Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie
Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Diagnostische und prognostische Bedeutung des DNA-Index in Korrelation zur immunhistochemischen Untersuchung von p53 und Ki-67 bei Patienten mit Leberzellkarzinom nach Resektion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Iphigenie Süßdorf-Suchan
aus Kaiserslautern

Datum der Promotion: 09. September 2016

**Meinen Eltern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... I
Abstrakt ..... III
Abstract ..... IV

1. Einleitung ..... 1
1.1. Das hepatozelluläre Karzinom ..... 2
1.1.1. Epidemiologie ..... 2
1.1.2. Ätiologie des HCC ..... 3
1.1.3. Pathologie und Stadieneinteilung ..... 11
1.1.4. Chirurgische Therapie ..... 19
1.1.5. Weitere Therapieoptionen ..... 21
1.2. Zellkernparameter und DNA-Ploidie ..... 22
1.2.1. Zellzyklus ..... 22
1.2.2. Euploidie-Polyploidie ..... 22
1.2.3. Aneuploidie ..... 23
1.2.4. Das p53-Tumorsuppressorgen ..... 24
1.2.5. Ki-67 ..... 25
1.3. Fragestellung ..... 26
2. Material und Methode ..... 27
2.1. Patienten ..... 27
2.2. DNA-Bildzytometrie ..... 27
2.2.1. Präparatebearbeitung und Färbeverfahren ..... 28
2.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung ..... 28
2.2.3. Feulgen-Färbung ..... 29
2.2.4. DNA-Bildzytometrie und DNA-Histogramm ..... 31
2.2.5. Interpretation der Histogramme ..... 35
2.3. Bestimmung von mutp53 und Ki-67 ..... 37
2.4. Statistikmethoden ..... 40

3. Ergebnisse ..... 41
3.1. Patientencharakteristik ..... 41
3.2. Univariate Analysen ..... 43
3.3. Multivariate Analyse ..... 62
4. Diskussion ..... 64
5. Zusammenfassung ..... 74
6. Literaturverzeichnis ..... 75
Tabellenverzeichnis ..... V
Abbildungsverzeichnis ..... VI
Abkürzungsverzeichnis ..... VIII
Eidesstattliche Versicherung ..... XI
Lebenslauf ..... XII
Danksagung ..... XIII

# Abstrakt

**Ziel:** In dieser Studie soll die prognostische Signifikanz der klassischen Prognoseparameter, der immunhistochemischen Marker p53 und Ki-67 und des DNA-Index (DI), bei Patienten mit einem hepatozellulärem Karzinom (HCC) nach Leberteilresektion untersucht werden.

**Hintergrund:** Das HCC ist ein häufiger Tumor mit einer hohen Mortalitätsrate und zunehmender Inzidenz. Die potentiell kurative Therapie ist die R0-Resektion und die Lebertransplantation. Um optimale Therapieentscheidungen prä- und postoperativ zu treffen, sollten aktuelle tumorbiologische Marker auf ihre prognostische Signifikanz geprüft werden, um die HCC-Klassifikationssysteme zu ergänzen.

**Patienten und Methode:** Von 2003 bis 2006 wurden 85 HCC-Patienten der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie Campus Virchow Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité nach Leberteilresektion eingeschlossen und bis 2011 nachbeobachtet. Die gewonnenen Tumorpräparate wurden nach Feulgen spezifisch gefärbt und die, mittels Bildzytometrie erstellten, DNA-Histogramme nach den Empfehlungen der European Society for Analytical Cellular Pathology interpretiert und der DI ermittelt. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Färbung mittels der monoklonalen Antikörper für Ki-67 (MIB-1) und p53 (Do-7) durchgeführt und die Expression des Proliferationsmarkers und des Apoptosemarkers ermittelt.

**Ergebnisse:** Patienten mit einem DI von ≤1,78 hatte eine 1-3-5-8-Jahresüberlebensrate (JÜR) von 100%-90,9%-62,9%-50,1%. Die Patienten mit einem DI von >1,78 hatten ein 1-3-5-8-JÜR von 87,8%-7,3%-4,8%-4,8%. Der DI stellt sich als signifikanter Prognosemarker ($p<0,0001$) bei Patienten mit HCC dar. In der univariaten Analyse waren der DI, die Gefäßinvasion und der Proliferationsmarker Ki-67 signifikante Prognosemarker. Der Apoptosemarker p53 zeigte keine Signifikanz. In der multivariaten Analyse zeigte sich alleinig der DI als hoch signifikant für das Überleben ($p <0,0001$).

**Schlussfolgerungen**: Der DI ist ein hoch signifikanter Prognoseparameter für Patienten mit HCC und eignet sich potentiell zur Ergänzung bestehender Klassifikationssysteme, um prä- und postoperativ optimale Therapieentscheidungen zu treffen. Die prädiktive Wertigkeit der Gefäßinvasion beim HCC sollte weiter in Studien evaluiert werden. Der Einsatz des Proliferationsmarkers Ki-67 ist aufgrund der sehr divergierenden Forschungsergebnisse, trotz Signifikanz in dieser univariaten Analyse, vorerst nicht valide für die Überlebensvorhersage.

# Abstract

**Objective:** This study analyses the prognostic significance of classical prognostic parameters and the immunohistochemic markers p53 and Ki-67 as well as the DNA-Index (DI) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) after liverresection.

**Backround:** HCC is a common tumor with a high mortality rate and increasing incidence. The only potential curative therapies are R0-resection and liver transplantation. Prevailing tumorbiological markers should be tested for their prognostic significance to supplement the HCC-classification-systems and to reach optimal decisions pre- and postoperative.

**Patients and methods:** From 2003 to 2006 85 HCC-patients of the Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie Campus Virchow Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité were included in this study and postoperative observed until 2011. The obtained tumor-preparations were specifically Feulgen-stained and the DNA-histograms, gained via semiautomatical image analyes, were interpreted following the recommendation of the European Society for Analytical Cellular Pathology and the DI was determined. An immunohistochemical stainig with the monoclonal antibody for Ki-67 (MIB-1) and p53 (Do-7) was conducted additionally and the expression of the markers of proliferation and apoptosis detected.

**Results:** Patients with a DI ≤1.78 had a 1-3-5-8-year survival rate of 100%-90,9%-62,9%-50,1%. Patients with a DI > 1,78 had a 1-3-5-8-year survival rate of 87,8%-7,3%-4,8%-4,8%. The DI is a significant prognostic marker (p<0,0001) in patients with HCC. In the univariate analysis, DI, vascular invasion and the marker of proliferation were significant prognostic markers. The marker of apoptosis p53 showed no significance. On multivariate analysis, only DI was a highly significant indicator for survival (p <0,0001).

**Conclusion:** The DI is a highly significant prognostic parameter for patients with HCC and is suited to potentially supplement the existing classification-systems to reach optimal decisions pre- and postoperative. The predictive significance of vascular invasion in HCC should be evaluated in further studies. Because of very divergent results of research and despite the significance in the univariate analysis, the application of Ki-67 is not a valid indicator for survival predication.

# 1. Einleitung

Das hepatozelluäre Karzinom (HCC) zählt zu den häufigsten malignen Tumoren weltweit und steht bei den tumorbedingten Todesursachen an dritter Stelle. Die Erkrankung ist bei Diagnosestellung meist schon im fortgeschrittenen Stadium, sodass die 5-JÜR weltweit nur 15% (Jamal 2011) beträgt.

Der Goldstandard der Therapie ist die potentiell kurative Lebertransplantation und die Leberresektion mit dem Ziel, eine R0-Situation zu erreichen **(**Lang 2005). Aktuell erkranken in Deutschland jährlich etwa 8.000 Patienten an einem primären Lebertumor. 2012 waren es 1.792 Neuanmeldungen auf der Warteliste zur Lebertransplantation, davon etwa 20% aufgrund von Lebertumoren, gegenüber 1.199 Transplantationen (Pascher 2013).

Durch die zunehmende Inzidenz des HCC von 25% in den letzten 10 Jahren, bzw. von 50% in den letzten 20 Jahren (Stettmacher 2012), steigt auch die Anzahl der Patienten auf der Warteliste für eine Lebertransplantation (Llovet 1999). Die Wartezeitmortalität lag 2006 bei bis zu 21% (Rahmel 2007). Zur lokalen Tumorkontrolle werden die neoadjuvanten Bridging- und Downstaging-Verfahren eingesetzt, in deren Verlauf eine optimale histologische und immunhistochemische Untersuchung des Tumors stattfinden kann und sollte.

Auch aufgrund der extremen Knappheit an postmortalen Spenderorganen wird die Indikation unter sehr strenge Auflagen gestellt, überdies ist die Forschung im Bereich der prädiktiven Prognosefaktoren für die Langzeitprognose nach Transplantation intensiviert worden (Ispikoudis 2012). Es ist von zunehmender Bedeutung, die Mangelressource optimal zu nutzen, indem weitere tumorspezifische Malignitäts- und Proliferationsindikatoren identifiziert werden, welche die Allokationskriterien differenzierter ergänzen, um optimal geeignete Kandidaten mit einer potentiell guten Langzeitüberlebensprognose zu detektieren. Wichtig ist es auch, die Therapiestratifizierung in der Wartezeit, nach Resektion, bei Rezidiv und der Palliation gezielt zu ergänzen. Zukünftig werden aktuelle tumorbiologische Erkenntnisse größere Relevanz erlangen (Pascher 2013).

In der folgenden Arbeit wird die prognostische Wertigkeit des DNA-Gehaltes mittels DNA-Index und des mutierten Tumorantigens p53 als Apoptosemarker und des Ki-67-Antigens als Proliferationsmarker bei hepatozellulären Karzinomen nach Resektion untersucht.

## 1.1. Das hepatozelluläre Karzinom

Das HCC zählt zu den primären Lebertumoren und stellt mit 80-90% den größten Anteil dar (El-Serag 2007). Das cholangiozelluläre Karzinom (CC) hat einen Anteil von unter 20%, die Kombination aus HCC und CC hat einen Anteil von unter 1%. Seltener treten das Zystadenokarzinom, das mesenchymale Angiosarkom und das Hepatoblastom bei Kindern, sowie die sehr seltene Sonderform des HCC, das fibrolaminäre Karzinom, auf.

### 1.1.1. Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom macht 80-90% aller primären, malignen Lebertumore aus und ist weltweit die fünfthäufigste maligne Erkrankung. Bei einer weltweit steigenden Inzidenz, kam es 2008 zu etwa 750.000 Neuerkrankungen und etwa 695.000 Todesfällen (Vogel 2012), davon werden jährlich etwa 8.000 in der Bundesrepublik Deutschland diagnostiziert.
Eine Zunahme der Inzidenz wird auch für die europäischen Industriestaaten und die USA beschrieben (El-Serag 2007).
Die Prävalenz des HCC ist bei Männern 4- bis 10-fach höher als bei Frauen. Es steht weltweit an dritter Stelle bei den Krebs-Todesursachen bei Männern und an sechster Stelle bei Frauen (Farrell 2010).

Aufgrund der geographisch unterschiedlichen Verteilung der Risikofaktoren für das HCC werden Hochrisiko-Regionen von Mittel- und Niedrigrisiko-Regionen unterschieden.
Die höchste Inzidenz von HCC findet man in Asien und in der Subsahara in Afrika.
In Nord- und Lateinamerika liegt die jährliche Inzidenzrate mit unter 5/100.000 am niedrigsten, in Regionen Ostasiens mit über 30/100.000 am höchsten.
Auch Migranten aus Hochrisikogebieten in Afrika und Asien haben ein höheres Erkrankungsrisiko als die einheimische Bevölkerung. Dieses erhöhte Risiko erklärt sich hauptsächlich mit der hohen Prävalenz von chronischer Hepatitis B im Geburtsland, welche meistens durch die Geburt oder in der frühen Kindheit erworben wird.

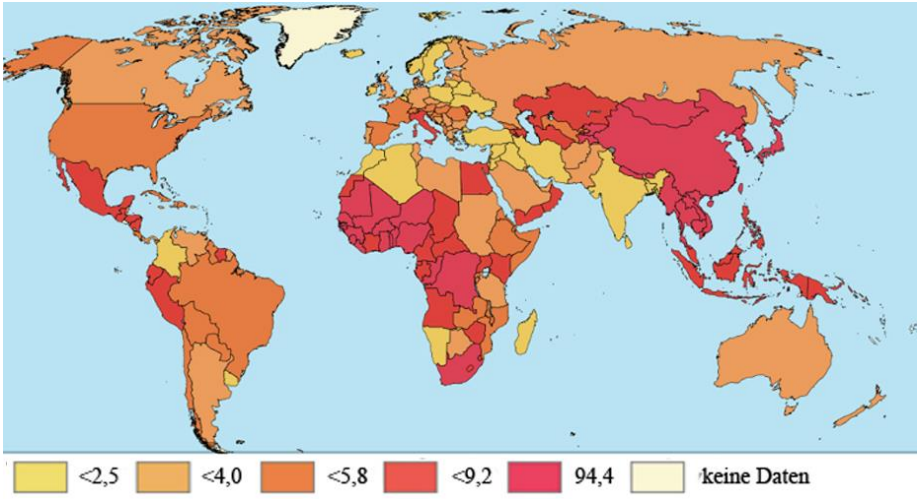



*Abbildung 1: Weltweite HCC-Inzidenz im Jahr 2008: In Deutschland liegt die Inzidenz bei 4/100.000 Einwohner.*

### 1.1.2. Ätiologie des HCC

Die Hepatokarzinogenese ist ein jahrelanger und mehrstufiger Prozess. Fast immer entsteht das HCC auf dem Boden einer chronischen Leberschädigung, deren Ätiologie meistens bekannt ist (Breuhahn 2010).

Die Leberzirrhose ist unabhängig von ihrer Ätiologie als Präkanzerose anzusehen (Sherman 2005). Die Ätiologie, Aktivität und Dauer der Erkrankung bestimmen das Lebenszeitrisiko, an einem HCC zu erkranken (Spangenberg 2004).

Zu den wichtigsten ätiologischen Faktoren gehören, global betrachtet, die chronische Infektion mit Hepatitis B- und/oder C-Viren mit Antigenpersistenz. In den westlichen Industrieländern zählen die nutritiv-toxischen Faktoren, wie der Alkoholabusus, als bedeutende Risikofaktoren und in zunehmendem Maß auch die nutritiv bedingte Leberschädigung durch Adipositas und Diabetes mellitus IIb, die zur Hepatosteatosis (NAFLD) und Steatohepatitis (NASH) führen.

Einen geringeren Anteil an der Inzidenz des HCC haben die genetischen Erkrankungen wie die hereditäre Hämochromatose, der Morbus Wilson, die Porphyria cutanea tarda, der α-1-Antitrypsinmangel, sowie die Leberschädigung durch das Aflatoxin und andere hepatotoxische Substanzen wie Medikamente (Methotrexat, Tamoxifen), Arsen und Pestizide. Seltener entwickelt sich ein HCC bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis oder primärer biliärer Zirrhose.

| Region | Männer/Frauen | Risikofaktoren | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | HCV (%) | HBV (%) | Alkohol (%) | Andere (%) |
| Europa | 6,7/2,3 | 60-70 | 10-15 | 20 | 10 |
| Nordamerika | 4,1/2,3 | 50-60 | 20 | 20 | 10 (NASH) |
| Asien und Afrika | - | 20 | 70 | 10 | 10 (Aflatoxin) |
| Asien | 21,6/8,2 | - | - | - | - |
| China | 23/9,6 | - | - | - | - |
| Japan | 20,6/7,8 | 70 | 10-20 | 10 | 10 |
| Afrika | 1,6/5,3 | - | - | - | - |
| Welt | 16/6 | 31 | 54 | 15 | - |

*Tabelle 1: Verteilung der Risikofaktoren nach geographischen Regionen (nach EASL-EORTC Clinical Practice Guidlines 2012) (Vogel 2012).*

#### 1.1.2.1. Leberzirrhose

80-90% der hepatozellulären Karzinome finden sich in der zirrhotisch umgebauten Leber, welche als Präkanzerose anzusehen ist (Ballhausen 2003).
Das erhöhte HCC-Risiko stellt sich, bezogen auf die Ätiologie, wie folgt dar (Spangenberg 2004):

| |
|---|
| Leberzirrhose und chronische Hepatitis C – Lebenszeitrisiko ca. 60% |
| Leberzirrhose und chronische Hepatitis B – Lebenszeitrisiko ca. 50% |
| Leberzirrhose und alkoholinduzierte Leberzirrhose – Lebenszeitrisiko ca. 30% |

Ein niedrigeres HCC-Risiko haben Patienten mit einer Leberzirrhose bedingt durch Morbus Wilson oder die primäre, biliäre Zirrhose (<10% Lebenszeitrisiko). Die Leberzirrhose entwickelt sich durch chronische Entzündungsreaktion, Gewebsuntergang und Regenerationsprozesse. Auch durch die jahrelange Persistenz des pathogenen Agens steigt das Risiko eines HCC stark an (Ballhausen 2003). Der Umbau der Leber ist ein sich über Jahre entwickelnder Prozess und wird definiert durch den histologischen Nachweis zerstörter Leberläppchen und Gefäßstrukturen mit Faservermehrung und knotiger Regeneration.

Zur Prognoseabschätzung und Einteilung des Schweregrades der Zirrhose werden zwei etablierte Klassifikationen verwendet, der Child-Pugh-Score und der MELD-Score. Beide Scores kommen bei der Indikationsstellung und Prognoseabschätzung bei Lebertransplantationskandidaten zum Einsatz.

Child-Pugh-Score:

Bei dem 1964 von Child entwickelten und 1973 von Pugh erweiterten Score (Child 1964, Pugh 1973) wird die Summe der Punkte (von horizontal 1-3) aus jeder der 5 Kategorien gebildet.
Die Höhe der Punkte korreliert mit der Häufigkeit der postoperativen Komplikationen wie Nierenversagen, Enzephalopathie, Blutungen, Aszites, Leberversagen und Infektionen.

| **Klassfikation der Leberzirrhose nach Child-Pugh** | | | |
|---|---|---|---|
| | 1 Punkt | 2 Punkte | 3 Punkte |
| **Quick** | >70% | 40-70% | <40% |
| **Bilirubin (mg/dl)** | <2,0 | 2,0-3,0 | >3,0 |
| **Albumin /g/dl)** | >3,5 | 3,0-3,5 | <3,0 |
| **Aszites#** | kein | gering | ausgeprägt |
| **Enzephalopathie** | Keine | Grad I-II | Grad III-IV |
| **Stadium** | **Punkteanzahl** | | |
| Child A | 5-6 | | |
| Child B | 7-9 | | |
| Child C | 10-15 | | |

*Tabelle 2: Child-Pugh-Klassifikation*

MELD-Score:

Dieser Score wurde zur Einschätzung der Schwere der Lebererkrankung im Endstadium (Model of End Stage Liver Disease) eingeführt (Malinchoc 2000).
Der Score wird mit einer Formel, bestehend aus den Laborwerten Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und INR, errechnet. Es gibt 6-40 Punkte; je höher der Wert, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, ohne Transplantation innerhalb von 3 Monaten zu versterben (Grattagliano 2011).
Die MELD-Score-Formel berechnet den labMeld:

$$10 * ( 0{,}957 * \log (\text{Kreatinin}) + 0{,}378 * \log (\text{Bilirubin}) + 1{,}12 * \log (\text{INR}) + 0{,}643)$$

Da sich damit die Dringlichkeit der Transplantation für HCC-bedingte und andere Lebererkrankungen nicht abbilden lässt, wurde der Standard Exception (SE) oder Exceptional MELD zusätzlich eingeführt.

#### 1.1.2.2. Hepatitis B

Das Hepatitis-B-Virus ist ein DNA-Virus aus der Gruppe der Hepadnaviren und besteht aus einer äußeren Hülle, dem HbsAG (HB surface-Antigen), dem Kern, HbcAG (HB core-Antigen) und der viralen DNA und DNA-Polymerase.
Weltweit haben fast 400 Millionen Menschen eine HB-Infektion, wovon 5% der infizierten Erwachsenen eine chronische Hepatitis B mit Viruspersistenz entwickeln.
Etwa 40-52% der HCC-Patienten leiden an einer chronischen HBV-Infektion, welche somit den häufigsten Risikofaktor des HCC darstellt (Donato 1998). In Asien und Afrika sind es 70% der HCC-Patienten, die an einer chronischen HBV-Infektion leiden, in Europa und den USA etwa 20% (Vogel 2012).
Das Erkrankungsrisiko an HCC ist auch ohne die Entwicklung einer Leberzirrhose deutlich erhöht und entsteht bei bis zu 30% der hochvirämischen Patienten ohne bestehende Leberzirrhose. Das HCC entwickelt sich häufiger im Rahmen einer chronischen Hepatitis B als bei der chronischen Hepatitis C (Alberti 1995, Nzeako 1995). Auch HBV-Träger mit einer inaktiven Hepatitis haben ein erhöhtes Risiko für ein HCC und einen leberassoziierten Tod (Chen 2009).
Die Tumorentstehung durch das Virus ist noch nicht vollständig erklärt. Durch die Infektion kommt es zu kontinuierlichen Entzündungsreaktionen, Zellschädigung und Zellregeneration. Die erhöhte Proliferationsrate der Hepatozyten kann zu einer Akkumulation von genetischen Veränderungen führen. Ebenso kommt es zum Einbau der Virus-DNA, die bei bis zu 80% der HBV-assoziierten Lebertumore gefunden wird. Im Verlauf kommt es durch virale Proteine auch zur Aktivierung von Protoonkogenen und Wachstumsfaktoren (Vogel 2012).
Es gibt einen Risikoscore (REACH-B) zur Abschätzung der HCC-10-Jahres-Erkrankungswahrscheinlichkeit unter Einbeziehung von Alter, Geschlecht, Serum-ALT-Werten, HBeAg und Höhe der HBV-DNA bei Patienten ohne Leberzirrhose.

#### 1.1.2.3. Hepatitis C

Das Hepatitis-C-Virus ist ein RNA-Virus der Familie der Flaviviren. Es gibt 6 Genotypen und 18 Subtypen. Von den weltweit geschätzten 130-170 Millionen HCV-Infizierten entwickeln etwa

80% eine chronische Hepatitis. Diese kann chronisch-persistent sein oder chronisch-aktiv mit schlechterer Prognose.

Unter den HC-Viren verursacht das HCV-1b das höchste Risiko, ein HCC zu entwickeln, kommt in Japan am häufigsten vor und ist dort die Ursache für 80-90% der HCC-Fälle (Kiyosawa 2004). Weltweit können etwa 25% der primären Leberkarzinome auf eine chronische HCV-Infektion zurückgeführt werden.

In der Ausbreitung des HC-Virus in den westlichen Industrieländern liegt auch eine Hauptursache für die Zunahme der HCC-Inzidenz um 50% in den letzten 20 Jahren (El-Serag 2003).

Liegt eine Koinfektion von HCV und HBV (positives HBsAG und anti-HCV) vor, verdoppelt sich das HCC-Risiko im Vergleich zur Mono-Infektion (Donato 1998). Erwähnenswert sind auch synergistische Effekte, u.a. bei Koinfektion mit HIV, bei Alkoholabusus, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, afroamerikanischer Herkunft und Alter (Liang 2004).

Das RNA-Virus kann, im Gegensatz zum HB-Virus, nicht in das Wirtsgenom integriert werden. Das Karzinom entwickelt sich stufenweise durch die chronische Entzündung mit erhöhten Entzündungsmediatoren, Zytokinen, chronischem oxidativem Stress und durch erhöhte Proliferation bei der Entwicklung von der Fibrose bis zur Zirrhose. Es entwickeln sich Dysplasien und es kommt zu molekulargenetischen Veränderungen mit Downregulation und Mutationen von p53, mit Auswirkungen auf die Onkogene, Tumorsuppressor-Gene und Angiogenese.

Die Zahl der HCC-Erkrankungen auf dem Boden viraler Hepatitiden wird sich aufgrund der verbesserten Prävention und Therapiemöglichkeiten verringern. Durch die Hepatitis-Impfprogamme verringert sich die Neuinfektionsrate, die Behandlung mit direkt wirkenden antiviralen Medikamenten (DAA, nukleotid- und nukleosidanaloge Polymeraseinhibitoren) führt zur Hepatitisausheilung. Auch bei bereits bestehender Zirrhose verbessert sich dadurch die Prognose (van Bömmel 2015).

#### 1.1.2.4. Alkoholtoxischer Leberschaden

Der chronische, schwere Alkoholabusus ist ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines HCC. Etwa 6 Mio. Menschen in Deutschland erkranken an einer alkoholbedingten Lebererkrankung, wovon etwa 20.000 jährlich versterben (Jahrbuch Sucht 2008). Bis zu 35% der Konsumenten

entwickeln eine alkoholische Steatohepatitis, 10-20% eine Leberzirrhose und davon etwa 10% ein hepatozelluläres Karzinom (Hassan 2002, Morgan 2004). 10% der HCC entstehen aufgrund von Alkoholabusus. Der schädliche Gebrauch beginnt bei 50-80g/die Ethanol bei Männern und 50g/die Ethanol bei Frauen.

Alkohol wird hauptsächlich über die Alkoholdehydrogenase (ADH) und Cytochrome P4502E1 zu Acetaldehyd verstoffwechselt, welches über Aldehydoxogenase 2 (ALDH2) weiter zu Acetat abgebaut wird. Es kommt zur Akkumulation von Acetaldehyd (zuviel Alkohol oder zuwenig ALDH2). Acetaldehyd ist mutagen und kanzerogen (Seitz 2006) und scheint die Mutation von Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen zu triggern.

Durch die erhöhte Induktion von Cytochrome P4502E1 kommt es zur Erhöhung des oxidativen Stresses, einer erhöhten Lipidperoxidation und der Entstehung von Hydroxyethyl-Radikalen (HERs) Malondialdehyd (MDA) und 4HNE (Hydroxynonenal), welches zur Inhibitionsmutation auf dem Codon 249 des Tumorsuppressor-Gens p53 führt. Auch die Eisenakkumulation führt zu einer Mutation im p53-Gen (Hu 2002).

Die Entwicklung von der Leberfibrose bis hin zur Zirrhose ist ein mehrstufiger Prozess. Es kommt zum Anstieg von Acetaldehyd, damit über die Zunahme des oxidativen Stresses zur Lipidperoxidation, der Hochregulierung von fibrogenetischen Cytokinen wie TGF-beta 1 (Transforming Growth Factor). Über die Apoptotic Bodies und Kupfferzell-Aktivierung kommt es zur Ausschüttung von inflammamtorischen Zytokinen (wie TNF-alpha), antifibröse Effekte von Natural-Killer-Zellen werden reduziert und Wachstumsfaktoren erhöht. Die Tumorüberwachung durch Natural-Killer-Zellen und Killerzellen, welche die virusinfizierten Zellen und Tumorzellen eliminieren, wird reduziert, u.a. weil durch Alkohol die in der Milz vorhandene Zellzahl vermindert wird (Müller 2008).

#### 1.1.2.5. Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen

NASH (Nonalcoholic Steato Hepatitis) und NAFLD (Nonalcoholic Fatty Liver Disease) sind mittlerweile alarmierende Risikofaktoren für das HCC, mit der Tendenz, die Zahl der HCV assoziierten Lebertumore in den Industrieländern zu übersteigen (Ascha 2010).

Infolge von zunehmender Adipositas und den Folgeerkrankungen, wie dem Diabetes mellitus Typ IIb und dem metabolischen Syndrom, kommt es zur Zunahme der Hepatosteatosis, die sich in die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) mit nur histologisch nachweisbaren entzündlichen Veränderungen und ggf. Fibrose, Mallory Bodies, Balloning und die

nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) aufteilt (Neuschwander-Tetri 2003).
Diabetes mellitus erhöht, unabhängig vom BMI und der Dauer der Erkrankung, das HCC-Erkrankungsrisiko um das 3,5-Fache (King 2014).
Bereits heute leiden 20% der deutschen Bevölkerung an einer Fettleber (NAFLD), wovon sich 10% in eine Steatohepatitis (NASH) entwickeln werden. Daraus entsteht in 10% der Fälle eine Leberzirrhose, wovon wiederum 10% ein HCC entwickeln werden (Manns 2013).
Es wird vermutet, dass die alimentär erhöhte Fettsäurezufuhr bei der Hepatosteatose eine Kaskade aus Fettsäureoxidation, damit erhöhten oxidativen Stress und Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und Proonkogenen auslöst und es schließlich zur genetischen Veränderung des Hepatozyten kommt. Dieser Mechanismus findet auch ohne präexistente Leberzirrhose statt (Stickel 2010). Es gibt Publikationen von Fällen der NASH mit HCC ohne Zirrhose (Hai 2006).

#### 1.1.2.6. Aflatoxin B1

Das Toxin des Pilzes Aspergillus flavus, welcher häufig in kontaminierten Lebensmitteln zu finden ist, vor allem wenn sie unter feuchtwarmen Bedingungen gelagert werden, ist ein hochpotentes Hepatokarzinogen.
Im Aflatoxin bedingten HCC finden sich erhöhte Mutationsraten des p53. Es kommt zur inaktivierenden Mutation am Codon 249 des Tumor-Protein-53-Gens (Ozturk 1991).

