di Bisceglie AM:** Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1995; 15(1): 64-69
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL:** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356(6366): 215-221
- Dowell SP, Ogden GR:** The use of antigen retrieval for immunohistochemical detection of p53 over-expression in malignant and benign oral mucosa: a cautionary note. *J Oral Pathol Med* 1996; 25(2): 60-64
- Eckert J:** Helminthologie, in: Kayser, F.H. Bienz, K.A. Eckert, J. (eds.) *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme Verlag 1992; 8. Aufl.: 471-472
- El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM:** WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54(5): 1169-1174
- Eriksson S, Carlson J, Velez R:** Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1986; 314(12): 736-739
- Evans DM:** Angiosarcoma and hepatocellular carcinoma in vinyl chlorid workers. *Histopathologie* 1983; 7: 377-1049
- Fields S, Jang SK:** Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 1990; 249(4972): 1046-1049
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ:** The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57(7): 1083-1093
- Fricker J:** Hepatocellular carcinoma and p53 gene therapy. *Mol Med Today* 1996; 2(9): 361
- Fujimoto I:** Trend in incidence and mortality rates for selected primary sites in Osaka, in: *Cancer incidence and mortality in Osaka 1963-1989* 1993; 21-29
- Gannon JV, Greaves R, Iggo R et al.:** Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; 9(5): 1595-1602
- Gashau W, Mohammed I:** Hepatitis B viral markers in Nigerian patients with primary liver carcinoma. *Trop Geogr Med* 1991; 43(1-2): 64-67
- Goetz IE, Weinstein C, Roberts E:** Effects of protease inhibitors on growth of hamster tumor cells in culture. *Cancer Res* 1972; 32(11): 2469-2474
- Goldblum JR, Bartos RE, Carr KA et al.:** Hepatitis B and alterations of the p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993; 17(12): 1244-1251

- Grand RJ**, Lecane PS, Owen D et al.: The high levels of p53 present in adenovirus early region 1-transformed human cells do not cause up-regulation of MDM2 expression. *Virology* 1995; 210(2): 323-334
- Green MR**: When the products of oncogenes and anti-oncogenes meet. *Cell* 1989; 56(1): 1-3
- Grundmann E**: Einführung in die allgemeine Pathologie. in: Gustav-Fischer Verlag 1994; 185
- Gupta RK**, Lister TA, Bodmer JG: Proliferation of Reed-Sternberg cells and variants in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1994; 5 Suppl 1: 117-119
- Haines DS**: The mdm2 proto-oncogene. *Leuk Lymphoma* 1997; 26(3-4): 227-238
- Hall PA**, Lane DP: p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? Revisited! *J Pathol* 1994; 172(1): 1-4
- Henderson BE**, Preston-Martin S, Edmondson HA et al.: Hepatocellular carcinoma and oral contraceptives. *Br J Cancer* 1983; 48(3): 437-440
- Herskowitz I**: Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 1987; 329(6136): 219-222
- Hey A**, Rockelein G: Primary liver cancers in autopsy material. *Fortschr Med* 1985; 103(9): 238-242
- Herold G**: Leber, chronische Hepatitis, in: Innere Medizin (ed.: Gerd Herold) 1994; 394 - 404
- Hofman W**: Correlation of p53 expression and proliferative activity in hepatocellular carcinoma. Abstracts Molecular Biology and Clinical Aspects of p53 in Human Cancer, Second international meeting 1993
- Hollstein M**, Sidransky D, Vogelstein B et al.: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015): 49-53
- Hollstein M**, Shomer B, Greenblatt M et al.: Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(1): 141-146
- Hsing AW**, McLaughlin JK, Hoover RN: Parity and primary liver cancer among young women. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84: 1118-1119
- Hsing AW**, McLaughlin JK, Olsen JH et al.: Cancer risk following primary hemochromatosis: a population-based cohort study in Denmark. *Int J Cancer* 1995; 60(2): 160-162
- Hsu HC**, Peng SY, Lai PL et al.: Allelotype and loss of heterozygosity of p53 in primary and recurrent hepatocellular carcinomas. A study of 150 patients. *Cancer* 1994; 73(1): 42-47
- Hugh TJ**, Poston GJ: The aetiology and management of hepatic metastases. *Aust N Z J Surg* 1997; 67(7): 400-409
- Hughes KS**, Rosenstein RB, Songhorabodi S: Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases. A multi-institutional study of long-term survivors. *Dis Colon Rectum* 1988; 31(1): 1-4
- IARC Monograph**: Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some naturally occurring carcinogens. International Agency for Research on Cancer 1993
- Ito T**: Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 1992; 52: 1369-1371

