

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln  
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

# **Morphologische und immunhistochemische Charakterisierung schlecht differenzierter primärer Leberkarzinome**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Denise Karahan  
aus Wien, Österreich

promoviert am 30. Juni 2026



Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Professorin Dr. med. U. Drebber

2. Gutachter: Professor Dr. med. Nierhoff

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Frau Prof. Dr. med. Uta Drebber ; Mina Komuta, M.D., Ph.D. ; Kiwako Sekine.

Weitere Personen waren an der geistigen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die für diese Arbeit benötigten Patient:innendaten aus den Befunden *des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln* wurden von mir, mit Unterstützung von Frau Prof. Dr. med. Uta Drebber, persönlich zusammengetragen.

Die für diese Arbeit benötigten Patient:innendaten *der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Tumor- und Transplantationschirurgie der Uniklinik Köln* wurden von mir freundlicherweise von Frau Dr. med. Denise Buchner zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit angegebenen immunhistochemischen Färbungen wurden freundlicher von den medizinisch-technischen Mitarbeiter:innen *des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln durchgeführt*.

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Auswertung und Interpretation der immunhistochemischen Untersuchungen sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Prof. Dr. med. Uta Drebber, Mina Komuta, M.D., Ph.D. und Kiwako Sekine von mir selbst ausgeführt und dokumentiert worden.

Die Fotografien der Präparate wurden mittels *Whole Slide Imaging* Verfahren unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Yuri Tolkach von mir selbst durchgeführt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden statistischen Auswertungen sind von mir mit Unterstützung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Margarete Odenthal durchgeführt worden.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 17.01.2026



## Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Dissertation im *Institut für Pathologie* der *Universität zu Köln* erstellen zu dürfen, möchte ich dem Direktor des Institutes, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Reinhard Büttner, danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Uta Drebber für die Überlassung des Themas, die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei Planung und Durchführung dieser Arbeit und ihre herausragend-motivierende Betreuung!

Weiterhin danke ich den medizinisch-technischen Assistent:innen des *Instituts für Pathologie* der *Universität zu Köln* und Frau Prof. Dr. rer. nat. Margarete Odenthal, welche mich durch ihre geduldige Unterstützung im Rahmen dieses Projekts begleitet haben.

Zum Schluss gilt mein Dank meinen Eltern – Barbara und Oktay Karahan –, Großeltern – Christine und Walter Novak –, sowie meinen großartigen Freund:innen, welche mich liebevoll im Laufe meiner bisherigen akademischen Laufbahn motiviert und unterstützt haben.

*Für Mama, Papa, Oma und Opa*

-

*In tiefster Liebe und Dankbarkeit.*

# **Inhaltsverzeichnis**

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>                                               | <b>10</b> |
| <b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>                                                  | <b>12</b> |
| <b>2. EINLEITUNG</b>                                                       | <b>13</b> |
| 2.1. Einführung in die primären Leberkarzinome                             | 13        |
| 2.2. Hepatozelluläres Karzinom                                             | 14        |
| 2.2.1. Ätiologie und Pathogenese                                           | 14        |
| 2.2.2. Klinische Präsentation und Diagnostik                               | 15        |
| 2.2.3. Histopathologie                                                     | 16        |
| 2.2.4. Grading                                                             | 16        |
| 2.2.5. Das Zytokeratin 19-positive HCC                                     | 17        |
| 2.3. Intrahepatisches Cholangiokarzinom                                    | 18        |
| 2.3.1. Ätiologie und Pathogenese                                           | 18        |
| 2.3.2. Klinische Präsentation und Diagnostik                               | 18        |
| 2.3.3. Histopathologie und Lokalisation                                    | 19        |
| 2.4. Kombiniertes Hepato-Cholangiokarzinom                                 | 20        |
| 2.4.1. Ätiologie und Pathogenese                                           | 21        |
| 2.4.2. Histopathologie                                                     | 21        |
| 2.4.3. Diagnostik                                                          | 21        |
| 2.4.4. Intermediäres Zellkarzinom                                          | 22        |
| 2.5. Prognose                                                              | 22        |
| 2.6. Klinisch therapeutische Konsequenz                                    | 22        |
| 2.7. Fragestellungen und Ziel der Arbeit                                   | 23        |
| <b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>                                            | <b>25</b> |
| 3.1. Zusammenstellung des Patient:innenkollektivs                          | 25        |
| 3.2. Datenerhebung                                                         | 25        |
| 3.3. Verarbeitung der verwendeten Proben                                   | 25        |
| 3.4. Mikroskopische Analyse und Selektion eines geeigneten Blockpräparates | 26        |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.5. Immunhistochemie</b>                                                      | <b>26</b> |
| 3.5.1. Auflistung und Beschreibung der verwendeten Primärantikörper               | 26        |
| 3.5.1.1. HepPar1                                                                  | 27        |
| 3.5.1.2. Arginase1                                                                | 27        |
| 3.5.1.3. $\alpha$ -Fetoprotein (AFP)                                              | 28        |
| 3.5.1.4. CD10                                                                     | 28        |
| 3.5.1.5. ABCB11                                                                   | 29        |
| 3.5.1.6. CK7 und CK9                                                              | 29        |
| 3.5.1.7. EMA                                                                      | 29        |
| 3.5.1.8. LFABP                                                                    | 30        |
| 3.5.1.9. TROP2                                                                    | 30        |
| 3.5.2. Allgemeines Prinzip der Färbung                                            | 31        |
| 3.5.3. Färbeprotokoll                                                             | 31        |
| 3.5.3.1. Vorpräparation des Gewebes                                               | 31        |
| 3.5.3.2. Teilschritte des Färbeprozesses                                          | 32        |
| <b>3.6. Lichtmikroskopische, semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie</b> | <b>33</b> |
| <b>3.7. Statistische Auswertung und Analyse der Ergebnisse</b>                    | <b>34</b> |
| <b>3.8. Digitalisierung</b>                                                       | <b>35</b> |
| <b>3.9. Ethik</b>                                                                 | <b>35</b> |
| <b>4. ERGEBNISSE</b>                                                              | <b>36</b> |
| 4.1. Beschreibung des Gesamtkollektivs                                            | 36        |
| 4.1.1. Patient:innencharakteristika                                               | 36        |
| 4.1.2. Analyse des Hintergrundlebergewebes auf Grunderkrankungen                  | 36        |
| 4.1.3. Beschreibung der Morphologie des Leberhintergrundgewebes                   | 37        |
| 4.1.4. Mikroskopische Analyse der peritumoralen Fibrose/Kapsel                    | 38        |
| 4.2. Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse                                  | 38        |
| 4.2.1. Immunhistochemische Analyse hepatozellulärer Marker:                       | 38        |
| Gegenüberstellung von Positivität und Negativität                                 | 38        |
| 4.2.1.1. HepPar1, Arginase1 und deren Kombination                                 | 39        |
| 4.2.1.2. CD10, ABCB11 und deren Kombination                                       | 41        |
| 4.2.1.3. AFP                                                                      | 43        |
| 4.2.1.4. LFABP                                                                    | 44        |
| 4.2.2. Immunhistochemische Analyse cholangiozellulärer Marker:                    |           |
| Gegenüberstellung von Positivität und Negativität                                 | 44        |
| 4.2.2.1. CK19, CK7 und deren Kombination                                          | 45        |
| 4.2.2.2. EMA                                                                      | 47        |

|           |                                                                                                                                      |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.2.3.  | Alcian PAS                                                                                                                           | 48        |
| 4.2.2.4.  | TROP2                                                                                                                                | 49        |
| 4.2.3.    | Vergleichende Übersicht der bislang präsentierten immunhistochemischen Markerprofile                                                 | 50        |
| 4.2.4.    | Erwartete Immunoreaktivität gegensätzlicher Marker-Kombinationen: Gegenüberstellung von Positivität und Negativität                  | 51        |
| 4.2.4.1.  | Tumorentität HCC                                                                                                                     | 52        |
| 4.2.4.2.  | Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA                                                                                                   | 53        |
| 4.2.4.3.  | Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA                                                                                                   | 54        |
| 4.2.5.    | Immunhistochemische Konditionen                                                                                                      | 55        |
| 4.2.6.    | Gegenüberstellung von fokalem und diffusem Färbeverhalten der stärksten hepato- und cholangiozellulären Marker                       | 57        |
| 4.2.6.1.  | Tumorentität HCC                                                                                                                     | 58        |
| 4.2.6.2.  | Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA                                                                                                   | 59        |
| 4.2.6.3.  | Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA                                                                                                   | 61        |
| 4.2.7.    | Immunhistochemische Resultate des cHCC-CCAs                                                                                          | 62        |
| 4.2.8.    | Bilderkatalog                                                                                                                        | 64        |
| <b>5.</b> | <b>DISKUSSION</b>                                                                                                                    | <b>69</b> |
| 5.1.      | Interpretation der Ergebnisse für das Hepatozelluläre Karzinom                                                                       | 69        |
| 5.1.1.    | Interpretation der Ergebnisse zu HepPar1 und Arginase1                                                                               | 69        |
| 5.1.2.    | Interpretation der Ergebnisse zur Marker-Kombination HepPar1 und CK19                                                                | 70        |
| 5.1.3.    | Interpretation der Ergebnisse zu EMA                                                                                                 | 71        |
| 5.1.4.    | Interpretation der Ergebnisse zu LFABP                                                                                               | 72        |
| 5.2.      | Interpretation der Ergebnisse für das intrahepatische „small-duct“ Typ Cholangiokarzinom                                             | 72        |
| 5.2.1.    | Interpretation der Ergebnisse zu HepPar1 und Arginase1                                                                               | 72        |
| 5.2.2.    | Interpretation der Ergebnisse zu Kondition 3: „≥ 1 klassischer iCCA Marker ist positiv und alle klassischen HCC-Marker sind negativ“ | 73        |
| 5.2.3.    | Interpretation der Ergebnisse zu ABCB11                                                                                              | 74        |
| 5.2.4.    | Interpretation der Ergebnisse zu EMA „für SDT typisches Färbemuster“                                                                 | 75        |
| 5.3.      | Interpretation der Ergebnisse für das intrahepatische „large-duct“ Typ Cholangiokarzinom                                             | 75        |
| 5.3.1.    | Interpretation der Ergebnisse zu EMA „für LDT typisches Färbemuster“                                                                 | 76        |
| 5.3.2.    | Interpretation der Ergebnisse zum Farbstoffprotokoll Alcian PAS                                                                      | 77        |

|        |                                                                     |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3.3. | Interpretation der Ergebnisse zur Marker-Kombination LFABP und CK19 | 77 |
| 5.4.   | Ausblick                                                            | 78 |
| 6.     | LITERATURVERZEICHNIS                                                | 80 |
| 7.     | ANHANG                                                              | 86 |
| 7.1.   | Abbildungsverzeichnis                                               | 86 |
| 7.2.   | Tabellenverzeichnis                                                 | 86 |

## Abkürzungsverzeichnis

|          |                                                         |
|----------|---------------------------------------------------------|
| AFP      | $\alpha$ -Fetoprotein                                   |
| BSEP     | Gallensalz-Exportpumpe (engl. „bile salt export pump“)  |
| CC       | Kontingenzkoeffizient                                   |
| CCC/CCA  | Cholangiozelluläres Karzinom                            |
| cHCC-CCA | Kombiniertes HCC-CCA                                    |
| CK       | Zytokeratin                                             |
| CT       | Computertomografie                                      |
| CTLA-4   | Engl. “cytotoxic T-lymphocyte-associated” Protein 4     |
| ECOG     | Eastern Cooperative Oncology Group                      |
| EMA      | Epitheliales Membranantigen                             |
| HCC      | Hepatozelluläres Karzinom                               |
| HepPar1  | Hepatozytenparaffin 1                                   |
| HPC      | Hepatische Progenitorzelle                              |
| HRP      | Meerrettichperoxidase (engl. “horse radish peroxidase”) |
| iCCA     | Intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom           |
| KM       | Kontrastmittel                                          |
| LDT      | „Large-duct“ Typ iCCA                                   |
| LFABP    | Engl. „liver fatty acid-binding protein“                |
| MF       | Knotenbildend (engl. „mass-forming“)                    |
| MRT      | Magnetresonanztomografie                                |
| PI       | Periductal infiltrativ                                  |
| PLC      | Primäre Leberkarzinome (engl. „primary liver cancers“ ) |
| PD-L1    | Engl. „Programmed cell death ligand-1“                  |
| SDT      | „Small-duct“ Typ iCCA                                   |

|       |                                                                 |
|-------|-----------------------------------------------------------------|
| SIRT  | Selektive interne Radiotherapie                                 |
| TACE  | Transarterielle Chemoembolisation                               |
| TARE  | Transarterielle Radioembolisation                               |
| TROP2 | Engl. „trophoblast cell-surface antigen 2 „                     |
| WHO   | Weltgesundheitsorganisation (engl. “World Health Organization“) |



## 1. Zusammenfassung

Primäre Leberkarzinome stellen eine hoch-relevante Tumorgruppe mit erheblichen Herausforderungen für das weltweite Gesundheitssystem dar.<sup>1</sup> Die Tumorentitäten HCC, „small-duct“ Typ iCCA, „large-duct“ Typ iCCA und cHCC-CCA wurden bis vor kurzem als unabhängige und strikt voneinander abzugrenzende Tumorentitäten betrachtet. Diese strenge Einteilung wird jedoch zunehmend verlassen: Die PLCs werden nun als Teil eines *Spektrums* mit fließenden Übergängen von hepatozellulärer zu cholangiozellulärer Differenzierung betrachtet.<sup>2</sup> Da sich ihre Therapien voneinander unterscheiden<sup>3</sup>, ist die korrekte histopathologische Einordnung eines Präparates unabdingbar. Aufgrund des Spektrums können PLCs eine gewisse Homogenität bzw. Kontinuität in vielen Aspekten aufweisen. Histomorphologisch gilt dies insbesondere für schlecht differenzierte Tumore, welche sich als erschwert diagnostizierbar erweisen und in der Findung eines angemessenen Therapieprozederes zu Schwierigkeiten führen können.<sup>2</sup> Um eine möglichst hohe diagnostische Treffsicherheit zu bieten, ist eine umfassende histopathologische Analyse in Kombination mit Immunhistochemie entscheidend.

Im Rahmen dieses Projekts wurde das Ansprechen auf und die Färbemuster von verschiedenen Markern bei den unterschiedlichen Tumorentitäten analysiert, mit dem Ziel, ein immunhistochemisches Panel zu erstellen, welches diagnostische Lücken in den angewandten Diagnosealgorithmen verschmälert und somit die insgesamt diagnostische Treffsicherheit von PLCs in der Situation einer geringgradigen histopathologischen Differenzierung optimiert. Es wurde ein Kollektiv aus 40 gering differenzierten PLCs, welches die 4 o.g. Entitäten umfasst, auf unterschiedliche Antikörper und Farbstoffe analysiert (HepPar1, Arginase1, AFP, CD10, ABCB11, CK7, CK19, EMA, TROP2, LFABP und schließlich Alcian PAS), wobei die Marker einzeln, sowie in unterschiedlichsten Kombinationen zueinander statistisch ausgewertet wurden. Anhand der Berechnung ihrer jeweiligen Kontingenzkoeffizienten wurden anschließend ihre Zusammenhänge zu den jeweiligen Tumorentitäten bestimmt und untereinander verglichen.

Unsere Analyse zeigt, dass unterschiedliche Antikörper(-Kombinationen) sich eher zur Zuordnung eines Präparates zu seiner Entität eignen als andere; es bedarf daher definitiv eines aus mehreren Antikörpern bestehenden Panels. In diesem Projekt haben sich insbesondere HepPar1, Arginase1, EMA, LFABP, ABCB11, Alcian PAS und CK19 als effektiv bewährt. Ein aus diesen Antikörpern bestehendes Panel könnte somit eine wertvolle Ergänzung in der Routinediagnostik der PLCs darstellen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Einführung in die primären Leberkarzinome

Primäre Leberkarzinome (engl. „primary liver cancers“, PLCs) sind Karzinome, die aus den unterschiedlichen Epithelien der Leber hervorgehen. Zusammen repräsentieren sie die sechsthäufigste Tumorart und sind als die vierthäufigste Ursache tumor-assoziiierter Todesursachen zu verzeichnen. Allein für das Jahr 2018 wurden 841.000 Erstdiagnosen und 781.000 PLC-assoziierte Tumorfälle weltweit registriert.<sup>1</sup> Damit stellen PLCs eine hochrelevante Tumorgruppe mit erheblichen Herausforderungen für das Gesundheitssystem weltweit dar.

PLCs umfassen hepatozelluläre Karzinome (HCC), intrahepatische Cholangiokarzinome (iCCA), kombinierte HCC-CCA (cHCC-CCA), sowie seltene andere Tumore wie das intermediate cell carcinoma, das fibrolamelläre Karzinom und das (pädiatrische) Hepatoblastom. In dieser Gruppe machen die HCCs mit 75-85% den größten Anteil der Tumoren aus<sup>1</sup>, gefolgt von den iCCAs.<sup>4</sup>

Traditionell werden HCCs und iCCAs als unabhängige Tumorentitäten betrachtet, welche aus unterschiedlichen Ursprungszellpopulationen hervorgehen und sich hinsichtlich der Risikofaktoren und Morphologie, sowie der Klinik und Prognose unterscheiden. Mit der Definition und Aufnahme der Subtypisierung der iCCAs in einen „large-duct“ Typ (LDT) und einen „small-duct“ Typ (SDT) in die noch aktuelle Version der WHO Klassifikation<sup>5</sup> wird diese Sichtweise verschoben: Das iCCA vom „small-duct“ Typ stellt seither eine distinkte Tumorentität mit ähnlichen Risikofaktoren wie das HCC und einer unterschiedlichen Morphologie zum iCCA des „large-duct“ Typs dar, welche sich auch immunhistochemisch und molekularpathologisch belegen lässt.<sup>5</sup> Auch das Vorkommen des seltenen intermediate cell carcinoma und des cHCC-CCA - mit einem Zusammentreffen hepatozellulärer und cholangiozellulärer Differenzierungsmerkmale<sup>6</sup> - wirft die Frage nach der Ursprungszellpopulation des Tumors auf. Während für das reine HCC der Hepatozyt und für das iCCA der Cholangiozyt als Ursprungszelle angesehen werden, besagt die Stammzelltheorie einen möglichen Ursprung aus einer gemeinsamen Stamm- bzw. Progenitorzelle.<sup>7</sup> Diese Theorie könnte auch die biphenotypische Differenzierung des intermediate cell carcinoma und des cHCC-CCAs erklären, wobei in einer Subgruppe zuletzt genannter Tumorentität Stammzellen histomorphologisch und immunhistochemisch nachgewiesen werden können. Auch das Cytokeratin 19-positive HCC (CK19+ HCC), welches den cholangiozytären Differenzierungsmarker CK19 exprimiert und klinisch eine schlechte Prognose aufweist<sup>8</sup>, legt nahe, dass möglicherweise keine klare Trennung zwischen einer rein hepatozellulären und cholangiozellulären Differenzierung existiert, sondern fließende

Übergänge, die möglicherweise auch im Rahmen einer Transdifferenzierung entstehen könnten.<sup>9</sup>

Während die seltenen Subtypen des PLC-Spektrums, u.a. aufgrund der kleinen Fallzahlen, bis dato im klinischen Alltag, im Rahmen der pathologischen Routinediagnostik und in den gängigen bildgebenden Verfahren noch wenig Beachtung finden, erscheint eine genaue histomorphologische Analyse dieser Tumoren, auch in Hinblick auf eine mögliche zielgerichtete Therapie, unerlässlich zu sein. Somit ist Ziel dieser Arbeit, ein Kollektiv gering differenzierter PLCs histomorphologisch und immunhistochemisch zu untersuchen und anschließend, anhand einer vergleichenden Analyse der Tumorsubtypen, ein geeignetes immunhistochemisches Markerpanel zu etablieren. Dieses Panel soll Eingang in die histopathologische Routinediagnostik finden.

## **2.2. Hepatozelluläres Karzinom**

Das HCC stellt mit 75-85% der PLCs den häufigsten aller malignen Lebertumoren dar.<sup>1</sup> Im Gegensatz zum iCCA, welches sich je nach Subtyp entweder proximal am Hilus oder in der Leberperipherie befindet, kann das HCC an jeglicher Lokalisation des Leberparenchyms auftreten.<sup>5</sup> Nach der noch aktuellen WHO Klassifikation können insgesamt acht verschiedene Subtypen unterschieden werden, welche sich in Häufigkeit, Prognose, Histo- und Molekularpathologie voneinander abgrenzen.

### **2.2.1. Ätiologie und Pathogenese**

In 70-90% der Fälle entsteht das HCC auf dem Boden einer chronischen Lebererkrankung und Leberzirrhose.<sup>10</sup> Zu den Risikofaktoren dieser Präkanzerose, und dementsprechend des HCCs, zählen die chronische Hepatitis B<sup>11</sup> und C<sup>12</sup>, die alkoholische Steatohepatitis und „metabolic dysfunction-associated steatohepatitis“<sup>13</sup>, Speichererkrankungen, wie die genetische Hämochromatose oder exogene Faktoren, wie eine Exposition gegenüber Aflatoxin B1.<sup>14</sup> Diese Ursachen erklären, weshalb das nicht-tumoröse Leberparenchym in 80% der Fälle fibrotische oder sogar zirrhotische Veränderungen aufweist.<sup>5</sup> Sie bilden eine Basis für prä-maligne Läsionen, sog. dysplastische Foci, welche sich über gut differenzierte „small/early“ HCCs weiter zu schlecht differenzierten HCCs mit anfangs intrahepatischen und schlussendlich extrahepatischen Metastasen entwickeln.<sup>5</sup> Parallel wird diese stufenweise Entwicklung durch eine Anhäufung an molekularen Alterationen begleitet; ihre Natur korreliert mit der zugrunde liegenden Ursache für die chronische Lebererkrankung bzw. zirrhotischen Veränderungen.<sup>15</sup>

In seltenen Fällen liegt ein maligne entartetes hepatozelluläres Adenom dem HCC zugrunde.<sup>16</sup> Zuletzt kann das HCC auch in einer gesunden Leber entstehen.<sup>17</sup>

### 2.2.2. Klinische Präsentation und Diagnostik

Klinisch zeigen Patient:innen Symptome, welche durch das HCC selbst oder die ihm zugrunde liegende Grunderkrankung verursachten wurden. Darunter fallen Gewichtsverlust, Oberbauchschmerzen im rechten oberen Quadranten, Hepato- und Splenomegalie, Aszites und Ikterus. Im Falle von durch das HCC selbst verursachten Symptomen kann ein bereits fortgeschrittenes Tumorstadium mit schlechter Prognose angenommen werden.<sup>5</sup>

Die Diagnostik, sowie das Staging des HCCs, erfolgt in erster Linie mittels Bildgebung. Zu dieser zählen hauptsächlich kontrastmittelverstärkte Verfahren wie die kontrastmittelverstärkte Sonografie, Computertomografie (CT) und Magnetresonanztomografie (MRT). In letzteren Untersuchungen zeigt das HCC eine charakteristische Kontrastmittel (KM) -Dynamik, welche durch eine arterielle Hypervaskularisation und ein Auswaschen in der portalvenösen und venösen Phase gekennzeichnet ist.<sup>18</sup> Das Vorhandensein dieser typischen KM-Dynamik bei einem unklaren Leberrundherd mit einem Durchmesser >1cm und kurativer Therapieindikation reicht bereits aus, um die Diagnose eines HCCs zu stellen und die Therapie einzuleiten.<sup>3</sup> Bei uncharakteristischer KM-Dynamik in der MRT wird bei kurativer Behandlungsindikation eine zweite Bildgebung (CT bzw. CEUS) veranlasst. Zeigt diese nun ein charakteristisches KM-Verhalten, kann erneut die Diagnose eines HCCs gestellt werden. In beiden Fällen werden keine weiteren diagnostischen Verfahren wie Histologie oder Immunhistochemie benötigt, um die kurative Therapie einzuleiten.<sup>3</sup>

Im Falle eines charakteristischen KM-Verhaltens in palliativer Behandlungssituation, eines atypischen KM-Verhaltens in zwei aufeinanderfolgenden Bildgebungen oder eines atypischen KM-Verhaltens in palliativer Behandlungssituation wird den behandelnden Ärzt:innen in der aktuellen S3-Leitlinie zur *Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome*<sup>3</sup> eine Biopsie zur Sicherung der Diagnose nahe gelegt. Die Gewinnung dieser wird mittels 16-18 Gauge Biopsienadel empfohlen, da somit, im Gegensatz zur Feinnadelaspiration, genug Gewebe für die Feststellung des Gewebekontextes (in welchem der Tumor wächst) und ggf. zusätzliche immunhistochemische und molekularpathologische Untersuchungen zur Verfügung steht. Die weit verbreitete Annahme, dass eine Biopsieentnahme zu schweren Komplikationen wie schlecht therapierbaren Stichkanalmetastasen oder schweren Blutung führe, wurde bereits in mehreren Studien widerlegt: Die Komplikationsrate einer HCC-Biopsie ist dementsprechend klein. Rockey et al.<sup>19</sup> beschreiben in ihrem Positionspapier exemplarisch in nur 3-4% der Fälle geringe und somit nicht behandlungsbedürftigen Blutungen, lediglich bei 0,5% der Patient:innen kam es zu transfusionsbedürftigen Blutungen. In Bezug auf Stichkanalmetastasen haben Silva et al.<sup>20</sup> in ihrer Metaanalyse gezeigt, dass diese ebenfalls selten sind (Vorkommen in 2,7% der Fälle), spät auftreten und gut therapierbar sind. Nach Müllhaupt et al.<sup>21</sup> und Fuks et al.<sup>22</sup> haben sie

außerdem weder einen negativen Einfluss auf den Erfolg der therapeutischen Maßnahmen, noch auf das Überleben der Patient:innen. Dementsprechend sollte die histologische und immunhistochemische Untersuchung bei der Abklärung von unklaren Lebertumoren, im Gegensatz zum Status quo, unumgebar sein.