#### 1.1.2.7. Hämochromatose

Die hereditäre Hämochromatose ist eine Eisenspeicherkrankheit. Unbehandelt kommt es zur Entwicklung einer Leberzirrhose und es besteht ein 200-fach erhöhtes HCC-Risiko. Es gibt 4 verschiedene genetische Mutationen. Bei der in Deutschland am häufigsten vorkommenden Form der Hämochromatose handelt sich um eine autosomal-rezessive Erkrankung, wobei der Gendefekt sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 befindet und es zu der Missense-Mutation HFE C282Y kommt, während Cystein an Position 282 durch Tyrosin ausgetauscht wird (Feder 1999).
Es kommt zu einer Eisenüberlagerung in Leber und Herz. Eisen wirkt direkt mitogen auf die Hepatozyten mit proliferationsförderndem Effekt. Dies führt in den Hepatozyten zu der Bildung von Hydroxylradikalen und anderen Metaboliten, wodurch es zur DNA-Schädigung über die

Zunahme des oxidativen Stresses kommt (Loeb 1988).

In Gewebe von HCC-Tumoren aufgrund einer Hämochromatose wurden in 70% der untersuchten Fälle erhöhte p53-Genmutationen (Codon 220) gefunden (Vautier 1999). Es wurden auch Mutationen des p53-Gens in Lebergewebe ohne Tumor gefunden (Codon 249), allerdings fanden diese in unterschiedlichen Codonen statt. Die unterschiedlichen p53-Mutationen könnten ein Hinweis auf die frühe oder späte DNA-Schädigung bei Hämochromatosepatienten sein (Ballhausen 2003).

#### 1.1.2.8. Morbus Wilson

Bei der seltenen hepatolentikulären Degeneration kommt es zur Anreicherung von Kupfer insbesondere in der Leber, den Basalganglien, den Augen (Kayser-Fleischer-Ring), den Nieren und im Blut. In 95% der Fälle findet sich eine erniedrigte Coeruloplasmin-Konzentration im Serum.

Der Morbus Wilson ist eine autosomal-rezessive Erkrankung mit Lokalisation des Gendefektes auf dem langen Arm des Chromosom 13, im ATP7B-Gen, in welchem über 250 Mutationen gefunden wurden. In Deutschland betrifft es etwa 3 von 100.000 Patienten. Früh manifestiert sich die Leberzirrhose und führt häufig vor dem 45. Lebensjahr zum fulminanten Leberversagen, Nierenversagen und zur Koagulopathie. Im frühen Versterben erklärt sich die seltenere Entwicklung eines HCC (Bacon 1999). Das Kupfer selbst ist in hoher Konzentration toxisch und hat mutagene Eigenschaften. Es besteht eine chronische Entzündung mit oxidativem Stress, der zu genetischen Veränderungen führt. Dabei finden sich u.a. Mutationen von p53 am Codon 249 und 250, auch in nichtzirrhotischen Leberzellen (Hussain 2000).

### 1.1.3. Pathologie und Stadieneinteilung

Makroskopisch werden 4 Ausbreitungsmuster unterschieden:

- Expansiver Typ (18%) mit großen solitären oder multiplen Tumorherden und häufig auch Satellitenknoten
- Infiltrativer Typ (33%)
- Gemischter Typ (42%) mit expansiven und infiltrativem Wachstum
- Diffuser Typ (5%), der als Leberzirrhose mit Regeneratknoten imponieren kann

(Tischoff 2007)

Es finden sich großknotige, unilokulär, multifokal, multizentrisch oder diffus wachsende Tumore. Die multifokalen können simultan entstandene Tumore oder ein Primärtumor mit intrahepatischer Metastasierung sein.
Intrahepatisch breitet sich das HCC entlang der Portalvenen aus, selten kommt es zur Infiltration der großen Gallengänge. Bei etwa 60% der HCC-Erstdiagnosen bestehen bereits Metastasen. Die Metastasierung verläuft hauptsächlich hämatogen in die Lunge (47%), die Knochen (37%), die Nebennieren (12%) und das ZNS und Peritoneum (5-10%) (Bosman 2010).

#### 1.1.3.1. Histopathologie der Präparate

Das HCC zeigt verschiedene Wachstumsformen, welche auch kombiniert vorkommen können. Mikroskopisch zeigt sich ein trabekuläres, pseudoglanduläres oder azinäres Wachstum oft in gut bis mäßig differenzierten Tumoren, während das schlecht differenzierte HCC ein solides Wachstumsmuster zeigt (Tischoff 2007).
Der häufigste Wachstumstyp ist der trabekuläre Typ des gut bis hochdifferenzierten Tumors. Bei dem selteneren soliden Typ handelt es sich um undifferenzierte Tumorzellen mit Verlust der Trabekelstruktur und pleomorphen Zellen in unterschiedlicher Größe, Form und Anfärbbarkeit. Bei dem zirrhösen Tumor mit epithelialen Tumorzellverbänden und fibinösem Stroma handelt es sich um mäßig differenzierte Zellen. Bei der pseudoglandulären oder azinären Wachstumsform findet sich Zelldetritus, fibrinöses Exudat und Gallepigment in gut bis mäßig differenzierten Tumorzellen. Als sehr seltene Form findet sich bei jungen Menschen die fibrolamelläre Ausbreitung des HCC ohne Leberzirrhose. In etwa 5% der Fälle handelt es sich um eine

Kombination aus HCC und CC. Zur manchmal schwierigen Abgrenzung des hochdifferenzierten HCC von nicht malignen Tumoren, wie Regeneratknoten, fokaler nodulärer Hyperplasie, dysplastischen Knoten und dem hepatozellulären Adenom, stehen immunhistochemische Methoden zur Differenzierung zur Verfügung (Riemann 2008).

#### 1.1.3.2. Grading

Der Differenzierungsgrad (G) wird durch die vorhandenen Gradingsysteme benannt.

| **Histopathologisches Grading (nach Edmondson und Steiner 1954)** | |
|---|---|
| **G1** | hoch differenziert; Tumorzellen sind schwer von denen eines hepatozellulären Adenoms unterscheidbar (WHO 1) |
| **G2** | gut differenziert; Tumorzellen sind ähnlich den normalen Hepatozyten, aber die Kerne sind größer und mit höherem Chromatingehalt; häufig azinäre Anordnung (WHO 1) |
| **G3** | mäßig differenziert; die Kerne sind größer und chromatinreicher als bei G2, eine azinäre Anordnung ist seltener als bei G2, häufiger Tumorriesenzellen (WHO 2) |
| **G4** | schlecht differenziert; hyperchromatische Kerne, Trabekel sind schwer zu identifizieren (WHO 3) |

*Tabelle 3: Edmondson-Steiner-Grading*

| **Grading nach WHO (Hamilton und Aaltonen 2000)** | |
|---|---|
| **GX** | nicht bestimmbar |
| **G1** | gut differenziert (am häufigsten bei Tumoren <2 cm) |
| **G2** | mäßig differenziert (am häufigsten bei Tumoren >3 cm) |
| **G3** | schlecht differenziert (selten in niedrigen T-Kategorien) |
| **G4** | (nur für undifferenzierte Karzinome) |

*Tabelle 4: WHO-Grading*

| **Japanisches Grading des HCC (Japanese Liver Cancer Study Group 1997)** | |
|---|---|
| **G1** | gut differenziert |
| **G2** | mäßig differenziert |
| **G3** | schlecht differenziert |
| **G4** | undifferenziert |

*Tabelle 5: Japanisches Grading*

#### 1.1.3.3. Typisierung der Lebertumore nach WHO-Klassifikation

Das Staging erfolgt nach der TNM-Klassifikation (Wittekind 2010).

| **TNM Klassifikation** | |
|---|---|
| **T** | **Ausdehnung des Primärtumors** |
| T0 | keine Anzeichen eines Primärtumors oder Primärtumor unbekannt |
| T1 | solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion |
| T2 | solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder multiple Tumoren <5 cm |
| T3 | multiple Tumoren >5 cm (T3a) oder Tumor mit Befall eines größeren Astes der Vv.hepaticae oder der V.portae (T3b) |
| T4 | Tumor mit Invasion eines Nachbarorgans außer Gallenblase oder Perforation des Peritoneums |
| **N** | **Regionale Lymphknotenmetastasen** |
| Nx | regionale Lymphknoten nicht zu beurteilen |
| N0 | keine regionalen Lymphknoten befallen |
| N1-3 | zunehmender Befall lokoregionaler Lymphknoten |
| **M** | **Fernmetastasen** |
| M0 | keine Fernmetastasen vorhanden |
| M1 | Fernmetastasen vorhanden (in Organen und allen nicht lokoregionalen Lymphknotenmetastasen) |
| **L** | **Lymphgefäßinvasion** |
| L0 | keine Lymphgefäßinvasion |
| Lx | Lymphgefäßinvasion nicht beurteilbar |
| L1 | Lymphgefäßinvasion |
| **V** | **Veneninvasion** |
| V0 | keine Veneninvasion |
| Vx | Veneninvasion nicht beurteilbar |
| V1 | mikroskopische Veneninvasion |
| V2 | makroskopische Veneninvasion |
| **R** | **Resttumor nach nichtoperativer oder operativer Therapie** |
| R0 | kein Residualtumor |
| Rx | Vorhandensein eines Residualtumors nicht beurteilbar |
| R1 | mikroskopischer Residualtumor |
| R2 | makroskopischer Residualtumor |

| C | Diagnosesicherheit |
|---|---|
| C1 | Diagnosesicherung durch Standardverfahren (Rö., Endoskopie) |
| C2 | Diagnosesicherung durch spezielle Verfahren (MRT, CT, Nuklearmedizin, Biopsie) |
| C3 | Diagnosesicherung durch chirurgische Exploration mit Biopsie |
| C4 | Diagnosesicherung durch definitive Chirurgie und pathologische Untersuchung |
| C5 | Diagnosesicherung durch Autopsie |
| y-Symbol | wird der Klassifikation vorangestellt nach einer neoadjuvanten Therapie |
| p-Symbol | Wird postoperativ vom Pathologen vorangestellt (C4-Diagnosesicherheit) |
| r-Symbol | wird der Klassifikation vorangestellt, wenn es sich um ein Rezidiv handelt |

| UICC Stadieneinteilung | | | |
|---|---|---|---|
| Stadium I | T1 | N0 | M0 |
| Stadium II | T2 | N0 | M0 |
| Stadium IIIA | T3 | N0 | M0 |
| Stadium IIIB | T1 | N1 | M0 |
| | T2 | N1 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| Stadium IVA | T4 | jedes N | M0 |
| Stadium IVB | jedes T | jedes N | M1 |

*Tabelle 6: WHO-Stadieneinteilung*

#### 1.1.3.4. Stadieneinteilung des HCC

Bei der Therapieplanung ist nicht nur die Tumorausbreitung (TNM-Stadium) (Llovet1998), sondern auch die noch erhaltene Leberfunktion (Child-Pugh-Stadium) (Mazzaferro 1996) und der klinische Zustand des Patienten (Performance-Status, PS) (Reig 2014) entscheidend.
Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Klassifikationssysteme entwickelt. Die aktuellen und wichtigsten sind der Okuda-Score, der CLIP-Score, der Tokyo-Score und der BLCL-Score.

Okuda-Score:

Der Okuda-Score wurde 1985 etabliert und berücksichtigt die klinischen Parameter Leberbefall und Aszites, sowie die laborchemischen Parametern Albumin und Bilirubin (Okuda 1985).

| **HCC-Graduierung nach Okuda** | | |
|---|---|---|
| | **0 Punkte** | **1 Punkt** |
| **Leberbefall** | 50% | >50% |
| **Ascites** | nein | ja |
| **Bilirubin** | 3 mg/dl | >3 mg/dl |
| **Albumin** | >3 g/dl | <3 g/dl |
| | | |
| **Stadium I** | 0 Punkte | |
| **Stadium II** | 1-2 Punkte | |
| **Stadium III** | 3-4 Punkte | |

*Tabelle 7: Okuda Score*

CLIP-Score:

Der CLIP-Score (Cancer of the Liver Italian Program) intergriert zusätzlich zu der Tumorausbreitung das Child-Pugh-Stadium als Grad der Leberzirrhose, den Tumormarker α-Feto-Protein und eine vorhandene Protalvenenthrombose (Gallo 1998). Der Score ergibt sich aus der Summe der vergebenen Punkte der einzelnen Variablen.

| **CLIP-Score** | | | |
|---|---|---|---|
| **Variable** | **0 Punkte** | **1Punkt** | **2Punkte** |
| **Child-Pugh-Stadium** | A | B | C |
| **HCC-Morphologie** | Solitär und Ausdehnung <50% | Multilokulär und Ausdehnung <50% | Infiltrativ oder Ausdehnung >50% |
| **AFP (ng/ml)** | <400 | >400 | |
| **Pfortaderthrombose** | Nein | Ja | |

*Tabelle 8: CLIP Score*

Tokyo-Score:

Der Tokyo-Score beinhaltet Serum-Albumin, Bilirubin, Tumorgröße und Tumoranzahl und teilt diese in 3 Kategorien ein (Tateishi 2005).

| **Tokyo-Score** | | | |
|---|---|---|---|
| | **0 Punkte** | **1Punkt** | **2Punkte** |
| **Albumin (g/dl)** | >3,5 | 2,8-3,5 | <2,8 |
| **Bilirubin (mg/dl)** | >1 | 1-2 | >2 |
| **Tumor (Größe in cm)** | <2 | 2-5 | >5 |
| **Tumor (Anzahl** | <3 | | >3 |

*Tabelle 9: Tokyo-Score*

BCLC-Score:

Der BCLC-Score (Barcelona Clinic Liver-Cancer) berücksichtigt das Okuda-Stadium, den Child-Phug-Score, den Bilirubinwert und die Tumorgröße. Das Vorliegen einer portalen Hypertension und von Fernmetastasen wird ergänzt. Zusätzlich wird der Allgemeinzustand des Patienten über den Performance Status (PS) beurteilt (Llovet 1999). Diese Klassifikation hat sich als gut geeignet etabliert und wird mit einer validen Prognoseabschätzung verbunden (Marrero 2005).

| **BCLC Staging** | | |
|---|---|---|
| **Stadium** | **Tumor** | **Assoziierte Leberfunktion** |
| | **Stadium A (early HCC)** | |
| **A1 PS 0** | Singulärer Herd | Keine portale Hypertension |
| **A2 PS 0** | Singulärer Herd | Bilirubin normal, Portale Hypertension |
| **A2 PS 0** | Singulärer Herd | Portale Hypertension<br>Bilirubin normal |
| **A3 PS 0** | Singulärer Herd | Portale Hypertension, erhöhtes Bilirubin<br>erhöhtes Bilirubin |
| **A4 PS 0** | 3 Herde <3 cm | Child-Pugh A-B |
| | **Stadium B (intermediate HCC)** | |
| **PS 0** | Groß, mehrere Herde | Child-Pugh A-B |
| | **Stadium C (advanced HCC)** | |
| **PS 1-2** | Vaskuläre Invasion oder extrahepataler Befall | Child-Pugh A-B |
| | **Stadium D (end stage HCC)** | |
| **PS 3-4** | Jede Größe/Verteilung | Child-Pugh C |

*Tabelle 10: BCLC Score*

Der Score wurde mehrfach aktualisiert und es wurde damit ein Behandlungsalgorithmus generiert, welcher laut der deutschen S3-Leitlinie zum Staging und zur Therapiestratifikation in der Tumorkonferenz hinzugezogen werden soll (Greten 2013).

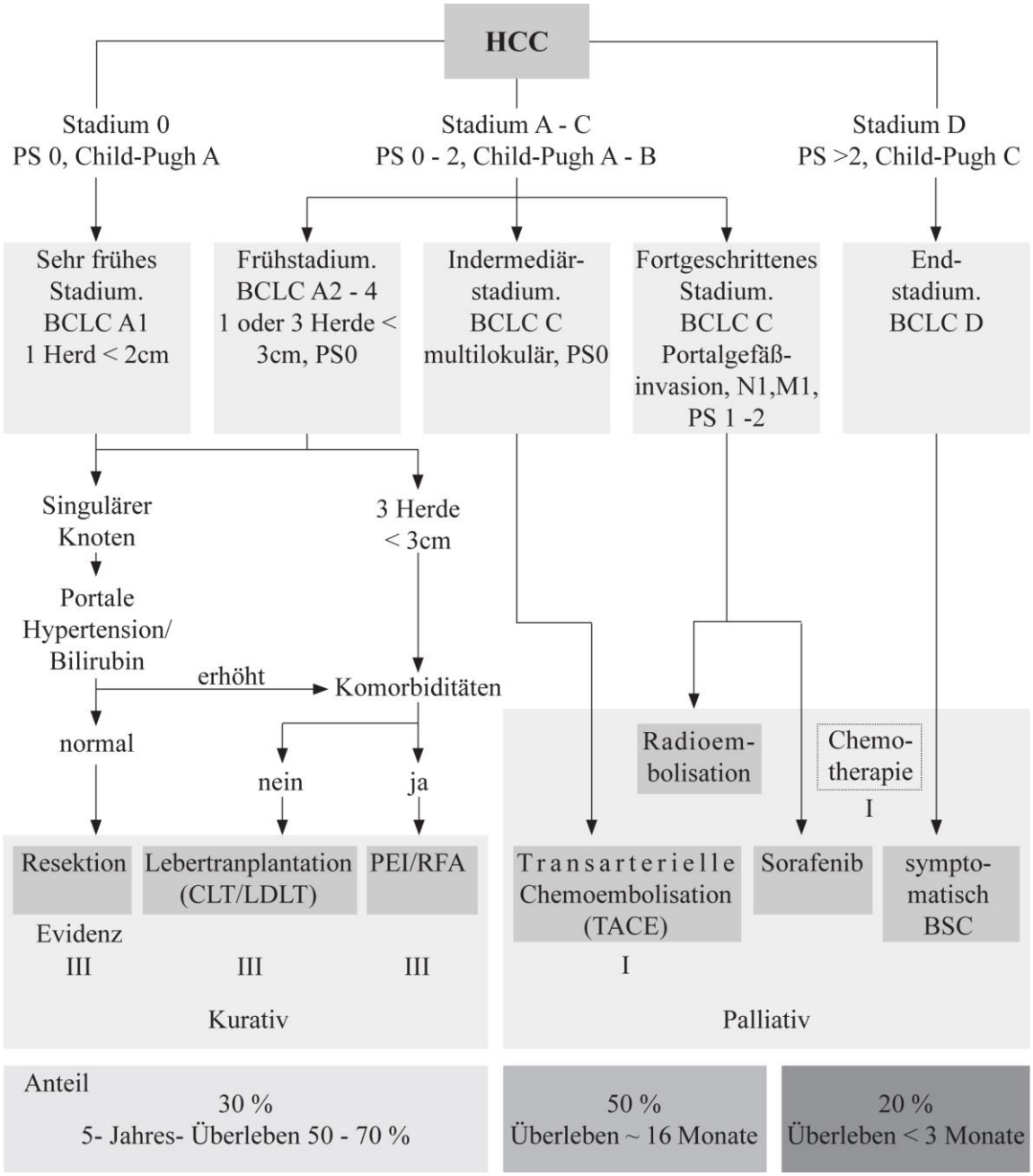



*Abbildung 2: Behandlungsalgorithmus (Barcelona Clinic Liver Cancer)*

### 1.1.4. Chirurgische Therapie

#### 1.1.4.1. Die Leberteilresektion

Patienten ohne Leberzirrhose und mit potentiell resektablem HCC sollten reseziert werden. Die Therapieentscheidung sollte in einem Zentrum für hepatobiliäre Chirurgie getroffen werden (S3-Leitlinie HCC [Greten 2013]).
Die chirurgische Resektion des Tumors bei Patienten mit unifokalen, kleinen Tumoren ohne Leberzirrhose ist eine potentiell kurative Therapie, allerdings findet man diese Situation nur bei etwa 5% der Erstdiagnosen (Llovet 1999).
Bei unifokalen Tumoren mit einer Größe von <5cm kann mit einer Leberresektion eine 5-JÜR von 40-60% (S3-Leitlinie HCC [Greten 2013]) erreicht werden.
Die Therapie der Wahl bei einem HCC ohne Zirrhose ist die bevorzugte anatomiegerechte, segmentorientierte Leberresektion, aber auch die atypische Resektion wird bei größeren Tumoren durchgeführt, wobei mindestens ein Restlebervolumen von 25% erhalten bleiben soll. Die perioperative Mortalitätsrate wird unter 2% angegeben (Lang 2000). Die Einhaltung eines ausreichenden Sicherheitsabstands von 2 cm hat bezüglich der lokalen Rezidivrate nur teilweise Vorteile gezeigt. Andere Studien zeigten für Tumore <2cm mit Mikrometastasen Vorteile beim Einhalten eines 2cm-Sicherheitsabstandes (Shi 2007, Poon 2000). Dies könnte mit den molekularbiologischen Eigenschaften der weniger aggressiven größeren Tumore zusammenhängen, welche langsamer wachsen und weniger Mikrosatelliten ausbilden (Farkas 2012).
Die 5-JÜR beträgt 40-60%, da in nicht-zirrhotischen Lebern das HCC meist eine aggressivere Tumorbiologie aufweist. Trotz einer R0-Resektionsrate von 90% zeigten sich das höhere T-Stadium und die Gefäßinfiltration als prognostisch ungünstig (Lang 2005).
Patienten mit einem lokalen Rezidiv können erneut reseziert werden und haben eine 5-JÜR von bis zu 80%, wenn keine Portalveneninfiltration vorlag (Minagawa 2003).

Patienten mit Leberzirrhose in HCC mit guten klinischen Voraussetzungen kommen für eine Resektion in Betracht, wenn das Stadium Child-Pugh A/BCLC-Stadium 0 vorliegt. Bei Vorliegen einer portalen Hypertension erhöht sich das perioperative Risiko. Häufig muss eine atypische Resektion durchgeführt werden, um mindestens 40-50% funktionstüchtiges Restvolumen zu erhalten und die postoperative Leberfunktion zu gewährleisten (Farkas 2012, Breitenstein 2009). Somit sind Patienten im Child-Pugh-Stadium C und meistens auch im Stadium B nicht geeignet.

Nach der Leberteilresektion des HCC in der Leberzirrhose besteht ein Rezidivrisiko. Sie ist nur potentiell kurativ, da die Leberzirrhose als Präkanzerose bestehen bleibt und durch die Resektion ein Leberregenerationsreiz in Gang gesetzt wird, der proliferativ wirkende Signalwege aktiviert, wodurch es zur Hypertrophie, aber auch einer Wachstumsförderung von im Gewebe verbliebenen Mikrometastasen kommt (Ispikoudis 2012). Daraus ergeben sich trotz hoher R0-Resektionsrate 5-JÜR von 30% bis über 50% (Spangenberg 2009).

#### 1.1.4.2. Lebertransplantation

Für Patienten mit einem HCC und Leberzirrhose innerhalb der Mailand-Kriterien besteht eine Indikation zur Lebertransplantation (S3-Leitlinie HCC [Greten 2013]).
Die Kriterien werden in den sog. Mailand-Kriterien definiert (Mazzaferro 1996):
1 Läsion ≤5cm oder 3 Läsionen ≤3cm im Durchmesser, keine makrovaskuläre Gefäßinvasion. Dies entspricht einem frühen BCLC-Stadium, welche nur 10-20% aller HCC-Patienten erfüllen (Llovet 1999).
Bei strikter Selektion können Überlebensraten vergleichbar mit benignen Grunderkrankungen erreicht werden. Es werden 5-Jahresüberlebensraten bis 70% erreicht, die Lokalrezidivraten liegen unter 15% (Bruix 2011).
Auch für Patienten außerhalb der Mailand-Kriterien kann eine Indikation zur Lebertransplantation bestehen. Bei den Up-to-7-Kriterien wird die Summe der Gesamtzahl an Tumoren und des Durchmessers des größten Tumors gebildet, die 7 nicht übersteigen darf. Hierbei wurde bei den transplantierten Patienten außerhalb der Mailand-Kriterien, aber innerhalb der Up-to-7-Kriterien ohne Mikroinvasion und Metastasen ein 5-Jahres-Überleben von 71,2% (Mazzaferro 2009) und somit ein ähnlich gutes Langzeitüberleben wie bei den Mailand-Kriterien erreicht.
In Deutschland wurden im Jahr 2011 insgesamt 1.119 Lebertransplantationen durchgeführt, die Indikation war in 20% der Fälle ein Lebertumor. Annähernd ausgeglichen war das Geschlechterverhältnis, das durchschnittliche Alter der Empfänger betrug etwas weniger als 50 Jahre. Die 1-, 5- und 10-JÜR nach Lebertransplantation lagen in Europa bei 82%, 71% und 61%. Aus den Daten der Charité Berlin geht hervor, dass die 1-, 5- und 10-JÜR bei etwa 100-120 Lebertransplantationen jährlich bei 90,4%, 79,6% und 70,3% liegen (Pascher 2013). 2011 wurden 1792 Patienten neu auf die Warteliste zur Lebertransplantation aufgenommen (Manns 2013). Entsprechend der aktuellen S3-Leitlinie geschieht die Indikationsstellung unter

Zuhilfenahme des BCLC-Scores, mit der Maßgabe der weiteren Forschung bezüglich der Prognosefaktoren. Desgleichen werden die Allokationskriterien regelmäßig modifiziert und signifikante Forschungsergebnisse integriert.

#### 1.1.4.3. Leberlebendspende

Durch die zunehmende Organknappheit hat sich in den letzten 10 Jahren die Leberlebendspende (LDLT – Living Donor Liver Transplantation) weiterentwickelt und wurde zunächst Patienten außerhalb der Mailand-Kriterien empfohlen. Dabei stellt sich das Risiko des Donors in erfahrenen Zentren als gering dar. Steht ein geeigneter Spender zur Verfügung, entfällt die Wartezeit und somit die Tumorprogression und damit wiederum die Verschlechterung der Prognose.
Die Prognose bezüglich der Überlebenszeit und die Komplikationen nach LDLT sind vergleichbar mit der DDLT (Deceased Donor Liver Transplantation) und abhängig vom präoperativen Tumorstadium, der Leberfunktion und der portalen Hypertension des Empfängers (Mazzaferro 2008).

### 1.1.5. Weitere Therapieoptionen

Bei etwa 80% der jährlichen HCC-Patienten kann weder eine kurative Resektion noch eine Lebertransplantation durchgeführt werden.
Die transarterielle Chemoembolisation (TACE), die selektive interne Radiotherapie (SIRT), die Radiofrequenzablation (RFA) und die Chemotherapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenid (Nevaxar®) werden als Therapie zur Reduktion der Tumormasse, zur lokalen Tumorkontrolle als Überbrückungstherapie vor und während der Wartezeit auf eine Organallokation, stadienadaptiert und komplementär angewandt.

## 1.2. Zellkernparameter und DNA-Ploidie

### 1.2.1. Zellzyklus

Die Zellvermehrung erfolgt bei allen Eukaryoten, so auch bei den Hepatozyten, durch die mitotische Teilung. Der Zellzyklus wird in die 3 Phasen der Interphase und die Mitose unterteilt. Es wird das Zellwachstum, die Zellverdopplung und Zellteilung kontrolliert eingeleitet.

Der ruhende Hepatozyt tritt aus der G0-Phase in den Zellzyklus ein. Die G0-Phase ist die Ruhephase und nicht an der Zellteilung beteiligt.

Durch Eintritt in die Interphase beginnt in der G1-Phase, die Wachstumsphase mit der Proteinsynthese (Zytosol) und die Produktion zytoplasmatischer Organellen. In den Phasen G0 und G1 ist der normale DNA-Gehalt (c-Content) diploid oder 2c. In der S(Synthese)-Phase wird DNA synthetisiert und die Chromosomen werden verdoppelt. Am Ende der S-Phase und in der G2-Phase werden Fehler behoben, die während der Replikation entstanden sind. In der G2- und M-Phase ist der DNA-Gehalt vor der Zellteilung 4c.

Die Mitose durchläuft 6 Phasen, an deren Ende die Zytogenese stattfindet, in der sich die Zelle in 2 Tochterzellen mit je 2 Chromosomen mit je einem DNA-Gehalt von 2c geteilt hat.

### 1.2.2. Euploidie-Polyploidie

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist als Doppelhelix in den Chromosomen arrangiert, befindet sich fast ausschließlich in den Zellkernen und trägt die genetische Information.

Die DNA-Ploidie gibt den DNA-Gehalt (c) einer Zelle an, die Ploidie entspricht der Chromosomenzahl (n).

Diploid bezeichnet eine normale, euploide 2n-Chromosomenzahl in somatischen Zellen. Der DNA-Gehalt 2c in einer diploiden Zelle beträgt 7,18 Pikograrn (6,3 +/- 0,5 pg [1pg=10hoch minus12g]) und wird auch als euploid bezeichnet, wenn sich der Zellkern-DNA-Gehalt im Bereich des Mittelwertes (+/-15%) befindet.

Haploid ist die einfache bzw. halbe 1n-Chromosomenzahl, welche sich in den Keimzellen findet.

Die in manchen Gewebearten stattfindende physiologische Vervielfachung des Chromosomensatzes 2c wird als euploide Polyploidisierung bezeichnet. Es finden sich ganzzahlige Potenzierungen (4c, 8c, 16c, 32c) des 2c-Wertes. Sie entstehen durch vermehrte

Regeneration, in funktionell stark beanspruchten Zellen (Myozyten), durch Einflüssen von Viren (HPV), aber auch durch Behandlung mit Zytostatika und Bestrahlung (Böcking 2006, Biesterfeld 1994).
So finden sich in der Leber metabolisch aktive Hepatozyten, deren Zellkerne einen polyploiden DNA-Gehalt aufweisen. Diese entstehen durch die Unterlassung der Mitose (mitotischen Teilung) nach der S-Phase. Es handelt sich um numerische Aberrationen mit einem ganzzahligen Vielfachen des habloiden Chromosomensatzes (euploide Polyploidie).
Etwa 25% der Hepatozyten sind diploid (2c), 70% sind tetraploid (4c) und 5% sind oktaploid (8c). Die Größe der Hepatozytenzellkerne ist abhängig von der Polyploidie, welche in Laufe des Lebens zunimmt (Kann 2013).