- Kaczynski J:** Incidence of primary liver cancer and aetiological aspects: a study of a defined population from low-endemicity area. *Br J Cancer* 1996; 73(1):128-132
- Kawarada Y, Mizumoto R:** Cholangiocellular carcinoma of the liver. *Am J Surg* 1984; 147(3): 354-359
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D:** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51(23 Pt 1): 6304-6311
- Kastrinakis WV, Ramchurren N, Rieger KM et al.:** Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene* 1995; 11(4): 647-652
- Kennedy SM, Macgeogh C, Jaffe R et al.:** Overexpression of the oncoprotein p53 in primary hepatic tumors of childhood does not correlate with gene mutations. *Hum Pathol* 1994; 25(5): 438-442
- Kern E:** Chirurgie im Wandel der Zeit 1945-1983. in: *Gallen-und Leberchirurgie* (eds.: Schreiber, Carstensen) Berlin 1983
- Knoefel WT, Rogiers X, Malago M et al.:** The status of liver transplantation in therapy of hepatocellular carcinoma. *Zentralbl Chir* 1994; 119(11): 772-776
- Kommerell B:** Lebertumoren, in: *Lehrbuch der Inneren Medizin* (eds.: Classen, Diehl, Kochsiek) Urban et Schwarzenberg Verlag (1993)
- Kress S, Jahn UR, Buchmann A et al.:** p53 Mutations in human hepatocellular carcinomas from Germany. *Cancer Res* 1992; 52(11): 3220-3223
- Lane DP, Crawford LV:** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278(5701): 261-263
- Lane DP:** p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15-16
- Lasky T, Magder L:** Hepatocellular carcinoma p53 G > T transversions at codon 249: the fingerprint of aflatoxin exposure? *Environ Health Perspect* 1997; 105(4): 392-397
- Laurent-Puig P, Flejou JF, Fabre M et al.:** Overexpression of p53: a rare event in a large series of white patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992; 16(5): 1171-1175
- La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S et al.:** Oral contraceptives and cancer. A review of the evidence. *Drug Saf* 1996; 14(4): 260-272
- Levine AJ:** Tumor suppressor genes, the cell cycle and cancer, in: *Cancer Surveys*, Vol. 12; Cold Spring Harbor Laboratory Press 1992
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA:** The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351(6326): 453-456
- Levine AJ:** The p53 tumour suppressor gene. *Helix, Amgen's Magazine of Biotechnology* 1995; 2: 18-25
- Linzer DI, Levine AJ:** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17(1): 43-52
- Livingston LR:** Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompanying loss of wild-type p53. *Cell* 1992; 70: 923-935

- Malkin D**, Li FP, Strong LC et al.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250(4985): 1233-1238
- Mant JW**, Vessey MP: Trends in mortality from primary liver cancer in England and Wales 1975-92: influence of oral contraceptives. *Br J Cancer* 1995; 72(3): 800-803
- Marshall CJ**: Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64(2): 313-326
- Melato M**, Sasso F, Zanconati F: Liver cirrhosis and liver cancer. A study of their relationship in 2563 autopsies. *Zentralbl Pathol* 1993; 139(1): 25-30
- Mori T**, Kato Y: Epidemiological, pathological and dosimetric status of Japanese thorotrast patients. *J Radiat Res (Tokyo)* 1991; 32 Suppl 2: 34-45
- Munoz N**: Epidemiology of hepatocellular carcinoma (1987). in: *Neoplasms of the liver* (eds.: Okuda, Ishak) Springer, Berlin Heidelberg New York: 23-45
- Muir C**: Cancer incidence in five continents (1987). Vol. V: International Agency for Research on Cancer
- Nagai E**, Yao T, Sakamoto M et al.: Risk factors related to liver metastasis in colorectal carcinoma: a multivariate analysis of clinicopathologic and immunohistochemical variables. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85(12): 1280-1287
- Nelson WG**, Kastan MB: DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 1994; 14(3): 1815-1823
- Neuberger J**, Forman D, Doll R et al.: Oral contraceptives and hepatocellular carcinoma. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 292(6532): 1355-1357
- Nigro JM**, Baker SJ, Preisinger AC: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342(6250): 705-708
- Nizze H**, Hebecker R: Primary and secondary malignant liver tumors at autopsy, biopsy and cytology: frequency and problems of differential diagnosis. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1995; 79: 137-143
- Nonomura A**, Hayashi M, Takayanagi N et al.: Correlation of morphologic subtypes of liver cirrhosis with excess alcohol intake, HBV infections, age at death, and hepatocellular carcinoma. A study on 234 autopsy cases in Japan. *Acta Pathol Jpn* 1986; 36(5): 631-640
- Okuda K**: Primary liver cancer in Japan. *Cancer* 1980; 45: 2663-2669
- Okuda K**, Obata H, Nakajima Y et al.: Prognosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1984; 4(1 Suppl): 3S-6S
- Polio J**: Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease. *J Clin Gastroenterol* 1989; 11: 220-224
- Popper H**: Comparison of neoplastic hepatic lesions in man and experimental animals. *Origins in human cancer (Book C)* 1977; 1359-1382
- Prior P**, Gyde SN, Macartney JC et al.: Cancer morbidity in ulcerative colitis. *Gut* 1982; 23(6): 490-497
- Quian GS**: A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 9: 30-34