Da die Klassifikation maligner Lebertumore auf histologischen Kriterien beruht, stellt die erst durch eine Biopsie ermöglichte histopathologische Untersuchung die Basis der HCC-Diagnose und ihrer Differentialdiagnosen dar.<sup>3</sup> Die Unterscheidung des HCCs von seinen malignen Differentialdiagnosen ist bezüglich der Auswahl der einzuleitenden Therapie relevant. Liefert auch die konventionelle Histologie keine Klarheit über die Natur der Tumorentität, empfehlen die Leitlinien die Einleitung von immunhistologischen und molekularpathologischen Untersuchungen zur Sicherung der Diagnose.<sup>3</sup>

### **2.2.3. Histopathologie**

Das HCC ist ein Tumor, der morphologisch und immunhistochemisch eine hepatozelluläre Differenzierung (v.a. Galleproduktion, gut definiertes, kräftig gefärbtes Zytoplasma, rundliche Kerne mit prominenten Nucleoli, trabekuläres Wachstum)<sup>5</sup> aufweist. Er ist durch einen Verlust an normaler Leberarchitektur charakterisiert, wie der Läppchenarchitektur inkl. ihrer Periportalfelder oder dem retikulären Fasernetz. Dieser Verlust wird von einer starken Vaskularisation durch Arteriolen und Kapillaren in Parenchym und Sinusoiden begleitet. Zelluläre Atypie-Kriterien können in schwachem bis starkem Ausmaß vorliegen.<sup>5</sup>

Des Weiteren können vier verschiedene Wachstumsmuster des HCCs voneinander unterschieden werden<sup>23</sup>: das trabekuläre, makrotrabekuläre (im Falle von Trabekeln mit einer Breite von >10 Zellen), solide (Syn.: kompakte) und schließlich pseudoglanduläre (Syn.: pseudoazinäre) Muster. In ungefähr 50% der Fälle treten mehrere Wachstumsmuster simultan innerhalb eines HCCs auf, wobei meistens das trabekuläre Muster in Kombination mit ein bis zwei weiteren vorliegt. Eine Korrelation zwischen Subtyp und Wachstumsmuster ist bis dato nicht bekannt<sup>5</sup>, ganz im Gegensatz zur Prognose: Solide-wachsende HCCs sind mit einer besseren Prognose als makrotrabekuläre und pseudoglanduläre HCCs assoziiert.<sup>24</sup>

### **2.2.4. Grading**

Momentan sind international mehrere Gradingssysteme im Umlauf. Insb. die vierstufigen Systeme nach Edmondson und Steiner<sup>25</sup> und das AFIP-Grading<sup>23</sup> werden besonders eingesetzt, wobei aktuellere Vorschläge ein dreistufiges Grading bevorzugen.<sup>26</sup> Als Zusammenfassung und zur Vereinheitlichung der multiplen Gradingssysteme schlägt die WHO ein dreistufiges System vor, dessen Anwendung auch in der aktuellen S3-Leitlinie zur *Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome*<sup>3</sup> empfohlen wird.

Histologisch kann das HCC nach dem Grading-System der WHO als gut, moderat oder schlecht differenziert charakterisiert werden. Hierfür wird die Morphologie der Tumorzellen mit dem nicht-tumorösen Leberparenchym verglichen.<sup>5</sup> Je schlechter die Differenzierung, umso schwerer fällt der Rückschluss auf das Ursprungsgewebe des Tumors. Im Falle des HCCs bedeutet dies, dass der Tumor immer mehr an hepatozellulären Differenzierungsmerkmalen verliert. HCCs können innerhalb eines Tumors mehrere Differenzierungsgrade gleichzeitig vorweisen, wobei der niedrigste Grad die Prognose bestimmt.<sup>27</sup>

Das Grading des HCCs steht in direkter Relation zur Überlebensrate und krankheitsfreien Überlebensrate von Patient:innen nach Resektion mit kurativer Therapieindikation, einerseits in zirrhotischer<sup>28</sup> und nicht-zirrhotischer Leber<sup>29</sup>, andererseits nach Lebertransplantation.<sup>30</sup>

### **2.2.5. Das Zytokeratin 19-positive HCC**

Zytokeratine (CKs) repräsentieren einen wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts von Epithelzellen, zu denen u.a. Hepatozyten und Cholangiozyten gehören. Je nach Organzugehörigkeit und Differenzierung exprimieren Epithelien charakteristische CK-Kombinationen<sup>31</sup>, durch welche sie diesen Organen zugeordnet werden können. In gesundem Gewebe exprimieren Hepatozyten CK8 und CK18, Cholangiozyten sowie hepatische Progenitorzellen (engl. „hepatic progenitor cells“, HPCs) CK7 und CK19.<sup>32,33</sup> Maligne entartete Epithelzellen behalten z.T. ihre CK-Expressionsmuster bei.<sup>31</sup>

Bei diesem Subtyp des HCCs exprimieren per definitionem  $\geq 5\%$  der Tumorzellen immunhistochemisch CK19.<sup>34</sup> Dies wirft Fragen über die Histogenese von HCCs auf, da bei alleiniger Entwicklung von HCCs aus Hepatozyten nicht mit einer Expression von CK19 zu rechnen wäre. Folglich kann eine von u.a. hepatischen Progenitorzellen ausgehende Entstehung dieser Tumorentität angenommen werden.<sup>35,36</sup> Die Stimulation und Aktivierung von HPCs im Rahmen von akuten und chronischen Lebererkrankungen, wie beispielsweise der (chronischen) viralen Hepatitis oder (M)ASH, macht diese zu potenziellen Targets einer malignen Entartung<sup>37-39</sup>; diese Erkenntnis untermauert die Genesishypothese. Auch die Präsenz von HPCs in „small cell“ dysplastischen Foci, der frühesten Vorläuferläsion des HCCs, erhärtet diese Hypothese.<sup>34</sup> Libbrecht et al.<sup>40</sup> beschreiben in ihrer Arbeit das Vorkommen von HPCs in 55% der „small cell“ dysplastischen Foci.

Die Differenzierung zwischen HCC und CK19+ HCC hat eine große klinische Relevanz, da Zweiteres einen wesentlich aggressiveren Tumor mit schlechterer Prognose und früherer Rezidivrate als das HCC darstellt.<sup>8</sup> Trotz CK19 Expression weisen die Tumorzellen keine cholangiozelluläre Differenzierung auf und bilden keine glandulären Strukturen aus; morphologisch ist das CK19+ HCC dem HCC ident. Auch das Färbemuster für CK19

unterscheidet sich vom klassischen iCCA. Dementsprechend sind bei der Identifikation dieses HCC-Subtyps in erster Linie die Morphologie und Immunhistochemie zu berücksichtigen.<sup>41</sup>

### **2.3. Intrahepatisches Cholangiokarzinom**

Je nach Lokalisation werden biliäre Karzinome in Gallenblasenkarzinome oder Cholangiokarzinome unterteilt. Cholangiokarzinome können weiter in intrahepatische (iCCA) und extrahepatische Cholangiokarzinome (eCCA) unterschieden werden. Da ausschließlich die iCCAs zu den PLCs gezählt werden, wird diese Arbeit nur noch auf diese eingehen.

Per definitionem liegt das iCCA proximal des Ductus hepaticus dexter bzw. sinister. Es repräsentiert nach dem HCC den zweithäufigsten primären malignen Lebertumor und umfasst ca. 10-15% aller PLCs.<sup>4</sup> Das iCCA wird erst seit Kurzem als Tumorart verstanden, welche zwei sich stark unterscheidende Entitäten bzw. Subtypen, den „large-duct“ und „small-duct“ Typ, umfasst: Sie unterscheiden sich in Ätiologie, Wachstumsmuster, klinischen Charakteristika und molekularem Mutationstyp.<sup>5</sup>

#### **2.3.1. Ätiologie und Pathogenese**

Das Risikofaktor-Profil der beiden Subtypen unterscheidet sich voneinander: „Small-duct“ Typ iCCAs haben die gleichen Risikofaktoren wie das HCC (wie beispielsweise die chronische Virushepatitis, die alkoholische Steatohepatitis und „metabolic dysfunction-associated steatohepatitis“, oder auch die Leberzirrhose als präkanzerotische Läsion), während „large-duct“ Typ iCCAs ihre Risikofaktoren eher mit eCCAs teilen. Zu diesen zählen chronische Cholangitiden, wie die primäre sklerosierende Cholangitis, aber auch Leberegel und Hepatholithiden.<sup>5</sup>

Zusätzlich sind beim „large-duct“ Typ iCCA einige prä maligne Vorläuferläsionen bekannt, wie die biliäre intraepitheliale Neoplasie oder intraductale papilläre Neoplasie.<sup>5,42</sup> Liao et al.<sup>43</sup> beschreiben diese bei 45% der „large-duct“ Typ iCCAs. Dahingegen sind beim „small-duct“ Typ iCCA keine Vorläuferläsionen beschrieben.<sup>41</sup> Als mögliche Ätiologie wird hier die Transdifferenzierung aus HPCs und reifen Hepatozyten diskutiert.<sup>44</sup> Trotz dieser Erkenntnisse bleibt die genaue Ursache vieler iCCAs jedoch unbekannt.

#### **2.3.2. Klinische Präsentation und Diagnostik**

Die Symptome des iCCAs sind unspezifisch und umfassen allgemeines Unwohlsein, Gewichtsverlust und Bauchschmerzen. Im Falle einer Verlegung der großen Gallengänge durch den „large-duct“ Typ, welcher periductal infiltrativ wächst, kann auch eine Cholestase bis Cholangitis auftreten. Das „small-duct“ Typ iCCA fällt dahingegen meist erst im späteren Verlauf, ergo bei Größenzunahme, klinisch auf.<sup>5</sup>

Bei V.a. auf ein biliäres Karzinom, beispielsweise aufgrund erhöhter Leberwerte, wird die Sonografie zur initialen Einschätzung benutzt. In Endemiegebieten Südasiens ist sie sogar die Methode der Wahl zum jährlichen Screening auf biliäre Karzinome.<sup>45</sup> Im weiteren Verlauf kommen zur Diagnostik und zum initialen Staging bei kurativer Behandlungsindikation eine mehrphasische hepatische MRT, sowie eine kontrastverstärkte CT des Thorax und Abdomens hinzu.<sup>3</sup> CT-morphologisch präsentieren sich iCCAs typischerweise als hypodense Leber Raumforderungen mit unregelmäßigen Rändern in der Nativphase und anschließend progressivem Enhancement von der arteriellen zur venösen Phase.<sup>46</sup> Dieser Effekt kann durch eine Fibrose-bedingte, intravenöse KM-Retention erklärt werden.<sup>3</sup> Im Gegensatz dazu ist das HCC, wie bereits erläutert, durch eine arterielle Hypervaskularisation und ein Auswaschen in der portalvenösen und venösen Phase gekennzeichnet. Die kontrastmittelverstärkte CT kann dementsprechend bei der Unterscheidung zwischen HCC und iCCA behilflich sein. An dieser Stelle sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass die bildgebenden Merkmale des iCCAs nur suggestiv und nicht beweisend für seine Diagnose sind. Eine Biopsie ist daher unumgebar. Das Beispiel besonders kleiner iCCAs, welche bildmorphologisch eine arterielle Hypervaskularisation aufweisen und somit ein HCC imitieren können, untermauert diese Aussage.<sup>47</sup> Außerdem ist insbesondere bei kleinen Raumforderungen und/oder zirrhotischem Hintergrundgewebe die Aussagekraft der bildgebenden Verfahren eingeschränkt<sup>48,49</sup>; die radiologischen Kriterien sind hier nicht sensitiv genug, um die Diagnose eines iCCAs präzise zu stellen. Sie können beispielsweise nicht sicher zwischen dem sklerosierenden Subtyp des HCCs, einem iCCA und einer Metastase eines Adenokarzinoms unterscheiden.<sup>50</sup>

Aufgrund des Mangels beweisender, positiver bildgebender diagnostischer Kriterien ist die histologische Untersuchung und Sicherung der iCCAs grundsätzlich obligat.<sup>3</sup>

### **2.3.3. Histopathologie und Lokalisation**

Histopathologisch betrachtet sind iCCAs beinahe ausschließlich Adenokarzinome.<sup>5</sup> Sie gehen u.a. aus maligne entarteten Cholangiozyten hervor, welche die Epithelschicht der Gallengänge bilden. Das Gallengangssystem der Leber ist baumartig aufgebaut und verzweigt sich mit sich immer weiter verzweigenden Verästelungen in Richtung Leberperipherie.<sup>41</sup> Je nach Lokalisation der Cholangiozyten unterscheiden sich diese in ihrem Phänotyp (u.a. bzgl. Größe und Charakteristika): Die Cholangiozyten der großen, hilusnahen Gallengänge weisen einen zylindrischen, Muzin-produzierenden Phänotyp auf und sind zytoplasmatisch stark positiv in der EMA-Färbung. Dahingegen ist das Epithel der kleinen, peripher gelegenen Gallengänge kuboidal, Muzin-negativ und nur apikal positiv in der EMA-Färbung.<sup>51</sup> Aus diesen unterschiedlichen Arten von Cholangiozyten gehen die 2 Subtypen des iCCAs hervor: „Large-duct“ Typ iCCAs gehen aus Zellen der großen intrahepatischen Gallengänge in Hilusnähe



hervor und erinnern histomorphologisch an ein eCCA.<sup>5</sup> „Small-duct“ Typ iCCAs kommen dahingegen eher in der Leberperipherie vor, da sie aus den Zellen der kleinen, peripher gelegenen Gallengänge hervorgehen. Sie sind aufgrund ihrer histologischen Aspekte teilweise nur schwer vom HCC zu unterscheiden.

Dabei behalten die iCCAs die Charakteristika der Cholangiozyten, aus welchen sie hervorgehen, z.T. bei: Beispielsweise produzieren, in Analogie zu den Cholangiozyten der großen Gallengänge, die Tumorzellen des „large-duct“ Typ iCCAs Mucin und sind zytoplasmatisch stark positiv in der EMA-Färbung; die Zellen des „small-duct“ Typs sind währenddessen Mucin-negativ und nur apikal positiv für EMA.<sup>41</sup>

iCCAs präsentieren meist ein ductales oder tubuläres Wachstumsmuster mit unterschiedlich großen Lumina, können aber auch ein strangförmiges Wachstumsmuster mit schlitzförmigem Lumen aufweisen. Beide Wachstumsmuster gehen mit einer variablen, jedoch häufig stark ausgeprägten Stromafibrose einher.<sup>52</sup> Jedoch zeigen beide Entitäten auch bezüglich ihres Wachstumsmusters Unterschiede auf: Der „large-duct“ Typ breitet sich entlang der großen Portalfelder aus, weist ein hauptsächlich periductales infiltratives (PI) Wachstumsmuster auf und ist mit einer perineuralen und/oder lymphatischen Infiltration assoziiert. Der „small-duct“ Typ wächst dahingegen peripher und primär knotenbildend (engl. „mass-forming pattern“, MF)<sup>5</sup> und zeigt im Vergleich selten perineurale und lymphatische Infiltrationen.<sup>41</sup> Dies ist die wichtigste Unterscheidungskomponente der beiden Subtypen, da „small-duct“ Typ iCCAs ausschließlich im MF-Muster wachsen<sup>41</sup>: Besonders bei schlecht differenzierten iCCAs, die sich aufgrund der Zellmorphologie und -architektur kaum unterscheiden lassen, können diese unterschiedlichen Wachstumsmuster dementsprechend bei der Differenzierung helfen.

Eine weitere Möglichkeit, die beiden Subtypen voneinander abzugrenzen, bietet der oben bereits angesprochene Nachweis von Mucin. Seine Sekretion ist häufig bei „large-duct“ Typ iCCAs nachzuweisen, während sie bei „small-duct“ iCCAs meistens fehlt.<sup>5</sup> Seine Präsenz bietet somit, u.a. unter Hinzuziehung von speziellen histologischen Färbemethoden wie Alcian PAS, welche die Auswertung erleichtern, ein gutes Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Subtypen.

## **2.4. Kombiniertes Hepato-Cholangiokarzinom**

Ein gewisser Prozentsatz der PLCs weist morphologische und zytologische Aspekte auf, die Eigenschaften des HCCs und auch des iCCAs aufweisen. Diese PLCs werden als biphenotypisches PLC, gemischtes oder kombiniertes HCC-CCA (cHCC-CCA) bezeichnet. Sie stellen mit 2-5% aller PLCs eine seltene Tumorentität dar und werden in der WHO Klassifikation als Subtyp des iCCAs aufgeführt.<sup>53</sup>

### **2.4.1. Ätiologie und Pathogenese**

Die alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz, Klinik und Ätiologie (wie beispielsweise das Vorliegen einer Leberzirrhose oder -erkrankung) des cHCC-CCAs ähneln denen des HCCs und iCCAs.<sup>53</sup>

Seine genaue Pathogenese steht noch unter Debatte: Es wurde ein vermehrtes Aufkommen von cHCC-CCAs nach TACE von HCCs observiert, was die Hypothese der Plastizität und Transdifferenzierung von HCC zu iCCA aufwirft.<sup>9</sup> Als weitere Entstehungshypothese wird das Hervorgehen des iCCAs aus hepatischen Progenitor- bzw. Stammzellen diskutiert.<sup>7</sup>

### **2.4.2. Histopathologie**

Histologisch wird das cHCC-CCA durch die Koexistenz von hepatisch und cholangiozellulär differenzierten Tumorzellen innerhalb desselben Tumors definiert.<sup>6</sup> Die beiden Komponenten wachsen entweder nebeneinander oder sind ineinander „verstrickt“, wobei der Übergang scharf oder unscharf sein kann.<sup>53,54</sup> Kollisionen von HCCs und iCCAs müssen hiervon abgegrenzt werden.<sup>5</sup>

Die beiden Komponenten besitzen die Wachstumsmuster des HCCs und iCCAs.<sup>41</sup> Jedoch können sie nur in 18% der Fälle eindeutig mittels HE-Färbung erkannt werden<sup>55</sup>, was die Heterogenität dieser Tumorentität unterstreicht: Sie kann verschiedene glanduläre Strukturen, ductale Konfigurationen und sogar Anteile mit solidem Wachstumsmuster enthalten.<sup>6</sup>

### **2.4.3. Diagnostik**

Die Diagnose eines cHCC-CCAs ist unabhängig vom Anteil der jeweiligen Komponenten und verlangt kein Mindestmaß an diesen<sup>5</sup>, weswegen sie mittels Pathologie und Bildgebung oft nicht eindeutig zu stellen ist: Dominiert z.B. die HCC-Komponente, so ähnelt die Bildung des cHCC-CCAs der eines HCCs.<sup>56</sup> Eine koreanische Studie aus dem Jahre 2021 hat gezeigt, dass ein großer Prozentsatz der cHCC-CCAs mittels Bildgebung fälschlicherweise als hochwahrscheinliches HCC (LR-4, 11,9% der Fälle) oder definitives HCC (LR-5, 35,5% d.F) diagnostiziert wurden.<sup>57</sup> Diese Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Diagnose durch Bildgebung in vielen Fällen falsch und daher nicht zu empfehlen ist. Wie oben bereits erwähnt, ist aufgrund der Tumorheterogenität auch die Diagnose anhand alleiniger Histopathologie oft nicht eindeutig. Eine französische Forschungsgruppe hat gezeigt, dass die Kombination aus bildgebenden und histopathologischen Verfahren eine höhere diagnostische Sensitivität aufweist, als eines der Verfahren alleine.<sup>58</sup> Daher ist zur Diagnose des cHCC-CCA der simultane Einsatz beider Verfahren stark zu empfehlen.

Bei immer noch uneindeutiger Diagnose kann zusätzlich eine immunhistochemische Färbung mittels hepatozellulären und cholangiozellulären Markern erfolgen. Die Immunhistochemie allein reicht nicht als diagnostisches Kriterium für das cHCC-CCA.

#### **2.4.4. Intermediäres Zellkarzinom**

PLCs mit monotoner Morphologie und Zellen, deren Aspekte zwischen den hepatozellulären und cholangiozellulären liegen, werden als intermediäre Zellkarzinome der Leber zusammengefasst.<sup>53,59</sup> Ihre Zellen exprimieren immunhistochemische Marker von Leber und Gallengängen. Die Diagnose eines intermediären (hepatobiliären) Zellkarzinoms kann nur gestellt werden, wenn sich der intermediäre Aspekt der Zellen durch den ganzen Tumor zieht<sup>60</sup>; die Tumorzellen coexprimieren per definitionem hepatozelluläre und biliäre Differenzierungsmarker. Diese seltene Tumorentität findet Eingang in die Subtypen der PLCs.

#### **2.5. Prognose**

Im Vergleich zum HCC sind iCCAs wesentlich aggressivere Tumore und gehen mit einer schlechteren Prognose einher. Dies wird durch eine hohe Mortalitätsrate und niedrige Überlebensrate gekennzeichnet<sup>61</sup>, hauptsächlich bedingt durch spät gestellte Diagnosen aufgrund eines mangelnden Screening-Systems, sowie einer höheren Rezidivrate (auch nach kurativ-angesetzten Operationen).<sup>62,63</sup> Auch bezüglich der Transplantationsmöglichkeiten und Wirksamkeit von lokal ablativen Behandlungen unterscheiden sich die zwei Tumorentitäten voneinander.<sup>53</sup>

Auch hier sollte wieder zwischen beiden Subtypen des iCCAs distinguished werden: Der „small-duct“ Typ (MF Wachstumsmuster) besitzt eine höhere postoperative 5-Jahresüberlebensrate als der „large-duct“ Typ (PI oder PI + MF Wachstumsmuster) und eine allgemein bessere Prognose.<sup>42,43,64</sup>

Weitere, voneinander unabhängige prognostische Faktoren sind das TNM-Stadium, die Tumorgroße, das Grading und das Vorhandensein von intrahepatischer Lithiasis.<sup>43</sup> Im Falle einer bereits makroskopisch sichtbaren Angioinvasion, einem noch Tumorzellen enthaltenden Resektionsrand und einem fortgeschrittenen TNM-Stadium ist von einer schlechten Prognose mit hoher Rezidivrate zu rechnen.<sup>65</sup>

#### **2.6. Klinisch therapeutische Konsequenz**

Die Therapiemöglichkeiten der verschiedenen PLCs hängen von zahlreichen Faktoren ab. Hierzu zählen beispielsweise das Tumorausbreitungsstadium, die Resektabilität, die Transplantierbarkeit, die Zugänglichkeit für interventionelle Verfahren (wie TACE, TARE, SIRT), die Leberfunktion (Child-Pugh-Stadium) oder der Allgemeinzustand des Patienten

(ECOG-Status).<sup>3</sup> Im fortgeschrittenen Tumorstadium stehen unterschiedliche Systemtherapien zur Verfügung, wie beispielsweise Tyrosinkinaseinhibitoren oder die kürzlich zugelassenen Therapien mittels Immuncheckpointinhibitoren (wie anti-PD-L1-, anti-CTLA-4-Antikörper) im Falle des HCCs.<sup>3</sup> Für das CCC gibt es neoadjuvante chemotherapeutische Therapiekonzepte, sowie auch moderne Ansätze einer gezielten molekularen Therapie. Diese spielt insbesondere beim „small duct“ Typ iCCA eine wichtige Rolle. Wichtige molekulare Zielstrukturen sind hierbei z.B. die IDH1/2 Mutation, die FGFR2-Translokation und die RAS-Mutation.<sup>42,66</sup> In seltenen Fällen findet sich auch eine Mikrosatelliteninstabilität und NTRK1-3 Mutationen.<sup>3</sup> Die exakte histomorphologische Differenzierung der PLCs hat somit auch bei gering differenziertem Tumoren eine hohe klinische Relevanz.

## 2.7. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Das Spektrum der primären Leberkarzinome umfasst HCC, „small-duct“ Typ iCCA, „large-duct“ Typ iCCA, cHCC-CCA und intermediate cell carcinoma. Da Prognose und Therapie der verschiedenen PLCs sich jedoch stark voneinander unterscheiden, ist die Etablierung eines Prozederes zur sichereren Differenzierung der vier o.g. Arten entscheidend.<sup>2</sup>

Aufgrund der Kontinuität und der überlappenden Aspekte der verschiedenen Tumorentitäten ist eine Kombination aus multiplen diagnostischen Tools wie Klinik, Bildgebung, Histologie und insbesondere Immunhistochemie wichtig, um eine hohe diagnostische Genauigkeit zu bieten. Trotz dieser Erkenntnis beschreiben die Diagnosealgorithmen der aktuellen S3-Leitlinie zur *Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome*<sup>3</sup> insbesondere für das HCC eine Tumorbioptie als nicht obligat für die Diagnosestellung; sie kann durch rein bildgebende Verfahren erfolgen. Problematisch erscheinen kleine Tumore, welche (noch) keine suffizienten Neovaskularisationen haben und daher hypovaskularisiert<sup>67</sup> sind, große, weit fortgeschrittene HCCs, welche ebenso ein atypisches KM-Verhalten aufweisen können, schlecht differenzierte HCCs und besondere histologische Subtypen des HCCs.<sup>50</sup> Letztere sind insbesondere aufgrund der uneindeutigen Bildgebung vom solide wachsenden iCCA nur mittels zusätzlicher immunhistologischer Verfahren zu unterscheiden.<sup>3</sup> In diesen Fällen reichen bildgebende Verfahren nicht aus, um eine sichere Diagnose zu stellen; eine Biopsie ist notwendig.

Andererseits können gewisse PLCs fälschlicherweise als HCC befundet werden: Kleine iCCAs können beispielsweise eine arterielle Hypervaskularisation aufweisen und somit ein HCC imitieren.<sup>47</sup> Eine zusätzliche histologische Untersuchung wäre dementsprechend zur korrekten Diagnosestellung notwendig. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund, dass iCCAs auch bei den typischen prädisponierenden Lebererkrankungen des HCCs, wie auch der Leberzirrhose, gehäuft auftreten können, relevant. Somit sollten iCCAs bei bildgebendem Verdacht eines HCCs als Differentialdiagnose berücksichtigt werden.<sup>3</sup>

Fragestellung dieser Arbeit ist die Analyse und Umgehung der diagnostischen Hürden, welche durch o.g. Heterogenität der PLCs entstehen, insbesondere im Falle einer geringgradigen histopathologischen Differenzierung. In dieser Situation ist eine genaue histomorphologische Analyse entschieden, welche immunhistochemisch erweitert wird. Konkret soll im Rahmen dieser Dissertationsschrift analysiert werden, welche immunhistochemischen Differenzierungsmarker die Diskriminierung der unterschiedlichen Entitäten zuverlässig ermöglicht. Hierbei wird insbesondere darauf geachtet, ob beziehungsweise welche Zellstrukturen (Zytoplasma, Zellmembran, Vakuolen, etc.) der vier verschiedenen Entitäten sich mittels eines bestimmten Antikörpers anfärben lassen und in welcher Ausprägung. Anhand dieser erhobenen Daten wird anschließend versucht, Trends in den Färbemustern zu finden. Ziel ist die Erstellung eines immunhistochemischen Panels, welches bei insbesondere schlecht differenzierten PLCs ihre Entität enthüllen soll. Darüber hinaus soll dieses Projekt allgemein neue immunhistochemische Erkenntnisse zu den einzelnen Entitäten liefern, in der Absicht, diagnostische Lücken in den angewandten Diagnosealgorithmen zu verschmälern und somit die insgesamt diagnostische Treffsicherheit von PLCs zu optimieren.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Zusammenstellung des Patient:innenkollektivs**

Das im Rahmen dieses Projekts verwendete Kollektiv beinhaltet 37 Patient:innen mit gering differenzierten hepatozellulären Karzinomen, cholangiozellulären Karzinomen und kombinierten Hepato-Cholangiokarzinomen.

Die Resektion der PLCs erfolgte zwischen den Jahren 2014 und 2022 in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Tumor- und Transplantationschirurgie der Uniklinik Köln (Direktorin: Univ.-Prof.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> Christiane J. Bruns, FEBS, FACS (Hon.)). Die verschiedenen Tumorpräparate wurden im Institut für Pathologie der Uniklinik Köln (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Büttner) präpariert, befundet und archiviert.