### 1.2.3. Aneuploidie

Die numerischen und strukturellen Abweichungen außerhalb der numerischen Aberration sind am abweichenden DNA-Gehalt messbar und werden als chromosomale Aneuploidie bezeichnet, wenn die Abweichung sich <>10% von der Norm unterscheidet (Haroske 2001).
Die chromosomale Aneuploidie gilt international als Marker für das Vorliegen von Tumorzellen, welche sich schrittweise durch mehrfache Aneuploidisierungen entwickelt hat (Duesberg 2003, 2004). Die meisten Tumore, auch gutartige Tumore, zeigen numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen (chromosomale Aneuploidie) (Böcking, 2006).
Die chromosomale Aneuploidie entsteht durch die Chromosomeninstabilität und ist ein frühes Schlüsselereignis in der Tumorgenese (Böcking 1995, Haroske 2001). Es kommt zu Störungen im Zellzyklus. Die gestörte DNA-Synthese und Dysfunktionen sowie Defekte der an der Zellteilung beteiligten Organellen verhindern die regelrechte Aufteilung des Chromosomensatzes auf die Tochterzellen (Böcking 1997).

Es kommt zu Einflüssen auf Onkogene und Tumorsuppressorgene, Proliferation und Apoptose. Dies beinhaltet den Zelltod und Stopp der Zellteilung, die Immortalisierung der Zellen, die neoplastischen Transformation und Resistenz gegen Chemotherapie (Böcking 2006, Haroske 2001).

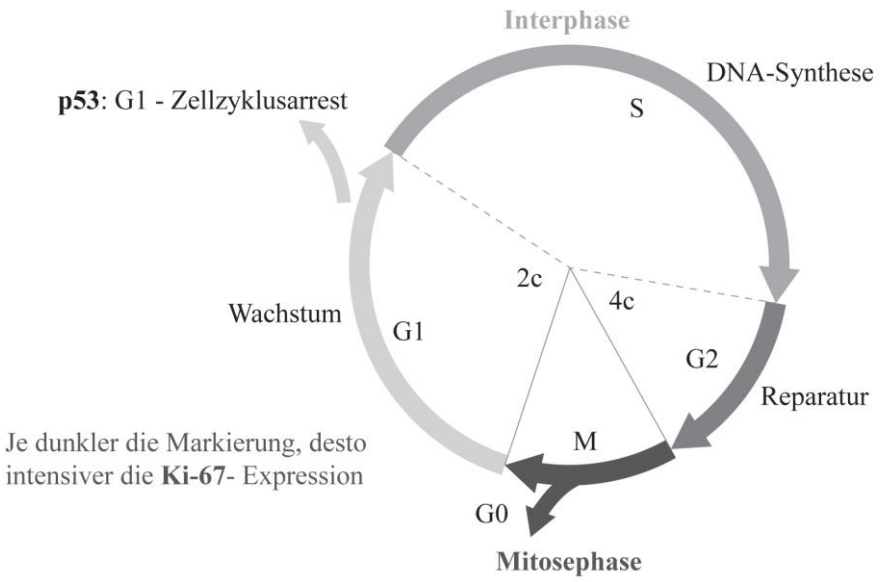



*Abbildung 3: Zellzyklus*

### 1.2.4. Das p53-Tumorsuppressorgen

Das p53-Tumorsuppressorgen wurde 1979 erstmals genannt. Es ist eines der meist untersuchten tumorassoziierten Antigene (TAA) und in niedriger Konzentration in Zellkernen normaler Zellen kaum zu detektieren (Benchimol 1982). Es wird in fast allen somatischen Zellen synthetisiert und hat eine sehr kurze Halbwertzeit (t ½) von 6-20 Minuten, abhängig vom Zell- und Gewebetyp.

Durch das Einwirken einer Vielzahl von Stresssignalen und Alarmauslösern wird das p53-Gen aktiviert. Die folgende Aktivierung von Transkriptionsprogrammen leitet entweder den Zellzyklusarrest, die Apoptose ein oder die DNA-Reparatur wird durchgeführt (Guardian of the Genom/Gatekeeper/Caretaker).

Durch Mutationen kommt es zu einem Funktionsverlust des Wildtypes. Mutiertes p53(mutp53)-Antigen wurde in ungefähr 50% der untersuchten Tumore und in vielen Tumorarten gefunden.

Die Mutationen (mutp53) des Wildtyps p53 sind zu 80% Punktmutationen, die nur eine veränderte Aminosäure enthalten. Die mutp53-Proteine haben eine deutlich verlängerte Halbwertzeit von 1-24 Stunden, wodurch es im Zellkern akkumuliert. Diese Akkumulation ermöglicht es, mit einem immunologischen Marker mutiertes p53 zu detektieren (Soussi 2005). Das mutp53 verliert die Tumorsuppressorfunktionen des Wildtyps (Loss of Function) und gewinnt onkogene Eigenschaften (Gain of Function).

Eine Störung der Funktion des Tumorsuppressorgens ist ein kritischer Schritt in der

Karzinogenese. Die Zelle mit einer fehlerhaften DNA kann sich der Apoptose entziehen (Loss of Function, antimorphic) und zu einer malignen Zelle werden, die durch mutp53 ein höheres Wachstums- und Invasionspotential besitzt (Gain of Function, neomorphic).
p53-Antikörper in Tumorzellen wurden erstmals 1982 beschrieben (Crawford 1982) und konnten als spezifischer Marker für Malignität dargestellt werden (Soussi 2000).
p53-Mutationen wurden in ungefähr 50% der Aflatoxin bedingten Leberkarzinome (Ozturk 1999, Tannapfel 2001, Buendia 2000). Es wurde in 28-42% der nicht-Aflatoxin-induzierten HCC gefunden, dabei unterschieden sich die HBV-bedingten HCC mit 45% von den HCV- bedingten HCCs mit 13% von p53-Alterationen (Teramoto 1994).
In einer Metaanalyse zeigten 26-46% der untersuchten HCC-Tumoren p53-Mutationen, dies war mit einer deutlich schlechteren Prognose bezüglich der Überlebenszeit der Patienten verbunden (Zhan 2012).

### 1.2.5. Ki-67

Der monoklonale Antikörper Ki-67 reagiert mit einem zellproliferationsassoziierten Zellkernantigen und wurde von Gerdes et al. 1983 beschrieben.
Das Ki-67-Gen produziert das Ki-67-Antigen in den Zellkernen von proliferierenden Zellen in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, nicht aber in der G0-Ruhephase. Als Proliferationsmarker zeigt es den Grad der Zellproliferation einer Zellpopulation an und wird als Prognoseindikator für malignes Geschehen herangezogen (Gerdes 1984). Durch die immunhistochemische Anfärbung des nukleären Proteins mit einem monoklonalen Antikörper (z.B. MIB-1) des Ki-67-Antigens kann das Molekül quantifiziert werden.
Ki-67 wird etwa in der mittleren bis späten G1-Phase positiv. In zahlreichen Untersuchungen wurde ein stetiges Ansteigen des Ki67-Antigens nachgewiesen. Dabei nimmt die Konzentration kontinuierlich in der S-Phase und der G2-Phase zu und erreicht seine höchsten Wert in der Mitose-Phase (Bruno 1992, du Manoir 1991). Bei der Halbwertszeit des Ki-67 von etwa 60 Minuten fällt die Konzentration nach der Mitose schnell wieder ab (Bruno 1992).
Die Fraktion von Ki-67-positiven Tumorzellen korreliert oft mit dem klinischen Verlauf der Krankheit (Scholzen 2000).
Die Bestimmung der Proliferationsfraktion mittels Ki-67-Antikörpern gehört bei verschiedenen Malignomarten zur Routine und ermöglicht die Diagnose zu sichern, Therapieentscheidungen zu treffen und dient als Prognosefaktor (Schwarting 1993).

## 1.3.Fragestellung

Das hepatozelluäre Karzinom zählt zu den häufigsten malignen Tumoren weltweit. Nur 15% der HCC-Erkrankungen können der potentiell kurativen Lebertransplantation zugeführt werden. Wenn möglich, wird eine R0-Leberteilresektion durchgeführt.
Die Untersuchung der tumorbiologischen Eigenschaften des HCC nimmt, auch aufgrund der eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten, an Bedeutung zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fallzahl von 85 Patienten mit einem Hepatozellulären Karzinom (HCC) nach Leberteilresektion erhoben.
Die Tumorgewebe werden auf ihren DNA-Gehalt untersucht, anschließend wird der DNA-Index mit den klassischen Prognoseparametern verglichen.
Es werden außerdem immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes auf die Expression von mutp53 und Ki-67 durchgeführt und auf ihre prognostische Signifikanz untersucht.
Anhand der gewonnenen Ergebnisse wird geprüft, ob und bei welchem Cut-Off-Wert der DNA-Index auf eine günstigere Tumorbiologie hinweist und einen Überlebensvorteil für die Patienten anzeigt.
Ebenso soll untersucht werden, ob die Mutation des Apoptosemarkers p53 und die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 mit einer ungünstigen Tumorbiologie verbunden sind und somit einen Überlebensnachteil für die Patienten darstellen.
Am Ende soll diskutiert werden, welche der untersuchten Variablen sich als signifikanter Prognosefaktor eignet und welche relevanten Schlussfolgerungen sich daraus für Diagnostik und Therapieplanung ziehen lassen.

# 2. Material und Methode

## 2.1.Patienten

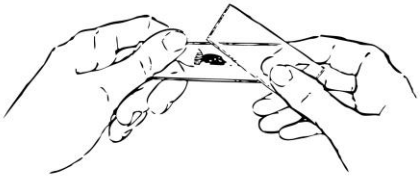
In die Untersuchung wurden 85 Patienten eingeschlossen, welche zwischen Januar 2002 bis Dezember 2006 in der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, aufgrund eines Lebertumors vorstellig wurden und aufgrund eines hepatozellulären Karzinoms eine Leberteilresektion hatten.
Die Datenerhebung erfolgte mithilfe der vorliegenden Patientenakten, Operationsberichten und Pathologiebefunden. Entsprechend dem TNM-Stadium nach WHO wurden das pathologische Tumorstadium (pT), das pathologische Lypmphknotenstadium (pN), Metastasenstadium (M), Resektionsrand (R), die Gefäßinfiltration (V) und das histopathologische Grading (G) erhoben.
Die Tumorzellen wurden aus den operativ gewonnenen Tumorproben entnommen, welche bei -80°C tiefgefroren in der Tumorbank der Charité gelagert wurden.
Die zytometrischen und immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse wurden durch die zeitnahe Aufarbeitung der Präparate im eigenen zytometrischen Labor gewonnen.
Parallel wurden die Überlebensdaten erhoben. Ein großer Anteil der Patienten wurde in regelmäßigen Follow-up-Untersuchungen in der Klinik vorstellig, ansonsten wurden die Patienten oder deren Onkologen und Hausärzte mit einem standardisierten Antwortrückschreiben kontaktiert. Die Überlebensdaten wurden zum 15.10.2011 letztmalig aktualisiert (Patienteneinverständnis lag vor).

## 2.2. DNA-Bildzytometrie

Zunächst wurde das Tumormaterial auf Objektträger aufgebracht und die Präparate der HE-Färbung und anschließend der spezifischen Kernfärbung nach Feulgen unterzogen (Feulgen 1924, Atkin 1956).
Die pro Zellkern gebundene Farbstoffmenge wird mikrodensitorisch selektiv mit dem digitalen TV-Bild-Analysesystem gemessen (Böcking 1997).
Nach der Zellkernfärbung nach Feulgen ist die gemessene optische Dichte (IOD) ein Äquivalent für den DNA-Gehalt, welche anschließend im Histogramm dargestellt und ausgewertet wird.

### 2.2.1. Präparatebearbeitung und Färbeverfahren

### 2.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung



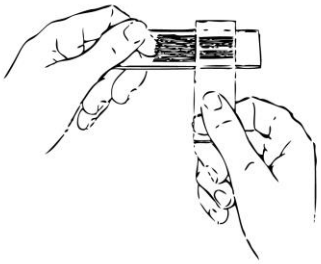


Abbildung 4: Scrapezytologie
Aufbringen des durch Abkratzen einer Probe gewonnenen Materials auf einen Glasträger (Glasstreifen).
*(mit freundlicher Genehmigung von H. Al-Abadi)*

Vermischen der Zellen und der Mikrofragmente: Unter stetigem leichten Druck wird der obere gegenüber dem unteren Objektträger nach rechts verschoben und damit das Material gleichmäßig ausgestrichen.

Mittels der Scrape- oder Kratzzytologie wurden von jeder aufgetauten Tumorprobe zunächst mindestens drei Ausstrichpräparate hergestellt. Dazu wurde die Probenschnittfläche vorsichtig mit einem Objektträger abgekratzt und auf einem anderen Objektträger ausgestrichen. Ein Präparat wurde mit Fixierungsspray fixiert, anschließend wurden alle Präparate 15 Minuten luftgetrocknet.

Von allen fixierten Präparaten wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt. Diese wurde in der aufgeführten Reihenfolge durchgeführt:

| **Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)** | | |
|---|---|---|
| **Abfolge** | **Material und Methode** | **Dauer/Frequenz** |
| 1. | Kernfärbung in Papanicolaou-Lösung 1b | 15-20 Sekunden |
| 2. | Abspülen in Aqua destillata | 30 Sekunden |
| 3. | Eintauchen in 0,25%igen HCL-Alkohol | 5x |
| 4. | Spülen mit fließendem heißen Leitungswasser | 6 Minuten |
| 5. | Zytoplasmafärbung mit 1%iger Eosinlösung | 2-5 Sekunden |
| 6. | Spülen in Ethanol (absoluter Alkohol, vergällt) | 2-5 Sekunden |
| 7. | Punkt 6 wiederholen | 3x |
| 8. | In Ethanol-Toluol spülen | kurz |
| 9. | In Toluol spülen | kurz |
| 10. | Eindecken (z.B. Entellan Schnelleindeckmittel) | - |

*Tabelle 11: Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Durch die HE-Färbung stellen sich die Zellkerne im Mikroskop hellblau und das Zytoplasma rosa bis rosarot dar und es lassen sich die Proben auf Qualität und Tumorgewebe untersuchen.
Zu den typischen Kriterien maligner Zellen gehören die Veränderungen des Zellkernes in Form von Polymorhphie, Hyperchromasie, Störung der Kern-Plasmarelation zugunsten des Kernes, die Pleomorphie der Nukleonen, Anisozytose und Anisokaryose.
Das HE-Präparat dient auch schon zur Identifizierung von genügend Referenzzellen, die später von jedem Präparat zur Kalibrierung des Messgerätes benötigt werden. Fanden sich zytomorphologisch genügend Hinweise auf das Vorhandensein von zahlreichen Tumorzellen, wurde nach einer Lufttrocknungszeit von 24 Stunden mit der Feulgen-Färbung fortgefahren.

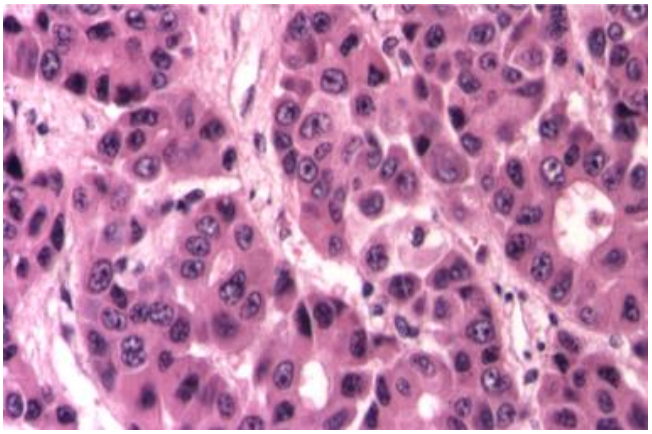


*Abbildung 5: HE-gefärbtes HCC*

### 2.2.3. Feulgen-Färbung

Feulgen und Rossenbeck entwickelten 1924 mit der sog. Nuklealreaktion zur Anfärbung des nukleären Chromatins eine DNA-Färbemethode. Es handelt es sich um eine spezifische, quantitativ exakte, stöchiometrische Färbung der DNA, welche die Grundlage der Zellkern-DNA-Bestimmungen durch die Zytophotometrie bildet (Feulgen 1924). Bei der DNA-spezifischen Färbung bleibt die Ribonukleinsäure (RNA) ungefärbt.
Das Prinzip der Feulgenschen Färbung beruht darauf, dass fuchsinschwefelige Säure (Schiffsches Reagenz) mit je zwei Aldehydgruppen, die einen Abstand von wenigsten 10Å haben, eine scharlachrote Verbindung eingeht.
Durch saure Hydrolyse mit Salzsäure (HCl) brechen die Wasserstoffbrücken der DNA-Doppelhelix auf und die Purinbasen Adenin und Guanin werden aus den DNA-Molekülen entfernt. Als Folge entsteht aufgrund der helikalen Struktur der DNA eine „Treppe“ aus freien Aldehyden. An die purinfreie Treppe lagert sich die farblose fuchsinschwefelige Säure an und reagiert mit den Aldehydgruppen. Fuchsin spaltet sich ab und es entsteht eine rot-violette Farbe

(Böcking 1997, Burck 1966, Buchner 1997).

Zur Feulgen-Färbung können luftgetrocknete, ungefärbte Proben, nach Pappenheim gefärbte Präparate und auch formalinfixiertes Gewebe in Paraffinblöcken verwendet werden.

Die Feulgen-Färbung wurde nach dem aufgeführten Färbeschema durchgeführt:

| Abfolge | Material und Methode | Dauer/Frequenz |
|---|---|---|
| 1. | Die luftgerockneten Präparate in 4% gepufferter Formalinlösung fixieren | 30 Minuten |
| 2. | Spülen mit Aqua destillata | 5 Minuten |
| 3. | Küvette stehen lassen und Aqua destillata laufen lassen | 10 Minuten |
| 4. | Fortsetzen mit dem Hydrolyseschritt der Feulgenreaktion:<br>5 N HCL (Titrisol) 1 mol/l (Fertiglösung) auf 200ml Aqua destillata auffüllen und in Küvette umfüllen. | - |
| 5. | Präparate in Glasfärbeständer stellen | 50 Minuten |
| 6. | Spülen mit Aqua destillata | 3x |
| 7. | Küvette mit Schiffsreagenz (gebrauchsfertige Lösung) füllen und Präparate in der Küvette bewegen | - |
| 8. | Küvette dunkel stellen | 60 Minuten |
| 9. | SO2-Spülung herstellen:<br>500 ml Aqua destillata, 30ml Kaliumdisulfat und 30ml 1% HCl auf 600 ml Aqua destillata auffüllen | - |
| 10. | SO2-Spülung auf die 3 Küvetten verteilen | - |
| 11. | Glasständer in die Küvetten | je 4 Minuten |
| 12. | Küvetten mit kaltem Leitungswasser spülen | je 5 Minuten |
| 13. | Spülen mit Aqua destillata | 1 Minute |
| 14. | Spülen mit 96%igem Alkohol | 2x je 1 Minute |
| 15. | Glasständer/Färbebehälter in Toluol spülen und bewegen | 1 Minute |
| 16. | Eindecken mit Entelan | 1 Minute |

*Tabelle 12: Färbung nach Feulgen*

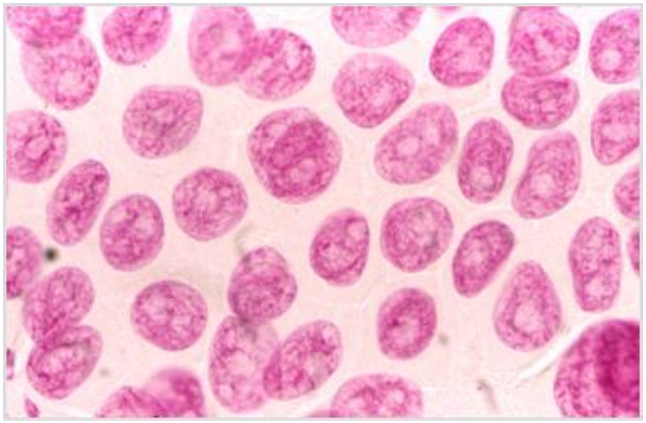


*Abbildung 6: Feulgenfärbung eines histologischen Präparates eines HCC*

### 2.2.4. DNA-Bildzytometrie und DNA-Histogramm

Zur Ermittlung des DNA-Gehaltes und der DNA-Ploidie der Tumorzellen stehen die Durchflusszytometrie (Flowzytometry) und die statische Bildzytometrie zur Verfügung.

Die Anfänge der Flusszytometrie wurden schon 1934 beschrieben (Ross 1996). Das Prinzip beruht auf der Messung der optischen Signale, die zuvor von DNA-spezifisch fluoreszenz-markierten Zellen beim Passieren eines Laserlichts abgegeben werden. Es können relativ schnell große Zellmengen (>1000 Zellen/sec) untersucht werden. Die simultane morphologische Beurteilung der Einzelzelle ist dabei nicht möglich. Fehlmessungen entstehen durch die Überlagerung bei großen Mengen an Epithel und Nichtepithelzellen gegenüber kleinen Mengen aneuploider Tumorzellen. Selten vorkommende, einzelne Zellen (Rare Events) mit hohem DNA-Gehalt (Exceeding Event) werden nicht erfasst (Motherby, 1998). Zweit- und Kontrolluntersuchungen sind nicht möglich (Ross 1996).

Die statische Bildzytrometrie ist ein standardisiertes Verfahren und hat ihre Anfänge um 1940 (Caspersson 1932, Sandritter 1952, Atkin 1956).

Mit der computergestützen Bildanalyse wird der DNA-Gehalt von spezifisch Feulgen-gefärbten Zellkernen ermittelt.

Sie bietet Vorteile gegenüber der Flowzytometrie. Der Hauptvorteil ist die Möglichkeit der interaktiven Messung. Dies erlaubt die Verwendung von bearbeiteten histologischen Schnittpräparaten, kleineren Proben und auch Kontrollmessungen. Die Zellen werden während der DNA-Analyse auch morphologisch beurteilt und die Messung wird visuell kontrolliert. Die Einzelzellmessung ist möglich, wodurch die stark veränderten und hoch aneuploiden Kerne

besser erfasst werden, auch wenn diese nur in kleinen Mengen vorliegen. Dies erhöht die Sensitivität des interaktiv erstellten Histogramms (Ross 1996). Zur Interpretation der Messwerte stehen objektive Algorithmen zur Verfügung.
In der vorliegenden Untersuchung wurden alle DNA-Gehalte mittels Bildzytometrie an einer Arbeitseinheit ermittelt.

#### 2.2.4.1. DNA-Bildzytometrie

Mittels der statischen DNA-Bildzytometrie wird die optische Dichte pro Tumorzellkern gemessen. Dabei werden die Grauwerte aller Pixel des Kernbildes summiert und als integrierte optische Dichte angegeben (IOD) (Böcking1997). Die IOD gilt als Äquivalenz des DNA-Gehaltes.
Die gemessenen nuklearen IOD-Werte der Tumorzellen werden in Bezug gesetzt zu dem IOD-Mittelwert der intern hinterlegten, gesunden Referenzzellen.
Alle DNA-Analysen wurden interaktiv an einer laboreigenen, computergestützten Bildanalyse-einheit durchgeführt.
Das computergestützte Bildanalysegerät setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:
Einem Standardmikroskop (Nikon Eclipse 50i) mit einer integrierten CCD-Kamera (CCD-Charge-Coupled-Device-Farbkamera JAIS 3300), Farbmonitor, PC mit Bildanalysesystem.
4 Consensus Reports der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) haben diese Methode bis ins kleinste Detail standardisiert (Böcking 1995; Haroske 1998, 2001).
Zur Qualitätssicherung wurden vor jeder neuen Messung externe Standards durchgeführt, die folgende Aspekte beinhalteten:

Vor Untersuchungsbeginn wurde das Mikroskop justiert, anschließend wurde ein Schwarz- und ein Weißabgleich durchgeführt.

Zur Eichung wurden 30 Referenzzellen zur internen Kalibrierung im selben Präparat gemessen.

Der Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellen sollte nicht unter 5% liegen und deren mittlerer IOD nicht mehr als 10% vom IOD der vorherigen Messungen abweichen. Berücksichtigt wurde des Weiteren der relative Fehler des Mittelwertes (<1,5%) und der Korrelationskoeffizient (r) von Kernfläche zu IOD Referenzzellen (<0,4) (Böcking 2006).
Je eines der nach Feulgen gefärbten Präparate wurde zur Messung der Tumorzellen verwendet, eines zur Messung der Referenzzellen.

Das zweite Untersuchungspräparat diente als Referenzpräparat zur internen Kalibrierung. Es wurden je 30 normale Lymphozyten oder Granulozyten als Referenzzellen detektiert und gemessen. Es handelte es sich um Zellen mit einem diploiden Chromosomensatz und einem IOD-Mittelwert von 2c.

Zunächst wurde in einer Übersichtseinstellung das eingestellte Präparat meanderförmig auf geeignete Areale gemustert. Die Messung erfolgte mit der immer gleichen Objektiveinstellung 20x0,4.

Es wurde anschließend bei jeder Messung von der Bildanalysesoftware eine sogenannte Messmaske durch Einfrieren des Bildes erstellt, welche das auf den Bildschirm projizierte Bild des Zellkerns komplett abdeckt und in welcher der IOD gemessen werden soll.

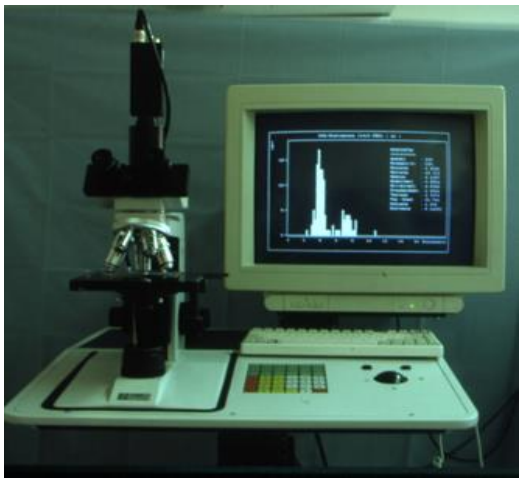


*Abbildung 8: Messmonitor*

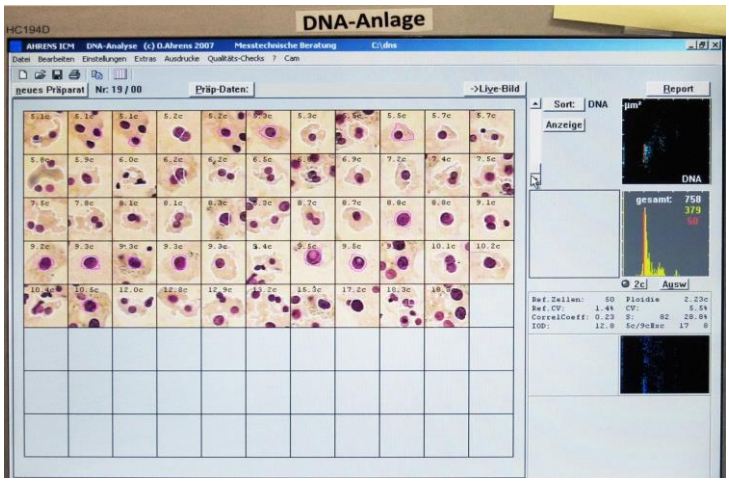



*Abbildung 7: DNA-Messung*

Die Abbildungen zeigen das Mikroskop und den Messmonitor. Rechts sieht man die Aufnahme der Feulgen-gefärbte Zellkerne.

Zur Bestimmung des Leerwertes (Io) bzw. des mittleren Grauwertes des Hintergrundes wird eine zweite Maske generiert, welche der Kernmaske eng anliegt. Durch Softwareprozeduren werden Streulicht- und Lichtbeugungsfehler korrigiert, um falsch hohe oder falsch niedrige Messfehler zu vermeiden (Anleitung Böcking 1997, Kindermann 1994).

Alle Zellkerne wurden nun automatisch von dem Bildanalysesystem detektiert und gemessen. Sie wurden kategorisiert und farblich markiert, Artefakte wurden ausgeschlossen.

Die interaktive Messung erfolgte durch Anklicken der jeweiligen Analysezellen mit der Maus, die dadurch markiert wurden. Alle markierten wurden getrennt nach Analysezellen (rot) und

Referenzzellen (blau) in eine Bildergalerie eingefügt. Überlagerte Zellkerne, autolytische Kerne und ungeeignete Kerne wurden selektiert und eliminiert.
Da die Fragestellung die Bestimmung des Malignitätsgrades der DNA beinhaltet, wurden alle Tumorzellen nach dem Zufallsprinzip gemessen, ohne morphologisch besonders auffällige zu präferieren, um falsch hohe DNA-Werte im Sinne einer Selektion zu vermeiden.
Bei dieser positiven, subjektiven Selektion ermittelt die Software nur für die ausgewählten Kerne eine exakte Messmaske. Im gleichen Messvorgang wurde im zweiten Schritt die im Referenzpräparat vorhandenen Referenzzellen markiert (blau) und gemessen.
Die IOD-Werte der Tumorzellen wurden dem mittleren IOD-Wert der Referenzzellen, der als 2c definiert wurde, in Bezug gesetzt. Dies stellte sich dann im Histogramm dar.