- Rabinovitz M**, Gavalier JS, Kelly RH et al.: Lack of increase in heterozygous alpha 1-antitrypsin deficiency phenotypes among patients with hepatocellular and bile duct carcinoma. *Hepatology* 1992; 15(3): 407-410
- Resnick JM**, Cherwitz D, Knapp D et al.: A microwave method that enhances detection of aberrant p53 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119(4): 360-366
- Riede UK**, Schäfer H-E: Funktionelle Läsionen der Leber. in: *Lehrbuch der allgemeinen und speziellen Pathologie*, Georg Thieme Verlag 1993; 742-796
- Ringe B**, Weimann A, Lamesch P et al.: Liver transplantation as an option in patients with cholangiocellular and bile duct carcinoma. *Cancer Treat Res* 1994; 69: 259-275
- Rustig VK**: Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1987; 16: 545-551
- Sainte-Marie G**: A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J Histochem Cytochem* 1962; 10: 250-258
- Saracci R**, Repetto F: Time trends of primary liver cancer: indication of increased incidence in selected cancer registry populations. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65(2): 241-247
- Sarkis AS**, Dalbagni G, Cordon-Cardo C et al.: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(1): 53-59
- Saul SH**: Masses of the liver (1994). in: *Diagnostic Surgical Pathology* (ed.: Sternberg SS) Vol. 2; Chap. 37; Raven Press, NY: 87-112
- Scheele J**, Stang R, Altendorf-Hofmann A et al.: Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg* 1995; 19(1): 59-71
- Schindler JF**: Wie beeinflusst p53 die Therapie bei Krebserkrankungen? *Gyne* 1996; 16: 37-40
- Schreiber WM**, Kato H, Robertson JD: Primary carcinoma of the liver in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Cancer* 1970; 26(1): 69-75
- Schrumpf E**: Association of primary sclerosing cholangitis and celiac disease: fact or fancy? *Hepatology* 1989; 10(6): 1020-1021
- Schubert GE**, Bethke-Bedurftig BA: Liver cirrhosis in autopsy material within 48 years. II. Causes of death, liver cell carcinoma, weights of liver and spleen. *Z Gastroenterol* 1982; 20(4): 221-227
- Scorsone KA**: p53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinoma in China. *Cancer Res* 1992; 52: 1635-1638
- Selivanova G**, Wiman KG: p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Cancer Res* 1995; 66: 143-180
- Shi SR**, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39(6): 741-748

- Shiota G**, Kishimoto Y, Suyama A et al: Prognostic significance of serum anti-p53 antibody in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27(4): 661-668
- Silvestri F**, Bussani R, Giarelli L: Metastatic neoplasms of the liver: their frequency in relation to age and to locations of the primary neoplasms. Analysis of 10157 malignant tumours at autopsy. *Pathologica* 1988; 80(1069): 533-549
- Simonetti RG**, Camma C, Fiorello F et al.: Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci* 1991; 36(7): 962-972
- Singerland JM**: *EMBO J.* 1993; 12: 1029-1037
- Soussi T**, Caron de Fromentel C, May P: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990; 5(7): 945-952
- Stenger JE**, Mayr GA, Mann K et al.: Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol Carcinog* 1992; 5(2): 102-106
- Takeuji J**: Primary liver cancer in Japan. *Cancer* 1984; 54: 1747-1755
- Terada T**, Shimizu K, Izumi R et al.: Methods in pathology. p53 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded archival specimens of intrahepatic cholangiocarcinoma: retrieval of p53 antigenicity by microwave oven heating of tissue sections. *Mod Pathol* 1994; 7(2): 249-252
- Teramoto T**, Satonaka K, Kitazawa S et al.: p53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54(1): 231-235
- Terris B**, Laurent-Puig P, Belghitti J et al.: Prognostic influence of clinicopathologic features, DNA-ploidy, CD44H and p53 expression in a large series of resected hepatocellular carcinoma in France. *Int J Cancer* 1997; 74(6): 614-619
- Thut CJ**, Goodrich JA, Tjian R: Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev* 1997; 11(15): 1974-1986
- TNM-Atlas** (UICC) Springer, Berlin Heidelberg New York 1997
- Tsao JI**, Asbun HJ, Hughes KS et al.: Hepatoma registry of the Western world. Repeat Hepatic Resection Registry. *Cancer Treat Res* 1994; 69: 21-31
- Tsukuma H**, Hiyama T, Tanaka S: Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328(25): 1797-1801
- Vanbockrijck M**, Kloppel G: Incidence and morphology of liver metastasis from extrahepatic malignancies to cirrhotic livers. *Zentralbl Pathol* 1992; 138(2): 91-96
- Van Kaik G**: Neoplastic diseases induced by chronic alpha-irradiation. *J Radiat Res* 1991 sup.2: 20-33
- Varley JM**, Evans DG, Birch JM: Li-Fraumeni syndrome: a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 1997; 76(1): 1-14
- Vitale GC**, Heuser LS, Polk HC Jr: Malignant tumors of the liver. *Surg Clin North Am* 1986; 66(4): 723-741
- Vogelstein B**, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70(4): 523-526