Es wurden 3 Fälle aus den Archiven des Anatomic Pathology Department des IUHW Narita Hospital von Mina Komuta, M.D., Ph.D. ausgewählt. Die Tumore wurden in den Jahren 2020 und 2021 reseziert.

Insgesamt umfasst das Kollektiv somit 40 Fälle schlecht differenzierter PLCs.

#### **3.2. Datenerhebung**

Zu jedem Fall wurden retrospektiv Daten aus dem Archiv der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Tumor- und Transplantationschirurgie der Uniklinik Köln und aus den Befunden des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln erhoben. Hierfür wurden die Softwares ORBIS und PathoPro benutzt. Die Daten umfassen Alter, biologisches Geschlecht und hepatische Grunderkrankung der Patient:innen.

#### **3.3. Verarbeitung der verwendeten Proben**

Die aus Tumorpräparaten gewonnen Paraffinblöcke wurden über Nacht in einer vierprozentigen Formaldehydlösung fixiert. Nach makroskopischer Begutachtung wurden die Raumforderungen inkl. angrenzendem Lebergewebe von erfahrenen Patholog:innen im Zuschnitt des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln präpariert. Aus jedem Operationspräparat wurden mehrere Blockpräparate gewonnen: Pro 1 cm Durchmesser wurde ein Blockpräparat gewonnen und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus den somit entstandenen Paraffinblöcken wurden im darauffolgenden Schritt unterschiedlich dicke Schnitte mittels Mikrotomie für die weiteren (immun)histochemischen Färbungen gewonnen: Einerseits 3 µm dicke Schnitte für die Hämatoxylin & Eosin (HE) Übersichtsfärbung, andererseits 2-3 µm dicke Schnitte für die Färbungen mit denen im Rahmen dieses Projekts untersuchten Antikörpern. Zu diesen zählen HepPar1, Arginase1, AFP, CD10, ABCB11, CK7, CK19, EMA, Alcian PAS, LFABP und schließlich TROP2.

### 3.4. Mikroskopische Analyse und Selektion eines geeigneten Blockpräparates

In einem ersten Arbeitsschritt wurden die einzelnen, im Archiv bereits vorhandenen HE-gefärbten Schnitte der 37 hiesigen Fälle mittels Multikopf Lichtmikroskopie betrachtet. Unter Berücksichtigung der histomorphologischen Kriterien nach WHO<sup>5</sup> wurden die einzelnen Fälle einer Tumorentität zugewiesen. Diese umfassen: HCC (n=18), CK19+HCC (n=1), cHCC-CCA (n=3), „large-duct“ Typ iCCA (n=4), „small-duct“ Typ iCCA (n=11). Mit den weiteren 3 Fällen aus den Archiven der IUHW, welche alle der Tumorentität cHCC-CCA entsprechen und mittels des Programms PidPort zusätzlich digital betrachtet wurden, umfasst das Projekt insgesamt 40 Fälle.

Da pro Fall mehrere Paraffinblöcke aus jeweils unterschiedlichen Schnittebenen des Tumors vorlagen, wurden im nächsten Arbeitsschritt die zu jedem Block korrespondierenden HE-Schnitte untereinander verglichen. Ziel war, pro Fall einen Paraffinblock auszuwählen, welcher folgende 2 Kriterien erfüllt: Anwesenheit von tumorösem und nicht-tumorösem Lebergewebe, möglichst klare Abgrenzung zwischen Tumorgewebe und nicht-tumorösem Lebergewebe. An diesem Block wurden im weiteren Verlauf die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt.

Zusätzlich wurde das Hintergrundlebergewebe analysiert und das Fibrorestadium nach Desmet ermittelt. Eine Übersicht über das Desmet-Scoring-System bietet Tabelle 1.

**Tabelle 1** Übersicht über das Desmet Scoring-System nach Desmet et al.<sup>68</sup>

| Desmet Score | Fibrorestadium                                                                                                          |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F0           | keine Fibrose vorhanden                                                                                                 |
| F1           | Geringgradige Fibrose im Sinne einer periportal Faservermehrung, keine Septen                                           |
| F2           | Mittelgradige Fibrose im Sinne einer periportal Faservermehrung mit vereinzelt vorliegenden portoportal Septen          |
| F3           | Hochgradige Fibrose im Sinne einer stark ausgeprägten portoportal Septenbildung mit Auftreten einzelner Regeneratknoten |
| F4           | Zirrhotischer Leberumbau                                                                                                |

### 3.5. Immunhistochemie

#### 3.5.1. Auflistung und Beschreibung der verwendeten Primärantikörper

Tabelle 2 bietet eine Übersicht zu den in diesem Projekt verwendeten Primärantikörpern.

**Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper**

| Antikörper | Hersteller            | Klon       | Wirt   | Name                       | Verdünnung | Vorbehandlung |
|------------|-----------------------|------------|--------|----------------------------|------------|---------------|
| HepPar1    | Dako / CE             | OCH1E5     | Mouse  | Hepatocyten (HepPar1)      | 1:1000     | EDTA          |
| Arginase1  | Zytomed / RUO         | SP156      | Rabbit | Arginase-1                 | 1:100      | EDTA          |
| AFP        | Dako / CE             | polyklonal | Rabbit | Alpha-Fetoprotein AFP      | 1:1600     | Citrat        |
| CD10       | Novocastra / CE       | 56C6       | Mouse  | CD10                       | 1:20       | Citrat        |
| ABCB11     | Merck Millipore / RUO | 10D4.1     | Mouse  | ABCB11                     | 1:500      | Citrat        |
| CK19       | Dako / CE             | RCK108     | Mouse  | Cytokeratin19              | 1:200      | EDTA          |
| CK7        | Dako / CE             | OV-TL12/30 | Mouse  | Cytokeratin7               | 1:6000     | Enzym         |
| EMA        | Cellmarque / CE       | E29        | Mouse  | EMA                        | 1:500      | EDTA          |
| LFABP      | Abcam / RUO           | L2B10      | Mouse  | Fatty-acid binding protein | 1:1500     | Citrat        |
| TROP2      | Abcam / RUO           | ERP20043   | Rabbit | Trop2                      | 1:1000     | EDTA          |

### 3.5.1.1. HepPar1

Bei HepPar1 handelt es sich um den aus der Maus stammenden Klon OCH1E5 der Firma *Dako*. Er findet Anwendung an Paraffinschnitten.

Hepatocyte paraffin 1 (HepPar1) ist ein im Jahre 1993 entwickelter monoklonaler Antikörper der Immunglobulinklasse IgG1κ.<sup>69</sup> Erst später wurde die Carbamoylphosphat-Synthetase 1, welche den geschwindigkeitsdefinierenden Schritt des Harnstoffzyklus katalysiert, als Antigen von HepPar1 identifiziert.<sup>70</sup>

HepPar1 weist ein diffuses, granuläres zytoplasmatisches Färbemuster bei tumorösen und nicht-tumorösen Hepatozyten auf<sup>71</sup> und hat eine hohe Sensitivität und Spezifität gegenüber HCCs<sup>72</sup>. Jedoch gibt es mehrere Limitationen in der Diagnostik von HCCs mittels HepPar1: Einerseits sinkt die Sensitivität des Markers mit zunehmend schlechter werdendem Differenzierungsgrad des HCCs, des Weiteren ist sie beim sklerosierenden Subtypen des HCCs niedrig.<sup>73,74</sup> Außerdem können Adenokarzinome und hepatoide Karzinome unterschiedlichster Organe ebenfalls eine positive Färbung für HepPar1 aufweisen.<sup>75-77</sup>

### 3.5.1.2. Arginase1

Bei dem gegen Arginase1 gerichteten monoklonalen Antikörper handelt es sich um den aus dem Kaninchen stammenden Klon SP156 des Herstellers *Zytomed Systems*. Er gehört der Immunglobulinklasse IgG an und ist für Paraffinschnitte geeignet.

Arginase1 ist ein binukleares Mangan-Metalloenzym, welches hauptsächlich in der Leber von Wirbeltieren vorkommt und im Harnstoffzyklus die Hydrolyse von Arginin zu Ornithin und Harnstoff katalysiert.<sup>78</sup> Die Immunhistochemie für Arginase1 zeigt analog zu HepPar1 ein diffuses zytoplasmatisches Färbemuster in tumorösen und nicht-tumorösen Hepatozyten auf, mit einer variablen Färbung der Nuclei.<sup>71</sup> Arginase1 wird bis dato in der



Literatur als sensitivster Marker für das HCC beschrieben, mit einer hohen Sensitivität in schlecht differenzierten HCCs und sogar HCCs vom sklerosierenden Subtypen.<sup>73,74</sup> Auch die Spezifität von Arginase1 gegenüber HCCs ist hoch.<sup>78,79</sup> Doch auch die Immunhistochemie von Arginase1 zeigt Limitationen und ist somit nicht pathognomonisch für das HCC: In erneuter Analogie zu HepPar1 kann die Immunhistochemie für Arginase1 auch bei Adenokarzinomen und hepatoiden Karzinomen in den unterschiedlichsten Organen positiv sein.<sup>77,80</sup>

### **3.5.1.3. $\alpha$ -Fetoprotein (AFP)**

Der gegen das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) gerichtete polyklonale Antikörper des Herstellers *Dako* stammt vom Kaninchen und ist für Paraffinschnitte geeignet.

AFP ist ein in der Leber und dem viszeralem Endoderm des Dottersacks produziertes onkofetales Protein.<sup>81,82</sup> Es fungiert als immunhistochemischer Marker für HCCs, weist hierfür jedoch eine geringe Sensitivität (ca. 30%) und ein z.T. lückenhaftes bzw. unregelmäßiges Färbemuster auf.<sup>72,83</sup> Außerdem exprimieren auch Keimzelltumore, wie beispielsweise Dottersacktumore, AFP<sup>71</sup> und sind somit positiv in seiner immunhistochemischen Färbung. Dementsprechend ist der Nutzen von AFP im Rahmen der HCC-Diagnostik begrenzt.

Trotzdem ist AFP in der HCC-Diagnostik von Nutzen: Seine Immunhistochemie ist im Vergleich zu anderen Markern (wie beispielsweise CD10 oder pCEA) häufiger auch noch bei schlecht differenzierten HCCs positiv.<sup>84</sup> AFP weist bei HCCs ein zytoplasmatisches Färbemuster auf.

### **3.5.1.4. CD10**

Der gegen CD10 gerichtete Maus-Antikörper des Herstellers *Novocastra* stammt aus dem Klon 56C6 und gehört der Antikörperklasse IgG1 an. Er ist für Paraffinschnitte geeignet.

CD10 (Syn.: Nephilysin) ist eine Zelloberflächen-Metallo-Endopeptidase, welche u.a. von Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämie exprimiert wird. Sie galt lange als tumorspezifisch und ist daher auch unter der Bezeichnung "Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen" (CALLA) bekannt ist. Mittlerweile wurde das CD-10 Antigen auch in diversen nicht-lymphatischen Neoplasmen, wie beispielsweise Karzinomen der Leber, des Pankreas, der Nieren, der Blase, der Prostata und des Uterus, sowie Sarkomen and Melanomen identifiziert.<sup>84</sup>

CD10 weist ein charakteristisch kanalikuläres Färbemuster in normalem und neoplastischem Lebergewebe auf, vergleichbar mit dem Färbemuster des polyklonalen karzinoembryonalen Antigens (pCEA). Bei HCCs ist die immunhistochemische Sensitivität von CD10 niedriger als die von pCEA<sup>84</sup>. Trotz dieser Erkenntnis wird die Immunhistochemie von CD10 im Rahmen der HCC-Diagnostik angewandt, da, im Vergleich zu pCEA, seltener das Zytoplasma mitangefärbt wird<sup>85</sup> und somit die Interpretation einfacher ausfällt.

### 3.5.1.5. ABCB11

Der gegen ABCB11 gerichtete monoklonale Maus-Antikörper vom Hersteller *Merck Millipore* stammt aus dem Klon 10D4.1. Er gehört der Immunglobulinklasse IgG1κ an und ist für Paraffinschnitte geeignet.

Bei dem durch das ABCB11-Gen kodierte ABCB11-Protein handelt es sich um eine Gallensalzexportpumpe (engl. „bile salt export pump“, BSEP). Dieser Transporter wird ausschließlich in Hepatozyten exprimiert und ermöglicht den Transport von Gallensäuren in die Canaliculi biliferi. Immunhistochemisch weist normales Lebergewebe ein kanalikuläres Färbemuster für ABCB11 auf.<sup>77</sup> Da Mutationen des ABCB11-Gens zu einer gestörten Sekretion und somit Akkumulation von Gallensäure führen, spielen sie eine bedeutsame Rolle in der Karzinogenese von PLCs.<sup>86,87</sup>

ABCB11 ist hochspezifisch für Hepatozyten; der Nachweis mittels immunhistochemischer Verfahren beweist eine hepatozelluläre Differenzierung. Dies zeigt sich insbesondere durch die ABCB11-Immunhistochemie von cHCC-CCAs, bei welcher lediglich der HCC-Anteil positiv für den Marker ist. In Kontrast dazu können HepPar1 und Arginase1 z.T. auch in cholangiozellulär differenzierten Arealen nachgewiesen werden. Gegenüber HCCs besitzt ABCB11 zwar eine geringe Sensitivität, jedoch höhere Spezifität als HepPar1 und Arginase1. Andere PLCs sind negativ.<sup>77</sup>

### 3.5.1.6. CK7 und CK9

Die gegen CK7 und CK19 gerichteten Maus-Antikörper vom Hersteller *Dako* stammen jeweils aus den Klonen OV-TL12/30 und RCK108. Der Anti-CK7 Antikörper gehört der Immunglobulinklasse IgG1κ an, der Anti-CK19 Antikörper der Antikörperklasse IgG1. Beide finden Anwendung in Gefrier- und Paraffinschnitten.

CK7 und CK19 sind Zytokeratine, welche vom normalen Gallengangsepithel exprimiert werden und zu den immunhistochemischen Markern der cholangiozellulären Differenzierung zählen.<sup>71</sup> Dementsprechend ist die immunhistochemische Färbung der meisten iCCAs positiv für diese Marker<sup>88</sup> und zeigt sich als membranöses und/oder zytoplasmatisches Färbemuster. Jedoch sind CK7 und CK19 keine spezifischen Marker für iCCAs, da auch HCCs eine positive Färbung für sie aufweisen können.<sup>34,89</sup>

### 3.5.1.7. EMA

Der gegen das epitheliale Membranantigen (EMA) gerichtete Maus-Antikörper der Firma *Cell Marque* stammt aus dem Klon E29 und gehört der Immunglobulinklasse IgG an. Er ist für Paraffinschnitte geeignet.

EMA gehört zu den Zytokeratinen und wird von vielen Epithelzellen exprimiert. Im normalen Lebergewebe wird EMA jedoch nur von Cholangiozyten exprimiert, Hepatozyten

sind konsistent negativ für diesen Marker.<sup>90</sup> Somit weist eine positive Immunhistochemie von EMA auf eine cholangiozelluläre Differenzierung hin, wobei das Färbemuster (ganzes Zytoplasma oder nur apikales Zytoplasma) die Heterogenität der Cholangiozyten (je nach Lokalisation) widerspiegelt. Analog hierzu lässt sich das unterschiedliche Färbeverhalten in den zwei Subtypen des iCCAs wiederfinden.<sup>41</sup>

#### **3.5.1.8. LFABP**

Der gegen das Liver fatty acid-binding protein (LFABP, Syn.: FABP1) gerichtete monoklonale Maus-Antikörper des Herstellers *Abcam* entstammt dem Klon L2B10. Er gehört der Immunglobulinklasse IgG1 an und ist für Paraffin- und Gefrierschnitte geeignet.

LFABP bindet an langkettige Fettsäuren und fungiert als Transporter für diese im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation.<sup>91</sup> Das Protein gehört zur Familie der Fatty acid-binding proteins (FABPs) und wird in der höchsten Konzentration in Hepatozyten exprimiert, bei welchen es 10% der zytoplasmatischen Proteine ausmacht.<sup>92,93</sup> Durch seine hohe Gewebsspezifität ist FABP1 ein potenziell nützlicher immunhistochemischer Marker.<sup>94</sup> Die immunhistochemische Färbung weist ein zytoplasmatisches Färbemuster in Hepatozyten auf und besitzt eine der höchsten Positivitätsraten in HCCs, wobei Dum et al.<sup>94</sup> auch LFABP-positive Cholangiokarzinome beschrieben haben. Des Weiteren kann die maligne Entartung von Hepatozyten mit einer Downregulation von LFABP einhergehen<sup>95</sup> und somit eine weitere Hürde in der immunhistochemischen Interpretation von FABP1 darstellen.

#### **3.5.1.9. TROP2**

Der gegen das Trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP2) gerichtete monoklonale Kaninchen-Antikörper des Herstellers *Abcam* entstammt dem Klon ERP20043. Er gehört der Immunglobulinklasse IgG an und ist für Paraffinschnitte geeignet.

Das TROP2-Protein wird durch das Tacstd2-Gen kodiert und entspricht einem transmembranösem Glykoprotein, welches als Calcium-vermittelter Signaltransduktor fungiert.<sup>96</sup> Es spielt eine bedeutende Rolle in der Onkogenese, da es einerseits als Onkogen, andererseits als Tumorsuppressor agieren kann.<sup>97</sup> TROP2 wird, im Gegensatz zu hepatozellulärem Gewebe, intensiv im gesunden Gallengangsepithel exprimiert<sup>97</sup> und stellt somit einen cholangiozellulären Marker da. Sawanyawisuth et al.<sup>97</sup> beschreiben in ihrer Studie jedoch einen Zusammenhang zwischen der Downregulation von TROP2 und der neoplastischen Proliferation von CCC-Zellen, weswegen die immunhistochemische Potenz dieses Markers für die Diagnostik von iCCAs mit Einschränkungen einhergeht.

### 3.5.2. Allgemeines Prinzip der Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen sind mithilfe des Vollautomaten *BOND-MAX* der Firma *Leica Biosystems* erfolgt. Als Nachweissystem wurde das *Bond Polymer Refine Detection Kit* inkl. des dazugehörigen Färbeprotokolls benutzt. Laut Hersteller vermindert dieses Nachweissystem aufgrund endogen vorhandenen Biotins das Auftreten von unspezifischen Färbungen durch die Umgehung der Streptavidin- und Biotinverwendung.

Es handelt sich um ein indirektes immunhistochemisches Verfahren, bei welchem zuerst ein aus Maus oder Kaninchen stammender spezifischer, jedoch unkonjugierter Primärantikörper (der sog. Marker) an ein Zielantigen bindet; in anschließend Schritten binden Sekundär- und Tertiärantikörper an den Marker. Der Tertiärantikörper ist mit polymeren Konjugaten aus Meerrettichperoxidase (engl. „horse radish peroxidase“, HRP) gekoppelt, welche eine Häm-Gruppe mit einem katalytischen  $\text{Fe}^{3+}$  innerhalb des Porphyrinringes besitzt und als Reportermolekül fungiert: HRP katalysiert die Redoxreaktion zwischen Wasserstoffperoxid und einem Chromogen (Substrat-Chromogen-Reaktion), hier 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die Oxidation von DAB bildet ein braunes Präzipitat, welches anschließend mikroskopisch nachgewiesen werden kann. Die Anwesenheit dieses braunen Reaktionsproduktes in den Zielzellen weist auf die Anwesenheit des gesuchten Zielantigens hin.

### 3.5.3. Färbeprotokoll

#### 3.5.3.1. Vorpräparation des Gewebes

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung muss das Gewebe zuerst in zwei Etappen vorpräpariert werden.

In einem ersten Arbeitsschritt erfolgt die Entparaffinierung der bereits eingebetteten Gewebsschnitte mit dem Ziel, unspezifische Hintergrundfärbungen bestmöglich zu eliminieren. Sie erfolgt mittels der gebrauchsfertigen *BOND Dewax Solution*. Anschließend wird das Gewebe rehydratisiert.

Durch die Fixierung von Gewebe mit Formalin werden darin Aldehyd- und Aminogruppen quervernetzt. Diese Quervernetzungen können Epitope maskieren, zum Antigenitätsverlust des Gewebes führen und somit die Bindung der Primärantikörper an ihr Zielantigen erschweren. Außerdem führt Formalin zur Ausbildung von Methylenbrücken, wodurch die dreidimensionale Struktur des Epitops verändert werden kann. Dies führt erneut zu einer herabgesenkten Immunreaktivität des untersuchten Gewebes und ggf. falsch negativen Ergebnissen. Dementsprechend erfolgt in einem zweiten Arbeitsschritt das sog. Epitop-Retrieval, auch Antigendemaskierung genannt: Je nach Primärantikörper (cf. Tab. 2) wird eine enzymatische oder hitzeinduzierte Demaskierung (HIER) der Epitope durchgeführt: Bei der enzymatischen Vorbehandlung werden durch proteolytische Enzyme die Peptidbindungen

aufgebrochen und somit das Epitop freigelegt. Die benötigte Enzymkonzentration ist, wie die Inkubationsdauer, proportional zur Fixierdauer der Probe. Dahingegen ist der grundlegende Mechanismus der HIER noch nicht vollständig entschlüsselt, wobei von einer Hitze-induzierten Hydrolyse der Formalin-bedingten Quervernetzungen bei Zugabe der Epitop-Retrieval-Lösung ausgegangen wird. Für das hier angewandte BOND-System wird je nach Primärantikörper (cf. Tab. 2) eine Pufferlösung auf Citrat- (pH 5.9–6.1) oder EDTA- (pH 8.9–9.1) Basis benutzt.

Die Primärantikörper erkennen nun wieder erleichtert das Epitop und können an ihr Zielantigen binden.

Das Gewebe ist nun vorpräpariert und bereit für den eigentlichen Färbeprozess.

### 3.5.3.2. Teilschritte des Färbeprozesses

Das im Rahmen dieser Arbeit angewandte Färbeschema besteht aus sechs verschiedenen Teilschritten. Die Abfolge und jeweilige Inkubationszeit der einzelnen Schritte können aus Tab. 3 entnommen werden.

**Tabelle 3** Übersicht der Teilschritte der Bond Polymer Refine Detection

| Teilschritt                                                                               | Inkubationszeit |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Inkubation mit Wasserstoffperoxid („Peroxide Block“)                                      | 5 Minuten       |
| Zugabe des spezifischen Primärantikörpers                                                 | 20 Minuten      |
| Inkubation mit einem verknüpften Sekundärantikörper                                       | 8 Minuten       |
| Inkubation mit einem Polymerreagenz aus polymeren Konjugaten (HRP & tertiären Antikörper) | 8 Minuten       |
| Sichtbarmachung des Komplexes mit DAB                                                     | 10 Minuten      |
| Kontrastfärbung mit Hämatoxylin                                                           | 5 Minuten       |

In einem ersten Arbeitsschritt werden die einzelnen Schnitte für 5 Minuten in einer 3-4% Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, um unspezifische Hintergrundfärbungen<sup>98</sup> oder falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Diese sind auf endogene Peroxidasen und Peroxidase-ähnliche Proteine im Gewebe zurückzuführen, welche mit dem Substrat der HRP reagieren können. Durch den „Peroxide Block“ werden die endogenen Peroxidasen gesättigt, das Signal wird klarer.

Daraufhin folgt die Zugabe der spezifischen Primärantikörper, welche vorher gemäß Herstellerempfehlung mittels gebrauchsfertigem Verdünnungspuffer (*BOND Primary Antibody*

*Diluent*) verdünnt wurden, um eine optimale Leistung der Primärantikörperkonzentrate zu gewährleisten, ergo ein intensives Farb-Ergebnis bei möglichst geringer unspezifischer Hintergrundfärbung. Die einzelnen Verdünnungen der verschiedenen Primärantikörper können Tab. 2 (S. 15) entnommen werden. Jeder Schnitt wird mit insgesamt 100 µL verdünnter Lösung benetzt; die Inkubationszeit beträgt 20 Minuten.

Anschließend wird das Gewebe für insg. 8 Minuten mit einem verknüpften Sekundärantikörper (Post-Primary Kaninchen-anti-Maus-IgG in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung / 0,1% ProClin™ 950) zur Lokalisation der Mausantikörper inkubiert. Daraufhin erfolgt eine weitere 8-minütige Inkubation mit einem aus HRP und tertiären Antikörpern bestehenden Polymerreagenz (Polymer Anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung / 0,1% ProClin™ 950) zur Lokalisation der Kaninchenantikörper.

Die nachfolgende 10-minütige Inkubation mit dem Chromogen DAB ermöglicht die Sichtbarmachung des Enzymkomplexes: Es bildet sich ein braunes, in Wasser unlösliches Reaktionsprodukt, welches lichtmikroskopisch nachgewiesen und als Präsenz des Zielantigens an dieser Lokalisation interpretiert werden kann.

Zu guter Letzt erfolgt die Kontrastfärbung mit Hämatoxylin, welche die Sichtbarmachung der Zellkerne ermöglicht. Um den Färbeprozess abzuschließen und die Schnitte für die Lichtmikroskopie vorzubereiten, werden sie noch gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe stufenweise dehydriert und in einem finalen Schritt über Xylol eingebettet.

### **3.6. Lichtmikroskopische, semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie**

Die Auswertung der Ergebnisse ist bei allen 40 Fällen einheitlich und mittels Multikopf Lichtmikroskopie erfolgt. Jede Färbung wurde von mindestens zwei Evaluatoren:innen ausgewertet, um bei uneinheitlicher Meinung oder uneindeutigem Ergebnis einen Diskussionsraum zu ermöglichen. Die Auswertung wurde semiquantitativ nach folgenden Kriterien durchgeführt: Eine Färbung galt als *positiv*, wenn  $\geq 5\%$  der für den Marker bzw. Farbstoff typischen Strukturen angefärbt waren (cf. Tab. 4). Diese lauten wie folgt: Zytoplasma für HepPar1, Zytoplasma und/oder Zellkern für Arginase1, Zytoplasma für AFP, kanalikuläres und/oder punktförmiges Färbungsmuster für CD10 (in 10-15% der Fälle ist für CD10 ein zytoplasmatisches Färbemuster beschrieben – daher wurde dieses ebenso als positiv gewertet), kanalikuläres und/oder punktförmiges Färbungsmuster für ABCB11, Zytoplasma und/oder Zellmembran für CK19, Zytoplasma und/oder Zellmembran für CK7, ganzes Zytoplasma („large-duct“ Typ iCCA) und apikales Zytoplasma („small-duct“ Typ iCCA) für EMA, intrazelluläre Muzin-Vakuolen für Alcian PAS, Zytoplasma für LFABP und schließlich Zytoplasma für TROP2. Eine zusammenfassende Übersicht bietet Tabelle 5.