#### 2.2.4.2. DNA-Histogramm

Das DNA-Histogramm bildet graphisch die Häufigkeitsverteilungen des DNA-Gehalts der Zellkerne, ermittelt über den IOD-Wert, ab. Dabei liegt die Zahl der gemessenen Zellkerne (n) auf der y-Achse und der relative DNA-Gehalt (c) auf der x-Achse.
Eine c-Einheit entspricht einem haploiden DNA-Gehalt einer normalen Zelle, diploide Zellen entsprechen einem 2c-Wert, periploide Zellen weisen einen periploiden DNA-Wert zwischen 1,8c und 2,2c und einen peritetraploiden Wert zwischen 3,6 und 4,4c aus.
Eine normale Zellpopulation von diploiden Zellen bildet den ersten Häufigkeitsgipfel (Peak) bei etwa 2c (1,80c-2,20c) und repräsentiert Zellen der G0-/G1-Phase. Ein zweiter Peak entsteht bei etwa 4c (3,60c-4,40c) in der G2-/M-Phase, entsprechend der DNA-Menge nach der dazwischen liegenden Synthesephase, in welcher sich die DNA verdoppelt hat.
Die Euploidie besteht, wenn die Abweichungen weniger als +/-15% vom Mittelwert der diploiden Eichpopulation (2c) oder deren Vielfachen liegen.
Die Bestimmung der Dignität erfolgt über das Vorkommen abnorm hoher DNA-Gehalte (sog. Exceeding Events, >5c, >9c) einzelner Zellkerne (sog. Rare Events) und über Lage und Zahl der nachgewiesenen aneuploiden Stammlinien (Böcking 2006).
Finden sich DNA-Gehalte, die weder diploid, euploid periploid oder euploid polyploid sind, deren DNA-Gehalte also außerhalb von 1c, 2c und nicht zwischen 1,8c-2,2c oder 3,6c-4,4c liegen, handelt es sich um aneuploide Zellkerne.
Aneuploide Stammlinien stellen sich als Peak außerhalb der euploiden DNA-Peaks dar (<1,80c, >2,20c, <3,60c, >4,40c) (Böcking 1998).

Die Aneuploidie ist ein Marker für die Malignität, wobei der Zellkern-DNA-Gehalt außerhalb des Mittelwertes der Eichzellpopulation (+/-15%) liegt.

Der Nachweis von Aneuploidie aufgrund von Exceeding Events (EE) einzelner, abnorm hoher Zellkern-DNA-Gehalte ist abhängig vom Vorkommen von Polyploidisierung im untersuchten Zelltyp. Die EE lassen sich als Einzelzellaneuploidien in 5c Exceeding Events (5cEE) und 9c Exceeding Events (9cEE) angegeben (Haroske 2001).

### 2.2.5. Interpretation der Histogramme

Diagnostisch und prognostisch relevante Prinzipien werden zu der Interpretation der Histogramme nach Böcking herangezogen (Böcking 1997, 2008, Haroske 1998):

| |
|---|
| Nachweis einer diploiden Stammlinie (STL) – G0/G1-Phase – Fraktion einer proliferierenden Zellpopulation (2c+/-10%) |
| Nachweis euploid-polyploider Stammlinien – DNA-Euploidie – euploide Stammlinien in den definierten euploiden Verdoppelungsregionen (4c, 8c, 16c +/-10% ) |
| Nachweis anneuploider Einzelzellen (5cEE, 9cEE) |
| Nachweis aneuploider Stammlinien mit und ohne Polyploidisierung, d.h. außerhalb des Normbereichs mit signifikanter Abweichung (><2c, 4c, 8c, 16c +/-10%) |
| Nachweis mehrere aneuploider Stammlinien mit Polyploidisierung |
| Nachweis mehrerer aneuploider Stammlinien ohne Polyploidisierung |
| Nachweis der Kombination der letztgenannten 4 Kriterien |
| Bestimmung der Dignität einer Läsion über den qualitativen Nachweis von DNA-Aneuploidie |
| Bestimmung des Malignitätsgrades bzw. des Progressionsrisikos einer Läsion über die Quantifizierung von DNA-Aneuploidie |

Der DNA-Index (DI) ist der Modalwert eines Peaks, dividiert durch den Modalwert des dazugehörigen diploiden Referenzzellpeaks.

Der DI von 1 entspricht dem Index von diploiden Zellkernstammlinien, also normalem Gewebe. Bis zu einem DNA-Index von <1,5 wird von einem weniger malignen Verhalten, bei ≥1,5 von einem höheren Malignitätsgrad mit schlechterer Prognose ausgegangen.

Für jedes Histogramm sollte zusätzlich zur prognostischen DNA-Ploidiegradierung auch die Zahl und exakte Lage der DNA-Stammlinie angegeben werden.

Das prognoserelevante Ausmaß der Aneuploidie wird tumorspezifisch quantifiziert.

Für spezifische Tumore wird in der Literatur über die prognostische Relevanz spezieller Indices berichtet (Böcking1997).

In zahlreichen Studien konnte die Malignität und damit auch die Prognose durch die DNA-

Zytometrie eingeschätzt werden. J. Ross (Ross 1996) bezieht die Flusszytometrie dabei mit ein (Fujimoto 1991, Ng 1994, Cottier 1994). Dabei war die Aneuploidie in univarianten Analysen ein statistisch signifikanter Indikator für das postoperative Überleben.

In unserer Klinik wurde 2009 von Jonas die Bedeutung des DNA-Index bei HCC in Leberzirrhose bedingten Lebertransplantationen untersucht. Die Aneuploidie der Tumore zeigte statistisch signifikant eine schlechtere Prognose und Überlebenszeit der Patienten, verglichen mit solchen mit diploiden und euploid-polyploiden Tumoren. Bei 159 (65%) der untersuchten HCC war der DNA-Index <1,5. Diese Patienten hatten eine 5- und 10-Jahresüberlebensrate von 86% und 80%. Bei 87 (35%) Patienten war der DNA-Index der Tumore ≥1,5 und die 5- und 10-Jahresüberlebenszeit der Patienten lag bei 27% und 6%.

In univariaten Analysen waren der DNA-Index, Gefäßinvasion, Erfüllung der Mailand-Kriterien und histopathologisches Grading die prognostischen Parameter. In den multivariaten Analysen zeigte sich eine prognostische Signifikanz des DNA-Index, welche den anderen Prognosefaktoren überlegen war (Jonas 2009).

In unserer Untersuchung erfolgte die Malignitätsbeurteilung der hepatozellulären Karzinome mittels DNA-Index.

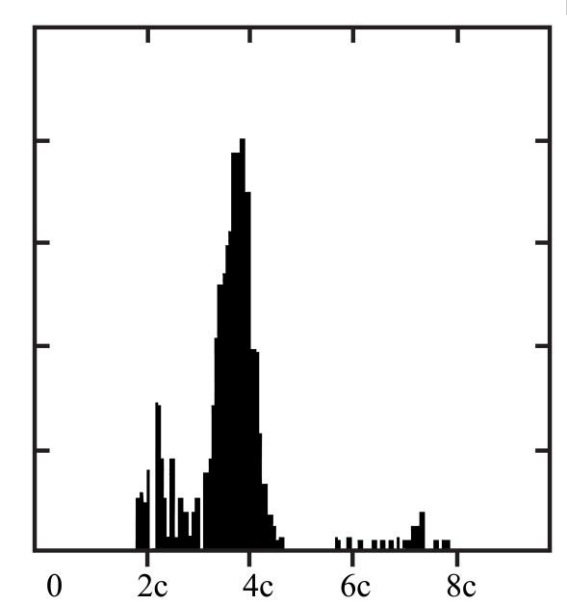



*Abbildung 9: DNA-Histogramm*

| **DNA Parameter** | | | |
|---|---|---|---|
| DNA Index (modal) | 1,9 | Zahl der Kerne | 499 |
| 2c Deviation Index | 3,28 | 5c Exceeding Events | 19 |
| DNA Stammlinie: hypo-tetraploid | 3,78c | 9c Exceeding Events | 1 |

*Tabelle 13: Histogrammauswertung*

### 2.3. Bestimmung von mutp53 und Ki-67

Es wurden zunächst die bereits vorhandenen Hämatoxylin-Eosin(HE)-gefärbten Tumorgewebepräparate auf das Vorhandensein von Tumorzellen überprüft, anschließend wurde die immunhistochemische Färbung durchgeführt.

Bei der immunhistochemischen Anfärbung der Gewebsschnitte für mutp53 wurde der monoklonale Mouse-Anti-Human-p53-Protein-Clone-DO-7-Antikörper verwendet.

Zur Anfärbung von Ki-67 wurde der Monoclonal-Mouse-Anti-Human-Ki-67-Antigen-Clone-MIB-1 verwendet.

| **Envision-Test von DAKO/HRP/Dual Link Rabbit/Mouse (gebrauchsfertig K40631)**<br>**Primär-Antikörper Ki-67 (MIB 1), p53 (DO-7)** | | |
|---|---|---|
| **Abfolge** | **Material und Methode** | **Dauer/Frequenz** |
| **Vorbehandlung** | 20 Min. „HIER“ in Target Retrieval Solution (TRS) im Dampfgarer | |
| | Abkühlen und spülen in Aqua dest. | 10 Min. |
| **Peroxydaseblock** | bei Raumtemperatur mit 3% $H_2O_2$ (in Wanne legen), | 5 Min. |
| | abspülen in Aqua destillata. | |

| **Immunreaktion** | | |
|---|---|---|
| **Abfolge** | **Material und Methode** | **Dauer/Frequenz** |
| 1. | TBST 0,05M pH 7,6/0,05% Tween (100 ml TBST 10 x Konzentrat + 900 ml Aqua destillata = 1:10) | 5 Min. |
| 2. | Primärantikörper Ki-67( MIB-1), p53, neg. Kontrolle, Bcl2) | 30 Min. |
| 3. | TBST | 4 Min. |
| 4. | Sekundär Antikörper (2. AK) Envision Test/HRP Dual Link Rabbit/Mouse (gebrauchsfertig 15 ml K406311) ( Polymere) | 20 Min. |
| 5. | TBST | 4 Min. |
| 6. | DAB (Liquid DAB + Buffer) (20ul DAB-Chromogenlsg. + 1 ml Substratpuffer) (Liquid DAB K346711) | 10 Min. |
| 7. | Aqua destillata | 4 Min. |
| 8. | Mayers Hämatoxylin (S 3309) (Dako) | 1 Min. |
| 9. | Leitungswasser zum bläuen | 5 Min. |
| 10. | Aqua destillata | 4 Min. |

| | |
|---|---|
| 11. | Alkoholreihe 70%, 95%, 95%, 100% |
| 12. | Xylol |
| 13. | Eindecken mit Entelan |

*Tabelle 14: Immunhistochemische Färbung mit den Antikörpern DO-7, MIB-1*

Die Auswertung der mutp53-gefärbten Präparate erfolgte semi-quantitativ nach den Richtlinien von Dowell und Ogden 1996:

| | |
|---|---|
| **R1** | negatives Färberesultat |
| **R2** | schwach positive Färbereaktion mit Anfärbung von 1 bis 10 Zellkernen pro Gewebsschnitt |
| **R3** | Positive Färbereaktion mit Anfärbung von weniger als 5% der Tumorzellkerne |
| **R4** | stark positive Färbereaktion bei mehr als 5% der Tumorzellkerne bei gleichen Kriterien |

Auswertung in folgenden Gruppen:

| | |
|---|---|
| **R1 und R2** | mutp53-negativ |
| **R3 und R4** | mutp53-positiv |

*Tabelle 15: Auswertung der Färbung mutp53*

Die Auswertung von Ki-67-gefärbten Präparate erfolgte ebenfalls semi-quantitativ.
Semiquantitative Auswertung der MIB-1-Färbung:

| % der positiven Zellen | Aktivität |
|---|---|
| 0 | 0 inaktiv |
| <10 | 1 inaktiv |
| 5-10 | 2 aktiv |
| >50 | 3 aktiv |

*Tabelle 16: Auswertung der Färbung Ki-67*

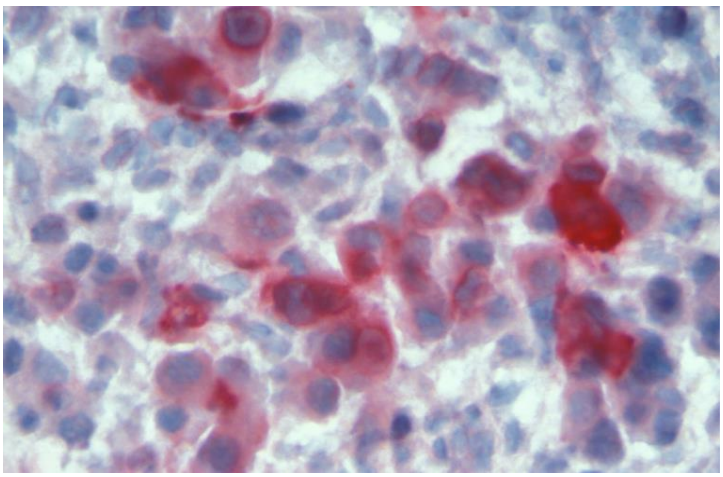


*Abbildung 10: Do-7 angefärbtes mutp53 in HCC-Zellen*

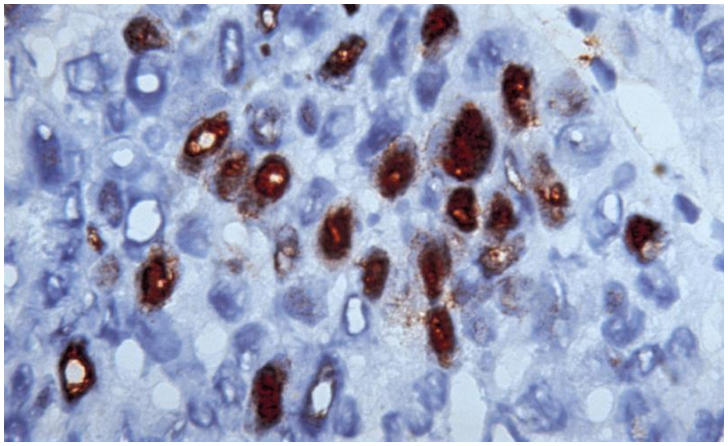


*Abbildung 11: MIB-1 angfärbtes Ki-67 in HCC-Zellen*

## 2.4. Statistikmethoden

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde die Analysesoftware R in der Version 2.15.1 für GNU/Linux verwendet (R. Core. Team 2012).

Die Überlebenszeitkurven wurde mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Dabei werden die Patienten des Beobachtungskollektivs in einen Zeitraum, nicht aber Zeitpunkt, rekrutiert und über eine bestimmte Nachbeobachtungsphase beobachtet. Das Ereignis muss am Beobachtungsende noch nicht eingetreten sein. Es wird hierbei von einer zensierten Beobachtungszeit gesprochen (Ziegler 2007).
Das Gesamtüberleben wurde vom Tag der Operation bis zum Tag der letzten Information (zensiert) oder Tod (Ereignis) berechnet.
Bei sich nicht überkreuzenden Kaplan-Meier-Graphen wurde der Log-Rang-Test der nicht verbundenen Stichproben durchgeführt.
Zur Ermittlung des Cut-Off-Wertes wurde eine Receiver-Operating-Kurve (ROC) erstellt.

Zeigten die verglichenen Variablen in den univariaten Analysen signifikante Unterschiede, wurden sie in die multivariate Analyse aufgenommen. Dazu wurde die Regressionsanalyse nach Cox verwendet, um mehrere Variable miteinander zu vergleichen. Es wurde von verschiedenen Variablen mittels Mann-Whitney (zwei Gruppen) und Kruskal-Wallis (3 Gruppen) eine Prüfung auf signifikante Unterschiede durchgeführt und die Normalverteilung im Shapiro-Wilk-Test ermittelt.
Die Signifikanz wird mit der Irrtumswahrscheinlichkeit (p) angegeben. Es gilt $p > 0{,}05$ als nicht signifikant, $p \leq 0{,}05$ als signifikant, $p \leq 0{,}01$ als sehr signifikant und $p \leq 0{,}001$ als hoch signifikant.

# 3. Ergebnisse

## 3.1. Patientencharakteristik

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Daten von 85 Patienten mit der Diagnose hepatozelluläres Karzinom und Leberresektion ausgewertet.
Alle Patienten erhielten zwischen Januar 2002 und Dezember 2006 eine Leberteilresektion in der Klinik für Allgemein-,Visceral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow.
Bei einem sog. Lost-to-follow-up wurden insgesamt 84 Patienten in die statistische Auswertung aufgenommen.
Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von Januar 2002 bis Oktober 2011, der Zeitpunkt der letztmaligen Datenerhebung. Der medianen Beobachtungszeitraum waren 36 Monaten (Minimum 6,8 Monate, Maximum 116 Monate)
Das Erkrankungsalter der Patienten lag zwischen 16 und 85 Jahren mit einem medianen Erkrankungsalter von 63 Jahren.
Von den Patienten waren 68 (81%) männlich und 16 (19%) weiblich. Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von 4,3: 1 von Männern zu Frauen.

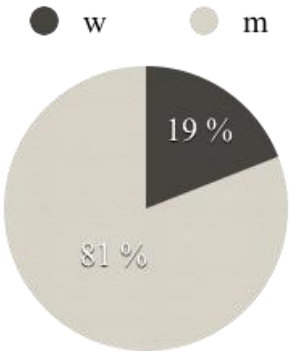



*Abbildung 12: Geschlechterverteilung*

Das Hauptkriterium für die Auswertung der untersuchten Variablen der Studie war die Überlebenszeit nach der Leberteilresektion der Patienten mit HCC.
Mit den klassischen Prognosefaktoren soll der individuelle Krankheitsverlauf vorhergesagt werden. Dabei soll die prognostische Relevanz der ausgewählten Faktoren auf die Überlebenswahrscheinlichkeit geprüft werden.

Im Beobachtungszeitraum sind 71,5% der Patienten verstorben, 28,5% lebten am Beobachtungsende.

| Überlebenszeiten | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Jahre** | **n. risk** | **n. event** | **Überleben %** | **std. err** | **lower 95% CI** | **upper 95% CI** |
| 1 | 80 | 5 | 94,1 | 2,55 | 89,1 | 99,1 |
| 2 | 61 | 19 | 71,8 | 4,88 | 62,2 | 81,3 |
| 3 | 43 | 18 | 50,6 | 5,42 | 40 | 61,2 |
| 4 | 32 | 10 | 38,5 | 5,3 | 28,1 | 48,9 |
| 5 | 27 | 3 | 34,9 | 5,2 | 24,7 | 45,1 |
| 6 | 26 | 0 | 34,9 | 5,2 | 24,7 | 45,1 |
| 7 | 17 | 0 | 34,9 | 5,2 | 24,7 | 45,1 |
| 8 | 4 | 2 | 28,5 | 5,94 | 16,8 | 40,1 |

*Tabelle 17: Überlebenszeiten der Patienten*

Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt das kumulierte Überleben aller eingeschlossenen Patienten

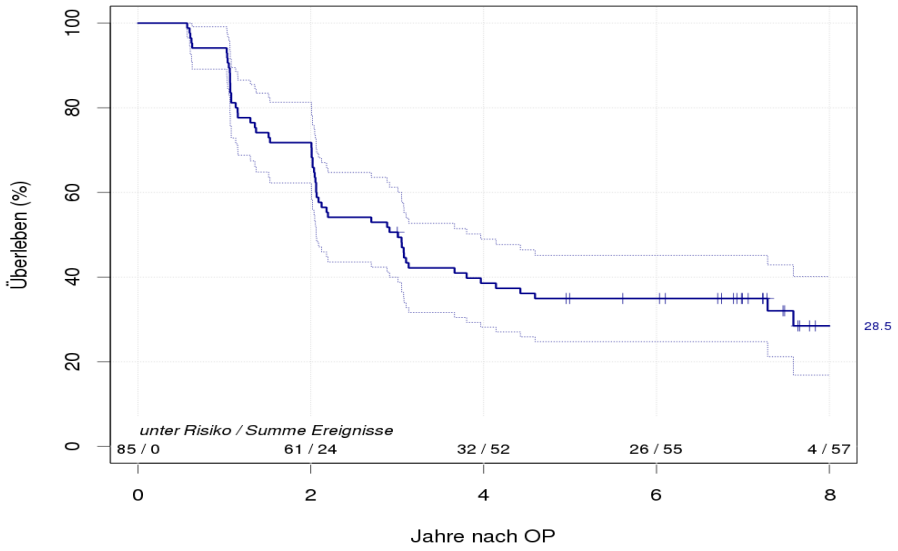



*Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve, kumuliertes Überleben aller Patienten*

## 3.2. Univariate Analysen

Im **Geschlechtervergleich** wird in der Kaplan-Meier-Kurve die Überlebenszeit von Männern und Frauen getrennt dargestellt.

Von den insgesamt 16 Frauen lebten am Beobachtungsende noch 56,2%, von den insgesamt 68 Männer lebten am Beobachtungsende noch 28,5%.

In der Log-Rank-Analyse zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil für Frauen, der mit einem p =0,094 (>0,05) nicht in die multivariate Analyse aufgenommen wurde.

**Log-Rank: Männer vs. Frauen: p = 0,094**

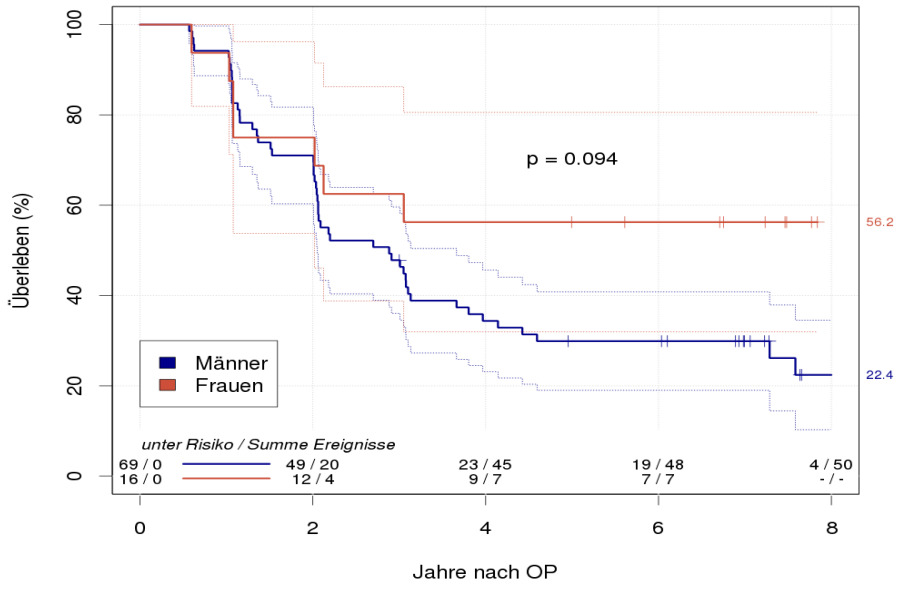



*Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve Frauen/Männer*

Für die klassischen Prognoseparameter wurde die Kaplan-Meier-Kurve erstellt und der Log-Rank-Test auf seine Signifikanz für die Überlebenswahrscheinlichkeit überprüft. Die folgende Abbildung bilden die Prüfung der pTNM-Stadien der HCC-Tumore anhand der TNM-Klassifikation, das Grading nach Edmondson-Steiner, sowie anhand des Resektionsrandes und der Gefäßinvasion ab.

**Tumorgröße (pT)**

Bei den 84 auswertbaren Patienten fanden sich 21 Tumore im Stadium pT1 (25%),36 (43%) im pT2-Stadium und 27 (32%) im pT3-Stadium.

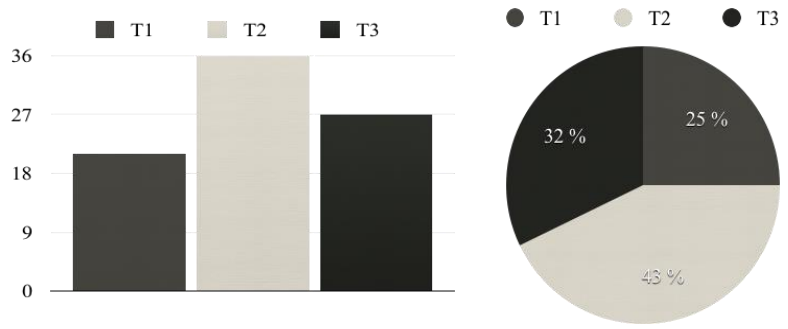



*Abbildung 16: Verteilung des Tumorstadiums*

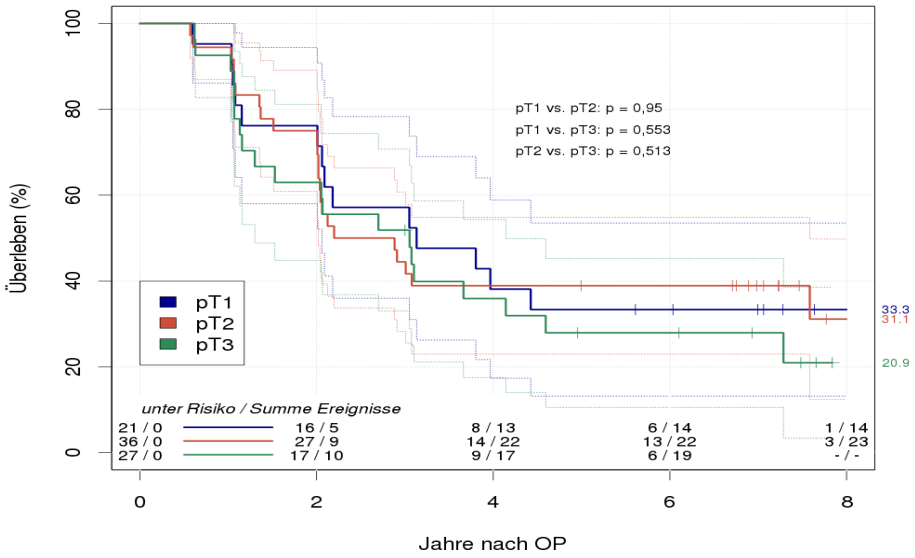



*Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve pT-Stadium*

In der Kaplan-Meier-Kurve stellte sich das kumulierte Überleben für alle Tumorstadien ähnlich dar. Im Log-Rank-Test ergab sich keine Signifikanz für die Vorhersage des Überlebens anhand der Tumorgröße.

**Log-Rank: pT1 vs. pT2: p= 0.95; pT2 vs. pT3:0,513; pT1 vs. pT3: 0,553**

**Lymphknotenstatus (pN)**

Der Befall der Lymphknoten (pN) war in 81 Fällen angegeben. Bei 75 (86%) der untersuchten Lymphknoten waren diese negativ (N0), in 3 Fällen fand sich pN1, in 3 Fällen pN2.

Die wenigen Fälle von Tumoren mit N1 und N2 wurden aus statistischen Gründen zu N2+N3

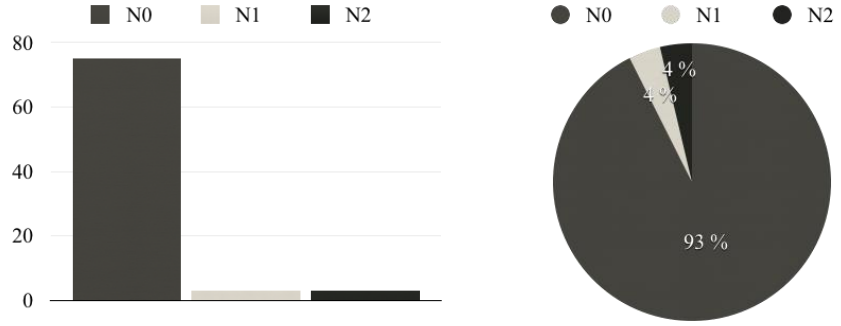



*Abbildung 18: Verteilung des Lymphknotenstadiums*

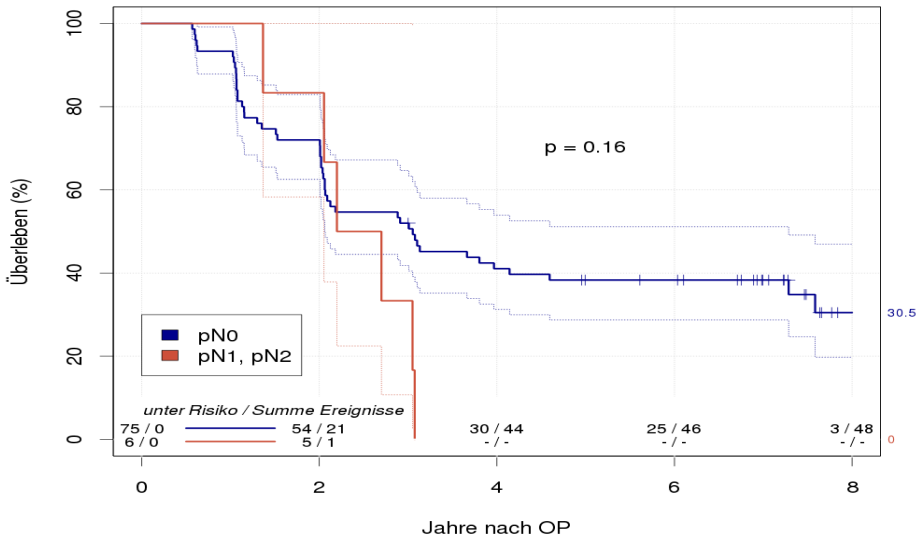



*Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve Lymphknotenstadium*

zusammengefasst.

In der Kaplan-Meier-Kurve zeigte sich eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für Tumore mit N0-Status. Im Log-Rank-Test ließ sich keine Signifikanz für den Lymphknotenstatus zur Überlebenswahrscheinlichkeit errechnen.