- Volkman M**, Muller M, Hofmann WJ: The humoral immune response to p53 in patients with hepatocellular carcinoma is specific for malignancy and independent of the alpha-fetoprotein status. *Hepatology* 1993; 18(3): 559-565
- Waetjen LE**, Grimes DA: Oral contraceptives and primary liver cancer: temporal trends in three countries. *Obstet Gynecol* 1996; 88(6): 945-949
- Walther HE**: Krebsmetastasen. Schwabe; Basel 1948
- Wang P**, Reed M, Wang Y et al.: p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol* 1994; 14(8): 5182-5191
- Wanless IR**, Medline A: Role of estrogens as promoters of hepatic neoplasia. *Lab Invest* 1982; 46(3): 313-320
- Wee A**, Teh M, Raju GC: p53 expression in hepatocellular carcinoma in a population in Singapore with endemic hepatitis B virus infection. *J Clin Pathol* 1995; 48(3): 236-238
- WHO Study Group**: Combined oral contraceptives and liver cancer. *Int J Cancer* 1989; 43: 254-259
- Xiong Y**, Hannon GJ, Zhang H et al.: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366(6456): 701-704
- Yonemura Y**, Ooyama S, Sugiyama K: Growth fractions in gastric carcinomas determined with monoclonal antibody Ki-67. *Cancer* 1990; 65(5): 1130-1134
- Yonish-Rouach E**, Resnitzky D, Lotem J et al.: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352(6333): 345-347
- Zaman SN**, Melia WM, Johnson RD et al.: Risk factors in development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prospective study of 613 patients. *Lancet* 1985; 1(8442): 1357-1360
- Zhao M**, Zhang NX, Laissue JA et al.: Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in liver cell dysplasia and in hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch* 1994; 424(6): 613-621

8. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. mult. C. E. Broelsch danke ich dafür, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, meine Untersuchungen in der von ihm geleiteten Klinik durchzuführen.

Frau Professor Dr. med. A. Frilling danke ich für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung und ihre stets ermutigende Kritik.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. med. A. Stenger, die mich immer mit freundlichem Rat und großem Einsatz unterstützt hat.

Herrn Professor Dr. med. C. Henke bin ich für die Durchsicht und Bewertung der immunhistochemischen Färbungen zu großem Dank verpflichtet.

9. CURRICULUM VITAE VON JUSTUS JOCHEN GILLE

Name:	Gille
Vorname:	Justus Jochen
Geburtsdatum:	20.07.1971
Geburtsort:	Hannover
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch - lutherisch
Eltern:	Prof. Dr. med. Jochen Gille, Arzt Dr. med. Gisela Gille, geb. Braune, Ärztin
Geschwister:	Caroline Gille, MA, Literaturwissenschaftlerin Stephanie Gille, Studentin der Rechtswissenschaften
Schulbildung:	1976 – 1981 Steinbachtalgrundschule, Würzburg 1981 – 1986 Röntgen-Gymnasium, Würzburg 1986 – 1990 Gymnasium Johanneum, Lüneburg Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife („Abitur“)
Studium:	1990 – 1991 Studium der Volkswirtschaftslehre an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel 1991 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg 5.4.1994 Ärztliche Vorprüfung 12.5.1995 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2.10.1997 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung April 1998 Beginn des Praktischen Jahres University of San Diego (UCSD), U.S.A. University of Stellenbosch, Südafrika AK Barmbek, Hamburg 18.5.1999 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10. ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes, kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

(Justus Gille)