Bei positivem Ergebnis wurde die Verteilung der angefärbten Strukturen beurteilt. Waren 5-50% der charakteristischen Strukturen angefärbt, wurde der Marker als *fokal positiv*, bei  $\geq 51\%$  als *diffus positiv* bewertet. Dies wird durch Tabelle 4 illustriert.

**Tabelle 4** Verwendetes Scoring-System

| Prozentrang der angefärbten Zellen im tumorösen Gewebe | Score          |
|--------------------------------------------------------|----------------|
| < 5%                                                   | negativ        |
| 5 – 50%                                                | fokal positiv  |
| $\geq 51\%$                                            | diffus positiv |

**Tabelle 5** Übersicht der Färbemuster bzw. Zielstrukturen der verwendeten Primärantikörper und Farbstoffe

| Primärantikörper oder Farbstoff | Färbemuster oder charakteristische Zielstruktur                                                                      |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HepPar1                         | zytoplasmatisch                                                                                                      |
| Arginase1                       | zytoplasmatisch und/oder nuklear                                                                                     |
| AFP                             | zytoplasmatisch                                                                                                      |
| CD10                            | kanalikulär und/oder punktförmig<br>(in 10-15% der Fälle ist für CD10 ein zytoplasmatisches Färbemuster beschrieben) |
| ABCB11                          | kanalikulär und/oder punktförmig                                                                                     |
| CK19                            | zytoplasmatisch und/oder membranös                                                                                   |
| CK7                             | zytoplasmatisch und/oder membranös                                                                                   |
| EMA                             | „large-duct“ Typ iCCA: ganzes Zytoplasma<br>„small-duct“ Typ iCCA: apikales Zytoplasma                               |
| Alcian PAS                      | intrazelluläre Muzin-Vakuole                                                                                         |
| LFABP                           | zytoplasmatisch                                                                                                      |
| TROP2                           | zytoplasmatisch                                                                                                      |

### 3.7. Statistische Auswertung und Analyse der Ergebnisse

Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung wurden in einer Excel-Tabelle dokumentiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics (Version 29.0.1.1).

Dies ermöglichte einerseits eine deskriptive Beschreibung der erhobenen Daten. Zu diesen gehören die absoluten und relativen Häufigkeiten der Geschlechteraufteilung, das durchschnittliche sowie mediane Alter innerhalb der einzelnen Tumorentitäten, die absoluten

Häufigkeiten von Grunderkrankungen, Fibrosestadium und Vorhandensein einer Kapsel innerhalb der einzelnen Tumorentitäten. Auch die Beschreibung der Immunoreaktivität der einzelnen Marker innerhalb einer Tumorentität gehört zur deskriptiven Statistik.

Mittels SPSS wurde eine Wertung der erhobenen Daten durchgeführt: Mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson (bei einem Signifikanzniveau von 5% oder 1% - je nach Auswertung) erfolgte die Bestimmung des Zusammenhangs zwischen der Immunoreaktivität der in diesem Projekt untersuchten Marker und den dahinterstehenden einzelnen Tumorentitäten. Um die Stärke des Zusammenhanges zu quantifizieren, erfolgte in einem zweiten Schritt die Ermittlung des Kontingenzkoeffizienten (CC).

Da das Farbverhalten der einzelnen Antikörper gezielt auf Aspekte wie positives oder negatives, fokales oder diffuses, typisches oder atypisches Farbverhalten beurteilt wurde und anhand dieser Variablen die statistische Auswertung erfolgte, wurden Ergebnisse, welche nicht in diese Kategorien eingegliedert werden konnten, nicht in die statische Beurteilung miteinbezogen. Außerdem erfolgte die statistische Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse zum kombinierten HCC-CCA separat; sie wird in Absatz 3.2.7. näher beschrieben. Aus diesen Gründen bezieht sich die statistische Auswertung je nach Marker und Tumorentität auf eine geringere (und von Auswertung zu Auswertung variierende) Fallzahl als  $n = 40$ . Beispielhaft sei der obere Teil von Tabelle 9 (S. 27) genannt, welcher sich auf 33 der in dieses Projekt eingeflossenen 40 Fälle bezieht, da 6 der 7 restlichen Präparate einem cHCC-CCA entsprachen und das Letzte aufgrund unterschiedlicher Tumorabschnitte nicht eindeutig den oben genannten Kriterien zugeordnet werden konnte. Dies entspricht einer deutlichen Limitation dieses Projekts.

### **3.8. Digitalisierung**

Alle Schnitte wurden mittels Nanozoomer S360 Scanner (Hamamatsu, Japan) digitalisiert, um einerseits den direkten Vergleich von zwei Färbungen mittels der Software NDP.view 2, andererseits die internationale Kollaboration zu ermöglichen.

### **3.9. Ethik**

Der Verwendung von Gewebeproben für Forschungszwecke haben die Patient:innen schriftlich im Rahmen von BioMaSOTA (Genehmigungsnummer 13-091) zugestimmt. Das hier beschriebene Projekt wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln unter dem Zeichen 18-052 genehmigt.



## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Beschreibung des Gesamtkollektivs**

#### **4.1.1. Patient:innencharakteristika**

Untersucht wurde ein Kollektiv aus insgesamt  $n = 40$  PLCs, wovon  $n = 19$  der Entität HCC (inklusive eines CK19+ HCCs),  $n = 11$  der Entität „small-duct“ Typ iCCA,  $n = 4$  der Entität „large-duct“ Typ iCCA und  $n = 6$  der Entität cHCC-CCA zugeordnet werden können.

Von den insgesamt 40 Patient:innen waren 16 weiblichen und 24 männlichen Geschlechts, mit einem Verhältnis von 1 : 1,5. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Operation 40, der älteste Patient 90 Jahre alt. Das durchschnittliche Alter betrug 69,7 Jahre, der Median lag bei 71 Jahren.

Von den 19 Patient:innen mit HCC waren 9 weiblichen und 10 männlichen Geschlechts, mit einem Verhältnis von 0,9 : 1. Das durchschnittliche Alter betrug 66,9 Jahre, der Median lag bei 69 Jahren.

Von den 11 Patient:innen mit „small-duct“ Typ iCCA waren 7 weiblichen und 4 männlichen Geschlechts, mit einem Verhältnis von 1,75 : 1. Das durchschnittliche Alter betrug 70,5 Jahre, der Median lag bei 71 Jahren.

Alle 4 Patient:innen mit „large-duct“ Typ iCCA und alle 6 Patient:innen mit cHCC-CCA konnten dem männlichen Geschlecht zugeordnet werden. Das durchschnittliche Alter und der Median der Patient:innen mit „large-duct“ Typ iCCA betrug 71,8 Jahre und 71,5 Jahre; der Patient:innen mit cHCC-CCA 73,5 Jahre und 76 Jahre.

#### **4.1.2. Analyse des Hintergrundlebergewebes auf Grunderkrankungen**

Bei 5 Fällen, einem HCC, einem „small-duct“ Typ iCCA und 3 cHCC-CCAs lag als Grunderkrankung eine alkoholische Steatohepatitis (ASH) vor.

Bei 9 Fällen lag eine „metabolic dysfunction-associated steatohepatitis“ (MASH) als Grunderkrankung vor, wovon 7 einem HCC (inkl. eines CK19+ HCCs) und 2 einem „small-duct“ Typ iCCA entsprachen.

Bei 7 Fällen lag eine Hepatitis-C-Virus (HCV) Infektion als Grunderkrankung vor, wovon 5 einem HCC, ein Fall einem „small-duct“ Typ iCCA und ein weiterer Fall einem cHCC-CCA entsprach.

Eine Hepatitis-B-Virus (HBV) Infektion lag in einem Fall – einem cHCC-CCA – vor. Eine Co-Infektion von HCV und HBV lag ebenfalls einmalig (bei einem HCC) in unserem Kollektiv vor.

Bei 4 Fällen lagen andere Grunderkrankungen (wie eine intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie oder primäre biliäre Cholangitis) vor, von welchen 3 einem HCC und einer einem „large-duct“ Typ iCCA entsprachen.

Bei insgesamt 13 Fällen konnte keine Grunderkrankung im non-tumorösen Leberparenchym festgestellt werden.

Der Zusammenhang zwischen Tumorentität und Grunderkrankung ist in Tab. 6 abgebildet.

**Tabelle 6** Übersicht der Grunderkrankungen unter den verschiedenen Tumorentitäten

|                        |           | Tumorentität |            |     |     |          | Gesamt |
|------------------------|-----------|--------------|------------|-----|-----|----------|--------|
|                        |           | HCC          | CK19 + HCC | LDT | SDT | cHCC-CCA |        |
| <b>Grunderkrankung</b> | Keine     | 2            | 0          | 3   | 7   | 1        | 13     |
|                        | ASH       | 1            | 0          | 0   | 1   | 3        | 5      |
|                        | MASH      | 6            | 1          | 0   | 2   | 0        | 9      |
|                        | HCV       | 5            | 0          | 0   | 1   | 1        | 7      |
|                        | HBV       | 0            | 0          | 0   | 0   | 1        | 1      |
|                        | HBV + HCV | 1            | 0          | 0   | 0   | 0        | 1      |
|                        | Andere    | 3            | 0          | 1   | 0   | 0        | 4      |
| Gesamt                 |           | 18           | 1          | 4   | 11  | 6        | 40     |

#### 4.1.3. Beschreibung der Morphologie des Leberhintergrundgewebes

Bei 8 Fällen bestand eine Fibrose des Stadiums F1. Hierunter fanden sich 2 HCCs, 4 „small-duct“ Typ iCCAs und jeweils ein „large-duct“ Typ iCCA und cHCC-CCA.

Das Fibrorestadium F2 konnten 9 Fälle (4 HCCs inkl. eines CK19+ HCCs, 4 „small-duct“ typ iCCAs und ein „large-duct“ Typ iCCA) zugeordnet werden.

Das Fibrorestadium F3 bestand bei 2 Fällen, welche beide der Tumorentität HCC entsprachen.

Eine Zirrhose (Desmet Score F4) konnte bei 12 Fällen nachgewiesen werden: 8 HCCs, 2 „small-duct“ Typ iCCAs, einem „large-duct“ Typ iCCA, sowie einem cHCC-CCA.

Bei 6 Fällen bestand keine Fibrose (Desmet Score F0) im non-tumorösen Grundgeweben. Tabelle 7 zeigt den Zusammenhang zwischen Tumorentität und Fibrorestadium.

**Tabelle 7** Übersicht der Fibrorestadien nach Desmet Score unter den verschiedenen Tumorentitäten

|  | Tumorentität |            |     |     |           | Gesamt |
|--|--------------|------------|-----|-----|-----------|--------|
|  | HCC          | CK19 + HCC | LDT | SDT | cHCC-CCA* |        |

|                                |    |    |   |   |    |   |    |
|--------------------------------|----|----|---|---|----|---|----|
| <b>Desmet Score</b>            | F0 | 3  | 0 | 1 | 1  | 1 | 6  |
|                                | F1 | 2  | 0 | 1 | 4  | 1 | 8  |
|                                | F2 | 3  | 1 | 1 | 4  | 0 | 9  |
|                                | F3 | 2  | 0 | 0 | 0  | 0 | 2  |
|                                | F4 | 8  | 0 | 1 | 2  | 1 | 12 |
| Gesamt                         |    | 18 | 1 | 4 | 11 | 3 | 37 |
| *fehlende Daten bei 3 cHCC-CCA |    |    |   |   |    |   |    |

#### 4.1.4. Mikroskopische Analyse der peritumoralen Fibrose/Kapsel

Insgesamt wiesen 21 der untersuchten Präparate eine Kapsel auf. Hiervon entsprachen 17 der Entität HCC, 2 der Entität „large-duct“ Typ iCCA und jeweils ein Fall den Entitäten „small-duct“ Typ iCCA und cHCC-CCA.

In Tabelle 8 wird der Zusammenhang zwischen Tumorentität und Kapsel illustriert.

**Tabelle 8** Übersicht über das Vorhandensein einer Kapsel unter den verschiedenen Tumorentitäten

|                                  |                 | Tumorentität |            |     |     | cHCC-CCA* | Gesamt |
|----------------------------------|-----------------|--------------|------------|-----|-----|-----------|--------|
|                                  |                 | HCC          | CK19 + HCC | LDT | SDT |           |        |
| <b>Kapsel</b>                    | Nicht vorhanden | 1            | 1          | 2   | 10  | 2         | 16     |
|                                  | vorhanden       | 17           | 0          | 2   | 1   | 1         | 21     |
| Gesamt                           |                 | 18           | 1          | 4   | 11  | 3         | 37     |
| * fehlende Daten bei 3 cHCC-CCAs |                 |              |            |     |     |           |        |

## 4.2. Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse

### 4.2.1. Immunhistochemische Analyse hepatozellulärer Marker:

#### Gegenüberstellung von Positivität und Negativität

Die Expression der Antikörper einer hepatozellulären Differenzierung (HepPar1, Arginase1, CD10, ABCB11, AFP und LFABP) führten bei den Tumorentitäten HCC, „small-duct“ und „large-duct“ Typ iCCA zu unterschiedlichen Ergebnissen.

#### 4.2.1.1. HepPar1, Arginase1 und deren Kombination

Die Ergebnisse der Immunoreaktivität von HepPar1, Arginase1 sowie deren Kombination in Relation zu den unterschiedlichen Tumorentitäten sind in der unten aufgeführten Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9** Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* HepPar1, Arginase1 sowie Kombination HepPar1 und Arginase1 Immunoreaktivität

|                                          |          | HepPar1                            |         | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|------------------------------------------|----------|------------------------------------|---------|--------|--------|------------------------------------|-------|
|                                          |          | negativ                            | positiv |        |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b>       | kein SDT | 4                                  | 18      | 22     | <0,001 | 19,8                               | 0,612 |
|                                          | SDT      | 11                                 | 0       | 11     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                               |          | 15                                 | 18      | 33     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b>       | Kein LDT | 11                                 | 18      | 29     | 0,019  | 5,462                              | 0,377 |
|                                          | LDT      | 4                                  | 0       | 4      |        |                                    |       |
| Gesamt LDT                               |          | 15                                 | 18      | 33     |        |                                    |       |
|                                          |          | Arginase1                          |         | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|                                          |          | negativ                            | positiv |        |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b>       | kein HCC | 15                                 | 0       | 15     | <0,001 | 33,0                               | 0,707 |
|                                          | HCC      | 0                                  | 18      | 18     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                               |          | 15                                 | 18      | 33     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b>       | Kein SDT | 4                                  | 18      | 22     | <0,001 | 19,8                               | 0,612 |
|                                          | SDT      | 11                                 | 0       | 11     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                               |          | 15                                 | 18      | 33     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b>       | Kein LDT | 11                                 | 18      | 29     | 0,019  | 5,462                              | 0,377 |
|                                          | LDT      | 4                                  | 0       | 4      |        |                                    |       |
| Gesamt LDT                               |          | 15                                 | 18      | 33     |        |                                    |       |
| <b>Kombination HepPar1 und Arginase1</b> |          | <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> |         | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|                                          |          | nein                               | ja      |        |        |                                    |       |
|                                          |          |                                    |         |        | <0,001 | 33,0                               | 0,707 |

|                                                  |                  |                                        |    |        |        |                                    |       |
|--------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------|----|--------|--------|------------------------------------|-------|
| <b>HepPar1<br/>und<br/>Arginase1<br/>positiv</b> | nein             | 15                                     | 0  | 15     |        |                                    |       |
|                                                  | beide<br>positiv | 0                                      | 18 | 18     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                                       |                  | 15                                     | 18 | 33     |        |                                    |       |
| <b>Kombination HepPar1 und<br/>Arginase1</b>     |                  | <b>Handelt es sich um ein<br/>SDT?</b> |    | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|                                                  |                  | nein                                   | ja |        | <0,001 | 19,8                               | 0,612 |
| <b>HepPar1<br/>und<br/>Arginase1<br/>positiv</b> | nein             | 4                                      | 11 | 15     |        |                                    |       |
|                                                  | beide<br>positiv | 18                                     | 0  | 18     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                                       |                  | 22                                     | 11 | 33     |        |                                    |       |
| <b>Kombination HepPar1 und<br/>Arginase1</b>     |                  | <b>Handelt es sich um ein<br/>LDT?</b> |    | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|                                                  |                  | nein                                   | ja |        | 0,019  | 5,462                              | 0,377 |
| <b>HepPar1<br/>und<br/>Arginase1<br/>positiv</b> | nein             | 11                                     | 4  | 15     |        |                                    |       |
|                                                  | beide<br>positiv | 18                                     | 0  | 18     |        |                                    |       |
| Gesamt LDT                                       |                  | 29                                     | 4  | 33     |        |                                    |       |

Alle HCCs zeigen eine Immunoreaktivität für HepPar1 (Pearson-Chi-Quadrat(1) = 33,0 bei  $p < 0,001$ ). Der Zusammenhang ist stark (CC = 0,707 bei  $p < 0,001$ ). Für iCCAs als Obergruppe (d.h. ohne Differenzierung zwischen „small-duct“ Typ und „large-duct“ Typ iCCA) gilt: Alle iCCAs zeigen sich negativ für HepPar1 (Pearson-Chi-Quadrat(1) = 33,0 bei  $p < 0,001$ ). Der Zusammenhang ist stark (CC = 0,707 bei  $p < 0,001$ ). Da die zwei letzten Ergebnisse das Gleiche in inverser Konstellation darstellen, wird bei den anschließend behandelten Markern und Tumorentitäten nur Erstere präsentiert werden.

Die Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA und die Immunoreaktivität – im Sinne eines negativen Färbeverhaltens – von HepPar1 stehen in einem starken Zusammenhang. Bei „large-duct“ Typ iCCAs besteht ein mittlerer Zusammenhang. Ähnlich für den Marker Arginase1: Die Tumorentität HCC und die Immunoreaktivität – im Sinne eines positiven Färbeverhaltens – von Arginase1 stehen in einem starken Zusammenhang ; der Zusammenhang zwischen SDTs sowie Arginase1 ist ebenfalls stark, jedoch im Sinne des negativen Färbeverhaltens. Für LDTs besteht ein mittlerer Zusammenhang.

In einem weiteren Schritt wurden die kombinierte Immunoreaktivität von HepPar1 und Arginase1 untersucht: Waren beide Marker simultan bei einem PLC-Präparat positiv, galt die *kombinierte positive Immunoreaktivität* als gegeben. Waren beide Marker negativ oder nur einer positiv, galt sie als nicht-gegeben: Die Tumorentitäten HCC und „small-duct“ Typ iCCA und die kombinierte Immunoreaktivität von HepPar1 und Arginase1 stehen jeweils in einem starken Zusammenhang. Der Zusammenhang zur Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA ist dahingegen mittlerer Stärke.

#### 4.2.1.2. CD10, ABCB11 und deren Kombination

Die Ergebnisse der Immunoreaktivität von CD10, ABCB11 sowie deren Kombination in Relation zu den unterschiedlichen Tumorentitäten sind in der unten aufgeführten Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10** *Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* CD10, ABCB11 sowie Kombination CD10 und ABCB11 Immunoreaktivität*

|                                    |          | CD10    |         | Gesamt | p              | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|------------------------------------|----------|---------|---------|--------|----------------|-------------------------|-------|
|                                    |          | negativ | positiv |        |                |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 12      | 2       | 14     | <0,001         | 12,698                  | 0,533 |
|                                    | HCC      | 4       | 14      | 18     |                |                         |       |
| Gesamt HCC                         |          | 16      | 16      | 32     |                |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT | 7       | 15      | 22     | 0,002          | 9,309                   | 0,475 |
|                                    | SDT      | 9       | 1       | 10     |                |                         |       |
| Gesamt SDT                         |          | 16      | 16      | 32     |                |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT | 13      | 15      | 28     | 0,285 (> 0,05) | *                       | *     |
|                                    | LDT      | 3       | 1       | 4      |                |                         |       |
| Gesamt LDT                         |          | 16      | 16      | 32     |                |                         |       |
|                                    |          | ABCB11  |         | Gesamt | p              | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|                                    |          | negativ | positiv |        |                |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 15      | 0       | 15     | <0,001         | 23,860                  | 0,642 |
|                                    | HCC      | 3       | 16      | 19     |                |                         |       |

|                                    |               |                                    |    |        |                |                         |       |
|------------------------------------|---------------|------------------------------------|----|--------|----------------|-------------------------|-------|
| Gesamt HCC                         |               | 18                                 | 16 | 34     |                |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT      | 7                                  | 16 | 23     | <0,001         | 14,454                  | 0,546 |
|                                    | SDT           | 11                                 | 0  | 11     |                |                         |       |
| Gesamt SDT                         |               | 18                                 | 16 | 34     |                |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT      | 14                                 | 16 | 30     | 0,045          | 4,030                   | 0,326 |
|                                    | LDT           | 4                                  | 0  | 4      |                |                         |       |
| Gesamt LDT                         |               | 18                                 | 16 | 34     |                |                         |       |
| <b>Kombination CD10 und ABCB11</b> |               | <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> |    | Gesamt | p              | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|                                    |               | nein                               | ja |        |                |                         |       |
| <b>CD10 und ABCB11 positiv</b>     | nein          | 15                                 | 7  | 22     | <0,001         | 13,750                  | 0,542 |
|                                    | beide positiv | 0                                  | 11 | 11     |                |                         |       |
| Gesamt HCC                         |               | 15                                 | 18 | 33     |                |                         |       |
| <b>Kombination CD10 und ABCB11</b> |               | <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> |    | Gesamt | p              | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|                                    |               | nein                               | ja |        |                |                         |       |
| <b>CD10 und ABCB11 positiv</b>     | nein          | 11                                 | 11 | 22     | 0,004          | 8,250                   | 0,447 |
|                                    | beide positiv | 11                                 | 0  | 11     |                |                         |       |
| Gesamt SDT                         |               | 22                                 | 11 | 33     |                |                         |       |
| <b>Kombination CD10 und ABCB11</b> |               | <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> |    | Gesamt | p              | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|                                    |               | nein                               | ja |        |                |                         |       |
| <b>CD10 und ABCB11 positiv</b>     | nein          | 18                                 | 4  | 22     | 0,131 (> 0,05) | *                       | *     |
|                                    | beide positiv | 11                                 | 0  | 11     |                |                         |       |
| Gesamt LDT                         |               | 29                                 | 4  | 33     |                |                         |       |

\* keine statistische Signifikanz

Die Tumorentitäten HCC sowie „small-duct“ Typ iCCA und die Immunoreaktivität von CD10 stehen jeweils in einem mittleren Zusammenhang. Bei „large-duct“ Typ iCCAs besteht dahingegen kein statistisch relevanter Zusammenhang zur Immunoreaktivität von CD10 da p

= 0,285 > 0,05. Die Tumorentität HCC und die Immunoreaktivität – im Sinne eines positiven Färbeverhaltens – von ABCB11 stehen in einem starken Zusammenhang ; bei SDTs und LDTs besteht ein mittlerer Zusammenhang (bei negativem Färbeverhalten).

In Analogie zu HepPar1 und Arginase1 wurde auch hier die kombinierte Immunoreaktivität von CD10 und ABCB11 untersucht: Die Tumorentitäten HCC sowie „small-duct“ Typ iCCA und die kombinierte Immunoreaktivität von CD10 und ABCB11 stehen in einem mittleren Zusammenhang. Zu „large-duct“ Typ iCCAs besteht dahingegen kein statistisch relevanter Zusammenhang da  $p = 0,131 > 0,05$ .

#### 4.2.1.3. AFP

Die Ergebnisse der Immunoreaktivität von AFP sind in der unten aufgeführten Tabellen 11 dargestellt.

**Tabelle 11** *Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* AFP Immunoreaktivität*

|                                    |          | AFP     |         | Gesamt | p                    | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC |
|------------------------------------|----------|---------|---------|--------|----------------------|------------------------------------|----|
|                                    |          | negativ | positiv |        |                      |                                    |    |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 15      | 0       | 15     | 0,059<br>(><br>0,05) | *                                  | *  |
|                                    | HCC      | 15      | 4       | 19     |                      |                                    |    |
| Gesamt HCC                         |          | 30      | 4       | 34     |                      |                                    |    |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT | 19      | 4       | 23     | 0,141<br>(><br>0,05) | *                                  | *  |
|                                    | SDT      | 11      | 0       | 11     |                      |                                    |    |
| Gesamt SDT                         |          | 30      | 4       | 34     |                      |                                    |    |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT | 26      | 14      | 30     | 0,437<br>(><br>0,05) | *                                  | *  |
|                                    | LDT      | 4       | 0       | 4      |                      |                                    |    |
| Gesamt LDT                         |          | 30      | 4       | 34     |                      |                                    |    |

\* keine statistische Signifikanz

Alle oben genannten Tumorentitäten stehen in keinem statistisch relevanten Zusammenhang zur Immunoreaktivität von AFP ( $p_{\text{HCC}} = 0,059 > 0,05$  ;  $p_{\text{SDT}} = 0,141 > 0,05$  ;  $p_{\text{LDT}} = 0,437 > 0,05$ ).



#### 4.2.1.4. LFABP

Die Ergebnisse der Immunoreaktivität von LFABP sind in der unten aufgeführten Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12** *Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* LFABP Immunoreaktivität*

|                                    |          | LFABP   |         | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|------------------------------------|----------|---------|---------|--------|--------|------------------------------------|-------|
|                                    |          | negativ | positiv |        |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 11      | 1       | 12     | <0,001 | 26,996                             | 0,682 |
|                                    | HCC      | 0       | 19      | 19     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                         |          | 11      | 20      | 31     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT | 4       | 19      | 23     | <0,001 | 12,744                             | 0,540 |
|                                    | SDT      | 7       | 1       | 8      |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                         |          | 11      | 20      | 31     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT | 7       | 20      | 27     | 0,004  | 8,350                              | 0,461 |
|                                    | LDT      | 4       | 0       | 4      |        |                                    |       |
| Gesamt LDT                         |          | 11      | 20      | 31     |        |                                    |       |

Die Tumorentität HCC und die Immunoreaktivität – im Sinne eines positiven Färbeverhaltens – von LFABP stehen in einem starken Zusammenhang. Zu den Tumorentitäten „small-duct“ Typ iCCA und „large-duct“ Typ iCCA besteht – im Sinne eines negativen Färbeverhaltens – ein mittlerer Zusammenhang.

#### 4.2.2. Immunhistochemische Analyse cholangiozellulärer Marker: Gegenüberstellung von Positivität und Negativität

Dieser Unterpunkt präsentiert die Analyseergebnisse zur Immunoreaktivität der typischen cholangiozellulären Antikörper und Farbstoffe (CK19, CK7, EMA, Alcian PAS und TROP2) in Bezug auf die Tumorentitäten HCC, „small-duct“ Typ iCCA und „large-duct“ Typ iCCA. Unterschieden wurden zwischen einem positivem und negativem Färbeverhalten der einzelnen Marker. Die kommenden Tabellen führen die Ergebnisse in absoluten Zahlen auf, anhand welcher anschließend der Zusammenhang zwischen Marker und Tumorentität berechnet wurde.