**Log-Rank: N0 vs. N1+N2 : p = 0,16**

**Metastasenstatus (M)**

Es fanden sich bei 77 Patienten ausschließlich ein M0-Status (100%) Es wurden somit keine Patienten mit Fernmetastasierung genannt, bei 8 Patienten gab es hierzu keine Angaben. Da es sich statistisch gesehen um eine Konstante handelt, war die Prüfung auf Signifikanz nicht sinnvoll.

**Grading nach Edmondson-Steiner (G)**

Die Zuordnung der HCC nach dem histologischen Differenzierungsgrad der Tumore zu den Stadien G1-4 gelang in 84 Fällen. Dabei fand sich das Grading G1 mit 13 Fällen (15%). Am häufigsten fanden sich Tumore mit Grading G2 mit 50 Fällen (60%). Bei 21 (25%) der Tumore gestand Grading G3. Kein Tumor hatte das Grading G4.

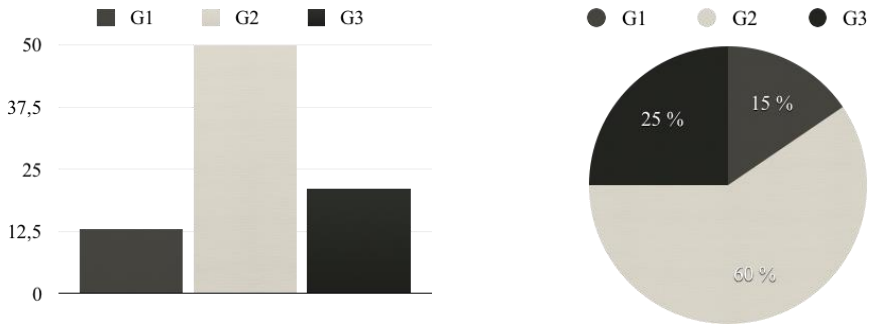



*Abbildung 19: Verteilung des Gradingstadiums*

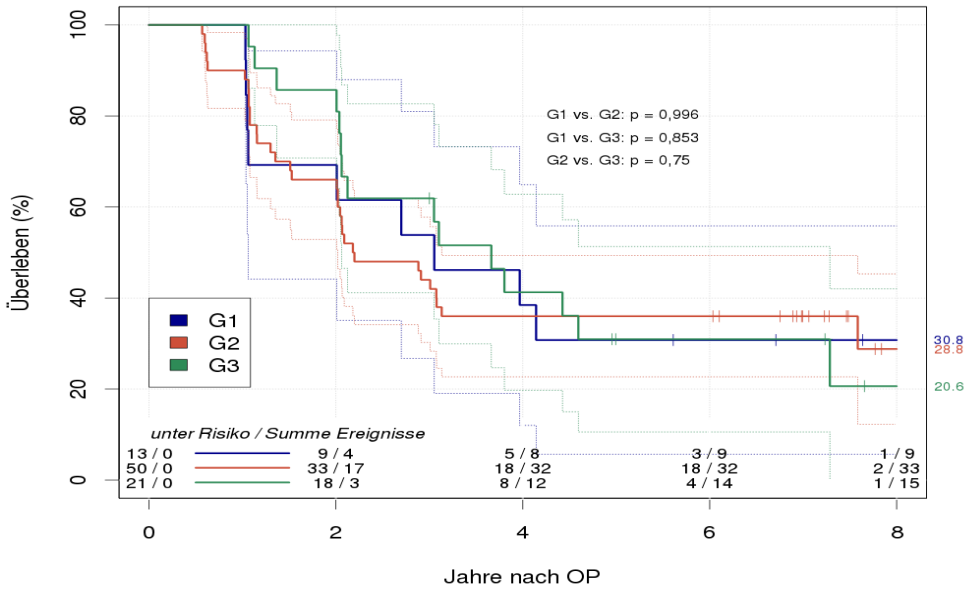



*Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve Gradingstadium*

Wie bei dem Tumorstadium gibt es in der Kaplan-Meier-Kurve für alle histologischen Grade ähnliche Überlebenswahrscheinlichkeiten, die sich im Log-Rank-Test nicht signifikant zeigen.

**Log-Rank: G1 vs. G2: 0,996; G1 vs. G3: 0,853; G2 vs G3:0,75**

**Resektionsrand (R)**

Ein wichtiges prognostisches Kriterium ist der histologische Status des Resektionsrandes. Bei 77 (92%) Resektaten fand sich ein R0-Status, bei 2 (2%) wurde ein R1-Status mit nur mikroskopisch sichtbaren Tumorzellen bis an den Resektionsrand gefunden. Ein R2-Status mit makroskopisch sichtbarem Tumor fand sich bei 5 (6%) der Resektate. Die wenigen Fälle von R1 und R2 wurden aus statistischen Gründen zusammengefasst.

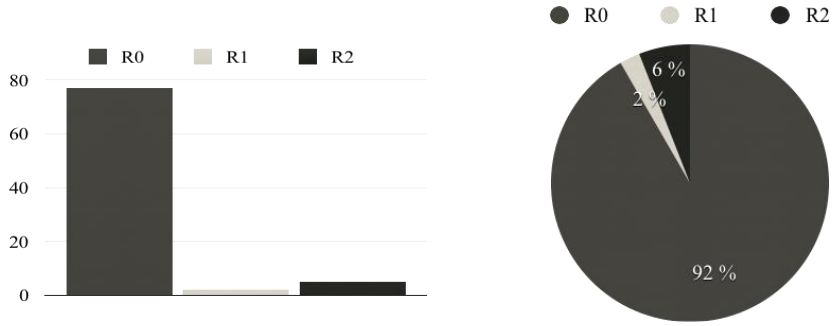



*Abbildung 22: Verteilung des Resektionsstatus*

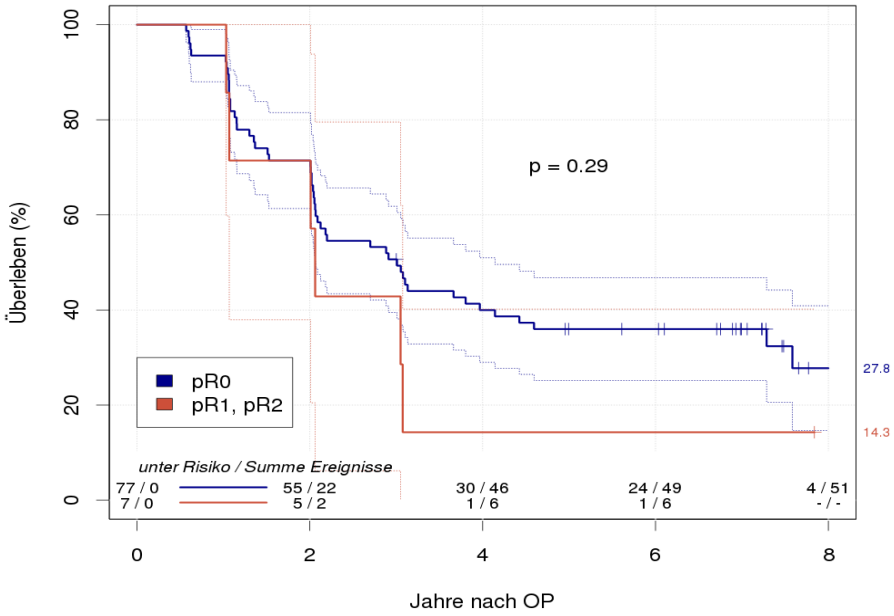



*Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve Resektionsrandstatus*

Die Kaplan-Meier-Kurve stellt einen Unterschied des Überlebens zwischen Tumoren, welche ohne und mit Resektionsrandbefall reseziert werden konnten, dar. Im Log-Rank-Test zeigt sich keine Signifikanz mit p =0,29.

**Log-Rank: pR0 vs. pR1+pR0 =0,29**

**Gefäßinvasion (V)**

Die Gefäßinvasion durch Tumorzellen zeigte sich als wichtiges Prognosekriterium. Diese fand sich bei insgesamt 26 (V1 und V2 34%) der Tumore, wovon 24 (..%) ein V1-Stadium zeigten und 4 (5%) ein V2-Stadium. 56 (67%) Tumore waren frei von einer Gefäßinfiltration.

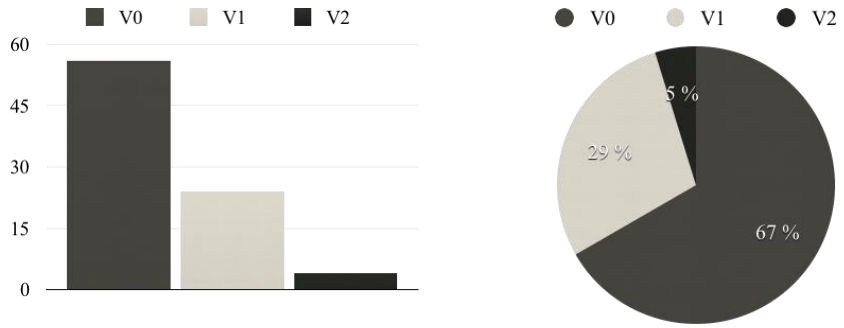



*Abbildung 23: Verteilung des Grades der Gefäßinvasion*

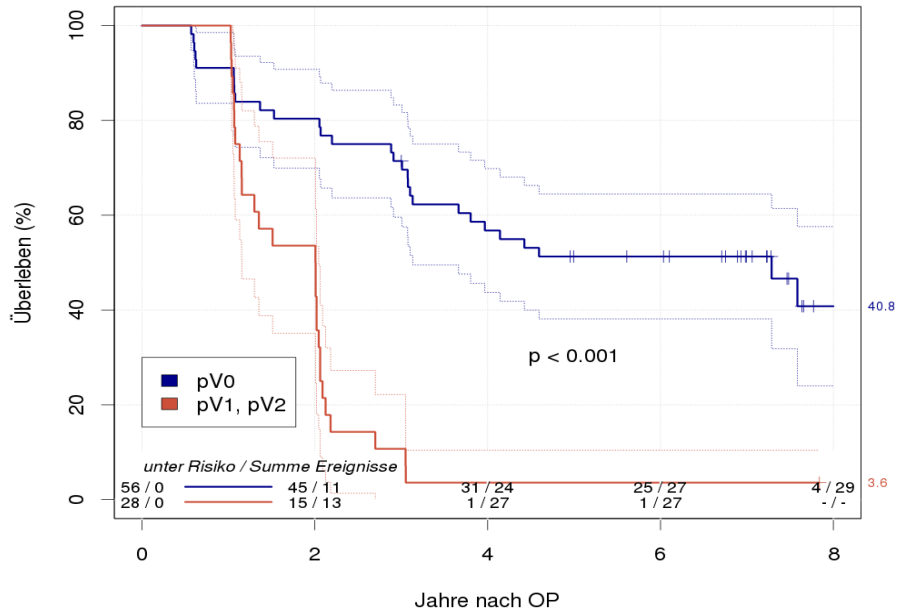



*Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve Gefäßinvasion*

Die Kaplan-Meier-Kurve bildete einen deutlichen Unterschied des Überlebens zwischen Tumoren ohne und mit Gefäßinvasion ab. Im Log-Rank-Test zeigt sich eine Signifikanz mit p <0,001.

**Log-Rank: pV0 vs. pV1+pV0 <0,001**

Im Fokus dieser Untersuchung standen, zusätzlich zu den klassischen Prognoseparametern, die Prüfung der Apoptosemarker p53, der Proliferationmarker Ki-67, sowie die DNA-Ploidiestatus und der DNA-Index auf ihr Signifikanzniveau zur Überlebensvorhersage.

**Apoptosemarkers mutp53**

Für den Apoptosemarkers mutp53 wurde mittels immunhistochemischer Anfärbung semiquantitativ eine Positivität für mutp53 bei 19 (22%), eine Negativität bei 66 (78%)Tumoren festgestellt.

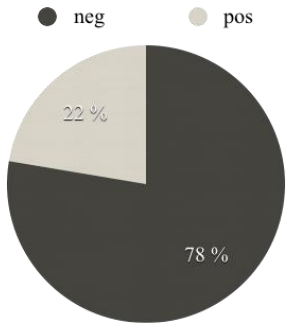



*Abbildung 25: Verteilung des mutp53*

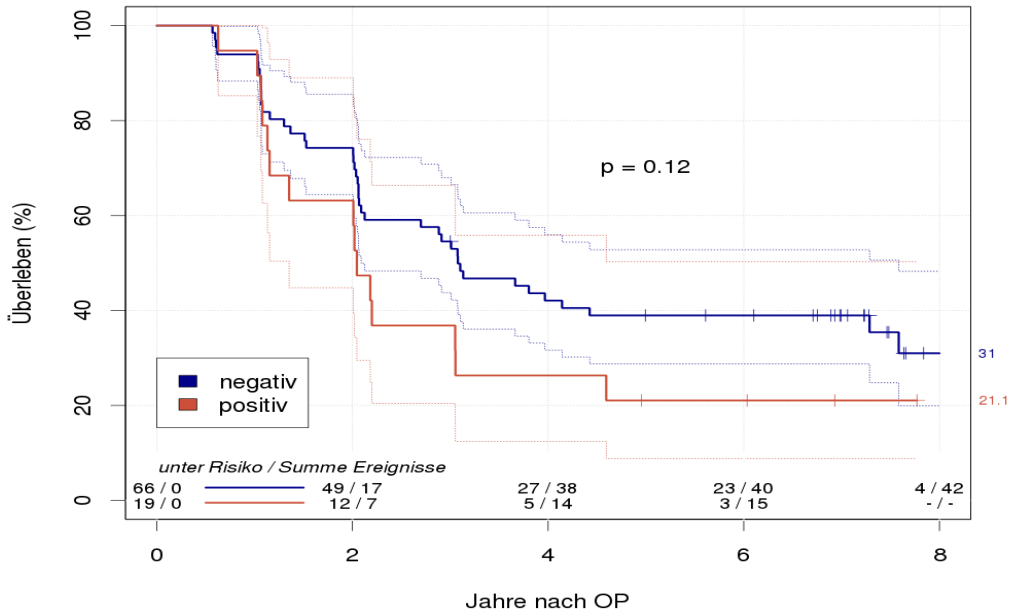



*Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve mutp53*

Die Kaplan-Meier-Kurve zeigte nur einen geringen Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeit bezogen auf die Expression von mutp53. Dies bildete sich in dem Log-Rank-Test als nicht signifikant ab p=0,12.

**Log-Rank: mutp53 positiv vs. mutp53 negativ: p = 0,12**

**Proliferationsmarker Ki-67**

Bei dem immunhistochemisch dargestellten Proliferationsmarker Ki-67 fanden sich 66 (78%) Tumore negativ für Ki-67 und 19 (22%) positiv.

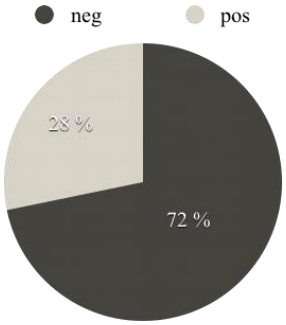



*Abbildung 28: Verteilung Ki-67*

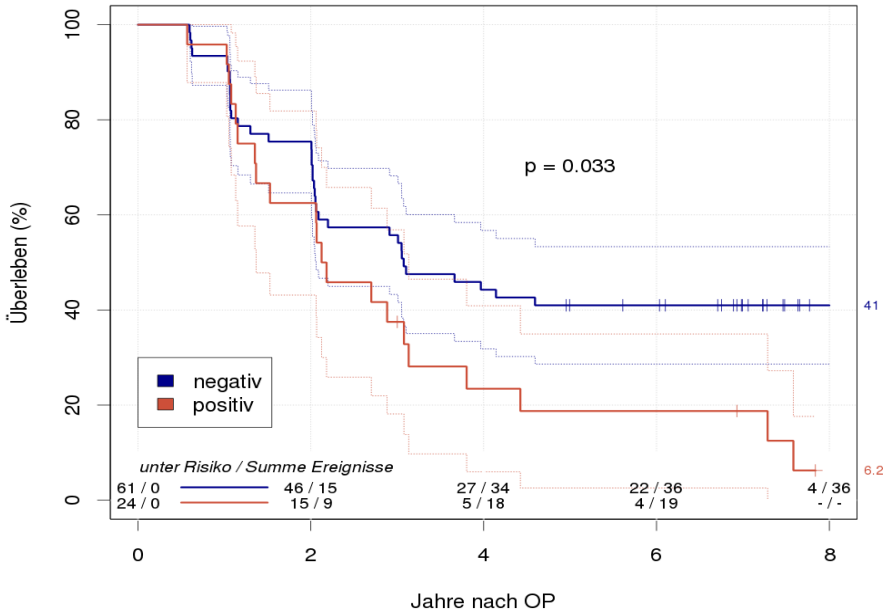



*Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve Ki-67*

In der Kaplan-Meier-Kurve stellte sich eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für die Ki-67 negativen Tumore dar. Der Log-Rank-Test bestätigte dies mit einem signifikanten Ergebnis von p <0.03.

**Log-Rank: Ki-67 positiv vs. Ki-67 negativ p<0,003**

**DNA-Ploidiestatus**

Der Ploidiestatus beschreibt den DNA-Gehalt der Zellkerne, aufgrund dessen die Klassifikation in diploide, aneuploide und tetraploide Zellen eingeteilt wurde.

Die Verteilung der Ploidiestadien zeigt in der Kaplan-Meier-Kurve eine deutlich schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit für tetraploide Tumore. Auch die Überlebenswahrscheinlichkeit bei aneuploiden Tumoren ist geringer als die der diploiden Tumore. Dies stellt sich auch im Log-Rank-Test als signifikante Prognosemarker für die Tetraploidie und Aneuploidie dar. Auch nach der Überprüfung nach der Bonferroni-Holm-Adjustierung bleiben beide signifikant (p =<0,001).

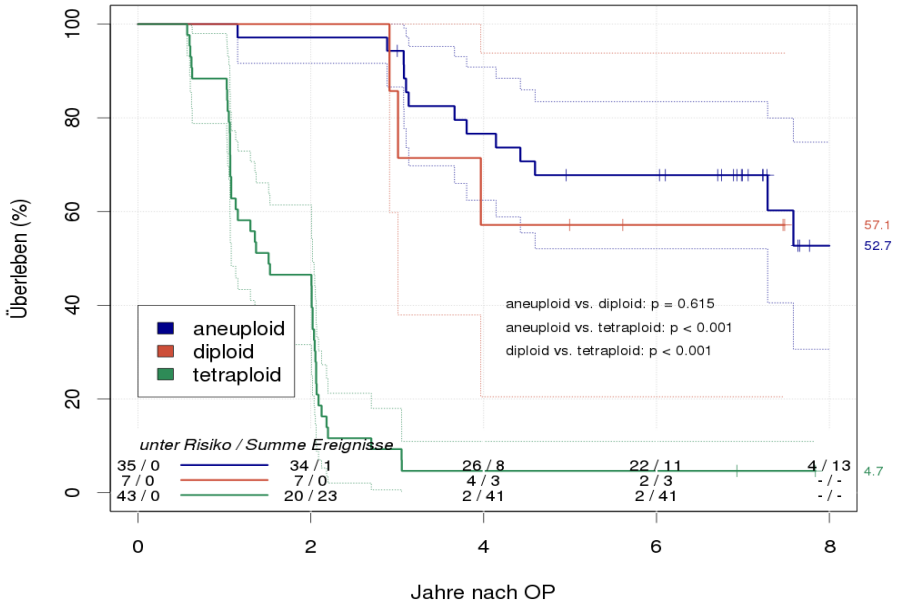



*Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve Ploidiestatus*

**Log-Rank: Aneuploidie vs Diploidie: p=0.615; Aneuploidie vs. Tetraploidie: p =< 0,001, Diploid vs. Tetraploid: p = < 0,001DNA-Index (DI)**

Zur Ermittlung des Cut-off-Wertes des DNA-Index wurde eine Receiver-Operating-Charakterisierung (ROC)-Kurve erstellt. Der DNA-Index von </=1,78 erwies sich als der Wert, welcher eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit darstellt und einen DNA-Index >1,78 ist mit einer signifikant schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert. Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) war 0,95 (Konfidenzintervall 0,89-1).

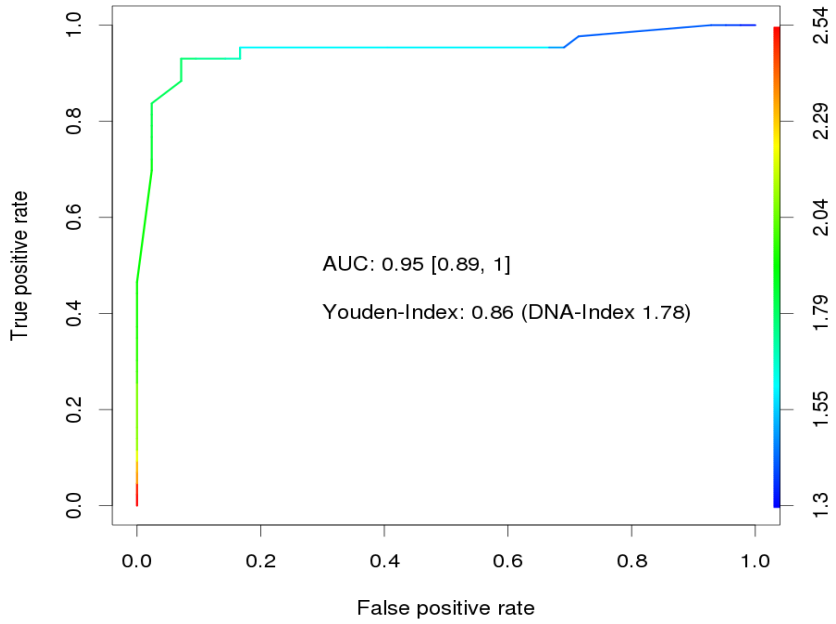



*Abbildung 30: ROC DNA-Index*

**Der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung war für den DNA-Index höchst signifikant**

**p = 0,00098**

Die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse stellt die bessere Prognose für den DI-Wert ≤ 1,78 dar.

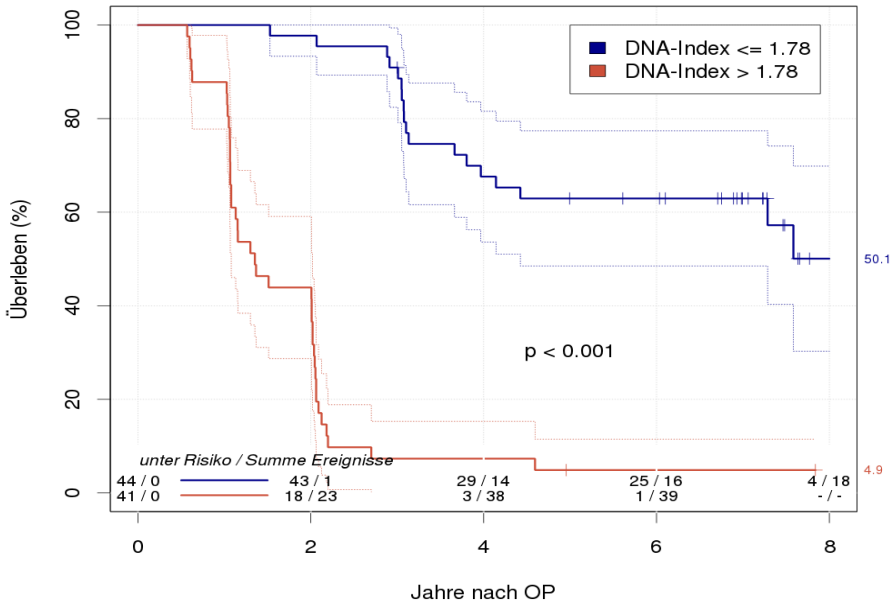



*Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve DNA-Index*

| **Überlebenszeiten bei einem DNA-Index•≤1,78** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Jahre** | **n.risk** | **n.event** | **survival(%)** | **std.err** | **lower 95% CI** | **upper 95% CI** |
| 1 | 44 | 0 | 100 | 0,00 | 100 | 100 |
| 2 | 43 | 1 | 97,7 | 2,25 | 93,3 | 100 |
| 3 | 40 | 3 | 90,9 | 4,33 | 82,4 | 99,4 |
| 4 | 29 | 10 | 67,6 | 7,13 | 53,6 | 81,6 |
| 5 | 26 | 2 | 62,9 | 7,36 | 48,5 | 77,4 |
| 6 | 25 | 0 | 62,9 | 7,36 | 48,5 | 77,4 |
| 7 | 16 | 0 | 62,9 | 7,36 | 48,5 | 77,4 |
| 8 | 4 | 2 | 50,1 | 10,09 | 30,3 | 69,8 |

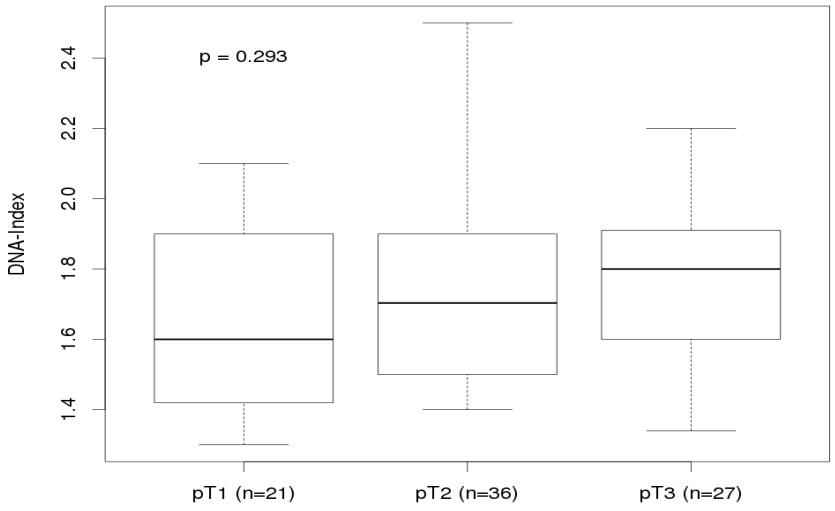
| Überlebenszeiten bei einem DNA-Index•>1,78 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Jahre** | **n.risk** | **n.event** | **survival(%)** | **std.err** | **lower 95% CI** | **upper 95% CI** |
| 1 | 36 | 5 | 87,8 | 5,11 | 77,8 | 97,8 |
| 2 | 18 | 18 | 43,9 | 7,75 | 28,7 | 59,1 |
| 3 | 3 | 15 | 7,32 | 4,07 | 0 | 15,3 |
| 4 | 3 | 0 | 7,32 | 4,07 | 0 | 15,3 |
| 5 | 1 | 1 | 4,88 | 3,36 | 0 | 11,5 |
| 6 | 1 | 0 | 4,88 | 3,36 | 0 | 11,5 |
| 7 | 1 | 0 | 4,88 | 3,36 | 0 | 11,5 |
| 8 | 1 | 0 | 4,88 | 3,36 | 0 | 11,5 |

*Tabelle 18: Überlebenszeiten der Patienten mit DNA-Index ≤1,78 und >1,78*

**Korrelationen des DNA-Index**

In den folgenden Boxplots-Graphiken werden der DNA-Index in Bezug auf die klassischen Prognoseparameter und die immunhistochemischen Parameter dargestellt. Die Parameter wurden mit dem Mann-Withney-Test (2 Gruppen) bzw. mit dem Kruskal-Wallis-Test (bei mehr als 2 Gruppen) auf signifikante Unterscheide untersucht.

**Korrelation des DNA-Index zu dem Tumorstadium (pT)**




*A*

*bbildung 32: Boxplot DNA-Index, pT1, pT2, pT3*

**Im Kruskal-Wallis Test ergabt sich für die Korrelation der Tumorgröße (T) zum DNA-Index kein signifikanter Zusammenhang bei p=0,29**

**Korrelation des DNA-Index zu dem Lymphknotenstatus (pN)**

Es zeigte sich bei dem pN0-Lymphknotenstatus ein niedrigerer medianer DNA-Index als im N1/2-Status. Es bestand eine signifikante Korrelation der Parameter zueinander.

**Der Wicoxon-Rank-Test errechnete ein p<0.0001**

| **DNA-Index, pN0** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** | **NA's** |
| 1.300 | 1.500 | 1.740 | 1.726 | 1.900 | 2.500 | 4 |

| **DNA-Index, pN1+2** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** | **NA's** |
| 1.690 | 1.732 | 1.845 | 1.813 | 1.890 | 1.900 | 4 |

*Tabelle 19: Korrelation DI, N0,N1+N2*

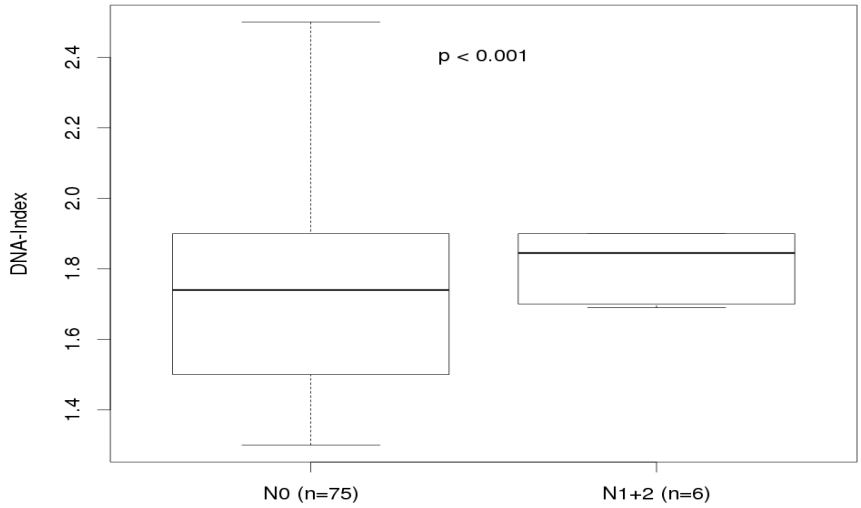



*Abbildung 33: Boxplot DNA-Index, pN0, pN1+2*

**Korrelation des DNA-Index zu dem Gradingstadium (G)**

**Im Kruskal-Wallis Test ergab sich für die Korrelation der histologischen Differenzierungsgrad (G) und dem DNA-Index kein signifikanter Zusammenhang bei p=0,81**

**Korrelation des DNA-Index zu dem Resektionsrand (R)**

Es zeigte sich bei dem tumorfreien Resektionsrand R0 ein niedrigerer medianer DNA-Index als bei Tumorrandbefall (R1/2).