#### 4.2.2.1. CK19, CK7 und deren Kombination

Die Ergebnisse der Immunoreaktivität von CK19, CK7 sowie deren Kombination in Relation zu den unterschiedlichen Tumorentitäten sind in der unten aufgeführten Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13** Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* CK19, CK7 sowie Kombination  
CK19 und CK7 Immunoreaktivität

|                                    |          | CK19    |         | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|------------------------------------|----------|---------|---------|--------|--------|------------------------------------|-------|
|                                    |          | negativ | positiv |        |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 2       | 12      | 14     | <0,001 | 21,852                             | 0,631 |
|                                    | HCC      | 18      | 1       | 19     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                         |          | 20      | 13      | 33     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT | 18      | 5       | 23     | 0,002  | 9,909                              | 0,481 |
|                                    | SDT      | 2       | 8       | 10     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                         |          | 20      | 13      | 33     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT | 20      | 9       | 29     | 0,008  | 7,003                              | 0,418 |
|                                    | LDT      | 0       | 4       | 4      |        |                                    |       |
| Gesamt LDT                         |          | 20      | 13      | 33     |        |                                    |       |
|                                    |          | CK7     |         | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|                                    |          | negativ | positiv |        |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 1       | 13      | 14     | <0,001 | 16,639                             | 0,579 |
|                                    | HCC      | 15      | 4       | 19     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                         |          | 16      | 17      | 33     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT | 15      | 8       | 23     | 0,004  | 8,508                              | 0,453 |
|                                    | SDT      | 1       | 9       | 10     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                         |          | 16      | 17      | 33     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT | 16      | 13      | 29     | 0,038  | 4,284                              | 0,339 |
|                                    | LDT      | 0       | 4       | 4      |        |                                    |       |
| Gesamt LDT                         |          | 16      | 17      | 33     |        |                                    |       |

| Kombination CK19 und CK7 |               | Handelt es sich um ein HCC? |    | Gesamt | p      | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|--------------------------|---------------|-----------------------------|----|--------|--------|-------------------------|-------|
|                          |               | nein                        | ja |        |        |                         |       |
| CK19 und CK7 positiv     | nein          | 2                           | 18 | 20     | <0,001 | 21,852                  | 0,631 |
|                          | beide positiv | 12                          | 1  | 13     |        |                         |       |
| Gesamt HCC               |               | 14                          | 19 | 33     |        |                         |       |
| Kombination CK19 und CK7 |               | Handelt es sich um ein SDT? |    | Gesamt | p      | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|                          |               | nein                        | ja |        |        |                         |       |
| CK19 und CK7 positiv     | nein          | 18                          | 2  | 20     | 0,002  | 9,909                   | 0,481 |
|                          | beide positiv | 5                           | 8  | 13     |        |                         |       |
| Gesamt SDT               |               | 23                          | 10 | 33     |        |                         |       |
| Kombination CK19 und CK7 |               | Handelt es sich um ein LDT? |    | Gesamt | p      | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|                          |               | nein                        | ja |        |        |                         |       |
| CK19 und CK7 positiv     | nein          | 20                          | 0  | 20     | 0,008  | 7,003                   | 0,418 |
|                          | beide positiv | 9                           | 4  | 13     |        |                         |       |
| Gesamt LDT               |               | 29                          | 4  | 33     |        |                         |       |

Die Tumorentität HCC und die Immunoreaktivität – im Sinne eines negativen Färbeverhalten – von CK19 stehen in einem starken Zusammenhang. Zum Marker CK7 ist der Zusammenhang dahingegen mittlerer Stärke. Das Gleiche gilt für die Tumorentitäten „small-duct“ Typ iCCA sowie „large-duct“ Typ iCCA und die Immunoreaktivitäten – im Sinne eines positiven Färbeverhalten – von CK19 und CK7: Sie stehen ebenso jeweils in einem mittleren Zusammenhang.

Auch hier wurde in einem weiteren Schritt die kombinierte Immunoreaktivität von CK19 und CK7 untersucht: Die kombinierte Immunoreaktivität CK19 und CK7 steht im stärksten Zusammenhang zu HCCs ; zu den zwei iCCA Subtypen ist der Zusammenhang mittlerer Stärke.

#### 4.2.2.2. EMA

Die Auswertung der Immunoreaktivität von EMA erfolgte unter Berücksichtigung der für die einzelnen Tumorentitäten typischen Färbemuster, welche in den kommenden Tabellen als *klassisches Färbemuster* betitelt sind. Im Falle von „small-duct“ Typ iCCAs handelt es sich um ein apikales, im Falle von „large-duct“ Typ iCCAs um ein zytoplasmatisches und im Falle der Tumorentität HCC um ein negatives Färbeverhalten.

Jedoch zeigte EMA bei einigen HCCs ein kanalikuläres (statt einem negativen) Färbemuster, weswegen in einem separaten Schritt auch der Zusammenhang zwischen den *für HCCs möglichen Färbemuster* (ergo negatives und kanalikuläres Färbeverhalten) und dieser Tumorentität analysiert wurde

Die Ergebnisse sind in den unten aufgeführten Tabellen 14 und 15 dargestellt.

**Tabelle 14** *Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* EMA Immunoreaktivität*

|                                    |          | EMA     |         | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|------------------------------------|----------|---------|---------|--------|--------|------------------------------------|-------|
|                                    |          | negativ | positiv |        |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 0       | 13*     | 13     | <0,001 | 14,140                             | 0,560 |
|                                    | HCC      | 12      | 6*      | 18     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                         |          | 12      | 19*     | 31     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT | 0       | 23**    | 23     | <0,001 | 18,431                             | 0,539 |
|                                    | SDT      | 7       | 4**     | 11     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                         |          | 7       | 27**    | 34     |        |                                    |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT | 0       | 30***   | 30     | <0,001 | 34,000                             | 0,707 |
|                                    | LDT      | 4       | 0***    | 4      |        |                                    |       |
| Gesamt LDT                         |          | 4       | 30***   | 34     |        |                                    |       |

\* verschiedene Färbemuster für EMA (ergo kanalikulär, zytoplasmatisch oder apikal)

\*\* „EMA positiv“ i.S. eines für SDTs klassischen Färbemusters (apikales Muster)

\*\*\* „EMA positiv“ i.S. eines für LDTs klassischen Färbemusters (zytoplasm. Muster)

Die Tumorentität HCC und die Immunoreaktivität – im Sinne eines Vergleichs von negativem und positivem Färbeverhalten – von EMA stehen in einem mittleren Zusammenhang.

Die Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA und die Immunoreaktivität – im Sinne eines für diese Tumorentität klassischen Färbeverhaltens – von EMA stehen in einem mittleren Zusammenhang.

Die Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA und die Immunoreaktivität – im Sinne eines für diese Tumorentität klassischen Färbeverhaltens – von EMA stehen in einem starken Zusammenhang.

**Tabelle 15** *Erweiterte Kreuztabelle: HCC \* EMA Immunoreaktivität (für HCC mögliche Färbemuster)*

|                                    |          | Für HCC mögliche Färbemuster |    | Gesamt | p       | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|------------------------------------|----------|------------------------------|----|--------|---------|-------------------------|-------|
|                                    |          | nein                         | ja |        |         |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 12                           | 1  | 13     | < 0,001 | 27,109                  | 0,683 |
|                                    | HCC      | 0                            | 18 | 18     |         |                         |       |
| Gesamt                             |          | 12                           | 19 | 31     |         |                         |       |

Die Tumorentität HCC und die Immunoreaktivität – im Sinne von für diese Tumorentität möglichen Färbeverhalten (d.h. negatives oder kanalikuläres Färbemuster) – von EMA stehen in einem starken Zusammenhang.

#### 4.2.2.3. Alcian PAS

Die Ergebnisse zur Immunoreaktivität von Alcian PAS sind in der unten aufgeführten Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16** *Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* Alcian PAS Immunoreaktivität*

|                                    |          | Alcian PAS |         | Gesamt | p     | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|------------------------------------|----------|------------|---------|--------|-------|-------------------------|-------|
|                                    |          | negativ    | positiv |        |       |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 11         | 3       | 14     | 0,039 | 4,256                   | 0,343 |
|                                    | HCC      | 18         | 0       | 18     |       |                         |       |
| Gesamt HCC                         |          | 29         | 3       | 32     |       |                         |       |

|                                    |          |    |   |    |                   |        |       |
|------------------------------------|----------|----|---|----|-------------------|--------|-------|
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT | 19 | 3 | 22 | 0,220<br>(> 0,05) | *      | *     |
|                                    | SDT      | 10 | 0 | 10 |                   |        |       |
| Gesamt SDT                         |          | 29 | 3 | 32 |                   |        |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT | 28 | 0 | 28 | <0,001            | 23,172 | 0,648 |
|                                    | LDT      | 1  | 3 | 4  |                   |        |       |
| Gesamt LDT                         |          | 29 | 3 | 32 |                   |        |       |

\* keine statistische Signifikanz

Die Tumorentität HCC und die Immunoreaktivität – im Sinne eines negativen Färbeverhaltens – von Alcian PAS stehen in einem mittleren Zusammenhang. Der stärkere Zusammenhang – im Sinne eines positiven Färbeverhaltens – besteht jedoch zur Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA. Dahingegen besteht zu „small-duct“ Typ iCCAs kein statistisch relevanter Zusammenhang bei  $p = 0,220 > 0,05$ .

#### 4.2.2.4. TROP2

Die Ergebnisse der Immunoreaktivität von TROP2 sind in der unten aufgeführten Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17** *Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* TROP2 Immunoreaktivität*

|                                    |          | <b>TROP2</b> |         | Gesamt | p      | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|------------------------------------|----------|--------------|---------|--------|--------|-------------------------|-------|
|                                    |          | negativ      | positiv |        |        |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein HCC?</b> | kein HCC | 4            | 9       | 13     | <0,001 | 14,701                  | 0,561 |
|                                    | HCC      | 18           | 1       | 19     |        |                         |       |
| Gesamt HCC                         |          | 22           | 10      | 32     |        |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> | Kein SDT | 19           | 4       | 23     | 0,007  | 7,311                   | 0,431 |
|                                    | SDT      | 3            | 6       | 9      |        |                         |       |
| Gesamt SDT                         |          | 22           | 10      | 32     |        |                         |       |
| <b>Handelt es sich um ein LDT?</b> | Kein LDT | 21           | 7       | 28     | 0,044  | 4,073                   | 0,336 |
|                                    | LDT      | 1            | 3       | 4      |        |                         |       |
| Gesamt LDT                         |          | 22           | 10      | 32     |        |                         |       |

Alle oben genannten Tumorentitäten und die Immunoreaktivität – im Sinne eines positiven bzw. negativen Färbeverhaltens – von TROP2 stehen jeweils in einem mittleren Zusammenhang.

#### 4.2.3. Vergleichende Übersicht der bislang präsentierten immunhistochemischen Markerprofile

Tab. 18 stellt eine Übersicht der bislang präsentierten Ergebnisse dar: Sie zeigt die Kontingenzkoeffizienten des Färbeverhaltens der einzelnen Marker (Unterscheidung in positives und negatives Färbeverhalten) zu den Tumorentitäten HCC, „small-duct“ und „large-duct“ Typ iCCA. Auch die bereits aufgeführten kombiniert-positiven Färbeverhalten von HepPar1&Arginase1, CD10&ABCB11 und CK19&CK7 sind aufgeführt. Im Falle des Markers EMA wurde auf die bereits im Unterpunkt 3.2.2.2. erläuterten unterschiedlichen Färbemuster der Entitäten Rücksicht genommen.

**Tabelle 18** Übersicht der Kontingenzkoeffizienten zwischen den unterschiedlichen Tumorentitäten und Immunoreaktivität der analysierten Marker

| <b>Tumorentität<br/>Marker</b>                   | <b>HCC</b>                                       | <b>SDT</b>                                       | <b>LDT</b>                                       |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>HepPar1</b>                                   | 0,707                                            | 0,612                                            | 0,377                                            |
| <b>Arginase1</b>                                 | 0,707                                            | 0,612                                            | 0,377                                            |
| <b>Kombination<br/>HepPar1 und<br/>Arginase1</b> | 0,707                                            | 0,612                                            | 0,377                                            |
| <b>CD10</b>                                      | 0,533                                            | 0,475                                            | Keine statistisch<br>signifikante<br>Korrelation |
| <b>ABCB11</b>                                    | 0,642                                            | 0,546                                            | 0,326                                            |
| <b>Kombination CD10<br/>und ABCB11</b>           | 0,542                                            | 0,447                                            | Keine statistisch<br>signifikante<br>Korrelation |
| <b>AFP</b>                                       | Keine statistisch<br>signifikante<br>Korrelation | Keine statistisch<br>signifikante<br>Korrelation | Keine statistisch<br>signifikante<br>Korrelation |
| <b>LFABP</b>                                     | 0,682                                            | 0,540                                            | 0,461                                            |
| <b>CK19</b>                                      | 0,631                                            | 0,481                                            | 0,418                                            |

|                                 |                                                             |                                            |                                           |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>CK7</b>                      | 0,579                                                       | 0,453                                      | 0,339                                     |
| <b>Kombination CK19 und CK7</b> | 0,631                                                       | 0,481                                      | 0,418                                     |
| <b>EMA</b>                      | a) Für HCC mögliche Färbemuster: 0,683<br>b) negativ: 0,560 | 0,539 (bei für SDT typischem Färbemuster)  | 0,707 (bei für LDT typischem Färbemuster) |
| <b>Alcian PAS</b>               | 0,343                                                       | Keine statistisch signifikante Korrelation | 0,648                                     |
| <b>TROP2</b>                    | 0,561                                                       | 0,431                                      | 0,336                                     |

Anhand dieser Tabelle können die Primärantikörper, welche den stärksten Zusammenhang (gemessen anhand des Kontingenzkoeffizienten) zu den verschiedenen Tumorentitäten aufwiesen, identifiziert werden. Diese werden im weiteren Text als *stärkste Marker* bezeichnet.

Die 5 stärksten Marker für die Tumorentitäten HCC und „small-duct“ Typ iCCA lauten: HepPar1, Arginase1, ABCB11, LFABP und EMA. Die Kontingenzkoeffizienten (CC) der Marker zur Tumorentität HCC lauten in absteigender Reihenfolge:  $CC_{\text{HepPar1} \times \text{HCC}} = 0,707$ ,  $CC_{\text{Arginase1} \times \text{HCC}} = 0,707$ ,  $CC_{\text{EMA} \times \text{für HCC mögliche Färbemuster}} = 0,683$ ,  $CC_{\text{LFABP} \times \text{HCC}} = 0,682$  und  $CC_{\text{ABCB11} \times \text{HCC}} = 0,642$ . Die Kontingenzkoeffizienten der Marker zur Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA lauten in absteigender Reihenfolge:  $CC_{\text{HepPar1} \times \text{SDT}} = 0,612$ ,  $CC_{\text{Arginase1} \times \text{SDT}} = 0,612$ ,  $CC_{\text{ABCB11} \times \text{SDT}} = 0,546$ ,  $CC_{\text{LFABP} \times \text{SDT}} = 0,540$  und  $CC_{\text{EMA} \times \text{für SDT typisches Färbemuster}} = 0,539$ .

Im Falle der Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA wird ABCB11 durch Alcian PAS unter den stärksten Markern ersetzt. Die Kontingenzkoeffizienten der Marker zur Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA lauten in absteigender Reihenfolge:  $CC_{\text{EMA} \times \text{für LDT typisches Färbemuster}} = 0,707$ ,  $CC_{\text{Alcian PAS} \times \text{LDT}} = 0,648$ ,  $CC_{\text{LFABP} \times \text{LDT}} = 0,461$ ,  $CC_{\text{HepPar1} \times \text{LDT}} = 0,377$  und  $CC_{\text{Arginase1} \times \text{LDT}} = 0,377$ .

Diese stärksten Marker spielen in den kommenden Analysen eine wichtige Rolle.

#### 4.2.4. Erwartete Immunoreaktivität gegensätzlicher Marker-Kombinationen:

##### Gegenüberstellung von Positivität und Negativität

Auf Grundlage der bisher in Kreuztabellen dargestellten absoluten Fallzahlen ließ sich für jede Tumorentität das jeweils wahrscheinlichste Färbeverhalten der einzelnen Marker ableiten (Bsp.: Für HepPar1 ist bei HCCs mit einem positiven Färbeverhalten zu rechnen; für CK19 ist bei HCCs mit einem negativen Färbeverhalten zu rechnen). In einem weiteren Analyseschritt wurde diese Erkenntnis in eine neue Variable namens *erwartetes kombiniertes Färbeverhalten gegensätzlicher Marker* bzw. *erwartete kombinierte Immunoreaktivität gegensätzlicher Marker*



inkorporiert – diese Variable besteht aus einer Marker-Kombination, wobei ein Marker einem klassischen HCC-Marker und der andere einem klassischen iCCA-Marker entspricht (dementsprechend handelt es sich um *gegensätzliche* Marker). Im Falle der Tumorentität HCC würde dies in dem eben aufgegriffenen Beispiel bedeuten, dass ein *erwartetes* Färbeverhalten gegeben ist, wenn HepPar1 ein positives und CK19 ein gleichzeitig negatives Färbeverhalten aufweist. Ein *unerwartetes* Färbeverhalten würde wiederum vorliegen, wenn HepPar1 negativ und/oder CK19 positiv wäre.

Diverse Marker-Kombinationen wurden mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson auf ihren Zusammenhang (inkl. dessen Stärke CC) zu den unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht. Die Kombinationen lauten: HepPar1 und CK19; LFABP und CK19; LFABP und TROP2; ABCB11 und CK19. Sie umfassen u.a. die in Unterpunkt 3.2.3. gelisteten *stärksten Marker*.

#### 4.2.4.1. Tumorentität HCC

Die Ergebnisse zur kombinierten Immunoreaktivität der gegensätzlichen Marker-Kombinationen in Bezug auf die Tumorentität HCC sind in den unten aufgeführten Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19** Erweiterte Kreuztabelle: HCC \* gegensätzliche Marker-Kombinationen

|                                                              |            | Handelt es sich um ein HCC? |    | Gesamt | p      | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|--------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------|----|--------|--------|-------------------------|-------|
|                                                              |            | nein                        | ja |        |        |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von HepPar1 und CK19 erwartet für HCC?</b> | unerwartet | 14                          | 0  | 14     | <0,001 | 31,000                  | 0,707 |
|                                                              | erwartet   | 0                           | 17 | 17     |        |                         |       |
| Gesamt HCC                                                   |            | 14                          | 17 | 31     |        |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von LFABP und CK19 erwartet für HCC?</b>   | unerwartet | 12                          | 1  | 13     | <0,001 | 27,109                  | 0,683 |
|                                                              | erwartet   | 0                           | 18 | 18     |        |                         |       |
| Gesamt HCC                                                   |            | 12                          | 19 | 31     |        |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von LFABP und TROP2</b>                    | unerwartet | 9                           | 1  | 10     | <0,001 | 23,874                  | 0,678 |
|                                                              | erwartet   | 0                           | 18 | 18     |        |                         |       |

|                                                             |            |    |    |    |        |        |       |
|-------------------------------------------------------------|------------|----|----|----|--------|--------|-------|
| <b>erwartet für HCC?</b>                                    |            |    |    |    |        |        |       |
| Gesamt HCC                                                  |            | 9  | 19 | 28 |        |        |       |
| <b>Färbeverhalten von ABCB11 und CK19 erwartet für HCC?</b> | unerwartet | 14 | 3  | 17 | <0,001 | 22,885 | 0,640 |
|                                                             | erwartet   | 0  | 16 | 16 |        |        |       |
| Gesamt HCC                                                  |            | 14 | 19 | 33 |        |        |       |

Die Tumorentität HCC und alle oben gelisteten Kombinationen stehen in einem starken Zusammenhang.

#### 4.2.4.2. Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA

Die Ergebnisse zur kombinierten Immunoreaktivität der gegensätzlichen Marker-Kombination in Bezug auf die Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA sind in der unten aufgeführten Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20** *Erweiterte Kreuztabelle: SDT \* gegensätzliche Marker-Kombinationen*

|                                                              |            | <b>Handelt es sich um ein SDT?</b> |    | Gesamt | p      | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|--------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------|----|--------|--------|-------------------------|-------|
|                                                              |            | nein                               | ja |        |        |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von HepPar1 und CK19 erwartet für SDT?</b> | unerwartet | 18                                 | 2  | 20     | <0,001 | 11,210                  | 0,509 |
|                                                              | erwartet   | 4                                  | 8  | 12     |        |                         |       |
| Gesamt SDT                                                   |            | 22                                 | 10 | 32     |        |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von LFABP und CK19 erwartet für SDT?</b>   | unerwartet | 19                                 | 2  | 21     | 0,003  | 9,014                   | 0,475 |
|                                                              | erwartet   | 4                                  | 6  | 10     |        |                         |       |
| Gesamt SDT                                                   |            | 23                                 | 8  | 31     |        |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von LFABP und TROP2 erwartet für SDT?</b>  | unerwartet | 20                                 | 3  | 23     | 0,016  | 5,834                   | 0,404 |
|                                                              | erwartet   | 3                                  | 4  | 7      |        |                         |       |

|                                                             |            |    |    |    |       |       |       |
|-------------------------------------------------------------|------------|----|----|----|-------|-------|-------|
| Gesamt SDT                                                  |            | 23 | 7  | 30 |       |       |       |
| <b>Färbeverhalten von ABCB11 und CK19 erwartet für SDT?</b> | unerwartet | 18 | 2  | 20 | 0,002 | 9,909 | 0,481 |
|                                                             | erwartet   | 5  | 8  | 13 |       |       |       |
| Gesamt SDT                                                  |            | 23 | 10 | 33 |       |       |       |

Dahingegen stehen die Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA und alle hier gelisteten erwarteten kombinierten Immunoreaktivitäten in einem mittleren Zusammenhang.

#### 4.2.4.3. Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA

Die Ergebnisse zur kombinierten Immunoreaktivität der gegensätzlichen Marker-Kombination in Bezug auf die Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA sind in der unten aufgeführten Tabelle 21 dargestellt.

**Tabelle 21** *Erweiterte Kreuztabelle: LDT \* gegensätzliche Marker-Kombinationen*

|                                                              |            | Handelt es sich um ein LDT? |    | Gesamt | p     | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|--------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------|----|--------|-------|-------------------------|-------|
|                                                              |            | nein                        | ja |        |       |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von HepPar1 und CK19 erwartet für LDT?</b> | unerwartet | 20                          | 0  | 20     | 0,006 | 7,619                   | 0,439 |
|                                                              | erwartet   | 8                           | 4  | 12     |       |                         |       |
| Gesamt LDT                                                   |            | 28                          | 4  | 32     |       |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von LFABP und CK19 erwartet für LDT?</b>   | unerwartet | 21                          | 0  | 21     | 0,002 | 9,644                   | 0,487 |
|                                                              | erwartet   | 6                           | 4  | 10     |       |                         |       |
| Gesamt LDT                                                   |            | 27                          | 4  | 31     |       |                         |       |
| <b>Färbeverhalten von LFABP und TROP2 erwartet für LDT?</b>  | unerwartet | 22                          | 1  | 23     | 0,009 | 6,887                   | 0,432 |
|                                                              | erwartet   | 4                           | 3  | 7      |       |                         |       |
| Gesamt LDT                                                   |            | 26                          | 4  | 30     |       |                         |       |

|                                                                             |            |    |   |    |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------|----|---|----|-------|-------|-------|
| <b>Färbeverhalten<br/>von ABCB11<br/>und CK19<br/>erwartet für<br/>LDT?</b> | unerwartet | 20 | 0 | 20 | 0,008 | 7,003 | 0,418 |
|                                                                             | erwartet   | 9  | 4 | 13 |       |       |       |
| Gesamt LDT                                                                  |            | 29 | 4 | 33 |       |       |       |

Das Gleiche gilt für die Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA: Die hier gelisteten erwarteten kombinierten Immunoreaktivitäten stehen jeweils in einem mittleren Zusammenhang zu LDTs.

Summa summarum: Im Falle von HCCs und „small-duct“ Typ iCCAs weist die Kombination HepPar1 und CK19 die stärkste Korrelation zu diesen 2 Tumorentitäten auf (CC = 0,707 und CC = 0,509), im Falle von „large-duct“ Typ iCCAs die Kombination LFABP und CK19 mit einem CC = 0,487.

#### 4.2.5. Immunhistochemische Konditionen

Im Laufe einer weiteren statistischen Analyse wurde mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson der Zusammenhang (inkl. dessen Stärke CC) zwischen den einzelnen Tumorentitäten und 3 unterschiedlichen Konditionen untersucht. Diese lauten:

- 1) Kondition 1:  $\geq 1$  klassischer HCC-Marker ist positiv und alle klassischen iCCA-Marker sind negativ
- 2) Kondition 2:  $\geq 1$  klassischer HCC-Marker ist positiv und alle klassischen iCCA-Marker (außer CK7 und CK19) sind negativ
- 3) Kondition 3:  $\geq 1$  klassischer iCCA-Marker ist positiv und alle klassischen HCC-Marker sind negativ

Die erst- und zweitgenannte Kondition unterscheiden sich, wie oben aufgeführt, durch die Interpretation von CK7 und CK19 als einerseits „streng“ und andererseits „nicht streng“ betrachtete iCCA-Marker, da einige HCCs eine positive Immunhistochemie für CK7 und CK19 aufweisen können und diese Marker somit als „nicht streng“ genommene iCCA-Marker interpretiert werden können.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Zusammenhangs mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson (inkl. dessen Stärke CC) zwischen den Konditionen 1,2 und 3 und den verschiedenen Tumorentitäten sind in der unten aufgeführten Tabelle 22 dargestellt.

**Tabelle 22** Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT \* Kondition 1, 2 und 3

|                             |      | Handelt es sich um ein HCC? |    | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|-----------------------------|------|-----------------------------|----|--------|--------|------------------------------------|-------|
|                             |      | nein                        | ja |        |        |                                    |       |
| <b>Kondition 1 erfüllt?</b> | nein | 13                          | 4  | 17     | <0,001 | 16,639                             | 0,579 |
|                             | ja   | 1                           | 15 | 16     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                  |      | 14                          | 19 | 33     |        |                                    |       |
| <b>Kondition 2 erfüllt?</b> | nein | 13                          | 1  | 14     | <0,001 | 25,320                             | 0,659 |
|                             | ja   | 1                           | 18 | 19     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                  |      | 14                          | 19 | 33     |        |                                    |       |
| <b>Kondition 3 erfüllt?</b> | nein | 3                           | 19 | 22     | <0,001 | 22,393                             | 0,639 |
|                             | ja   | 11                          | 0  | 11     |        |                                    |       |
| Gesamt HCC                  |      | 14                          | 19 | 33     |        |                                    |       |
|                             |      | Handelt es sich um ein SDT? |    | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|                             |      | nein                        | ja |        |        |                                    |       |
| <b>Kondition 1 erfüllt?</b> | nein | 8                           | 9  | 17     | 0,004  | 8,508                              | 0,453 |
|                             | ja   | 15                          | 1  | 16     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                  |      | 23                          | 10 | 33     |        |                                    |       |
| <b>Kondition 2 erfüllt?</b> | nein | 5                           | 9  | 14     | <0,001 | 13,295                             | 0,536 |
|                             | ja   | 18                          | 1  | 19     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                  |      | 23                          | 10 | 33     |        |                                    |       |
| <b>Kondition 3 erfüllt?</b> | nein | 20                          | 2  | 22     | <0,001 | 14,061                             | 0,547 |
|                             | ja   | 3                           | 8  | 11     |        |                                    |       |
| Gesamt SDT                  |      | 23                          | 10 | 33     |        |                                    |       |
|                             |      | Handelt es sich um ein LDT? |    | Gesamt | p      | Pearson-<br>Chi-<br>Quadrat<br>(1) | CC    |
|                             |      | nein                        | ja |        |        |                                    |       |
| <b>Kondition 1 erfüllt?</b> | nein | 13                          | 4  | 17     | 0,038  | 4,284                              | 0,339 |
|                             | ja   | 16                          | 0  | 16     |        |                                    |       |
| Gesamt LDT                  |      | 29                          | 4  | 33     |        |                                    |       |

|                                 |      |    |   |    |                      |       |       |
|---------------------------------|------|----|---|----|----------------------|-------|-------|
| <b>Kondition<br/>2 erfüllt?</b> | nein | 10 | 4 | 14 | 0,013                | 6,177 | 0,397 |
|                                 | ja   | 19 | 0 | 19 |                      |       |       |
| Gesamt LDT                      |      | 29 | 4 | 33 |                      |       |       |
| <b>Kondition<br/>3 erfüllt?</b> | nein | 21 | 1 | 22 | 0,059<br>(><br>0,05) | *     | *     |
|                                 | ja   | 8  | 3 | 11 |                      |       |       |
| Gesamt LDT                      |      | 29 | 4 | 33 |                      |       |       |

\* keine statistische Signifikanz

Die Tumorentität HCC und die Kondition 1 stehen in einem mittleren Zusammenhang ; zu den Konditionen 2 und 3 besteht ein starker Zusammenhang.

Die Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA und die Konditionen 1,2 und 3 stehen in einem mittleren Zusammenhang

Die Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA und die Konditionen 1 und 2 stehen in einem mittleren Zusammenhang. Die Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA und die Kondition 3 stehen in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang da  $p = 0,059 > 0,05$ .

Summa summarum: Kondition 2 und 3 weisen die stärksten Zusammenhänge zu den 3 gelisteten Tumorentitäten auf, wobei HCCs den stärksten Zusammenhang zu Kondition 2 aufweisen mit einem  $CC = 0,659$ , „small-duct“ Typ iCCAs zu Kondition 3 mit einem  $CC = 0,547$  und „large-duct“ Typ iCCA zu Kondition 2 mit  $CC = 0,397$ .

Im Durchschnitt weist Kondition 2 den stärksten Zusammenhang zu den verschiedenen PLCs auf.

#### 4.2.6. Gegenüberstellung von fokalem und diffusem Färbeverhalten der stärksten hepato- und cholangiozellulären Marker

Im Laufe der finalen statistischen Analyse wurden die jeweils 5 stärksten Marker jeder Tumorentität (cf. Unterpunkt 3.2.3.) genauer betrachtet: Mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson wurden die Zusammenhänge (inkl. deren Stärke CC) zwischen fokalem bzw. diffusem Färbeverhalten der Marker und den Tumorentitäten HCC, „small-duct“ und „large-duct“ Typ iCCA errechnet.

Für die Tumorentitäten HCC und „small-duct“ Typ iCCA lauten die 5 stärksten Marker: HepPar1, Arginase1, ABCB11, LFABP und EMA (da im Rahmen dieses Projekts im Falle von EMA lediglich auf das Färbemuster und nicht die Farbverteilung geachtet wurde, wird EMA in diesem Absatz nicht näher behandelt werden). Zur Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA weisen folgende Marker den stärksten Zusammenhang auf: HepPar1, Arginase1, LFABP, EMA und Alcian PAS (auch im Falle von Alcian PAS wurde lediglich auf das Färbemuster geachtet – wie EMA kann Alcian PAS demnach hier nicht näher betrachtet werden).

#### 4.2.6.1. Tumorentität HCC

Die Ergebnisse der statistischen Analyse des diffusen und fokalen Färbemusters von HepPar1, Arginase1, ABCB11 und LFABP bei HCCs sind in der unten aufgeführten Tabelle 23 dargestellt.

**Tabelle 23** *Erweiterte Kreuztabelle: HCC \* fokales und diffuses Färbeverhalten der stärksten Marker*

|                              |                                   | Handelt es sich um ein HCC? |    | Gesamt | p              | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----|--------|----------------|-------------------------|-------|
|                              |                                   | nein                        | ja |        |                |                         |       |
| <b>Ist HepPar1 diffus?</b>   | nicht diffus (negativ oder fokal) | 15                          | 2  | 17     | <0,001         | 25,882                  | 0,663 |
|                              | diffus                            | 0                           | 16 | 16     |                |                         |       |
| Gesamt                       |                                   | 15                          | 18 | 33     |                |                         |       |
| <b>Ist HepPar1 fokal?</b>    | nicht fokal (negativ oder diffus) | 15                          | 16 | 31     | 0,183 (> 0,05) | *                       | *     |
|                              | fokal                             | 0                           | 2  | 2      |                |                         |       |
| Gesamt                       |                                   | 15                          | 18 | 33     |                |                         |       |
| <b>Ist Arginase1 diffus?</b> | nicht diffus (negativ oder fokal) | 15                          | 4  | 19     | <0,001         | 20,263                  | 0,617 |
|                              | diffus                            | 0                           | 14 | 14     |                |                         |       |
| Gesamt                       |                                   | 15                          | 18 | 33     |                |                         |       |
| <b>Ist Arginase1 fokal?</b>  | nicht fokal (negativ oder diffus) | 15                          | 14 | 29     | 0,051 (> 0,05) | *                       | *     |
|                              | fokal                             | 0                           | 4  | 4      |                |                         |       |
| Gesamt                       |                                   | 15                          | 18 | 33     |                |                         |       |
| <b>Ist ABCB11 diffus?</b>    | nicht diffus (negativ oder fokal) | 15                          | 13 | 28     | 0,016          | 5,752                   | 0,380 |
|                              | diffus                            | 0                           | 6  | 6      |                |                         |       |
| Gesamt                       |                                   | 15                          | 19 | 34     |                |                         |       |
| <b>Ist ABCB11 fokal?</b>     | nicht fokal (negativ oder diffus) | 15                          | 9  | 24     | <0,001         | 11,184                  | 0,498 |
|                              | fokal                             | 0                           | 10 | 10     |                |                         |       |

|                   |                                   |    |    |    |                |        |       |
|-------------------|-----------------------------------|----|----|----|----------------|--------|-------|
| Gesamt            |                                   | 15 | 19 | 34 |                |        |       |
| Ist LFABP diffus? | nicht diffus (negativ oder fokal) | 12 | 2  | 14 | <0,001         | 23,774 | 0,659 |
|                   | diffus                            | 0  | 17 | 17 |                |        |       |
| Gesamt            |                                   | 12 | 19 | 31 |                |        |       |
| Ist LFABP fokal?  | nicht fokal (negativ oder diffus) | 11 | 17 | 28 | 0,841 (> 0,05) | *      | *     |
|                   | fokal                             | 1  | 2  | 3  |                |        |       |
| Gesamt            |                                   | 12 | 19 | 31 |                |        |       |

\* keine statistische Signifikanz

Die Tumorentität HCC und das diffuse Färbeverhalten von HepPar1, Arginase1 sowie LFABP stehen in einem starken Zusammenhang. Ganz im Gegensatz zum fokalen Färbeverhalten dieser Marker: Es steht in keinem statistisch relevanten Zusammenhang zur Tumorentität HCC da  $p_{\text{HepPar1}} = 0,183 > 0,05$ ,  $p_{\text{Arginase1}} = 0,051 > 0,05$  und  $p_{\text{LFABP}} = 0,841 > 0,05$ .

Bei ABCB11 stehen das diffuse sowie fokale Färbeverhalten in einem mittleren Zusammenhang zur Entität HCC.

#### 4.2.6.2. Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA

Die Ergebnisse der statistischen Analyse des diffusen und fokalen Färbemusters von HepPar1, Arginase1, ABCB11 und LFABP bei „small-duct“ Typ iCCAs sind in der unten aufgeführten Tabelle 24 dargestellt.

**Tabelle 24** Erweiterte Kreuztabelle: SDT \* fokales und diffuses Färbeverhalten der stärksten Marker

|                     |                                   | Handelt es sich um ein SDT? |    | Gesamt | p              | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----|--------|----------------|-------------------------|-------|
|                     |                                   | nein                        | ja |        |                |                         |       |
| Ist HepPar1 diffus? | nicht diffus (negativ oder fokal) | 6                           | 11 | 17     | <0,001         | 15,529                  | 0,566 |
|                     | diffus                            | 16                          | 0  | 16     |                |                         |       |
| Gesamt              |                                   | 22                          | 11 | 33     |                |                         |       |
| Ist HepPar1 fokal?  | nicht fokal (negativ oder diffus) | 20                          | 11 | 31     | 0,302 (> 0,05) | *                       | *     |



|                              |                                   |    |    |    |                |        |       |
|------------------------------|-----------------------------------|----|----|----|----------------|--------|-------|
|                              | fokal                             | 2  | 0  | 2  |                |        |       |
| Gesamt                       |                                   | 22 | 11 | 33 |                |        |       |
| <b>Ist Arginase1 diffus?</b> | nicht diffus (negativ oder fokal) | 8  | 11 | 19 | <0,001         | 12,158 | 0,519 |
|                              | diffus                            | 14 | 0  | 14 |                |        |       |
| Gesamt                       |                                   | 22 | 11 | 33 |                |        |       |
| <b>Ist Arginase1 fokal?</b>  | nicht fokal (negativ oder diffus) | 18 | 11 | 29 | 0,131 (> 0,05) | *      | *     |
|                              | fokal                             | 4  | 0  | 4  |                |        |       |
| Gesamt                       |                                   | 22 | 11 | 33 |                |        |       |
| <b>Ist ABCB11 diffus?</b>    | nicht diffus (negativ oder fokal) | 17 | 11 | 28 | 0,062 (> 0,05) | *      | *     |
|                              | diffus                            | 6  | 0  | 6  |                |        |       |
| Gesamt                       |                                   | 23 | 11 | 34 |                |        |       |
| <b>Ist ABCB11 fokal?</b>     | nicht fokal (negativ oder diffus) | 13 | 11 | 24 | 0,009          | 6,775  | 0,408 |
|                              | fokal                             | 10 | 0  | 10 |                |        |       |
| Gesamt                       |                                   | 23 | 11 | 34 |                |        |       |
| <b>Ist LFABP diffus?</b>     | nicht diffus (negativ oder fokal) | 6  | 8  | 14 | <0,001         | 13,093 | 0,545 |
|                              | diffus                            | 17 | 0  | 17 |                |        |       |
| Gesamt                       |                                   | 23 | 8  | 31 |                |        |       |
| <b>Ist LFABP fokal?</b>      | nicht fokal (negativ oder diffus) | 21 | 7  | 28 | 0,754 (> 0,05) | *      | *     |
|                              | fokal                             | 2  | 1  | 3  |                |        |       |
| Gesamt                       |                                   | 23 | 8  | 31 |                |        |       |

\* keine statistische Signifikanz

Die Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA und das diffuse Färbeverhalten von HepPar1 stehen in einem mittleren Zusammenhang. Zum fokalen Färbeverhalten des Markers besteht jedoch kein statistisch relevanter Zusammenhang da  $p = 0,302 > 0,05$ . Ähnliches gilt für den Marker Arginase1: Die Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA und das diffuse Färbeverhalten von Arginase1 stehen in einem mittleren Zusammenhang ; dahingegen besteht kein statistisch relevanter Zusammenhang zum fokalen Färbeverhalten des Markers da  $p = 0,131 > 0,05$ . Genauso beim Marker LFABP: Das diffuse Färbeverhalten steht in mittlerem, das fokale jedoch in keinem statistisch relevanten Zusammenhang (da  $p = 0,754 > 0,05$ ) zur Entität small-

duct“ Typ iCCA. Nur der Marker ABCB11 zeigt die gegenteilige Situation: Hier stehen das diffuse Färbeverhalten von ABCB11 und SDTs in keinem statistisch relevanten Zusammenhang zueinander ( $p = 0,062 > 0,05$ ), das fokale Färbeverhalten dahingegen schon bei mittlerer Stärke.

#### 4.2.6.3. Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA

Die Ergebnisse der statistischen Analyse des diffusen und fokalen Färbemusters von HepPar1, Arginase1 und LFABP bei „large-duct“ Typ iCCAs sind in der unten aufgeführten Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 25** Erweiterte Kreuztabelle: LDT \* fokales und diffuses Färbeverhalten der stärksten Marker

|                       |                                   | Handelt es sich um ein LDT? |    | Gesamt | p              | Pearson-Chi-Quadrat (1) | CC    |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----|--------|----------------|-------------------------|-------|
|                       |                                   | nein                        | ja |        |                |                         |       |
| Ist HepPar1 diffus?   | nicht diffus (negativ oder fokal) | 13                          | 4  | 17     | 0,38 (> 0,05)  | *                       | *     |
|                       | diffus                            | 16                          | 0  | 16     |                |                         |       |
| Gesamt                |                                   | 29                          | 4  | 33     |                |                         |       |
| Ist HepPar1 fokal?    | nicht fokal (negativ oder diffus) | 27                          | 4  | 31     | 0,588 (> 0,05) | *                       | *     |
|                       | fokal                             | 2                           | 0  | 2      |                |                         |       |
| Gesamt                |                                   | 29                          | 4  | 33     |                |                         |       |
| Ist Arginase1 diffus? | nicht diffus (negativ oder fokal) | 15                          | 4  | 19     | 0,067 (> 0,05) | *                       | *     |
|                       | diffus                            | 14                          | 0  | 14     |                |                         |       |
| Gesamt                |                                   | 29                          | 4  | 33     |                |                         |       |
| Ist Arginase1 fokal?  | nicht fokal (negativ oder diffus) | 25                          | 4  | 29     | 0,428 (> 0,05) | *                       | *     |
|                       | fokal                             | 4                           | 0  | 4      |                |                         |       |
| Gesamt                |                                   | 29                          | 4  | 33     |                |                         |       |
| Ist LFABP diffus?     | nicht diffus (negativ oder fokal) | 10                          | 4  | 14     | 0,018          | 5,577                   | 0,390 |

|                     |                                         |    |   |    |                      |   |   |
|---------------------|-----------------------------------------|----|---|----|----------------------|---|---|
|                     | diffus                                  | 17 | 0 | 17 |                      |   |   |
| Gesamt              |                                         | 27 | 4 | 31 |                      |   |   |
| Ist LFABP<br>fokal? | nicht fokal<br>(negativ<br>oder diffus) | 24 | 4 | 28 | 0,483<br>(><br>0,05) | * | * |
|                     | fokal                                   | 3  | 0 | 3  |                      |   |   |
| Gesamt              |                                         | 27 | 4 | 31 |                      |   |   |

\* keine statistische Signifikanz

Die einzige Konstellation, welche aus obiger Tabelle einen statistisch relevanten Zusammenhang aufweist, herrscht zwischen der Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA und dem diffusen Färbeverhalten von LFABP: Hier besteht ein mittlerer Zusammenhang.

Alle restlichen aufgeführten Konstellationen stehen in keinem statistisch relevanten Zusammenhang zueinander. Die korrespondierenden p-Werte sind Tabelle 25 zu entnehmen.

Summa summarum: Im direkten Vergleich zeigt eine Differenzierung in *fokales* und *diffuses* Färbemuster der Marker keinen stärkeren Zusammenhang zu den verschiedenen Tumorentitäten als die (simplere) Unterteilung in *positives* und *negatives* Färbeverhalten.

Der einzige Marker, dessen *fokales* Färbeverhalten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zu den PLCs aufweist, ist ABCB11 mit einer Stärke  $CC_{HCC} = 0,498$  zur Tumorentität HCC und  $CC_{SDT} = 0,408$  zur Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA.

#### 4.2.7. Immunhistochemische Resultate des cHCC-CCAs

Die der Tumorentität cHCC-CCA zugehörigen Fälle wurden im Rahmen der immunhistochemischen Beurteilung in ihre 2 Komponenten, die HCC- und iCCA-Komponente, aufgeteilt. Diese wurden separat ausgewertet (cf. Tabelle 26). Da sich dieses Projekt mit schlecht differenzierten PLCs beschäftigt, stellte die Unterscheidung der verschiedenen Komponenten insbesondere im Rahmen dieser Tumorentität eine Herausforderung dar. Daher war die Komponenten-getrennte immunhistochemische Auswertung der cHCC-CCAs nicht in jedem Falle möglich. Weiters wurden 3 der 6 cHCC-CCA Fälle aus den Archiven der IUHW übernommen. Hier lagen unvollständige Daten vor. Aus diesen 2 Gründen sind die hier aufgeführten Zahlen zu den cHCC-CCAs nicht vollständig. Folglich wurde sich gegen eine genauere statistische Analyse und für eine rein deskriptive Darstellung der absoluten Daten entschieden. Diese wird im Verlauf von einer bildlichen Darstellung (cf. Unterpunkt 3.2.8.) begleitet.

Folgende Trends lassen sich aus den absoluten Zahlen ableiten: Die klassischen hepatozellulären Marker weisen ein positives Färbeverhalten überwiegend in der HCC-Komponente der cHCC-CCAs auf, jedoch nicht ausschließlich: 1 von insgesamt 6 iCCA-Komponenten zeigt sich positiv für HepPar1, Arginase1 und AFP. Dies geht beispielsweise

nicht mit dem Färbeverhalten von HepPar1 und Arginase1 bei den vorhin analysierten klassischen iCCAs einher, bei welchen sich diese Marker streng negativ zeigten (cf. Tabelle 9). Auch CD10 und LFABP zeigen eine positive Immunhistochemie in den iCCA-Komponenten ; vergleichend wurden diese Marker auch vereinzelt in den klassischen iCCAs exprimiert. Unter der cholangiozellulären Markern ist insb. CK19 zu nennen, welcher in gleichem Anteil bei HCC eine negative (2/4) sowie positive (2/4) Immunhistochemie aufweist. Im Falle der klassischen HCCs herrschte hierbei eine klare Diskrepanz: Nur 1/18 HCCs erwies sich positiv für CK19 (cf. Tabelle 13).

**Tabelle 26** Übersicht absolute Werte der immunhistochemischen Auswertung der cHCC-CCA

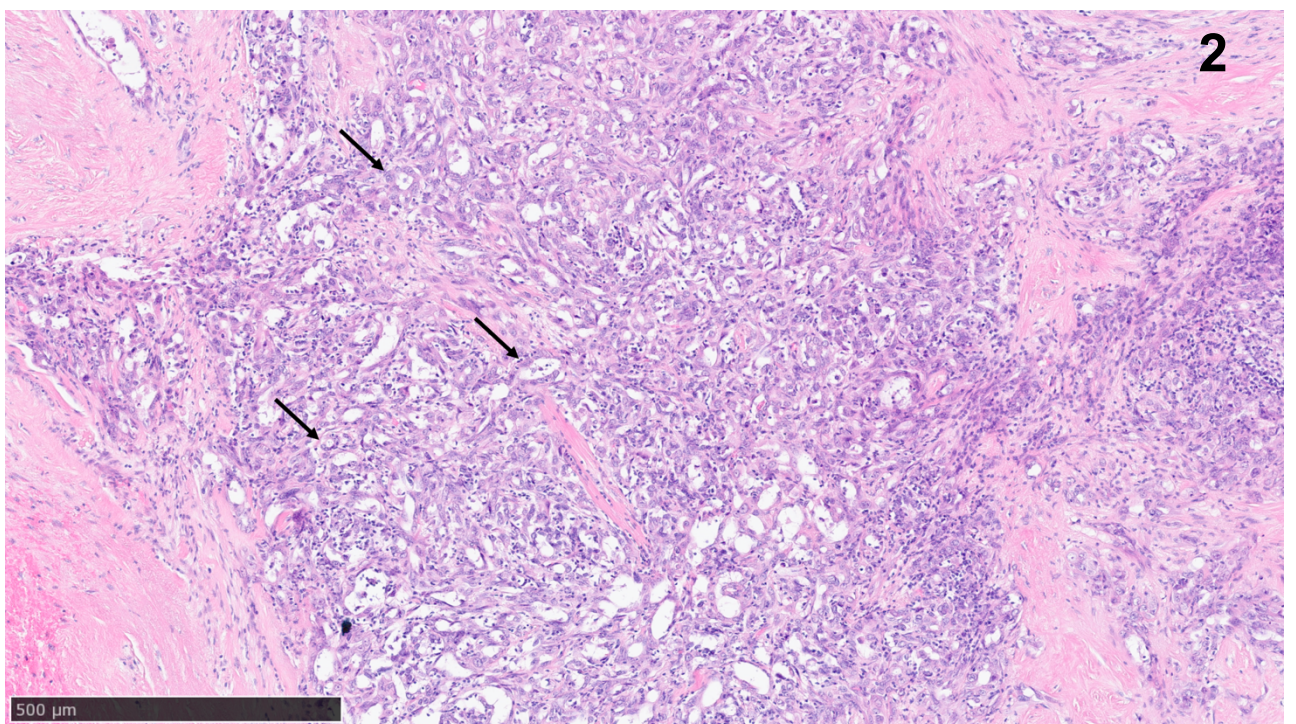
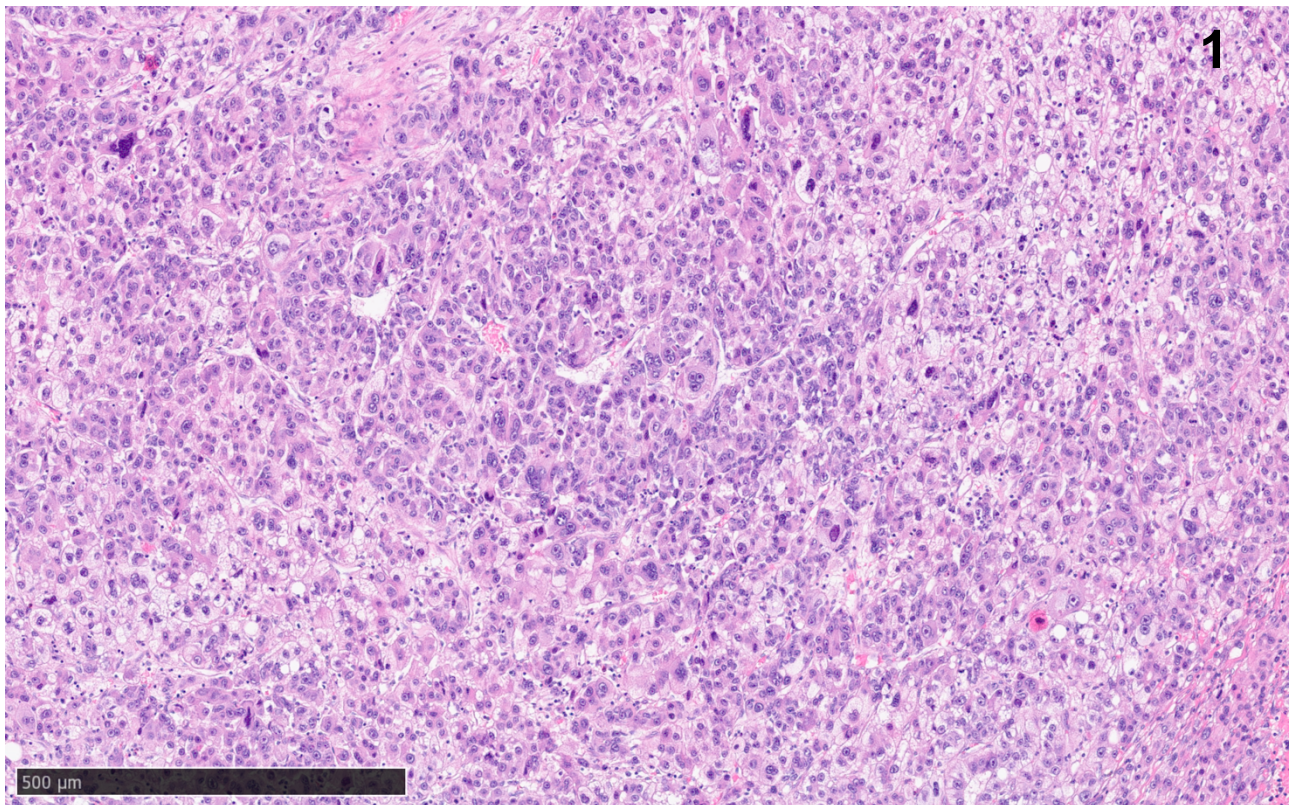
| Marker             | Farbverhalten | HCC-Komponente | iCCA-Komponente |
|--------------------|---------------|----------------|-----------------|
| <b>HepPar1</b>     | positiv       | 4              | 1               |
|                    | negativ       | 2              | 5               |
| <b>Arginase1</b>   | positiv       | 4              | 1               |
|                    | negativ       | 2              | 5               |
| <b>AFP</b>         | positiv       | 3              | 1               |
|                    | negativ       | 3              | 5               |
| <b>CD10</b>        | positiv       | 4              | 2               |
|                    | negativ       | 2              | 4               |
| <b>ABCB11</b>      | positiv       | 3              | 0               |
|                    | negativ       | 3              | 6               |
| <b>CK19*</b>       | positiv       | 2              | 3               |
|                    | negativ       | 2              | 1               |
| <b>CK7*</b>        | positiv       | 1              | 2               |
|                    | negativ       | 2              | 1               |
| <b>EMA*</b>        | positiv       | *              | 4**             |
|                    | negativ       |                | 1               |
| <b>Alcian PAS*</b> | positiv       | *              | 1               |
|                    | negativ       |                | 4               |
| <b>LFABP*</b>      | positiv       | 3              | 1               |
|                    | negativ       | 0              | 2               |
| <b>TROP2*</b>      | positiv       | 1              | 3               |
|                    | negativ       | 2              | 0               |