**Der Wicoxon-Rank-Test errechnete ein p <0.001**

| **DNA-Index, pR0** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** | **NA's** |
| 1.300 | 1.500 | 1.740 | 1.722 | 1.900 | 2.500 | 1 |

| **DNA-Index, pR1+2** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** | **NA's** |
| 1.690 | 1.750 | 1.900 | 1.864 | 1.940 | 2.080 | 1 |

*Tabelle 20: Korrelation DI, R0,R1+R2*

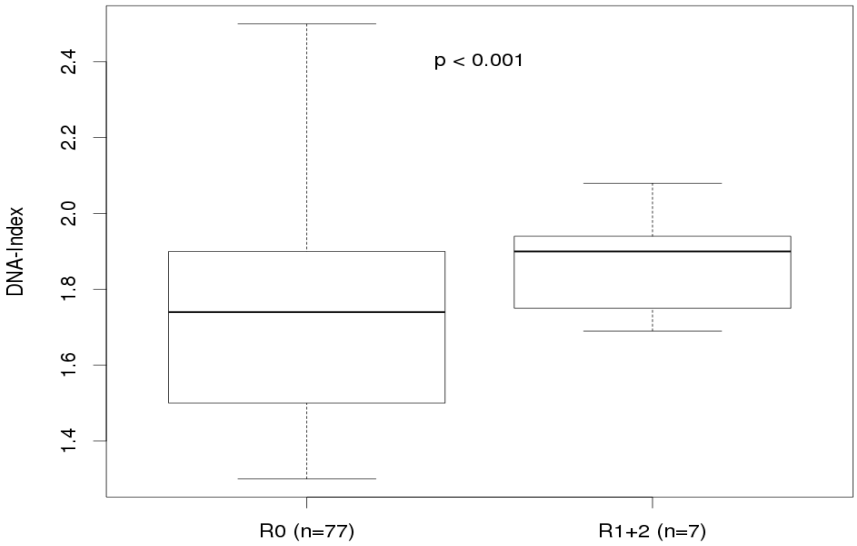



*Abbildung 34: Boxplot DNA-Index, pR0, pR1+2*

**Korrelation des DNA-Index zu der Gefäßinvasion (V)**

Es zeigte sich bei Tumoren ohne Gefäßinvasion (V0) ein im Median niedrigerer DNA-Index als bei Tumoren mit Gefäßinvasion (V1/2).

**Der Wilcoxon-Rank-Test errechnete ein p < 0.001**

| **DNA-Index, pV0** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** | **NA's** |
| 1.300 | 1.420 | 1.600 | 1.611 | 1.785 | 2.350 | 1 |

| **DNA-Index, pV1+2** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** | **NA's** |
| 1.690 | 1.900 | 1.930 | 1.962 | 2.000 | 2.500 | 1 |

*Tabelle 21: Korrelation DI, V0, V1+V2*

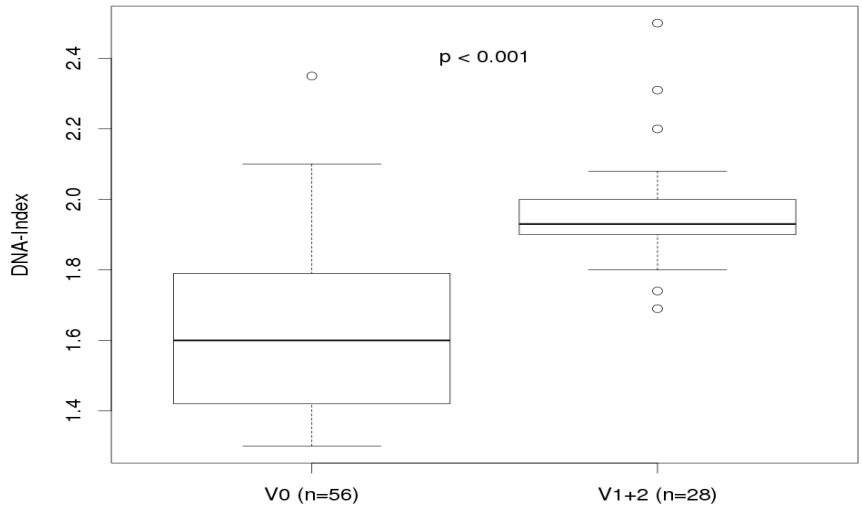



*Abbildung 35: Boxplot DNA-Index, pV0, pV1+2*

**Korrelation des DNA-Index zu dem Apoptosemarker p53**

Der mediane DNA-Index war bei negativem mutp53 niedriger als bei positivem mutp53

**Der Wilcoxon-Rank-Test errechnete ein p<0.001**

| DNA-Index, p53:neg | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** |
| 1.300 | 1.500 | 1.600 | 1.691 | 1.900 | 2.500 |

| DNA-Index, p53:pos | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** |
| 1.400 | 1.770 | 1.900 | 1.865 | 1.950 | 2.310 |

*Tabelle 22: Korrelation DI, p53*

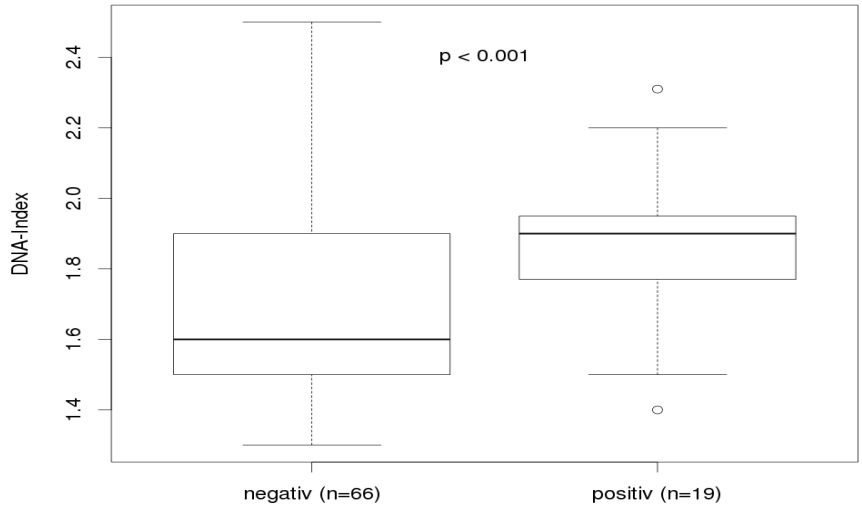



*Abbildung 36: Boxplot DNA-Index, p53*

**Korrelation des DNA-Index zu dem Proliferationsmarker Ki-67**

Der mediane DNA-Index war bei negativem Ki-67 niedriger als bei positivem Ki-67

**Der Wilcoxon-Rank-Test errechnete ein p < 0.001**

| **DNA-Index, Ki-67:neg** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** |
| 1.300 | 1.500 | 1.690 | 1.702 | 1.900 | 2.500 |

| **DNA-Index, Ki-67:pos** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** |
| 1.380 | 1.600 | 1.825 | 1.801 | 1.907 | 2350 |

*Tabelle 23: Korrelation DI, Ki-67*

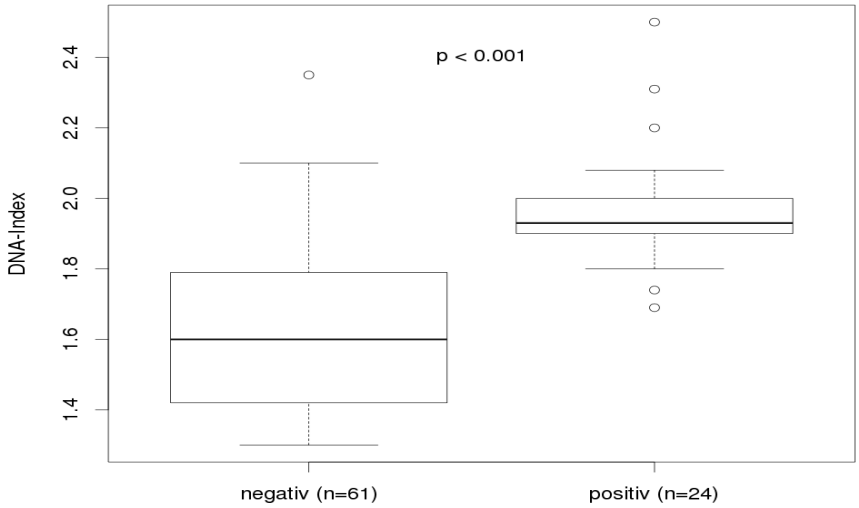



*Abbildung 37: Boxplot DNA-Index, Ki67*

**Korrelation des DNA-Index zu dem Ploidiestatus**

Hier zeigt sich der mediane DNA-Index umso höher je maligner die Zelle ist.

Am niedrigsten ist der mediane DNA-Index bei Tumoren mit diploidem DNA-Gehalt, höher bei aneuploidem DNA-Gehalt und am höchsten bei tetraploiden DNA-Gehalt.

**Der Krukal-Wallis-Rank-Test errechnete ein p<0,001**

| **DNA-Index, aneuploid** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** |
| 1.340 | 1.410 | 1.500 | 1.535 | 1.600 | 1.900 |

| **DNA-Index, diploid** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** |
| 1.300 | 1.400 | 1.400 | 1.431 | 1.460 | 1.600 |

| **DNA-Index, tetraploid** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Min.** | **1st Qu.** | **Median** | **Mean** | **3rd Qu.** | **Max.** |
| 1.600 | 1.845 | 1.900 | 1.937 | 1.995 | 2.500 |

*Tabelle 24: Korrelation DI, Ploidiestatus*

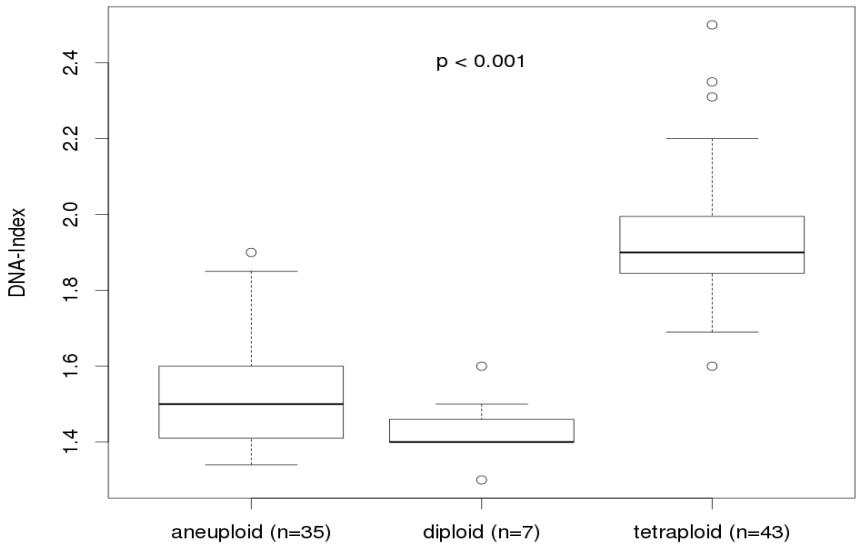



*Abbildung 38: Boxplot DNA-Index, aneuploid, diploid, tetraploid*

### 3.3. Multivariate Analyse

In den univariaten Analysen wurden alle zu untersuchenden Parameter auf ihre Signifikanz für die Wahrscheinlichkeit des Überlebens mittels der Kaplan-Meier-Kurve und dem Long-Rank Test getestet. Dabei zeigten unter den klassischen Prognoseparameter die Gefäßinvasion (p<0.001, V0 vs. V1+V2), bei den immunhistochemischen Prognoseparametern der Ki-67-Marker (p = 0,03 Ki-67pos. vs. Ki-67neg.) sowie der DNA-Index im Shapiro Wilk Test (p<0,0001) eine Signifikanz für die Überlebenswahrscheinlichkeit.
Alle Variablen mit einem Signifikanzniveau p<0,05 in der univariaten Überlebensanalyse wurden in die multivariate Analyse einbezogen und wurden in der multiplen Überlebensanalyse mit der Cox-Regression auf ihr multivariates Signifikanzniveau geprüft.
Die Auswertung der Cox-Regressionsanalyse für die Prognoseparameter Gefäßinvasion (V), Ki-67 und DNA-Index ergab nur für den DNA-Index eine Signifikanz für die Vorhersage der Überlebenswahrscheinlichkeit. Dabei erreichte der DNA-Index den höchstsignifikanten Wert von p<0,0001.

| **Multivariate Analyse** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **coef** | **exp(coef)** | **se(coef)** | **z Pr(>\|z\|)** | **p** |
| **pV** | 0.04209 | 1.04299 | 0.40981 | 0.103 | 0.918 |
| **ki67pos** | 0.32081 | 1.37825 | 0.29362 | 1.093 | 0.275 |
| **DNA index** | 4.23598 | 69.12963 | 0.68404 | 6.193 | <0,0001 |

**Significance Codes(p): 0,0001***,0.001**,0.01*,0.05**

| | **exp(coef)** | **exp(-coef)** | **lower .95** | **upper .95** |
|---|---|---|---|---|
| **pv_g** | 1.043 | 0.95878 | 0.4671 | 2.329 |
| **ki67pos** | 1.378 | 0.72556 | 0.7752 | 2.451 |
| **DNA index** | 69.130 | 0.01447 | 18.0887 | 264.193 |

*Tabelle 25: multivariate Analyse: DI, V, Ki-67*

Die Tabelle zeigt, um das Wievielfache das relative Risiko (RR) für Patienten mit einem HCC und einen um einen Punkt erhöhten DNA-Index steigt.

Beispiel: Steigt der DNA-Index des Tumors von 1,5 auf 2,5, so hat der Patient ein 69,13-fach höheres Sterberisiko (KI:18-264).

Errechnet man dies mittels Cox-Regressionsanalyse mit einem mit 10 multiplizierten DNA-Index-Wert, kann auch das relative Risiko für die Steigerung des DNA-Index in 0,1-Schritten beziffert werden und liegt bei einer Erhöhung des RR um das 1,54-Fache.

## 4. Diskussion

Das hepatozelluäre Karzinom (HCC) ist der fünfthäufigste maligne Tumor weltweit und steht bei den tumorbedingten Todesursachen an dritter Stelle (Parkin 2001, Bosch 2004). Die Erkrankung ist bei Diagnosestellung meist schon im fortgeschrittenen Stadium, sodass die 5-Jahres-Überlebensrate weltweit nur 15% (Jamal 2011) beträgt. Die Therapie und Prognose sind abhängig von Tumorstadium, Leberfunktion und dem klinischen Performance Status. Die potentiell kurativen Therapien sind die Leberresektion und die Lebertransplantation. Es werden bei HCC ohne Zirrhose 5-JÜR von 40-70% (Lang 2005, Delis 2008) und 30-50% bei Tumoren in Zirrhose (Spangenberg 2009) erreicht.

Um eine prognostisch günstige Therapieentscheidung zu treffen, werden verschiedene Staging-Scores angewendet und seit Jahrzehnten in vielen Studien auf ihre Validität getestet. Dennoch gibt es keine global angewandte Klassifikation mit dem Hinweis auf fehlende unabhängige Prognosemarker für diese komplexe Tumorerkrankung. Es gilt dabei sowohl die Ätiologie, die Leberfunktion und das Wachstumsmuster als auch das biologischen Verhalten des Tumors zu berücksichtigen.

Die umfangreiche Erforschung immunhistochemischer und molekularbiologischer Marker soll Erkenntnisse über Tumorverhalten und Therapiemöglichkeiten bereitstellen.

Der Apoptosemarker p53 und der Prolfierationsmarker Ki-67 wie auch die Zellkernanalyse sind seit Jahren im Fokus der Karzinomforschung.

In dieser Studie soll untersucht werden, welche der oben genannten Marker sich zusätzlich zu den klassischen Prognosemarkern als unabhängiger Prognoseindikator eignen und ob diese eine optimale Diagnosestellung und Therapieentscheidung ergänzen könnten.

Die demografischen Daten des Patientenkollektivs in unserer Untersuchung stellten sich folgendermaßen dar:

In die Untersuchung wurden 85 Patienten eingeschlossen, welche zwischen Januar 200 bis Dezember 2006 aufgrund eines hepatozellulären Karzinoms eine Leberteilresektion hatten. Ein Patient wurde als sog. Lost-to-follow-up aus den statistischen Erhebungen ausgeschlossen, sodass 84 Patienten in die statistische Auswertung einschlossen wurden.

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von Januar 2002 bis Oktober 2011. Der mediane Beobachtungsintervall betrug 36 Monate (6,8-116 Monate).

Die Altersverteilung entspricht mit einem medianen Erkrankungsalter von 63 Jahren (Range 16-85) den Angaben der Literatur für das durchschnittliche Erkrankungsalter in Ländern mit niedriger Inzidenz (Güthle 2014). Bei einer Untersuchung in Österreich war bei insgesamt 850

Patienten das mediane Erkrankungsalter 62,6 Jahre (Range 23-87) und 63,9 Jahre (Range 19-87) (Hucke 2011).

Die Geschlechterverteilung mit 68 Männer und 16 Frauen und einem Verhältnis von Männern zu Frauen von 4,3:1 entspricht der verbreiteten Angabe 4:1 in der Literatur (Jemal 2011, Chen 2003). In der bereits erwähnten Untersuchung von Hucke lag bei 850 HCC-Patienten das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen bei 4,6:1 (Hucke 2011). Einen Überlebensvorteil ($p<0,008$) für Frauen wird bei Bilimoria beschrieben. Dabei war die 5-JÜR bei insgesamt 446 HCC Patienten und einem 1:1-Verhältnis von Frauen zu Männern bei HCC ohne Zirrhose und einem Verhältnis 1:3 mit Zirrhose. Im Vergleich zu anderen Studien ist der Frauenanteil höher (Bilimoria 2001). Auch in unserer Untersuchung zeigte sich eine signifikant bessere Überlebenschance für Frauen ($p=0,094$) in der univariaten Analyse.

Bei HCC-Patienten, die der Leberresektion zugeführt werden können, findet sich eine 5-JÜR von über 70%, vorausgesetzt die Leberfunktion ist intakt und es handelt sich um einen solitären Tumor, der kleiner ist als 5cm ohne vaskuläre Invasion und mit einem Resektionsabstand von mindestens 5cm (Delis 2008, Llovet 2008, Schwartz 2007). Zu der 5-JÜR nach Resektion des HCC in Leberzirrhose finden sich Angaben von unter 30% bis über 50% (Spangenberg 2009, Delis 2008).

Betrachtet man HCC mit und ohne Leberzirrhose als eine Entität, so werden 5-JÜR von etwa 50% angegeben (Grazi 2003).

Die Überlebenszeiten (JÜR) in unserem Follow-up stellen sich wie folgt dar: Die 1-JÜR lag bei 94,1%, die 3-JÜR bei 50,6%, die 5-JÜR lag bei 34,9% und die 8-JÜR bei 28,5%. Die festgestellten Überlebensraten unserer Patientengruppe lagen damit im Bereich der Literaturangaben (Grazi 2003, Llovet 2008, Schwartz 2007, Chen 2003).

Das Tumorstadium wurde mit der WHO-pTNM-Klassifikation erstellt.
Die pT-Tumorgröße und -ausbreitung hatte bei den untersuchten 84 Patienten eine Verteilung von pT1 25%, pT2 43% und pT3 32% (0 pT4) und erreichte univariat kein Signifikanzniveau ($p\geq0,5$) für die Überlebensvorhersage.
In der Literatur finden sich sowohl signifikante als auch nicht signifikante Ergebnisse für das pT-Tumorstadium. Bei Bilimoria ist die Tumorgröße (pT4, pT3 vs. pT1; pT4 vs. pT1; 1 Tumorknoten vs. multiple Tumorknoten) signifikant (Bilimoria 2001). Bei Thelen findet sich univariat und multivariat eine Signifikanz. Univariat zeigten die höheren Tumorstadien pT3 und

pT4 (p<0,001) ein signifikant höheres Langzeitüberleben bei HCC Patienten ohne Zirrhose und multivariat erwiesen sich das Tumorstadium (pT1, pT2 vs. pT3, pT4) als unabhängiger Prognoseindikator (Thelen 2013). Die Ergebnisse unseres heterogenen Patientenkollektivs weichen von diesen Aussagen ab.
Zudem fand sich eine signifikante Korrelation von multifokalen Tumoren mit kürzerem Überleben (Hebestreit 2010). Für Patienten mit niedrigem Tumorstadium und guter erhaltener Leberfunktion, welche der Resektion zugeführt wurden, wird die Prognose mit dem pT-Stadium gut abbildet (Benson 2009).

Bei unseren HCC-Patienten fand sich in 86% der Fälle ein pN0-Lymphknotenstatus, in je 7% zeigte sich der Status pN1 und pN2. Bei dieser kleinen Untersuchungszahl liegen die Zahlen etwa auf dem Niveau anderer Untersuchungen von HCC und Resektion. Bei Grazi liegt der pN0 Status bei 85%, pN1und pN2 zusammen bei 14,9% (Grazi 2003). Diese Zahlen stimmen mit den Zahlen unserer Patientengruppe überein.
Der Lymphknotenstatus pN erreichte in unserer Untersuchung univariat mit p=0,16 kein signifikantes Niveau in der Überlebensanalyse. Bei Thelen fand sich (pN0 vs. pN1, pN2) als unabhängiger Prognosefaktor (p<0,026) für tumorfreies Überleben bei Patienten mit HCC ohne Zirrhose. Es wird eine Korrelation der Lymphangiogenese mit dem schlechteren Überleben aufgeführt (Thelen 2009, 2013). Ebenso untersuchte seine Gruppe den Einfluss des prolymphoangiogenetischen vasculär endothelialen Wachstumsfaktors auf die Progression des HCC (Thelen 2008). Auch Grazi findet in der multivariaten Analyse der Prognoseparameter von 443 HCC-Resektionen eine Signifikanz (p<0,001, pN0 vs. pN1,2) des Lypmhknotenstatus (Grazi 2003), während in der Kohorte (443+337 Patienten) bei Hucke univariat keine Signifikanz vorlag (p>0,1) (Hucke 2011).

Die Gefäßinvasion (V) zeigte bei 67% der Patienten einen V0-Status, bei 29% der Patienten einen V1-Status und bei 5% der Patienten einen V2-Status. Bei einigen Studien mit HCC und Resektion finden sich ein in etwa paritätisches Verteilungsmuster von V0 und V1, während V2 unter 5% liegt (Grazi 2003).

In der vorliegenden Untersuchung erreicht die Gefäßinvasion ein hohes Signifikanzniveau (P≤0,001, V0 vs. V1, V2) in der univariaten Analyse. Multivariat ergibt sich, verglichen mit den signifikanten Markern DNA-Index und positives Ki-67, keine Signifikanz.

Eine univariate Signifikanz für die Gefäßinvasion findet sich bei Bilimoria (p≤0,001);

multivariat zeigte die Gefäßinvasion im Vergleich zu Tumorgröße, Resektionsrandbreite, AFP und Ätiologie des HCC keinen signifikanten Einfluss auf die 5-JÜR (Bilimoria 2001).
Auch bei Thelen findet sich univariat eine Signifikanz für die Gefäßinvasion (p <0,001), nicht aber im multivariaten Vergleich (Thelen 2013).
Bei einer Studie zu den Risikofaktoren für den frühen Tod bei HCC-Patienten zeigte Kondo, dass die Gefäßinvasionsstadien V1 und V2 wichtigste Prognoseindikatoren (p<0,05; V0 vs. V1, V2) für das Versterben innerhalb von 2 Jahren postoperativ sind (Kondo 2005). Grazi findet in der multivariaten Analyse der Prognoseparameter von 443 HCC-Resektionen eine Signifikanz für die Gefäßinvasion in den Stadien V1 und V2 (p<0,001, V0 vs. V1, V2) und den Lymphknotenstatus in der 5-JÜR (Grazi 2003).
Pawlik untersuchte den Einfluss von Gefäßinvasion auf das Tumorstadium bei reseziertem HCC und konnte eine hohe Signifikanz konstatieren. Ein V0-Status hat unabhängig von der Tumorgröße eine bessere Überlebenschance (Pawlik 2005). Ebenso war der Differenzierungsgrad eng mit der Tumorgefäßinvasion verbunden. Bei Jonas wurde in der multivariaten Analyse eine hohe Signifikanz von Gefäßinvasion auf das postoperative Überleben nach der Lebertransplantation herausgearbeitet (Jonas 2001). Wie auch in unseren Ergebnissen gezeigt werden konnte, zeigen auch viele andere Studien, dass die Gefäßinvasion signifikant mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (Jonas 2001, Esnaola 2002, Llovet 1998, Vauthey 2002, Shetty 2004, Salizzoni 2003).

Es besteht die Tendenz, auch größere Tumore bei geringerer Residualkapazität der Leber in atypischen Resektionen radikal zu entfernen. Die Überlebensstudien zeigen für HCC-Patienten mit und ohne Leberzirrhose immer bessere Langzeitüberlebenschancen (Lang 2000, 2005, Spangenberg 2009, Thelen 2009, 2013).
Die Einhaltung eines sichereren Resektionsabstandes geht mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines tumorfreien Resektionsrandes (R0) einher. In unserem Kollektiv konnte bei 92% der Patienten ein R0-Status erreicht werden, 2% hatten einen R1- und 6% einen R2-Status. In der univariaten Analyse zeigte dies keine Signifikanz (p=0,29) für das Überleben. Die prozentuale Verteilung unserer Erhebung entspricht etwa der Verteilung in anderen Untersuchungen.
Die Signifikanz des tumorfreien Resektionsrandes wird in der Literatur unterschiedlich gewertet. Bei Thelen ist der Resektionsrand univariat signifikant (p=<0,001, R0 vs. R1, R2) (Thelen 2013). Kondo führt in seinen Untersuchungen bei HCC Patienten mit Resektion eine Signifikanz in der univariaten Analyse auf, nicht aber in der multivariaten Analyse (Kondo 2005).
Viele Studien untersuchen nicht den Status des Resektionsrandes, sondern betonen die

Bedeutsamkeit des sicheren Resektionsabstandes, definiert in >/< 1cm. Chen untersuchte den Resektionsrand und erreichte, bezogen auf die Prognose, eine hohe Signifikanz in der multivariaten Analyse ($p \leq 0{,}0001$, R<1cm vs. R>1cm) (Chen M.F. 2003).

Der Differenzierungsgrad (G) in dieser Untersuchung war bei 15% G1, bei 60% G2 und 25% bei G3. Der Differenzierungsgrad war nicht signifikant ($p \geq 0{,}1$) für das Überleben.
Pawlik äußert in der univariaten Analyse eine hohe Signifikanz ($p \leq 0{,}001$) für das histopathologische Tumorgrading als negativen Prediktor und weist insbesondere in der multivariaten Analyse mit dem Grad der Gefäßinvasion darauf hin, dass die schlechtere Differenzierung mit einer höheren Gefäßinvasion verbunden ist. Ist sowohl die Gefäßinvasion als auch das Grading-Stadium hoch, ist dies mit einer schlechteren Prognose verbunden (Pawlik 2005). Die Tatsache, dass sich bei Tumoren, die größer als 5cm sind, signifikant öfter ein höheres Edmondson-Steiner-Stadium findet, scheint naheliegend, ist aber in der Literatur nicht konstant zu finden.

Betrachtet man das gesamte WHO-pTNM-Stadium, so finden sich in dieser Untersuchung mit einer kleineren Patientenzahl in der univariaten Analyse allein die Gefäßinvasion (pV) als signifikanter Prädiktor für das Überleben. Die Kriterien Tumorgröße und Tumorausbreitung (pT), Lymphknotenstatus (pN), Metastasierung (M), Edmondson-Steiner-Grad (G) und Resektionsrand (R) zeigen keine Signifikanz als Indikator für das Überleben.
Damit entsprechen die Erkenntnisse dieser Untersuchung den Aussagen der Literatur, welche bei Betrachtung aller HCC-Tumore in ihrer Heterogenität bezüglich Ätiologie, Leberverhalten und Performance-Status nicht in der TNM-Klassifikation abgebildet sind. Betrachtet man die Gruppe der kleinen Tumore, welche reseziert wurden, ist das pTNM-Staging ein signifikanter Prognosemarker. Da diese Entität nur etwa 5% aller primären Lebertumore abbildet, stimmt die Aussage unserer Untersuchung mit der international vertretenen Auffassung überein, dass der TNM-Status nicht alleinig zur Therapieplanung und als Prognoseindikator herangezogen werden kann.
Kinoshita verglich 7 aktuelle Stagingsysteme. Zur Darstellung der Überlebensprognose bei HCC mit höhergradigen pTNM-Stadien und einer eingeschränkten Leberfunktion ist die TNM-Klassifikation nicht geeignet (Kinoshita 2015). Hier stellt sich die BCLC-Klassifikation am validesten dar.
Auch Marrero beschrieb die Unterlegenheit der Vorhersagewahrscheinlichkeit der pTNM-Klassifikation und stellt das BCLC-System in den Vordergrund (Marrero 2005). Wie auch die

Verfasser der deutschen S3-Leitlinie (Greten 2013) raten die Studienautoren zu einer umsichtigen Anwendung der Scores und der daraus entwickelten Therapiealgorithmen. Wir können uns der Meinung der vorgenannten Autoren nur anschließen; die Schwächen der Scores sollten berücksichtigt werden, die Scores sollten weiterentwickelt werden und es sollten ergänzende prädiktive Indikatoren erforscht werden.