\* Daten unvollständig

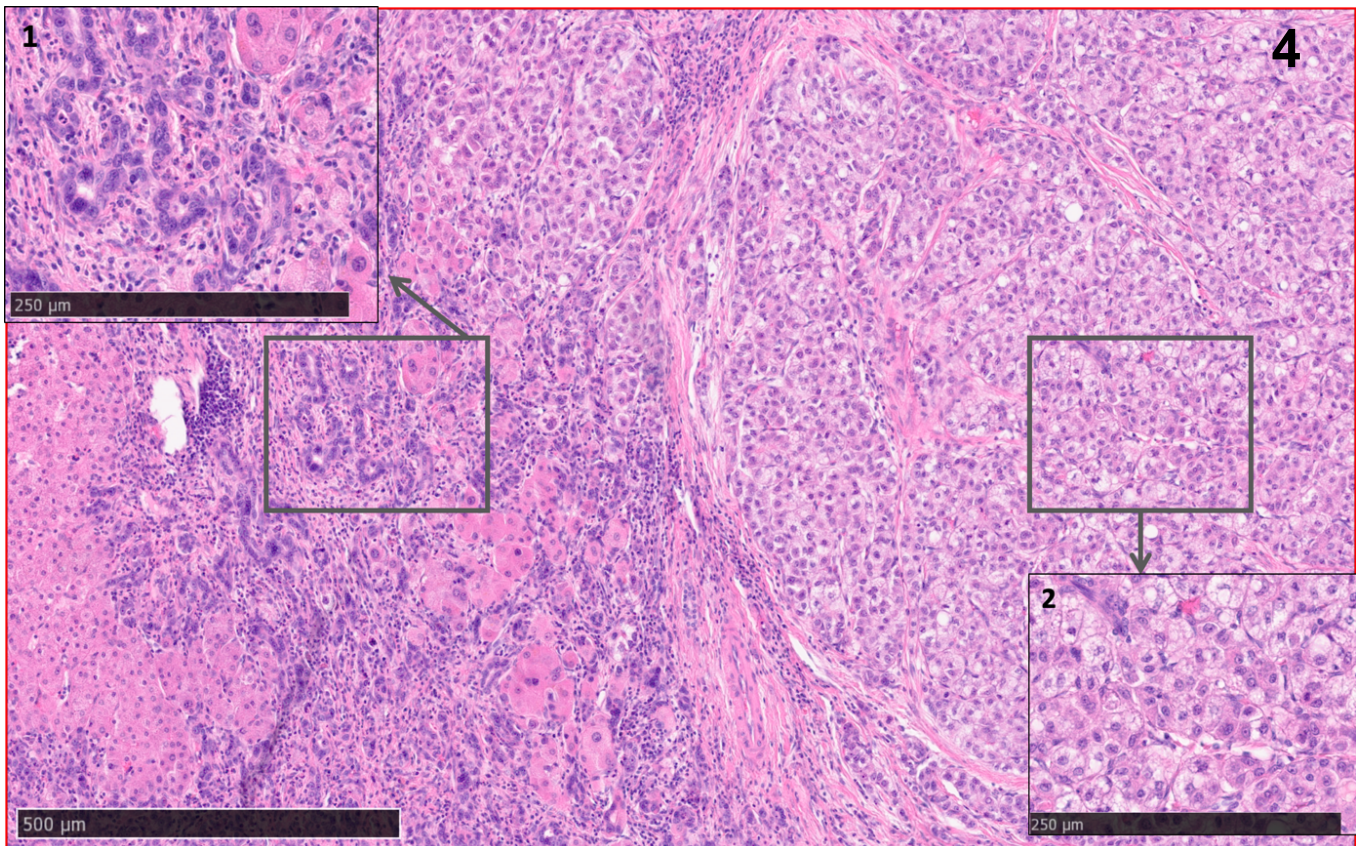
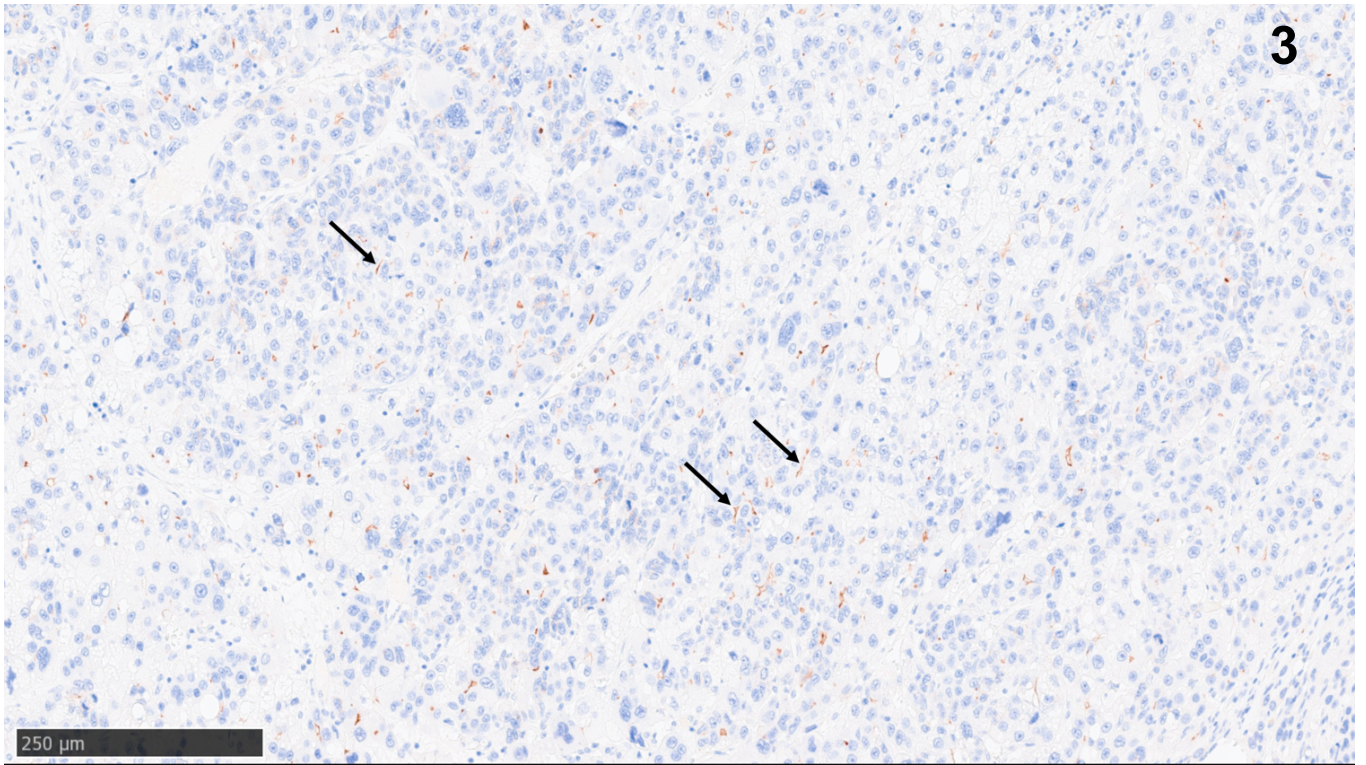
\*\* positiv im Sinne eines für small-duct“ Typ iCCAs typischen Färbemusters



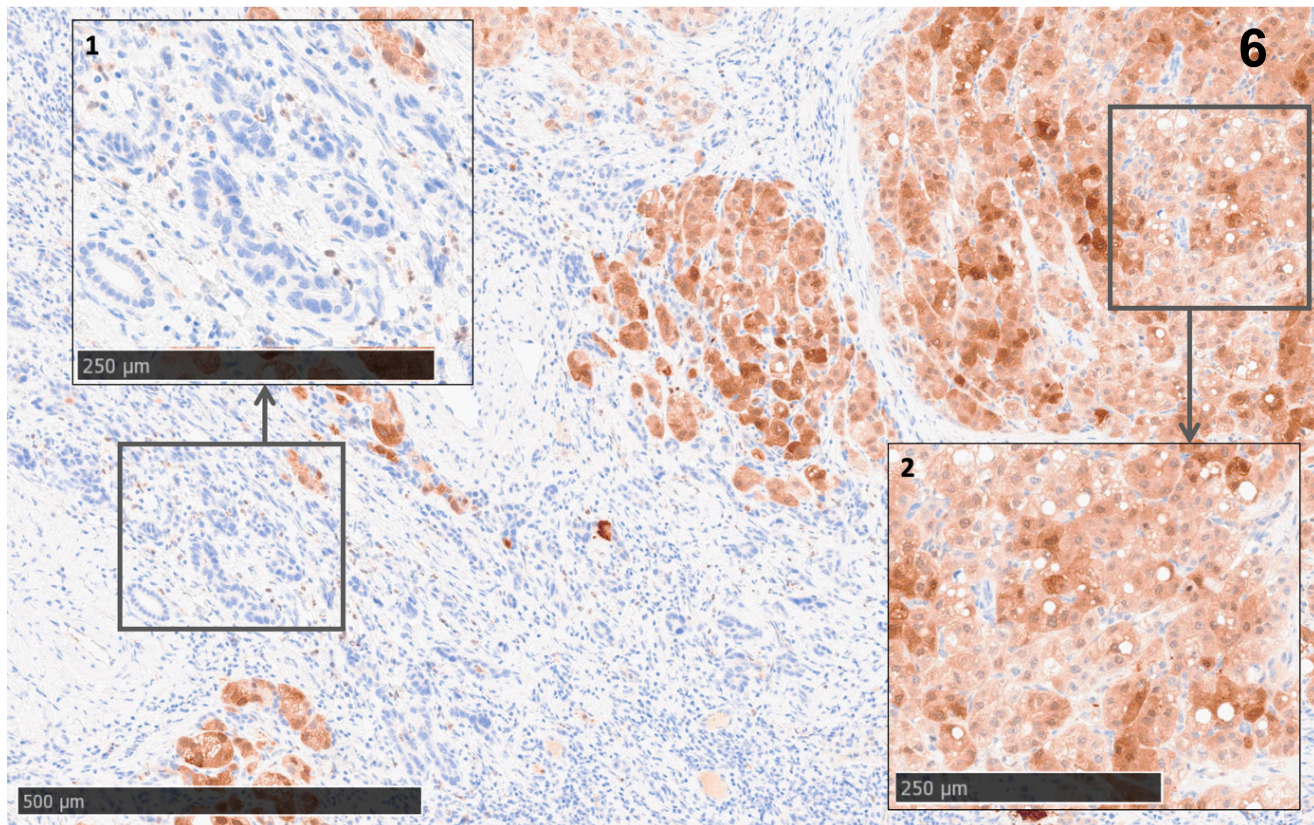
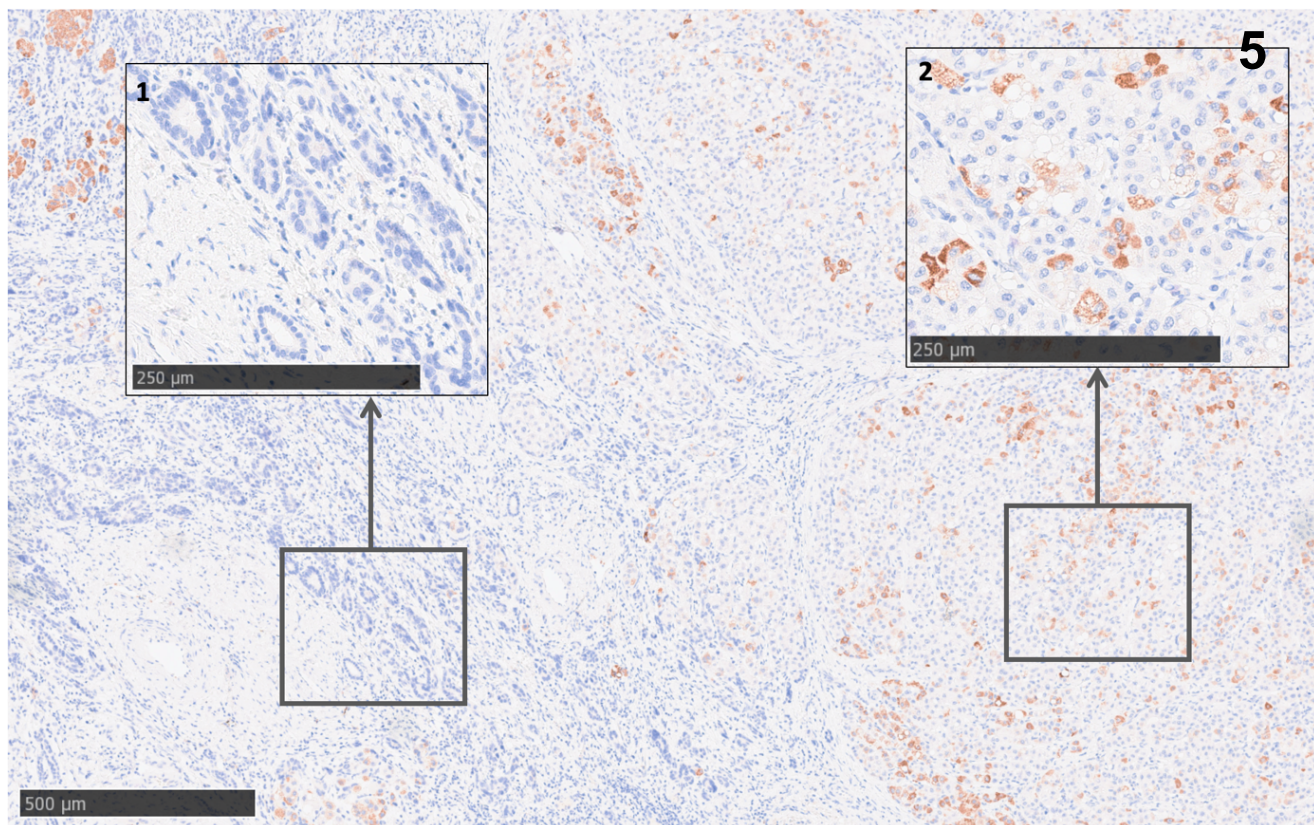
#### 4.2.8. Bilderkatalog



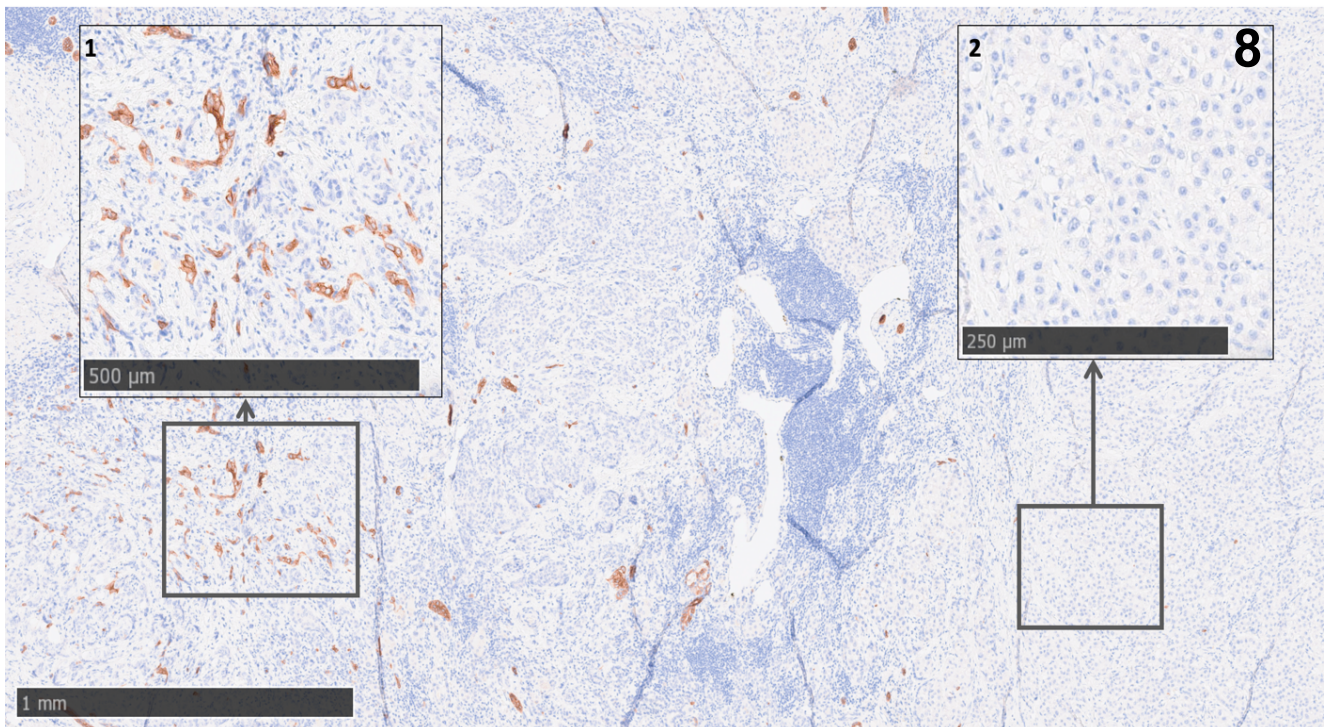
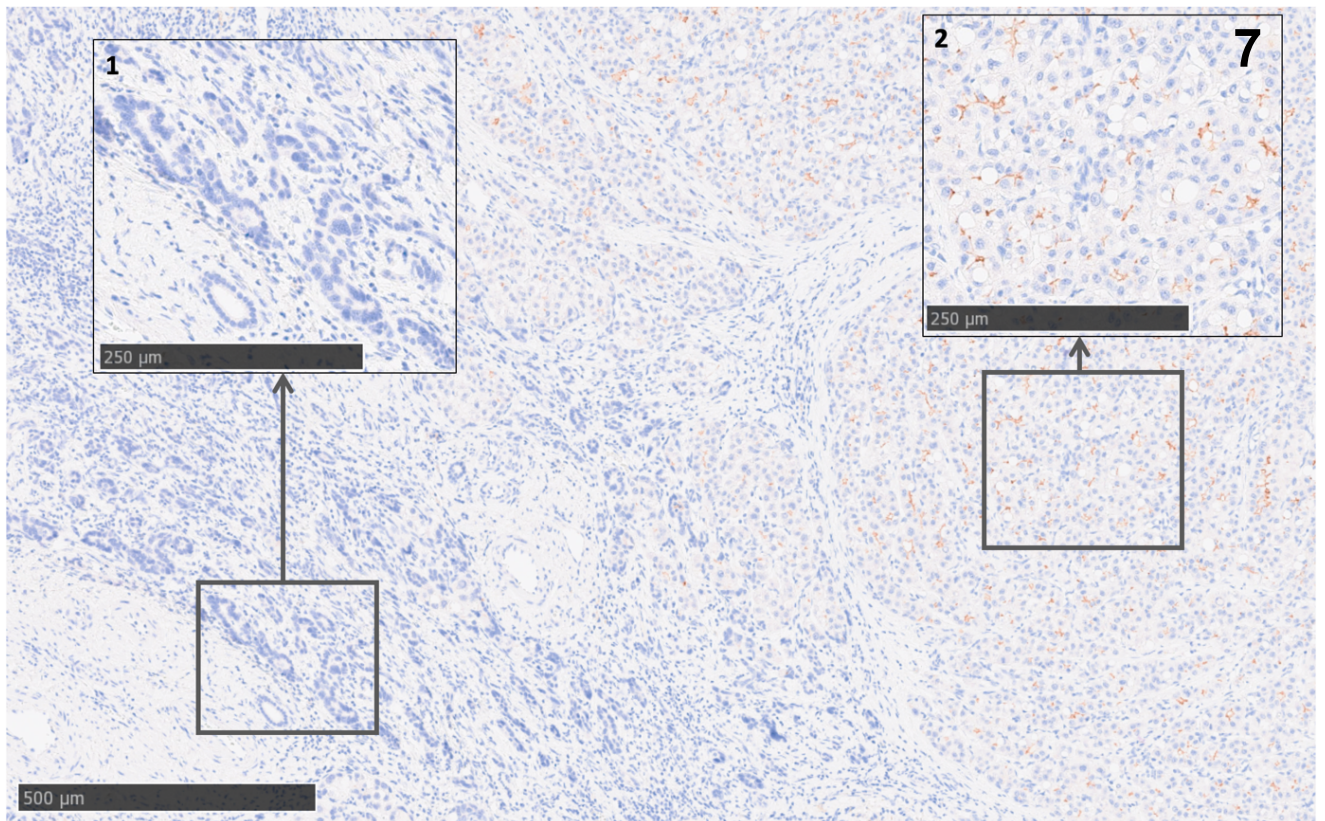




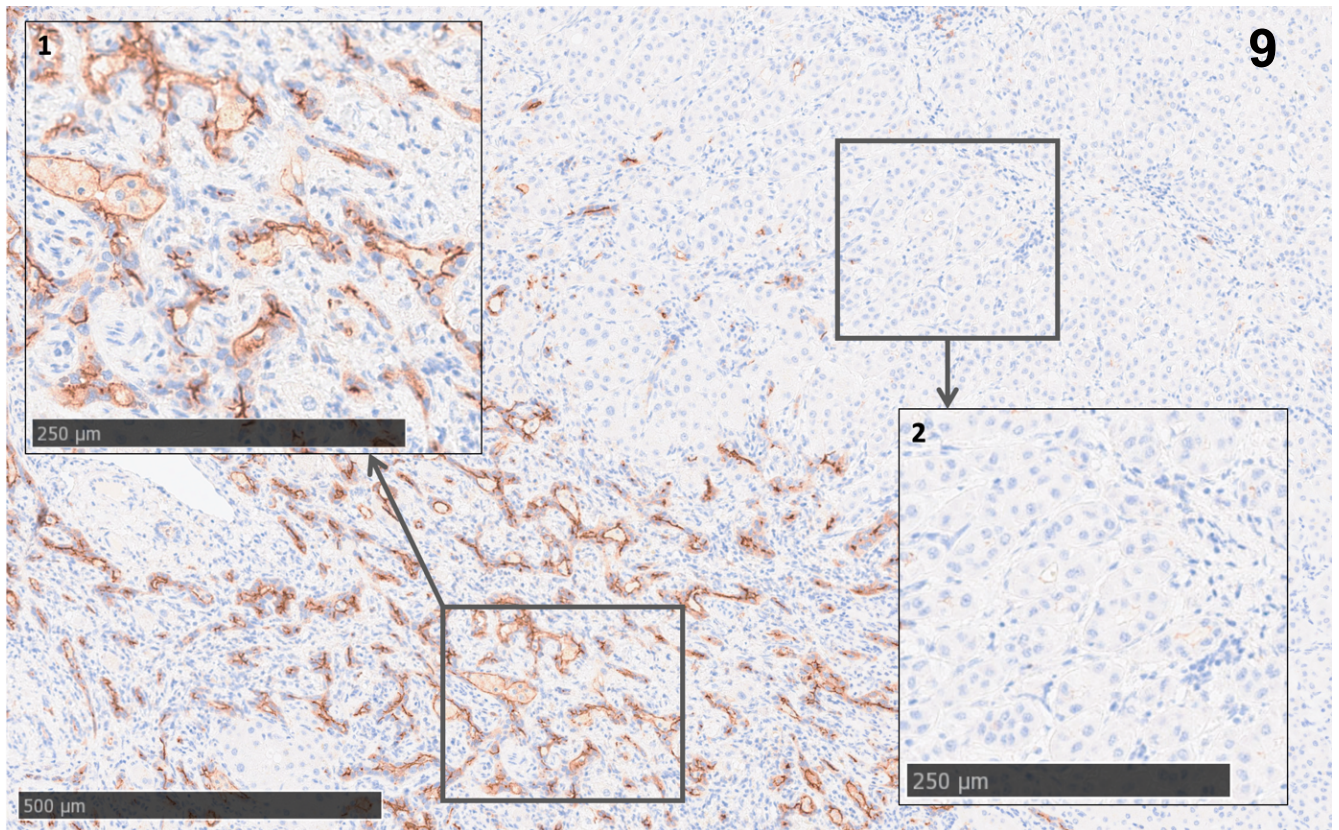












**Abbildungen 1-9** Schlecht differenzierte PLCs. **(1)** HCC in HE Färbung. **(2)** iCCA des „small-duct“ Typs in HE Färbung mit glandulär ähnelnden Strukturen (schwarze Pfeile). **(3)** Kanalikuläres Farbmuster von EMA (schwarze Pfeile) in HCC. **(4)** HE Färbung eines cHCC-CCA, linke Bildhälfte cholangiozelluläre Komponente (Vergrößerung 1), rechte Bildhälfte hepatozelluläre Komponente (Vergrößerung 2). **(5)** HepPar1 Immunhistochemie eines cHCC-CCA, negative Reaktivität in cholangiozellulärer Komponente (Vergrößerung 1), positive Reaktivität in hepatozellulärer Komponente (Vergrößerung 2).

**(6)** Arginase1 Immunhistochemie eines cHCC-CCA, negative Reaktivität in cholangiozellulärer Komponente (Vergrößerung 1), positive Reaktivität in hepatozellulärer Komponente (Vergrößerung 2). **(7)** ABCB11 Immunhistochemie eines cHCC-CCA, negative Reaktivität in cholangiozellulärer Komponente (Vergrößerung 1), kanalikuläres Färbemuster in hepatozellulärer Komponente (Vergrößerung 2). **(8)** CK19 Immunhistochemie eines cHCC-CCA, positive Reaktivität in CCC-Komponente (Vergrößerung 1), negative Reaktivität in HCC-Komponente (Vergrößerung 2). **(9)** Typische apikal betonte EMA Immunhistochemie (Vergrößerung 1) in „small-duct“ Typ iCCA Komponente eines cHCC-CCA, negative Reaktivität in HCC-Komponente (Vergrößerung 2).

## 5. Diskussion

Die PLCs umfassen eine Gruppe verschiedener primärer Karzinome der Leber mit den folgenden Tumorentitäten: HCC, „small-duct“ Typ iCCA, „large-duct“ Typ iCCA, cHCC-CCA, intermediäres Zellkarzinom, sowie das Hepatoblastom und das undifferenzierte Karzinom. Traditionell werden das HCC und das CCC als stark voneinander getrennte und unabhängige Tumorentitäten betrachtet. Das Vorhandensein von Mischtypen wie dem cHCC-CCA und dem intermediären Zellkarzinom führte zu der Erkenntnis, dass die Tumorzellen möglicherweise aus hepatischen Stammzellen hervorgehen können, die sich in eine biliäre oder hepatische Differenzierung entwickeln. Damit wird aktuell von einem Spektrum der PLCs ausgegangen, wobei fließende Übergänge nicht mehr auszuschließen sind.<sup>2</sup>

Diese Kontinuität macht verständlich, dass insbesondere schlecht differenzierte PLCs bei der klinischen als auch pathologischen Diagnostik zu Schwierigkeiten führen. Da Prognose und Therapie der verschiedenen primären Lebertumore sich jedoch stark voneinander unterscheiden, ist die Etablierung eines Prozederes zur sicheren Differenzierung entscheidend.<sup>2</sup>

Die Pathologie repräsentiert einen wichtigen Baustein in der Diagnostik von Tumor-Präparaten. Dabei ist die Immunhistochemie ein wesentlicher Bestandteil. Durch sie können wichtige, weiterführende Informationen gewonnen werden, welche wegweisend und u.a. beweisend für eine Diagnose sein können.<sup>3</sup>

Im Rahmen dieses Projekts wurden unterschiedliche Marker auf ihre Korrelation zu den verschiedenen PLCs untersucht; mit dem Ziel der Etablierung eines Markerpanels, zur Untermauerung einer gestellten Verdachtsdiagnose.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung werden im Folgenden in Anbetracht der Literatur diskutiert, wobei der Fokus auf die jeweils stärksten Marker gelegt wird.