Das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung liegt, zusätzlich zu den klassischen Prognoseparametern, auf der prognostischen Validität des Apoptosemarkers p53, des Proliferationmarkers Ki-67 sowie des DNA-Ploidiestatus und des DNA-Index.

Der Einfluss der Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 auf die Karzinogenese ist schon lange Gegenstand von immunhistochemischen Untersuchungen. Sie beeinflusst das biologische Verhalten der Tumore und bewirkt die hohe proliferative Aktivität, die Tumorprogression aber auch die Therapieresistenz. Die Mutationen des p53 (mutp53) wurden in vielen Tumorentitäten untersucht und auch im hepatozellulären Karzinom nachgewiesen (Tu 2012, Tseng 2008). Auch wurde die Bedeutung des mutp53 für die Tumorentstehung und Progression des HCC untersucht (Wang 2013).

Es werden verschiedene Mutationen beschrieben, wobei die Mutation im Codon 249 eine der häufigsten zu sein scheint, welche global auftritt. Viele Studien beschäftigten sich dabei mit der Ätiologie des HCC und legen dar, dass in Hepatitis B, C und Aflatoxin bedingten HCC-Tumoren hohe positive Werte für dieses mutp53 gefunden wurden. Im Vergleich von Patienten mit Leberzirrhose und HCC, beides Hepatitis B und C bedingt, zeigten sich signifikant ($p \leq 0{,}001$) höhere mutp53-Werte bei diesen Karzinomen (El-Shanawani 2006).

Im unserer Untersuchung erreichte univariat mutp53 keine Signifikanz ($p \geq 0{,}1$) als Marker für die Prognose. Es waren 78% der HCC-Tumore mutp53 negativ und nur 22% positiv. Die Aussagen zum prognostischen Wert von mutp53 bei HCC sind kontrovers. Einige Studien bestätigen den signifikanten Einfluss auf das Überleben (Naka 1998, Qin 2001, Schöniger-Hekele 2005, Sung 2005). Die Studie von Cui zeigte keine Signifikanz für die Überlebenszeit bei Patienten nach Resektion eines kleiner als 5cm großen HCC (Cui 2005). Chen beschrieb die Signifikanz von negativem mutp53 für das deutliche spätere Auftreten (16-32 Monate) von Rezidiven nach Resektion (Chen G.G. 2003). Bei Hu fand sich bei mutp53-positiven HCC-Tumoren nach Resektion eine signifikant kürzere Überlebenszeit und häufigere Rezidivraten (Hu 2007).

Hohes mutp53 korrelierte auch mit der schlechteren Differenzierung des HCC, einer höheren Gefäßinvasion und Tumoren größer als 5cm (Umemura 2008, Guo 2006, Qin 2005).

Die Häufigkeit in untersuchten Kohorten von Mutation im p53-Gen scheint stark zu variieren. Greenblatt gibt an, dass 25-50% der HCC-Tumore mutp53 positiv sind, bei Mann finden sich 22-81% (Greenblatt 1994, Mann 2007). Sheu fand im Hepatitis B bedingten HCC 32,8% der Tumore mutp53 (Codon 249) positiv (Sheu 1997).

In der Gesamtschau scheint die Überexpression von mutp53 mit einem aggressiveren Tumorverhalten zu korrelieren und sich mutp53 daher potentiell als Prognosemarker für das Überleben zu eignen. Dies spiegelt sich nicht in den Ergebnissen unserer Untersuchung wider. Allerdings gibt es in den Studien zu viele Variablen, die eine exakte Darstellung der Validität vorerst nicht ermöglichen. So werden in der immunhistochemischen Untersuchung unterschiedliche Marker verwendet und es besteht auch kein gemeinsamer Grenzwert. Auch unterscheidet sich in den Studien die Expression von mutp53 in untersuchten HCC-Tumoren aufgrund ihrer Ätiologie auch in den verschiedenen Kontinenten sehr in den Ergebnissen. Dies und mehr könnte auch die Ursache für die divergierenden Aussagen sein.

Die proliferative Aktivität von Tumorzellen ist ein wichtiger Indikator für die Aggressivität des Tumors und kann eine nützliche Ergänzung in der Vorhersage des biologischen Tumorverhaltens und des klinischen Behandlungsergebnisses sein.

Ki-67 hat sich als exakter Proliferationsmarker des Tumorgeschehens bewährt (Le Page 2010, Jiang 2012, Bologna-Molina 2013). Seine Konzentration im Zellkern steigt kontinuierlich von der G1-Phase bis zur Mitose an und seine Färbung mit dem monoclonalen Antikörper MIB-1 hat sich als effektive Methode und zur Prognose von vielen Tumorentitäten bewährt.

In unserer Untersuchung zeigte sich in der univariaten Analyse Ki-67 als signifikanter (p=0,03) Prognosemarker. Es fanden sich 28% Ki-67-positive Tumore und 72% Ki-67-negative. Die Zahlen unserer Patientengruppe finden sich auch in der Literaturrecherche wieder. Eine erhöhte Expression von Ki-67 hat sich in vielen Studien als signifikanter Prognosemarker bei Patienten mit HCC und Leberteilresektion erwiesen (Chen 2014, Cao 2012, Ke 2009, Schmilovitz-Weiss 2011). Huang zeigte in seiner Studie in der multivariaten Analyse eine Signifikanz für Ki-67 für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben (Huang 2014). Ki-67-Expression war in anderen Studien mit dem Differenzierungsgrad der Tumore korreliert, da bei schlecht differenzierten HCC-Tumoren die Wachstumskontrolle eingeschränkt ist und somit die Proliferationsrate sehr hoch (Huang 2014, Hsu 2014). In der Studie von Ito hatten die HCC-Tumore mit hoher Ki-67-Expression zusätzlich zum schlechteren Differenzierungsgrad ein höheres Tumorstadium, häufiger eine Portalveneninvasion und intrahepatische Metastasen, verbunden mit kurzem Überleben (Ito 1999).

Es scheint also insgesamt eine Signifikanz für Ki-67 als Prognosemarker zu geben, die wir mit

den Ergebnissen unserer Untersuchung bestätigen können. Leider lassen sich die Studien untereinander kaum vergleichen, da, ähnlich wie bei mutp53, unterschiedliche Labormethoden und Nachweisgrenzen zur Anwendung kommen. Von Nui wird empfohlen, mittels Erstellung von Grenzwertoptimierungskurven (ROC) Standardbedingungen zu etablieren (Nui 2015). So könnten auch Metaanalysen durchgeführt werden, welche die Integration der routinemäßigen Ki-67-Markierung zur Ergänzung der Diagnose und Therapieentscheidungen empfehlen.

In der quantitativen DNA-Zytometrie ist der Nachweis von DNA-Aneuploidie in den meisten Geweben ein Marker für Malignität (Ross 1996). Die bildanalytische DNA-Zytometrie ist eine etablierte Methode zur biologischen Tumorcharakterisierung. Sie ist eine wertvolle Hilfe einerseits bei der morphologischen Differentialdiagnose zwischen benignen und malignen Läsionen und andererseits bei der Erstellung eines objektiven Gradings bereits morphologisch gesicherter maligner Läsionen.

Es sind zahlreiche Studien zum prognostischen Stellenwert der DNA-Zytometrie bei malignen Tumoren verschiedener Organe publiziert worden. Aufgrund der Multivarianz-Analyse konnten die Autoren in ihren Studien die Relevanz des DNA-Histogramms im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern ermitteln. Dabei zeigte sich, dass eine Voraussage über den postoperativen Verlauf ausschließlich durch das DNA-Histogramm und das lokale Infiltrationsstadium möglich ist (Al-Abadi 1990, 1992, 1998, Bardales 1998, Bardi 1992, Befrits 1994, Böcking 1998, Haroske 2001, Rugge 1996). Warum aneuploide und diploide Tumore ein unterschiedliches Malignitätspotential entwickeln, ist noch offen. Das eindeutige aneuploide DNA-Verteilungsbild mag einen hohen Grad genetischer Instabilität in dieser Tumorzellpopulation wiedergeben. Obwohl die genetischen Gesetzmäßigkeiten für euploide und aneuploide Tumore gegenwärtig nicht verstanden werden, erlauben uns die zytophotometrischen Analysen des Zellkern-DNA-Gehaltes ohne Zweifel zwischen Tumoren mit niedrigem und hohem Malignitätsgrad zu unterscheiden. Die bildzytometrischen Zellkern-DNA-Untersuchungen zeigten, dass mit Hilfe der DNA-Zytometrie eine Aussage über den Malignitätsgrad des Tumors getroffen werden kann. Der DNA-Aneuploidie-basierte DNA-Index eignet sich als ein signifikanter Prognosemarker somit zur Selektion jener Patienten, die von einer Resektion oder Lebertransplantation profitieren können und kann als ein signifikanter Marker für die postoperative Prognose nützen (Bergquist 2000, Sears 1998, Sato 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde der DNA-Gehalt, ausgedrückt im DNA-Index und der Ploidiestatus der Tumore, bestimmt.

Die DNA-Ploidie gibt den DNA-Gehalt (c) einer Zelle an. Aneuploide Stammlinien stellen sich als Peak außerhalb der euploiden DNA-Peaks dar (<1,80c, >2,20c, <3,60c, >4,40c) (Böcking

1998). Finden sich DNA-Gehalte, deren DNA-Gehalte also außerhalb von 1c, 2c und nicht zwischen 1,8c-2,2c oder 3,6c-4,4c liegen, handelt es sich um aneuploide Zellkerne.

Die Aneuploidie ist ein Marker für die Malignität, wobei der Zellkern-DNA-Gehalt außerhalb des Mittelwertes der Eichzellpopulation (+/- 15%) liegt (Haroske 2001).

Der DNA-Index (DI) ist der Modalwert eines Peaks, dividiert durch den Modalwert des dazugehörigen diploiden Referenzzellpeaks. Bei einem DI von 1 handelt es sich um eine diploide Zellkernstammlinie, also um normales Gewebe. Bis zu einem DNA-Index von <1,5 wird von einem weniger malignen Verhalten, bei ≥1,5 von einem höherem Malignitätsgrad mit schlechterer Prognose ausgegangen (Böcking1997).

In unserer Untersuchung sind sowohl der Ploidiestatus als auch der DNA-Index in der univariaten hoch signifikant (p<0,0001, der DNA-Index auch in der multivariaten Analyse.

Wir haben dabei einen Cut-off berechnet, der sich bei DNA-Index 1,78 befindet. Dies bedeutet, dass in diesem ausgewählten Kollektiv von Patienten mit HCC nach Resektion mit einem DNA-Index ≤1,78 eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit und bei Patienten mit einem DNA-Index >1,78 eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit bestand.

Patienten, deren Tumor einen DI ≤1.78 hatte, hatten eine 1-, 3-, 5-, 8-JÜR von 100%, 90,9%, 62,9%, 50,1%. Patienten deren Tumor einen DNA-Index >1,78 hatte, hatten eine 1-, 3-, 5-, 8-JÜR von 87,8%, 7,3%, 4,8%, 4,8%.

Die höheren DNA-Index-Werte finden sich auch in der Verteilung des DNA-Gehaltes der HCC-Tumorzellkerne. Es fanden sich bei Diploidie ein medianer DNA-Index von 1,4 (Range 1,3-1,6), bei Aneuploidie ein medianer DNA-Index von 1,5 (Range 1,34-1,9) und bei den tetraploiden Tumoren ein medianer DNA-Index von 1,9 (Range 1,6-2,5).

Diese Tendenz zu einem höheren DNA-Index bei einem fortgeschritteneren Stadium ließ sich bei dem Lymphknotenstatus, dem Status der Gefäßinvasion, dem Status des Resektionsrandes sowie der Positivität von Ki-67 und mutp53 feststellen. Es besteht eine signifikante Wahrscheinlichkeit, dass bei einem höheren DNA-Index die angegebenen Parameter höhergradig vorliegen. Bei dem Tumorstadium (pT) und das Grading (G) stellte sich dies nicht dar.

Unsere gewonnen Untersuchungsergebnisse entsprechen den bisher veröffentlichten wenigen Studien zur Validität des DNA-Index als Prognosemarker für die Überlebenswahrscheinlichkeit bei HCC-Tumoren.

Jonas beschrieb den DNA-Index in der univariaten (p<0,0001) und multivariaten Analyse in Korrelation zu der Erfüllung der Mailandkriterien (p<0,001) als signifikanten Prognosemarker bei HCC-Patienten, die einer Lebertransplantation zugeführt wurden (Jonas 2009). Der Cut-Off-Wert des DNA-Index wurde bei <1,5 festgelegt. Auch wurde in der Studie univariat eine hohe

Signifikanz für den Einfluss der Gefäßinvasion auf das Überleben festgestellt. Andere Studien beschrieben die DNA-Ploidie als validen Prädiktor für das Überleben von Patienten mit HCC und Lebertransplantation (Al-Abadi 2000, Jonas 2001).

Ziel der Arbeit war es, für Patienten mit HCC weitere Prognosefaktoren auf ihren signifikanten Voraussagewert zu prüfen. Dazu wurden zunächst die klassischen, die immunhistochemischen und molekularbiologischen Faktoren untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen in der univariaten Analyse eine Signifikanz für die Gefäßinvasion und den Proliferationsmarker Ki-67 als prädiktiven Marker für das Überleben.

Allein der DNA-Index stellt sich in der multivariaten Analyse als hoch signifikanter Prognosemarker dar.

Unsere Ergebnisse bestätigen uneingeschränkt die Notwendigkeit die Erforschung des DNA-Verhaltens bei Lebertumoren zu intensivieren und breit angelegte internationale Studien zu initiieren, um den DNA-Index möglichst bald als zusätzlichen Zellkernmarker der Tumormalignität zu etablieren. Die Untersuchungsmethode ist global hoch standardisiert, einfach und kostengünstig durchzuführen. Dies könnte auch im Sinne der Autoren der HCC-Klassifikationssysteme, der S3-Leitlinie für das HCC sowie der Transplantationskriterien sein.

Der Proliferationsmarker Ki-67 ist und wird häufig in Lebertumoren untersucht. Da es sich um einen Marker der Zellkernaktivität handelt, haben wir festgestellt, dass Ki-67 eine sinnvolle Ergänzung zum DNA-Index sein könnte. Doch aufgrund der global sehr uneinheitlichen Untersuchungsmethoden und Studienprotokolle ist eine zeitnahe valide Aussage zu Ki-67 als Prognoseindikator des HCC nicht zu erwarten.

Da in den Studien zum DNA-Index der HCC-Tumore häufig gleichzeitig eine Signifikanz für die Gefäßinvasion als prädiktiver Wert für das Überleben festgestellt wurde, sollten diese weiter in multivariaten Analysen auf ihre Validität als Prognoseparameter im Vergleich zu den klassischen Prognoseparametern geprüft werden.

## 5. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit ein sehr häufig vorkommender Tumor mit einer hohen Mortalitätsrate. Die Inzidenz nimmt weltweit, auch in Europa, stetig zu. Die potentiell kurativen Therapien sind die R0-Resektion und die Lebertransplantation. Die HCC-Klassifikationssysteme und die Allokationskriterien werden kontinuierlich auf ihre wissenschaftliche Validität geprüft und ergänzt. Aufgrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten bei dem fortgeschrittenen Leberzellkarzinom und der zunehmenden Inzidenz des HCC bei gleichzeitig abnehmenden Spenderorganen werden zukünftig aktuelle tumorbiologische Erkenntnisse eine größere Relevanz erlangen.

Die vorliegende Arbeit hat klassische klinische und zellbiologische Prognoseparameter bei 85 HCC-Patienten mit einer Leberteilresektion der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow, untersucht und auf ihre prognostische Validität geprüft.

Die Gefäßinvasion des HCC-Tumors zeigt sich in vielen Studien, so auch hier, als signifikanter Prognosefaktor, deren Stellung innerhalb der klassischen Prognoseparameter weiter evaluiert werden sollte.
Der Proliferationsparameter Ki-67 zeigt sich als signifikant für das Überleben, ist aber aufgrund der global divergierenden Herangehensweisen und der kontroversen Ergebnisse aktuell kein valider Prognoseparameter. Es sollten Standardisierungen eingeführt werden, die zukünftig Metaanalysen ermöglichen.

In der multivariaten Analyse erweist sich in dieser Studie allein der DNA-Index als hoch signifikanter Prognoseindikator für das Überleben der Patienten mit HCC und reiht sich somit in die Ergebnisse der vorhandenen Studien ein. Der DNA-Index ist ein valider Prädiktor und kann zu einer Optimierung der prä- und postoperativen Therapieentscheidungen nützlich sein.

## 6. Literaturverzeichnis

**Al-Abadi H., Jonas S., Bechstein W.O., Neuhaus P.:** [Poster]. – Halkidiki: EACR – XVI – European Association for Cancer Research Biennial Meeting, 30.05. -04.06.2000.

**Al-Abadi H., Jonas S., Neuhaus P.:** DNA-content and survival rates of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Detect Prev. 1998; 22(Suppl 1):180.

**Al-Abadi H., Nagel R.:** Nuclear DNA-Analysis: DNA heterogeneity in the monitoring of patients with locally advanced prostatic carcinoma. Eur Urol. 1992; 22:303-310.

**Al-Abadi H., Nagel R.:** Nuclear DNA-Analysis: Relevance of ploidy DNA heterogeneity and phases of the cell cycle. An 8 year study of 329 patients with prostatic carcinoma. Urol Int. 1990; 45:350-355.

**Alberti A., Baccarini P., Beaugrand M., D`Errico A., De Mitri M.S., Grigioni W., Pisi E.,Pontisso P., Poussin K., Simon N.:** HCV-associated liver cancer without cirrhosis. Lancet. 1995; 345:413-415.

**Ascha M.S., Hanouneh I.A., Lopez R., Tamini T.A., Feldstein A.F., Zein N.:** The incidence and risk faktor of hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2010; 51(6):1972-1978.

**Atkin N.B., Richards B.M.:** Desoxyribonucleic acid in human tumours as measured by microspectophotometry of Feulgen stain: a comparison of tumours arising at different sites. Brit J Cancer. 1956; 10:769-786.

**Bacon B.R., Schilsky M.L.:** New knowledge of genetic pathogenesis of hemochromatosis and Wilson`s disease. Asv Intern Med. 1999; 44:91-116.

**Ballhausen W.G.:** Molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms-Stans. Chir Gastroneterol. 2003; 19:207-213.

**Bardales R.H., Stanley M.W., Simpson D.D., Baker S.J., Steele C.T., Schaefer R.F., Powers C.N.:** Diagnostic value of brush cytology in the diagnosis of duodenal, biliary, and ampullary neoplasms. Am J Clin Pathol. 1998; 109(5):540-548.

**Bardi G., Johansson B., Pandis N., Heim S., Mandahl N., Andrén-Sandberg A., Hägerstrand I., Mitelman F.:** Cytogenetic findings in three primary hepatocellular carcinomas.

Cancer Genet Cytogenet. 1992; 58(2):191-195.

**Befrits R., Hammarberg C., Rubio C., Jaramillo E., Tribukait B.:** DNA aneuploidy and histologic dysplasia in long-standing ulcerative colitis. A 10-year follow-up study. Dis Colon Rectum. 1994; 37(4):313-320.

**Benchimol S., Pim D., Crawford L.:** Radioimmunoessay of the cellular protein p53 in mouse and human cell lines. EMBO J. 1982; 1(9):1055-1062.

**Benson A.B., Abrams T.A., Ben-Josef E., Bloomston M., Botha J.F., Clary B.M., Covey A., Curley S.A., D´Angelica M.I., Davila R. et al.:** Hepatobiliary cancers: Clinical practice guidelines in oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2009; 7(4):350-391.

**Bergquist A., Tribukait B., Glaumann H., Broomé U.:** Can DNA cytometry be used for evaluation of malignancy and premalignancy in bile duct strictures in primary sclerosing cholangitis? Hepatology. 2000; 33:873-877.

**Biesterfeld S., Gerres K., Fischer-Wein G., Böcking A.:** Polyploidy in non- neoplastic tissues. J Clin Pathol. 1994; 47: 38-42.

**Bilimoria M.M., Lauwers G.Y., Doherty D.A., Nagorney D.M., Belghiti J., Do K.-A., Regimbeau J.-M., Ellis L.M., Curley S.A., Ikai I., Yamaoka Y., Vauthey J.-N.:** Underlying liver disease, not tumor factors, predicts long-term survival after resection of hepatocellular carcinoma. Arch Surg. 2001; 136:528-535.

**Böcking A., Giroud F., Reith A.:** Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA-image cytometry. Anal Cell Pathol. 1995; 8:67-74.

**Böcking A.:** Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. DÄ. 1998; 95(12):658-662.

**Böcking A.:** Biologische Grundlagen und Anforderungen an die Methodik der statischen DNA-Zytometrie. Fortschritt und Fortbildung in der Medizin, 1997; Bd 21.DÄ-Verlag: 21-49.

**Böcking A.:** DNA Bildzytometrie-Methode zur Früherkennung und Malignitäts-Gradierung bösartiger Tumoren. In: Samsel W., Böcking A.: Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom GEK-Edition: Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse Ba. Asgard-Verlag, 2006; 46-97.

**Bologna-Molina R., Mosqueda-Taylor A., Molina-Frechero N., Mori-Estevez A.D., Sánchez-Acuña G.:** Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013; 18(2):e174-179.

**Bosch F.X., Ribes J., Diaz M., Cleries R.:** Primary liver cancer: worlwide incidence and trends. Gastroenterology. 2004; 127:5-16.

**Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H. (Hrsg):** WHO classification of tumours of the digestive system. 4 Aufl, World Health Orgn. 2010.

**Breitenstein S., Apestegui C., Petrowski H. et al.:** „State of the art“ in liver resection and living donor liver transplantation: a worldwide survey of 100 liver centers.World J Surg. 2009; 33(4):797-803.

**Breuhahn K.:** Molekulare Progressionsmechanismen der humanen Hepatokarzinogenese. Pathologe. 2010; 31(Suppl 2):170-176.

**Bruix J., Sherman M.:** Managemant of the hepatocellular carcinoma: an update. Hepatology. 2011; 53(3): 1020-1022.

**Bruno S., Gorczyca W., Darzynkiewicz Z.:** Effect of ionoc strength in immuncytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA and the protein reacting with Ki-67 antibody. Cytometry. 1992; 13:496-501.

**Buchner O., Wartenberg H.:** Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12. vollständig überarbeitete Auflage, Verlag Hans Huber, 1997:14.

**Buendia M.A.:** Genetics of the hepatocellular carcinoma. Semin Cancer Biol. 2000; 10:185-200.

**Burck H.C.:** Histologische Technik. Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis. Thieme, Stuttgart, 1966.

**Cao X., Xia Y., Yang J., Jiang J., Chen L., Ni R., Li L., Gu Z.:** Clinical and biological significance of never in mitosis gene A-related kinase 6 (NEK6) expression hepatic cell cancer. Pathol Oncol Res. 2012; 189:81-88.

**Caspersson T.:** Die quantitative Betimmung von Thymonucleinsäure mittels fuchsinhaltiger Säure. Biochem Z. 1932; 253:97-117.

**Chen C.J., Yang H.I., Iloeje U.H. et al.:** Carriers of inactive Hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. Gastroenterology. 2009; 138(5):1747-1754.

**Chen G.G., Merchant J., Lai P.B.S., Ho R.L.K., Hu X., Okada M., Huang S.F., Chui A.K.K., Law D.J., Li Y.G., Lau W.Y., Li A.K.C.:** Mutation of p53 in recurrent hepatocellular carcinoma and its association with the expression of ZBP-89. Am J Pathol. 2003; 162(6):1823-1829.

**Chen H., Miao J., Li H., Wang C., Li J., Zhu Y., Wang J., Wu X., Qiao H.:** Expression and prognostic significance of p21-activated kinase 6 in hepatocellular carcinoma. J Surg Res. 2014; 189(1):81-88.

**Chen M.-F., Tsai H.-P., Jeng L.-B., Lee W.-C., Yeh C.-N., Yu M.-C., Hung C.-M.:** Prognostic factors after resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic livers: univariate and multivariate analysis. World J Surg. 2003; 27:443-447.

**Child C.G., Turcotte J.G.:** Surgery and portal hypertension. In: The liver and portal hypertension. Saunders, Philadelphia, 1964; 50-64.

**Cottier M., Jouffre C., Maubon I. et al:** Flow cytometric analysis of DNA ploidy in hepatocellular carcinoma specimens collected by ultrasound-guided fine needle aspiration. Cancer. 1994; 73:599- 605.

**Crawford L.V., Pim D.C., Bulbrook R.D.:** Detektion of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. Int J Cancer. 1982; 30(4)403-408.

**Cui J., Dong B.-W., Liang P., Yu X.-L., Yu D.-J.:** Construction and clinical significance of a predictive system for prognosis of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2005; 11(20):3027-3033.

**Delis S.G., Dervenis C.:** Selection criteria for liver resection in patients with hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. World J Gastroenterol. 2008; 14(22):3452-3460.

**Donato F., Boffetta P., Puoti M.:** A meta-Analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis b and c virus infection in causing hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 1998; 75:347-354.

**Dowell S.P., Ogden G.R., Tan L.K.:** Antigen retrieval: p53 stainig in benign, pre-malignant tissues of the larynx. Clin Otolaryngol Allied Sci. 1996; 21(2):147-150.

**du Manoir S., Guillaud P., Camus E., Seigneurin D., Brugal G.:** Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. Cytometry. 1991; 12:455-463.

**Duesberg P., Li R.:** Multistep carcinogesis: a chain reaction of aneuploization. Cell Cycle. 2003; 2(3): 202-210.

**Duesberg P., Ruhong L., Rasnick D.:** Aneulpoidy approaching a perfect score in predicting ans preventing cancer. Cell Cycle. 2004; 306:823-828.

**Edmondson H.A., Steiner P.E.:** Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. Cancer. 1954;7(3):462-503.

**El-Serag H.B., Davila J.A., Petersen N.J., McGlynn K.A.:** The continuing increase in tue incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. Ann Intern Med. 2003; 139(10): p817-23.

**El-Serag H.B., Rudolph K..L.**: Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology. 2007; 132:2557-2576.

**El-Shanawani F.M., Abdel-Hadi A.A., Abu Zikri N.B., Ismail A., El-Ansary M., El-Raai A.:** Clinical significance of aflatoxin, mutant p53 gene and sIL-2 receptor in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. J Egypt Soc Parasitol. 2006; 36(1):221-239.

**Esnaola N.F., Lauwers G.Y., Mirza N.Q., Nagorney D.M., Doherty D., Ikai I. et al.:** Predictors of microvascular inavasion in patients with hepatocellular carcinoma who are candidates for orthotopic liver transplantation. J Gastrointest Surg. 2002; 6:224-232.

**Farkas S.A., Schlitt H.J.:** Operative Therapie des Leberzellkarzinoms. Gastroenterologe. 2012; 7:398-406.

**Farrell G., Asia-Pacific Working Party on Prevention of Hepatocellular Carcinoma:** Prevention of hepatocellular carcinoma in the asia-pacific region:Consensus statements. J Gastroenterol Hepatol. 2010; 25:657-663.

**Feder J.N.:** The hereditary hemochromatosis gene (HFE): AMHC class I-like gene that functions in the regulation of iron homeostasis. Immuno Res. 1999; 20: 175-185.

**Feulgen R., Rossenbeck H.:** Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom

Typen der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Z.Physiol.Chem. 1924; 135:203-248.

**Fujimoto J., Okamoto E., Yamanaka N. et al:** Flow cytometric DNA-analysis of hepatocellular carcinoma. Cancer. 1991; 67:939-944.

**Gallo C., Manghisi G., Elba S., Mossa A., Giorgio A., Aloisio V. et al.:** A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: A retrospective study of 435 patients. Hepatology. 1998; 28(3):751-755.

**Gerdes J., Lemke H., Baisch H. et al:** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. J Immunol. 1984; 133:1710-1715.

**Grattagliano, Ubaldi E., Bonfrate L., Portincasa P.:** Management of liver cirrhosis between primary vare and specialists. World J Gastroenterol. 2011; 17(18): 2273-2282.

**Grazi G.L., Cescon M., Ravaioli M., Ercolani G., Gardini A., Del Gaudio M., Vetrone G., Cavallari A.:** Liver resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotics and noncirrhotics. Evaluation of clinicopathologic features and comparison of risk factors for long-term survival and tumor recurrence in a single centre. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 17(2):119-129.

**Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C.:** Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer eitology and molecular pathogenesis. Cancer Res. 1994; 54:4855-4878.

**Greten T.F., Malek N.P., Schmidt S. et al.:** Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms. Z Gastrenterol. 2013; 51:1269-1326.

**Guo R.P., Zhong C., Shi M., Zhang C.Q., Wei W., Zhang Y.Q., Li J.Q.:** Clinical value of apoptosis and angiogenesis factors in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2006; 132(9):547-555.

**Güthle M., Dollinger M.M.:** Epidemiologie und Risikofaktoren des hepatozellulären Karzinoms. Radiologe. 2014; 54:654-659.

**Hai S., Kubo S., Shuto T. et al.:** Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis: report of 2 cases. Surg Today. 2006; 36(4):390-394.

**Hamilton S.R., Aaltonen L.A.:** Pathology and genetics of tumours of the digestive system. WHO Classification of tumours. International Agency for Research of Cancer. 2000; 159.

**Haroske G., Baak J.P.A., Danielsen H., Giroud F., Gschwendtner A., Oberholer A., Reith A., Spieler P., Böcking A.:** Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Anal Cell Pathol. 2001; 23:89-95.

**Haroske G., Giroud F., Reith A., Böcking A.:** 1997 ESCAP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II Specific recommonations for quality assurance. Anal Cell Pathol. 1998; 17, 201-208.

**Hassan M.M., Hwang L.Y., Hatten C.J., Swaim M., Li D., Abbruzzese J.L., Beasley P., Patt Y.Z.:** Risk factors of hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hapatits and diabetes mellitus. Hepatology. 2002; 36:1206-1213.

**Hebestreit A., Hellerbrand C., Kirchner G., Kirovski G., Schlitt H.J., Schölmerich J., Stoeltzing O.:** Epidemiology and survival of patients with hepatocellular carcinoma in Southern Germany. Int J Clin Exp Med. 2010; 3:169-179.

**Hsu H.T., Wu P.R., Chen C.J., Hsu L.S., Yeh C.M., Hsing M.T., Chiang Y.S., Lai M.T., Yeh K.T.:** High cytoplasmic expression of Krüppel-like factor 4 is an independent prognostic factor of better survival in hepatocellular carcinoma. Int J Mol Sci. 2014; 15(6):9894-9906.

**Hu T.H., Wang C.C., Huang C.C., Chen C.L., Hung C.H., Chen C.H., Wang J.H., Lu S.N., Lee C.M., Changchien C.S., Tai M.H.:** Down-regulation of tumor suppressor gene PTEN, overexpression of p53, plus high proliferating cell nuclear antigen index predict poor patient outcome of hepatocellular carcinoma after resection. Oncol Rep. 2007; 18(6):1417-1426.

**Hu W., Feng Z., Eveleigh J., Iyer G., Pan J., Amin S., Chun F.L., Tang M.S.:** the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in human haepatocellular carcinoma. Carcinogesis. 2002; 23:1781- 1789.

**Huang X., Liu F., Zhu C., Cai J., Wang H., Wang X., He S., Liu C., Yao L., Ding Z., Zhang Y., Zhang T.:** Suppression of KIF3B expression inhibits human hepatocellular carcinoma proliferation. Dig Dis Sci. 2014; 59(4):795-806.

**Hucke F., Sieghart W., Schöniger-Hekele M., Peck-Radosavljevic M., Müller C.:** Clinical

characteristics of patients with heüatocellular carcinoma in Austia – is there a need for a structured screening program? Wien Klin Wochenschr. 2011; 123:542-551.

**Hussain S.P., Raja K., Amstad P.A., Sawyer M., Trudel L.J., Wogan G.N., Hofseht l.J., Shields P.G., Billiar D.H., Trautwein C., Hohler T., Galle P.R., Phillips D.H., Markin R., Marrogi A.J., Harris C.C.:** increased p53 mutationload in nontumorous human liver of Wilson disease and hemochromatosis: Oxyradical overload disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:12770-12775.

**Ispikoudis N., Rauchfuss F., Voigt R., Scheuerlein H., Bärthel E., Dittmar Y, Stettmacher U. :** Chirurgische Therapie von primären Lebertumoren bei Erwachsenen. Oncologe. 2012; 18: 617-623.

**Ito Y., Matsuura N., Sakon M., Takeda T., Umeshita K., Nagano H., Nakamori S., Dono K., Tsujimoto M., Nakahara M., Nakao K., Monden M.:** Both cell proliferation and apoptosis significantly predict shortened disease-free survival in hepatocellular carcinoma. Br J Cancer. 1999; 81:747-751.

**Jahrbuch Sucht** 2008 der Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen e.V. (DHS). Geesthacht: Neuland Verlagsgesellschaft mbH, 2008.

**Jamal A., Bray F., Center MM. et al:** Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61:69-90.

**Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D.:** Globalcancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61(2):69–90.

**Jiang Y.H., Cheng B., Ge M.H., Zhang G.:** The prognostic significance of p53 and Ki-67 expression in myoepithelial carcinoma. Head Neck Oncol. 2012; 4:9.

**Jonas S., Al-Abadi H., Benckert C., Thelen A. Hippler-Benscheid M., Saribeyoglu K., Radtke B., Praschke J., Neuhaus P.:** Prognostic significance of DNA-Index in liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. Ann Surg. 2009; 250 (6):1008-1013.

**Jonas S., Bechstein W.O., Steinmüller T., Herrmann M., Radke C., Berg T. et al.:** Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. Hepatology. 2001; 33:1080-1086.

**Jonas S., Steinmüller T., Settmacher U., Langrehr J., Müller A., Neuhaus P.:** Liver transplantation for recurrent hepatocellular carcinoma in Europe. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2001; 8:422-426.

**Kann T.:** Hintergrundinformationen zu den Präperationsabenden der MGW im März 2013.

**Kindermann D., Hilgers C.H.:** Glare-correction in DNA image cytometry. Anal. Cell. Pathol. 1994; 6:165-180.

**King L.Y.:** Diabetes mellitus is associated with an increased risk of HCC in a large prospective cohort with long term follow-up. Hepatology 2014; 60 (4Suppl.1):281A.

**Kinoshita A., Onoda H., Fushiya N., Koike K., Nishino H., Tajiri H.:** Staging systems for hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives. World J Hepatol. 2015; 7(3):406-424.

**Kiyosawa K., Umemura T., Ichijo T. et al:** Hepatocellular carcinoma: recent trends in Japan. Gastroenterology. 2004; 127(5 Suppl 1): S17-S26.

**Kondo K., Chijiiwa K., Makino I., Kai M., Maehara N., Ohuchida J., Naganuma S.:** Risk factors for early death after liver resection on patients with solitary hepatocellular carcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2005; 12:399-404.

**Lang H., Broelsch C.E.:** Leberresektion und Lebertransplantation als Therapie primärer Lebertumoren. Onkologe. 2000; 4:311-317.

**Lang H., Nagel E.:** Leberchirurgie, Pichlmayrs chirurgische Therapie. Springer, Berlin, 2005; 335-368.

**Lang H., Sotiropoulos G.C., Dömland M., Frühauf N.R., Paul A., Hüsing J., Malagó M., Broelsch C.E.:** Liver resection for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver without underlying viral hepatitis. Br J Surg. 2005; 92:198–202.

**Le Page C., Huntsman D.G., Provencher D.M., Mes-Masson A.M.:** Predictive and prognostic protein biomarkers in epithelial ovarian cancer: Recommendation for future studies. Cancers (Basel). 2010; 2(2):913-954.

**Liang T.J., Heller T**.: Pathogenesis of hepatitis-C-associated hepatocellulare carcinoma. Gastroenterology. 2004; 127(5 Suppl 1):S62-S71.

**Llovet J.M., Brú C., Bruix J.**: Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classifikation. Semin Liver Dis. 1999; 19(3):329-338.

**Llovet J.M., Bruix J., Fuster J. et al:** Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power. Hepatology. 1998; 27(6):1572-1577.

**Llovet J.M., Bruix J.:** Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. J Hepatol. 2008; 48(1):20-37.

**Llovet J.M., Fuster J., Bruix J.:** Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. Hepatology. 1999; 30(6):1434-1440.

**Loeb L.A., James E.A., Waltersdorph A.M., Klebanoff S.J.:** Mutagenesis by the autooxidation of iron with isolated DNY. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85:3918-3922.

**Malinchoc M. Kamath P.S., Gordon F.D., Peine C.J., Rank J., ter Borg P.C.:** A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic protosytemic shunts. Hepatology. 2000; 31(4):864-871.

**Mann C.D., Neal C.P., Garcea G., Manson M.M., Dennison A.R., Berry D.P.:** Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: A systematic review. Eur J Cancer. 2007; 43(6):979-992.

**Manns M.P.:** Liver cirrhosis, transplantation and organ shortage. Dtsch Arztebl Int. 2013; 110(6): 83–4.

**Marrero J.A., Fontana R.J., Barrat A. et al.:** Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an american cohort. Hepatology. 2005; 41: 707-716.

**Mazzaferro V., Chun Y.S., Poon R.T.P., Schwartz M.E., Yao F.Y., Marsh J.W., Bhoori S., Lee S-G.:** Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. Ann Surg Oncol. 2008; 15(4):1001–1007.

**Mazzaferro V., Regalia E., Doci R., Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F. et al.:** Liver tansplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. N Engl J Med. 1996; 334(11):693-699.

**Mazzaferro V., Regalis E., Doci R. et al:** Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a restrospective, exploratory analysis. Lancet Oncol. 2009; 10:35-45.

**Minagawa M., Makuuchi M., Takayama T., Kokudo N.:** Selection criteria for repeat hepatectomy in patients with recurrent hepatocellular carcinoma. Ann Surg. 2003; 238: 703-710.

**Morgan T.R., Pase C.S., Jamal M.M:** Alcohol and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2004; 127:87-96.

**Motherby H., Marcy T., Hecker M., Ross B., Nadjari B., Auer H., Müller K.M., Häussinger D., Strauer B.E., Böcking A.:** Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: I. DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes. Anal Quant Cytol Histol. 1998; 20:153-161.

**Müller S., Seitz H.K.:** Alkohol und Lebererkrankungen. Med Welt. 2008; 59:210-216.

**Naka T., Toyota N., Kaneko T., Kaibara N.:** Protein expression of p53, p21WAF1, and Rb as prognostic indicators in patients with surgically treated hepatocellular carcinoma. Anticancer Res. 1998; 18:555-564.

**Neuschwander-Tetri B.A., Caldwell S.H.:** Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of the AASLD Single topic conference. Hepatology. 2003; 37(5): 1202-1219.

**Ng I.O.L., Lai E.C.S., Fan S.T. et al.:** Prognostic significance of proliferatin cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. Cancer. 1994; 73:2268-2274.

**Niu Z.-S., Niu X.-J., Wang M.:** Management of hepatocellular carcinoma: Predictive value of immunhistochemical markers for postoperative survival. World J Hepatol. 2015; 7(1):7-27.

**Nzeako U.C.:** Etiologic factors and clinical presentation of hepatocellular carcinoma: differences between cirrhotic and non-cirrhotic italian patients. Cancer. 1995; 76:915.

**Okuda K., Ohtsuki T., Obata H., Tomimatsu M., Okazaki N., Hasegawa H., Nakajima Y., Ohnishi K.:** Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment study of 850 patients. Cancer. 1985; 56(4):918-928.

**Ozturk M.:** Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. Semin Liver Dis. 1999; 19:235-242.

**Ozturk M.:** p53 Mutation in hepatozellular carcinoma after aflatoxin exposure. Lancet. 1991; 338(8779): 1356-1359.

**Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.:** Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer. 2001; 94:153-156.

**Pascher A., Nebrig M., Neuhaus P.:** Irreversible liver failure: treatment by transplantation. Part 3 of a series on liver chirrhosis. Dtsch Arztebl Int. 2013; 110(10): 167-173.

**Pawlik T.M., Delman K.A., Vauthey J.-N., Nagorney D.M., Ng I.O.-L., Ikai I., Yamaoka Y., Belghiti J., Lauwers G.Y., Poon R.T., Abdalla E.K.:** Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. Liver Transpl. 2005; 11:1086-1092.

**Poon R.T.:** Significance of resection margin in hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a critical reappraisal. Ann Surg. 2000; 231:544-551.

**Pugh R.N.H., Murray-Lyon I.M., Dawson J.L. et al.:** Transection of the oesophagus for bleeding of oesophageal varices. Br J Surg. 1973; 60:646-649.

**Qin H.X., Nan K.J., Yang G., Jing Z., Ruan Z.P., Li C.L., Xu R., Guo H., Sui C.G., Wei Y.C.:** Expression and clinical significance of TAp73alpha, p53, PCNA and apoptosis in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2005; 11(18):2709-2713.

**Qin L.F., Ng I.O.:** Expression of p27 (KIP1) and p21 (WAF1/CIP1) in primary hepatocellular carcinoma: clinicopathologic correlation and survival analysis. Hum Pathol. 2001; 32;778-784.

**R Core Team:** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2012; Vienna, Austria.

**Rahmel A., Osterlee A.:** Eurotransplant International Foundation – Annual Report 2007.

**Reig M, Darnell A, Forner A, Rimola J, Ayuso C, Bruix J.:** Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: the issue of treatment stage migration and registration of progression using the BCLC-refined RECIST. Semin Liver Dis. 2014; 34:444–455.

**Riemann J.F., Fischbach W., Galle P.R., Mössner J. et al.:** Gastroenterologie, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2008; 21:1552.

**Ross J.S.:** DNA-Ploidy and cell cycle Analysis in Pathologie. Igaku-Shoin New York, Tokyo, 1996; 1.3: 4-23.

**Rugge M.; Sonego F., Sessa F., Leandro G., Capella C., Sperti C., Pasquali C., Di Mario F., Pedrazzoli S., Ninfo V.:** Nuclear DNA content and pathology in radically treated pancreatic carcinoma: The prognostic significance of DNA ploidy, histology and nuclear grade. Cancer. 1996; 77:459-466.

**Salizzoni M., Romagnoli R., Lupo F., David E., Mirabella S., Cerutti E., Ottobrelli A.:** Microscopic vascular invasion detected by anti-CD34 immunohistochemestry as a predictor of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. Transplantation. 2003; 76:844-848.

**Sandritter W.:** On the metabolism of nuclei acids in tumors ( aquanatitative investigation). Habilitationsschrift, University Frankfurt/Main, 1952.

**Sato Y., van Gulik T.M., Bosma A., Lygidakis N.J., Koyama K., van der Heyde M.N.:** Prognostic significance of tumor DNA content in carcinoma of the hepatic duct confluence. Surgery. 1994; 115(4):488-494.

**Schmilovitz-Weiss H., Tobar A., Halpern M., Levy I., Shabtai E., Ben-Ari Z.:** Tissue expression of squamous cellular carcinoma antigen and Ki67 in hepatocellular carcinoma-correlation with prognosis: A historical prospective study. Diagn Pathol. 2011; 6:121.

**Scholzen T., Gerdes J.:** The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown; J Cell Physiol. 2000; 182:311-322.

**Schöniger-Hekele M., Hänel S., Wrba F., Müller C.:** Hepatocellular carcinoma--survival and clinical characteristics in relation to various histologic molecular markers in western patients. Liver Int. 2005; 25:62-69.

**Schwarting R.:** Little missed markers and Ki-67. Lab Invest. 1993; 68:597-599.

**Schwartz M., Roayaie S., Konstadoulakis M.:** Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. Nat Clin Pract Oncol. 2007; 4:424-432.

**Sears R., Duckworth C.W., Decaestecker C., Bourgeois N., Ledent T., Deviere J., Salmon I., Kiss R., Yeaton P.:** Image cytometry as a discriminatory tool for cytologic specimens obtained by endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Cancer Cytopathol. 1998; 84:119-124.

**Seitz H.K., Stickel F.:** Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. Biol Chem. 2006; 387:349-360.

**Sherman M.:** Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology, Risk Factors, and Screening. Semin Liver Dis. 2005; 25(2):143-154.

**Shetty K., Timmins K., Brensinger C., Furth E.E., Rattan S., Sun W., et al.:** Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. Liver Transpl. 2004; 10:911-918.

**Sheu J.C.:** Molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 1997; 12(9-10):S309-313.

**Shi M., Guo R-P., Lin X-J., Zhang Y-Q. et al:** Partial hepatectomy with wide versus narrow resection margin for solitary hepatocellular carcinoma. Ann Surg. 2007; 245:36-43.

**Soussi T.:** P53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. Cancer Res. 2000; 60(7):1777-1788.

**Soussi, T.:** The p53 pathway and human cancer. Br J Surg. 2005; 92 (11): 1331-1332.

**Spangenberg H.C., Thimme R., Blum H.E.:** Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2009; 6(7):423-432.

**Spangenberg H.C., Thimme R., Weizsäcker F.v., Blum H.E.:** Hepatozelluläres Karzinom. Internist. 2004; 45 : 777-785.

**Stettmacher U., Schlag P.M.:** Primary malignant tumors of the liver. Onkologe. 2012; 18:570-572.

**Stickel F., Hellerbrand C.:** Non-alcoholic fatty leaver disease as a risk factor for hepatocellular carcinoma: mechanisms and implications. Gut. 2010; 59(10):1303-1307.

**Sung C.O., Yoo B.C., Koh K.C., Cho J.W., Park C.K.:** Prognostic significance of p53 overexpression after hepatic resection of hepatocellular carcinoma. Korean J Gastroenterol. 2005; 45:425-430.

**Tannapfel A., Busse C., Weinans L. et al:** INKa-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinogenesis. Oncogene. 2001; 20:7104-7109.

**Tateishi R., Yoshida H., Shiina S., Imamura H., Hasegawa K., Teratani T., Obi S., Sato S., Koike Y., Fujishima T., Makuuchi M., Omata M.:** Proposal of a new prognostic model for hepatocellular carcinoma: an analysis of 403 patients. Gut. 2005; 54:419-425.

**Teramoto T., Satonaka K., Kitazawa S., Fujimori T., Hayashi K., Maeda S.:** P53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infection and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. Cancer res. 1994; 54:231-235.

**Thelen A., Benckert C., Tautenhahn H.-M., Hau H.-M., Bartels M., Linnemann J., Bertolini J., Moche M., Wittekind C., Jonas S.:** Liver resection for hepatocellular carcinoma in patients without cirrhosis. Br J Surg. 2013; 100:130-137.

**Thelen A., Jonas S., Benckert C., Weichert W., Schott E., Bötcher C. et al.:** Tumor-associated lymphangiogenesis correlates with prognosis after resection of human hepatocellular carcinoma. Ann Surg. 2009; 16:1222-1230.

**Thelen A., Scholz A., Benckert C., von Marschall Z., Schröder M., Wiedenmann B. et al.:** VEGF-D promotes tumor growth and lymphatic spread in a mouse model of hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 2008; 122:2471-2481.

**Tischoff I., Tannapfel A.:** Hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma-different prognosis, pathogenesis and therapy. Zentralbl Chir. 2007; 132:300-305.

**Tseng P.L., Tai M.H., Huang C.C., Wang C.C., Lin J.W., Hung C.H., Chen C.H., Wang J.H., Lu S.N., Lee C.M., Changchien C.S., Hu T.H.:** Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC-patients. J Surg Oncol. 2008; 98(5):349-357.

**Tu K., Zheng X., Zan X., Han S., Yao Y., Lui Q.:** Evaluation of Fbxw7 expression and its correlation with the expression of c-Myc, cyclin E and p53 in human hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 2012; 42(9):904-910.

**Umemura A., Itoh Y., Itoh K., Yamaguchi K., Nakajima T., Higashitsuji H., Onoue H., Fukumoto M., Okanoue T., Fujita J.:** Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2008; 47:493-502.

**van Bömmel F., Berg T.:** Langzeittherapie der HBV-Infektion mit oralen Polymeraseinhibitoren. Gastroenterologe. 2015: 10:268-283.

**Vauthey J.-N., Lauwers G.Y., Esnaola N.F., Do K.A., Belghiti J., Mirza N.Q. et al.:** Simplified staging for hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol. 2002; 20:1527-1536.

**Vautier G., Bomford A.B., Partmann B.C., Metivier E., Williams R., Ryder S.D.:** P 53 mutations in British patients with hepatocellular carcinoma: Clustering in genetic hemochromatosis. Gastroenterology. 1999; 117:154-160.

**Vogel A., Manns M.P.:** Epidemiologie und molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms. Gastroentrologie. 2012; 7:382-389.

**Wang Z., Jiang Y., Guan D., Li J., Yin H., Pan Y., Xie D., Chen Y.:** Critical roles of p53 in epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. PLoS One. 2013; 8(9):e72846.

**Wittekind C.H., Meyer H.-J.:** TNM-Klassifikation maligner Tumore. 7. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2010.

**Zhan P., Ji Y.N., Yu L.K.:** The p53 mutation is associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary Surg Nutr. 2012; 2(5):260-265.

**Ziegler A., Lange S., Bender R**.: Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier-Methode. Dtsch Med Wochenschr. 2007; 132:e36-e38.

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verteilung der Risikofaktoren nach geographischen Regionen (nach EASL-EORTC Clinical Practice Guidlines 2012) (Vogel 2012) ..... 4
Tabelle 2: Child-Pugh-Klassifikation ..... 5
Tabelle 3: Edmondson-Steiner-Grading ..... 12
Tabelle 4: WHO-Grading ..... 12
Tabelle 5: Japanisches Grading ..... 12
Tabelle 6: WHO-Stadieneinteilung ..... 14
Tabelle 7: Okuda Score ..... 15
Tabelle 8: CLIP Score ..... 16
Tabelle 9: Tokyo-Score ..... 16
Tabelle 10: BCLC Score ..... 17
Tabelle 11: Hämatoxylin-Eosin-Färbung ..... 28
Tabelle 12: Färbung nach Feulgen ..... 30
Tabelle 13: Histogrammauswertung ..... 36
Tabelle 14: Immunhistochemische Färbung mit den Antikörpern DO-7, MIB-1 ..... 38
Tabelle 15: Auswertung der Färbung mutp53 ..... 38
Tabelle 16: Auswertung der Färbung Ki-67 ..... 38
Tabelle 17: Überlebenszeiten der Patienten ..... 42
Tabelle 18: Überlebenszeiten der Patienten mit DNA-Index ≤1,78 und >1,78 ..... 55
Tabelle 19: Korrelation DI, N0,N1+N2 ..... 56
Tabelle 20: Korrelation DI, R0,R1+R2 ..... 57
Tabelle 21: Korrelation DI, V0, V1+V2 ..... 58
Tabelle 22: Korrelation DI, p53 ..... 59
Tabelle 23: Korrelation DI, Ki-67 ..... 60
Tabelle 24: Korrelation DI, Ploidiestatus ..... 61
Tabelle 25: multivariate Analyse: DI, V, Ki-67 ..... 62

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite HCC-Inzidenz im Jahr 2008 (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f2/Hepatozellul%C3%A4res_Karzinom.svg) ... 3
Abbildung 2: Behandlungsalgorithmus (Barcelona Liver Cancer Conference) ... 18
Abbildung 3: Zellzyklus ... 24
Abbildung 4: Scrapezytologie (bereitgestellt von Al-Abadi) ... 28
Abbildung 5: HE-gefärbtes HCC ... 29
Abbildung 6: Feulgenfärbung eines histologischen Präparates eines HCC ... 31
Abbildung 7: Messmonitor ... 33
Abbildung 8: DNA-Messung ... 33
Abbildung 9: DNA-Histogramm ... 36
Abbildung 10: Do-7 angefärbtes mutp53 in HCC-Zellen ... 39
Abbildung 11: MIB-1 angefärbtes Ki-67 in HCC-Zellen ... 39
Abbildung 12: Geschlechterverteilung ... 41
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve, kumuliertes Überleben aller Patienten ... 42
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve Frauen/Männer ... 43
Abbildung 15: Verteilung des Tumorstadiums ... 44
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve pT-Stadium ... 44
Abbildung 17: Verteilung des Lymphknotenstadiums ... 45
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve Lymphknotenstadium ... 45
Abbildung 19: Verteilung des Gradingstadiums ... 46
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve Gradingstadium ... 47
Abbildung 21: Verteilung des Resektionsstatus ... 48
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve Resektionsrandstatus ... 48
Abbildung 23: Verteilung des Grades der Gefäßinvasion ... 49
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve Gefäßinvasion ... 49
Abbildung 25: Verteilung des mutp53 ... 50
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve mutp53 ... 50
Abbildung 27: Verteilung Ki-67 ... 51
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve Ki-67 ... 51
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve Ploidiestatus ... 52
Abbildung 30: ROC DNA-Index ... 53

Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve DNA-Index ..... 54
Abbildung 32: Boxplot DNA-Index, pT1, pT2, pT3 ..... 55
Abbildung 33: Boxplot DNA-Index, pN0, pN1+2 ..... 56
Abbildung 34: Boxplot DNA-Index, pR0, pR1+2 ..... 57
Abbildung 35: Boxplot DNA-Index, pV0, pV1+2 ..... 58
Abbildung 36: Boxplot DNA-Index, p53 ..... 59
Abbildung 37: Boxplot DNA-Index, Ki67 ..... 60
Abbildung 38: Boxplot DNA-Index, aneuploid, diploid, tetraploid ..... 61

**Abkürzungsverzeichnis**

| | |
|---|---|
| 4HNE | Hydroxynonenal |
| Abb | Abbildung |
| ADH | Alkoholdehydrogenase |
| AFP | Alpha-Feto-Protein |
| ALDH2 | Aldehydoxogenase 2 |
| BCLC | Barcelona Clinic Liver Cancer Group |
| BMI | Body Mass Index |
| bzw. | Beziehungsweise |
| c | DNA-Gehalt |
| CC | Cholangiozelluläres Karzinom |
| CLIP | Cancer of Liver Italian Progam |
| cm | Zentimenter |
| CT | Computertomographie |
| D h | Das heißt |
| DDLT | Deceased donor liver transplantation |
| DI | DNA-Index |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| EASL | European Association for the Study of the Liver |
| ECOG | Eastern Cooperative Oncology Group |
| EE | Exceeding Events |
| EORTC | European Organization for Research and Treatment of Cancer |
| ESACP | European Society for Analytical Cellular Pathology |
| G | Histopathologisches Grading / Edmondson-Steiner-Grad |
| Ggf. | Gegebenenfalls |
| HB | Hepatitis B |
| HBcAG | Hepatitis B core-Antigen |
| HBeAG | Hepatitis B e-Antigen |
| HBsAG | Hepatitis B surface-Antigen |
| HBV | Hepatitis B Virus |
| HCC | Hepatozelluäres Karzinom |
| HCl | Chlorwasserstoff |
| HCV | Hepatitis C Virus |

| | |
|---|---|
| HE | Hämatoxylin Eosin |
| HERs | Hydroxyethyl-Radikale |
| HIV | Humane Immundefizienz-Virus |
| HPV | Humane Papillomviren |
| IARC | International Agency for Research of Cancer |
| IGRT | Image-guided Radiotherapy |
| IHC | Immunhistochemie |
| IOD | Integrierte optische Dichte |
| JIS | Japan Integrated Staging |
| JÜR | Jahres-Überlebens-Rate |
| LDLT | Living donor liver transplantation |
| LTX | Lebertransplantation |
| M | Metastasierung |
| MDA | Malondialdehyd |
| MELD | Model of End Stage Liver Disease |
| Min. | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mol/l | Molarität / Stoffmengenkonzentration pro Liter |
| mutp53 | Mutiertes p53 |
| n | Chromosomenzahl |
| NAFLD | Nonalcoholic Fatty Liver Disease / Hepatosteatosis |
| NASH | Nonalcoholic Steato Hepatitis / Steatohepatitis |
| OTL | Orthotopic transplantation of the liver |
| PBC | Primär biliäre Zirrhose |
| pN | Pathologisches Lymphknotenstadium |
| PS | Preformance Status |
| pT | Pathologisches Tumorstadium |
| pV | Gefäßinvasion |
| R | Resektionsrand |
| RECIST | Response Evaluation Criteria In Solid Tumors |
| RFA | Radiofrequenzablation |
| RNA | Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid) |
| ROC | Receiver-Operating-Curve |
| SBRT | Stereotacitc Body Radiation Therapy |
| SE | Standard Exception |

| | |
|---|---|
| SIRT | Selektive interne Radiotherapie |
| sog. | Sogenannte/s/r |
| TAA | Tumorassoziierte Antigene |
| TACE | Transarterielle Chemoembolisation |
| TARE | Transarterielle Radioembolisation |
| TBST | Tris-Buffered Saline and Tween 20 |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TKI | Tyrosinkinaseinhibitor |
| TNF | Tumor necrosis factors |
| TNM | Tumor Nodes Metastasen |
| TX | Transplantation |
| u.a. | Unter anderem |
| UICC | Union internationale contre le cancer |
| V | Gefäßinvasion |
| WHO | World Health Organization |
| z.B. | Zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

**Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Iphigenie Süßdorf-Suchan, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Diagnostische und prognostische Bedeutung des DNA - Index in Korrelation zur immunhistochemischen Untersuchung von P53 und Ki-67 bei Patienten mit Leberzellkarzinom nach Resektion selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.
Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Danksagung

Für die Übernahme und Betreuung der Dissertation danke ich meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sascha Chopra.

Für die Bereitstellung des Themas und die Beratung bei der Durchführung der Studie sowie die unermüdliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen möchte ich mich bei meinem Mentor Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hussain Al-Abadi sehr bedanken.

Für die Einführung und Unterstützung in der Laborarbeit und Hilfe bei der Verwaltung der Patientendaten bedanke ich mich bei Frau Angelika Dürr. Ebenso danke ich Frau Theresia Töpel für die geduldige Hilfe bei der Vervollständigung des letzten Follow-up.

Herrn Hippler-Benscheidt danke ich für die statistische Auswertung und die konstruktive Diskussion.

Meinen Töchtern Alina und Ophelia Suchan möchte ich für ihre selbstlose Hilfe bei der Erstellung von Tabellen und Grafiken und dem schnellen Lektorat danken.

Meinem lieben Ehemann Thomas Suchan danke ich sehr für seine endlose Geduld, die Hilfe in der Selbststrukturierung und die Entlastung im Alltagsgeschehen.