### 5.1. Interpretation der Ergebnisse für das Hepatozelluläre Karzinom

#### 5.1.1. Interpretation der Ergebnisse zu HepPar1 und Arginase1

Als klassisch-hepatozellulärer Marker zählt HepPar1 im Rahmen immunhistologischer Untersuchungen von Lebertumoren zum angewandten Routinepanel.<sup>99</sup> Jedoch nennt die Literatur die verminderte Aussagekraft von HepPar1 bei schlecht differenzierten Tumoren.<sup>100</sup> Deshalb wurden weitere Marker der hepatozellulären Differenzierung, wie beispielsweise Arginase1, untersucht.<sup>101</sup> Arginase1 wurde hierbei nicht nur additiv, sondern auch im direkten Vergleich zu HepPar1 analysiert, wobei kontroverse Ergebnisse diskutiert werden: In der aktuellen WHO Klassifikation wird Arginase1 als überlegener Marker gegenüber HepPar1 bei der Identifikation schlecht differenzierter HCCs angeführt.<sup>5</sup> Die Untersuchungen von Atta et al.<sup>100</sup> offenbaren eine ebenso höhere Positivitätsrate von Arginase1 (88,7%) gegenüber

HepPar1 (74,19%), beziehen sich jedoch auf Daten zu HCCs im Allgemeinen. Die im anschließenden Textverlauf näher beschriebenen schlecht differenzierten HCCs weisen im Konträr eine höhere Positivitätsrate für HepPar1 (57,14%; für Arginase1 42,85%) auf.<sup>100</sup> Timek et al.<sup>79</sup> dokumentieren Arginase1 als den spezifischsten Antikörper in der Abgrenzung des HCCs gegenüber anderen Tumorentitäten. Wang et al.<sup>101</sup> beschreiben eine minimal höhere Positivitätsrate von HepPar1 (78,72%) gegenüber Arginase1 (76,60%) in ihren Ergebnissen.<sup>101</sup> Eine weitere Publikation berichtet von gegensätzlichen Resultaten (96,1% der untersuchten HCC-Präparate wiesen eine positive Immunhistochemie für Arginase1 auf, 80,7% für HepPar1).<sup>102</sup>

Die von uns erhobenen Daten bestätigen die hohe Sensitivität von Arginase1 und HepPar1 in HCCs, wobei beide Marker zu identischen Ergebnissen führen: Beide Marker wiesen bei 100% der Tumorentität HCC zugehörigen Präparate eine positive Immunhistochemie auf. Mit einem Kontingenzkoeffizienten von jeweils 0,707 bei  $p < 0,001$  haben Arginase1 und HepPar1 beide eine starke Korrelation zu diesem PLC-Subtypen. Unter allen in dieser Arbeit analysierten Markern zeigten HepPar1 und Arginase1 außerdem die stärkste Korrelation zur Tumorentität HCC und eignen sich dementsprechend, laut unseren Ergebnissen, am ehesten zur Bestätigung dieser Verdachtsdiagnose und Abgrenzung zu ICCAs. Dies kongruiert mit den Erkenntnissen von Wang et al.<sup>101</sup>

### **5.1.2. Interpretation der Ergebnisse zur Marker-Kombination HepPar1 und CK19**

Als ebenso starke Kombination hat sich in unserem Kollektiv die Marker-Kombination HepPar1 und CK19 in der Identifikation schlecht differenzierter HCCs gezeigt: Die Kombination einer positiven Immunhistochemie für HepPar1 mit einer simultan negativen Immunhistochemie für CK19 weist einen hohen Korrelationskoeffizienten (0,707) mit dieser Tumorentität auf. Da HepPar1 einen sehr hohen Kontingenzkoeffizienten zu HCCs aufweist und CK19 einem Zytokeratin entspricht, welches von normalem Gallengangsepithel exprimiert wird und dementsprechend zu den immunhistochemischen Markern der cholangiozellulären Differenzierung zählt<sup>71</sup>, ist dieses Resultat nicht überraschend. Jedoch sei an dieser Stelle das Zytokeratin 19-positive HCC erwähnt, bei welchem  $\geq 5\%$  der Tumorzellen eine CK19-positive Immunhistochemie aufweisen.<sup>34</sup>

Die immunhistochemische Untersuchung des Zytokeratin 19-positiven HCC repräsentiert einen interessanten Ansatz. Das CK19+ HCC stellt einen wesentlich aggressiveren Tumor als das klassische HCC dar, welcher mit einer höheren Mortalität, schlechteren Prognose und früheren Rezidiven einhergeht.<sup>8</sup> Diese besondere immunhistochemische Konstellation kann zu Fehldiagnosen führen und wird auch als Hinweis auf die sogenannte Stammzelltheorie gesehen.

### 5.1.3. Interpretation der Ergebnisse zu EMA

Das Zytokeratin EMA (Syn.: MUC1) wird von unterschiedlichen Epithelzellen exprimiert, im gesunden Lebergewebe jedoch nur von Cholangiozyten – Hepatozyten sind konsistent negativ für diesen Marker.<sup>90</sup> Dementsprechend liegt der Gedanke nahe, das Vorhandensein von EMA innerhalb eines PLCs auf einen cholangiozellulären Ursprung zurückzuschließen und somit die Diagnose HCC als unwahrscheinlich zu behaupten. Jedoch listet die Literatur unterschiedliche Ergebnisse zum Färbeverhalten des zugehörigen Antikörpers bei HCCs auf: Während Sasaki et al.<sup>103</sup> das Vorkommen des *MUC1 core protein* in Zellen hepatozellulärer Karzinome verneinen und dagegen in ICCAs bestätigen, beschreiben Cao et al.<sup>104</sup> in ihrer Arbeit die auffällig positive Immunhistochemie von EMA in HCCs, welche laut Kim et al.<sup>105</sup> sogar als negativ-prognostischer Faktor dient. Die von uns erhobenen Daten zeigen eine überwiegend negative Immunhistochemie von EMA bei gering differenzierten hepatozellulären Karzinomen, mit Ausnahme des bei einigen Präparaten sichtbaren kanalikulären Färbemusters. Wie bereits in Unterpunkt 3.2.2.2. erläutert, wurden diese zwei von uns festgestellten Farbverhalten in der Variable „für HCC mögliche Färbemuster“ kombiniert, welche mit einem CC = 0,683 eine starke Korrelation zu dieser Tumorentität zeigt. Somit spricht laut unseren Ergebnissen ein negatives oder kanalikuläres Färbemuster von EMA deutlich für das HCC und hilft somit bei dessen diagnostischer Abgrenzung gegenüber anderer PLCs, welche in unserem Kollektiv hauptsächlich ein zytoplasmatisches oder apikales Färbemuster aufwiesen. In direkter Gegenüberstellung hierzu beschreiben Kim et al.<sup>105</sup> ein zytoplasmatisches und/oder membranöses Färbemuster von EMA in HCCs, weitere Literatur schildert es als überwiegend membranös.<sup>106</sup> Zusammenfassend bietet die Literatur unterschiedliche Aussagen zum Farbverhalten des Markers EMA in HCCs, wobei Yuan et al.<sup>106</sup> sogar von einer Tumorentität-unabhängigen Expression des MUC1-Gens bei PLCs in ihren Ergebnissen berichten; diese hänge im Konträr vom Differenzierungsgrad der Neoplasie ab, nicht ihrer Entität.<sup>106</sup> Da wir uns im Rahmen dieses Projektes auf schlecht-differenzierte Tumore konzentriert und ausschließlich diese in unsere Auswertung eingeschlossen haben, können wir zur o.g. Erkenntnis keinen Vergleich bieten. Jedoch könnten die diversen Ergebnisse und Aussagen zum Farbverhalten von EMA in HCCs daraufhin deuten, dass die verschiedenen Tumorentitäten als nicht streng voneinander abzugrenzende Einheiten zu betrachten sind, sondern als Teil eines Spektrums mit sich überlappenden Eigenschaften und fließenden Übergängen.<sup>2</sup>

Expression und Lokalisation von EMA korrelieren nach der Literatur mit der Prognose der PLCs<sup>105,106</sup> und können bereits an Biopsie-Präparaten<sup>106</sup> durchgeführt werden. Somit stellt die Immunhistochemie von EMA ein in der klinischen Praxis niederschwelliges Verfahren zur Identifikation der PLCs dar.

#### 5.1.4. Interpretation der Ergebnisse zu LFABP

Mit einem CC in Höhe von 0,682 besitzt LFABP nach HepPar1 (bzw. Arginase1) und EMA die dritt-höchste Korrelation für das Hepatozelluläre Karzinom unter den hier untersuchten Antikörpern. Alle 19 (100%) HCCs exprimieren LFABP. Demnach kongruieren unsere Ergebnisse mit bereits durchgeführten Untersuchungen zum Farbverhalten von LFABP in hepatozellulären Karzinomen: Im Rahmen des wissenschaftlichen Artikels *FABP1 expression in human tumors: a tissue microarray study on 17,071 tumors*<sup>94</sup> haben Dum et al. 150 verschiedene Tumorarten auf ihre jeweilige immunhistochemische Expression von LFABP (Syn.: FABP1) analysiert. Mit einer Positivitätsrate von 65,3% befand sich das HCC unter den malignen Neoplasien mit der höchsten FABP1-Frequenz, wobei das durch Dum et al.<sup>94</sup> beispielweise gegenübergestellte CCC eine 3-fach geringere Positivitätsrate von 21,6% aufwies. Auch diese Tendenz lässt sich aus unseren Ergebnissen erschließen: LFABP zeigt eine mittlere Korrelation (CC = 0,540 für „small-duct“ Typ iCCAs und CC = 0,461 für „large-duct“ Typ iCCAs) für eine *negative* Immunhistochemie und somit eine deutlich geringere Positivitätsrate bei den hier analysierten iCCAs.

LFABP repräsentiert somit einen bedeutenden Marker in der Unterscheidung schlecht differenzierter PLCs. Insbesondere die kombinierte Interpretation des Färbeverhaltens mit anderen Markern (HepPar1 oder Arginase1) kann die Diagnose „Hepatozelluläres Karzinom“ unterstützen. Da LFABP nicht HCC-spezifisch ist, unterstützt seine Immunhistochemie zwar die Abgrenzung der PLCs untereinander, jedoch nicht die Unterscheidung eines HCCs zu anderen Raumforderung innerhalb des Leberparenchyms (z.B. Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt): 71,1% der kolorektalen Adenokarzinome weisen eine positive Immunhistochemie für LFABP auf.<sup>94</sup> Dieses Beispiel illustriert die Schwächen der Immunhistochemie und zugleich die Relevanz der Kombination unterschiedlicher diagnostischer Verfahren zur korrekten Bestimmung einer Tumorentität.

Weiters verdeutlicht es den Bedarf eines aus mehreren Antikörpern bestehenden Panels zur korrekten Bestimmung einer Tumorentität. Unsere Ergebnisse zeigen beispielsweise eine Erhöhung der Korrelationsstärke zu HCCs von CC = 0,682 bei alleiniger Auswertung von LFABP auf CC = 0,683 bei vereinter immunhistochemischer Analyse mit dem cholangiozellulären Marker CK19.

### 5.2. Interpretation der Ergebnisse für das intrahepatische „small-duct“ Typ Cholangiokarzinom

#### 5.2.1. Interpretation der Ergebnisse zu HepPar1 und Arginase1

In der Literatur wird die immunhistochemische Potenz und der Nutzen verschiedenster Antikörper im Rahmen der Diagnostik von primären Leberkarzinomen kontrovers diskutiert.

Die klassischen hepatozellulären Differenzierungsmarker HepPar1 und Arginase1<sup>101</sup> wurden nicht in den „small-duct“ Typ iCCAs exprimiert: Mit einem jeweiligen Kontingenzkoeffizienten in Höhe von  $CC = 0,612$  besitzt die negative Immunoreaktivität von HepPar1 und Arginase1 die höchste Korrelation zur Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA unter den hier untersuchten Markern. Unsere Beobachtungen sind somit konkordant mit den Resultaten von Timek et al.<sup>79</sup>, welche in ihrem Subkollektiv ein ebenso rein negativ-immunhistochemisches Farbverhalten für HepPar1 und Arginase1 beschreiben. Auch Fujiwara et al.<sup>80</sup> berichten von negativer Immunoreaktivität der beiden Antikörper in allen CCC-Präparaten. Ebenso listen Krings et al.<sup>74</sup> 16/16 für Arginase1 negative iCCAs, führen jedoch interessanterweise 1/16 für HepPar1 positives iCCA an. Genauso beschreiben auch Radwan & Ahmed<sup>107</sup> einen für Arginase1 und zwei für HepPar1 positive Fälle in ihrem aus 12 cholangiozellulären Karzinomen bestehenden Subkollektiv. Shiran et al.<sup>108</sup> deklarieren solch vereinzelt positiven Nachweise als nicht überraschend und führen erklärend die Abstammung der unterschiedlichen Tumorentitäten aus einer gemeinsamen Progenitorzelle an.<sup>7,109</sup>

Keines der untersuchten „large-duct“ Typ iCCAs wies eine positive Immunhistochemie für HepPar1 und Arginase1 auf. Somit besteht kein Unterschied im Farbverhalten der 2 Marker unter den iCCA-Subtypen. Die niedrigeren Kontingenzkoeffizienten von jeweils  $CC = 0,377$  (im Gegensatz zu o.g.  $CC = 0,612$  bei „small-duct“ Typ iCCAs) sind den unterschiedlich großen Kollektiven (11 „small-duct“ und 4 „large-duct“ Typ iCCA) und deren rechnerischer Gegenüberstellung zum Rest des Gesamtkollektivs (cf. Tabelle 9) geschuldet. Somit kann nicht von einer *wahren* stärkeren Korrelation zwischen negativer Immunhistochemie von HepPar1 und/oder Arginase1 und „small-duct“ Typ iCCAs als zu „large-duct“ Typ iCCAs ausgegangen werden. Die beiden Antikörper eignen sich nach unseren Ergebnissen dementsprechend nicht zur Abgrenzung der beiden Subtypen untereinander, da ihr negatives Farbverhalten bei 100% der Fälle beider Kollektive beobachtet werden kann. Folglich sind HepPar1 und Arginase1 in unsere Studie, sowie in diversen anderen Studien (Timek et al.<sup>79</sup>, Wang et al.<sup>101</sup>), potente Marker in der Unterscheidung von HCCs und iCCAs.

### **5.2.2. Interpretation der Ergebnisse zu Kondition 3: „≥ 1 klassischer iCCA**

#### **Marker ist positiv und alle klassischen HCC-Marker sind negativ“**

Die Tumorentität „small-duct Typ“ iCCA zeigte mit einem Kontingenzkoeffizienten in Höhe von  $CC = 0,547$  die stärkste Korrelation zu Kondition 3 (im Vergleich zu Kondition 1 bei einem  $CC = 0,453$  und Kondition 2 bei einem  $CC = 0,536$ ). Zusätzlich behauptete sich Kondition 3 unter allen in Relation zu dieser Tumorentität auf ihre Korrelationsstärke untersuchten Variablen (welche alleinstehende Marker, Marker-Kombinationen und -Konditionen umfassen) als – direkt nach o.g. HepPar1 und Arginase1 – zweitstärkste Variable zur Unterstützung der Diagnose „small-duct“ Typ iCCA. Jedoch sei an dieser Stelle die Korrelationshöhe zwischen

Kondition 3 und der Tumorentität HCC angemerkt, welche mit einem CC = 0,636 der zum „small-duct“ Typ iCCA überliegt. Eine erfüllte Kondition 3 eignet sich somit laut unseren Ergebnissen eher zum Ausschluss eines HCCs als zur Bestätigung des „small-duct“ Typ iCCAs. Ein Vergleich zur Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA kann an dieser Stelle nicht gezogen werden, da bei  $p > 0,05$  kein statistisch signifikantes Ergebnis vorlag; hier bedarf es weiterer Untersuchungen an größeren Kollektiven.

### 5.2.3. Interpretation der Ergebnisse zu ABCB11

ABCB11 ist hochspezifisch für Hepatozyten, seine positive Immunoreaktivität indiziert eine hepatozelluläre Differenzierung und repräsentiert laut Literatur einen der bedeutendsten Marker in der Diskriminierung der unterschiedlichen PLCs.<sup>77,110</sup>

Im Rahmen ihrer Studie haben Lagana et al.<sup>110</sup> die immunhistochemischen Ergebnisse des Markers ABCB11 von u.a. 48 HCCs und 41 intrahepatischen Cholangiokarzinomen verglichen: Während 43/48 (90%) der HCCs sich immunoreaktiv für ABCB11 zeigten, war keines der 41 iCCAs positiv für diesen Marker. Auch Fujikura et al.<sup>77</sup> stellen in ihren Resultaten 49/54 (91%) für ABCB11 positive HCCs den 34/34 für diesen Antikörper ausschließlich negativen iCCAs gegenüber. Diese Erkenntnis spiegelt sich in unseren Ergebnissen wider: Keines der 11 untersuchten „small-duct“ Typ iCCAs weist eine positive Immunhistochemie für diesen Marker auf. Mit einem CC = 0,546 besitzt ABCB11 – im Sinne eines negativen Farbverhaltens – die drittstärkste Korrelation zur Tumorentität „small-duct“ Typ iCCA. Laut unseren Ergebnissen schließt ein positives Farbverhalten von ABCB11 dementsprechend zuletzt genannte Tumorentität aus. Jedoch zeigten 3/19 (ca. 16%) der hier auf ABCB11 untersuchten schlecht differenzierten HCCs eine ebenso negative Immunhistochemie auf; Lagana et al.<sup>110</sup> und Fujikura et al.<sup>77</sup> beschreiben beide jeweils 5 für ABCB11 negative hepatozelluläre Karzinome in ihren Kollektiven, wobei dies insbesondere bei schlecht differenzierten Tumoren der Fall ist (22% bzw. 24% der schlecht differenzierten HCCs im Vergleich zu 8% bzw. 0% der gut bis moderat differenzierten HCCs waren negativ für ABCB11). Die negative Immunhistochemie von ABCB11 ist also kein Alleinstellungsmerkmal von schlecht differenzierten „small duct“ Typ iCCAs.

Zuletzt sei die herausfordernde und für das geschulte Auge bestimmte Unterscheidung von kanalikulärem (positive Immunhistochemie) und membranösem Färbemuster (negative Immunhistochemie)<sup>110</sup> erwähnt, welche eine mögliche Limitation des Markers ABCB11 in der Routinediagnostik darstellen kann.

#### 5.2.4. Interpretation der Ergebnisse zu EMA „für SDT typisches Färbemuster“

EMA gehört zu den Zytokeratinen und wird von vielen Epithelzellen exprimiert. Im normalen Lebergewebe wird EMA nur von Cholangiozyten exprimiert, Hepatozyten sind konsistent negativ für diesen Marker.<sup>90</sup> Somit weist eine positive Immunhistochemie von EMA auf eine cholangiozelluläre Differenzierung hin, wobei sich das Färbemuster von „large-duct“ Typ iCCAs (ganzes Zytoplasma) und „small-duct“ Typ iCCAs (apikales Zytoplasma) unterscheidet. Dies spiegelt die bereits erläuterte Heterogenität der Cholangiozyten wider, aus welchen die 2 verschiedenen iCCA Subtypen hervorgehen.<sup>41</sup>

Mit einem Kontingenzkoeffizienten von  $CC = 0,539$  weist EMA unter der Bedingung „für „small-duct“ Typ iCCA klassisches Färbemuster“ eine der stärksten Korrelationen der hier untersuchten Marker für die Entität „small-duct“ Typ iCCA auf. Blickt man jedoch auf die absoluten Zahlen (cf. Tab. 14, S. 36 ), hatten lediglich 4 von 7 der auf EMA untersuchten „small-duct“ Typ iCCAs ein für diese Tumorentität klassisches Farbverhalten. Die 3 restlichen Präparate erfüllten dieses Kriterium nicht, da sie beispielsweise ein dem „large-duct“ Typ iCCA ähnelndes Farbverhalten hatten (ohne diesem zu 100% zu entsprechen) oder sich das Farbverhalten in Tumorzentrum und -peripherie stark unterschied (ohne beispielsweise einem cHCC-CCA zu entsprechen). Die Ursache dieser Differenz konnten wir nicht eruieren. Auch Gerber et al.<sup>111</sup>, welche im Rahmen ihrer Arbeit 148 „small-duct“ Typ iCCAs und 84 „large-duct“ Typ iCCAs immunhistochemisch auf unterschiedliche Marker analysiert haben, beschreiben ein variables Farbverhalten von EMA bei „small-duct“ Typ iCCAs: 4% zeigten eine schwache, 39% eine moderate und 56% eine starke Färbung von EMA. Im weiteren Textverlauf wird sogar eine *negative* Immunhistochemie für EMA als mögliches Ereignis für „small-duct“ Typ iCCAs genannt. Ebenso führen Gerber et al.<sup>111</sup> in ihren Resultaten an, dass keiner der von ihnen untersuchten Antikörper (inkl. EMA) die Unterscheidung zwischen den 2 iCCA-Subtypen *alleine* ermöglichte, sondern nur in *Kombination* miteinander. Dieses Erkenntnis unterstreicht erneut den Bedarf eines aus mehreren Antikörpern bestehenden Panels zur korrekten Bestimmung der Tumorentität. Als weitere Limitation sei die Expertise voraussetzende Auswertung von EMA genannt, welche – analog zu ABCB11 – für das geschulte Auge bestimmt ist und dementsprechend einen limitierenden Faktor von EMA als Teil der Routinediagnostik darstellen kann.

#### 5.3. Interpretation der Ergebnisse für das intrahepatische „large-duct“ Typ Cholangiokarzinom

Seit der im Jahre 2019 publizierten WHO Klassifikation zu Tumoren des Gastrointestinaltraktes wird das intrahepatische Cholangiokarzinom anhand morphologischer, immunhistochemischer, anatomischer und genetischer Aspekte in 2 Subtypen unterteilt: Das



„small-duct“ und „large-duct“ Typ iCCA.<sup>5</sup> Die richtige Zuordnung eines entnommenen Tumorpräparates oder -biopsates ist essentiell, da 70% der Patient:innen sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem bereits inoperablen Stadium befinden<sup>112</sup> und es dementsprechend systemischer Therapien bedarf. Aufgrund unterschiedlich zugrundeliegender genetischer Mutationsprofile zwischen den zwei Subtypen gestaltet sich die Therapie, u.a. anhand zielgerichteter Therapie (engl. „targeted therapies“), unterschiedlich: „Small-duct“ Typ iCCAs liegen beispielsweise eine FGFR2-Translokation oder eine IDH1/2-Mutation zugrunde, während „large-duct“ Typ iCCAs genetisch eher perihilären und distaler gelegenen Cholangiokarzinomen ähneln und somit Mutationen in KRAS-, TP53- und SMAD4-Genen aufweisen.<sup>113,114</sup> Zusätzlich weisen „large-duct“ Typ iCCAs häufig Resistenzen gegenüber gängiger Radiotherapie oder Chemotherapie mit Gemcitabine oder FOLFIRINOX auf.<sup>115</sup>

Allein die unterschiedlichen Therapieansätze der beiden Subtypen untermauern die Relevanz der korrekten Diagnosestellung. Jedoch ermöglichen gängige Verfahren wie die einfache Auswertung von H&E Präparaten, insb. im Falle schlecht differenzierter Karzinome, keine eindeutige Zuordnung; Li et al.<sup>112</sup> berichten von 31.2% nicht zuordbaren Fällen (anhand alleiniger H&E Färbung). Dank der Hinzunahme immunhistochemischer Verfahren konnte die Zuordnungsrate in „small-duct“ Typ iCCAs und „large-duct“ Typ iCCAs jedoch von 67.9% auf 92.6% gesteigert werden. Diese wegweisende Studie unterstreicht die Relevanz immunhistochemischer Verfahren in der Untersuchung von iCCAs bzw. PLCs und plädiert für die Standardisierung von immunhistochemischen Panelanalysen als Teil der Routinediagnostik.

Die Untersuchung immunhistochemischer Verfahren zur Unterscheidung der zwei Subtypen war ebenso Teil dieses Projektes. Die drei höchsten Korrelationen zur Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA – und somit u.a. höchste Diskriminationsstärke zum „small-duct“ Typ iCCA – hatten die Marker EMA (unter der Bedingung „für „large-duct“ Typ iCCA typisches Färbemuster“), Alcian PAS und die Marker-Kombination LFABP und CK19 mit den jeweiligen Kontingenzkoeffizienten CC von 0,707, 0,648 und 0,487.

Jedoch sei an dieser Stelle auf die geringe Anzahl an „large-duct“ Typ iCCAs hingewiesen (n = 4), welche in unsere Untersuchungen eingeflossen ist. Diese geringe Größe stellt eine bedeutende Limitation unserer Studie dar, sodass unsere Auswertungen und anschließend errechneten Korrelationen primär als Ansatzpunkt für weitere, an größeren Kollektiven durchzuführende Immunhistochemie dienen.

### **5.3.1. Interpretation der Ergebnisse zu EMA „für LDT typisches Färbemuster“**

Mit einem CC = 0,707 besitzt der Antikörper EMA unter der Bedingung „für „large-duct“ Typ iCCA typisches Färbemuster“ die stärkste Korrelation zu dieser Tumorentität. Alle „large-

duct“ Typ iCCAs waren positiv für dieses Färbemuster. Auch Li et al.<sup>112</sup> beschreiben dieses Farbverhalten. Laut unserer Ergebnisse bestätigt somit die zytoplasmatische Anfärbung der Tumorzellen die Diagnose des „large-duct“ Typ iCCA und schließt diese vice versa aus. Dies sei den Ergebnissen zum Farbverhalten von EMA beim „small-duct“ Typ iCCA gegenüber gestellt: Hier zeigten 4/11 Präparaten *kein* für diesen Subtypen klassisches Färbemuster. Somit ist die Diskriminierungsstärke von EMA bei „large-duct“ Typ iCCAs der „small-duct“ Typ iCCAs überlegen und unterstützt die Unterscheidung von „large-duct“ Typ iCCAs gegenüber den restlichen PLCs.

Die unterschiedlichen Färbemuster (ganzes Zytoplasma oder nur apikales Zytoplasma) von EMA spiegeln die Heterogenität der Cholangiozyten wider, aus welchem die beiden Subtypen des iCCAs entstehen: „Small-duct“ Typ iCCAs gehen aus Muzin-negativen, kuboidalen Cholangiozyten der kleinen Gallengänge aus, während „large-duct“ Typ iCCAs aus Muzin-produzierenden, zylindrischen Cholangiozyten der großen Gallengängen ausgehen.<sup>41,51</sup>

### **5.3.2. Interpretation der Ergebnisse zum Farbstoffprotokoll Alcian PAS**

Die positive Alcian PAS Färbung zeigt die die zweithöchste Korrelation zur Tumorentität „large-duct“ Typ iCCA (CC = 0,648). Da dieser Subtyp durch Alcian PAS färbbare, intrazelluläre Muzin-Vakuolen enthält, spricht ein positives Farbergebnis für das Vorliegen eines „large-duct“ Typ iCCAs. 3/4 der hier ausgewerteten Fälle waren positiv für Alcian PAS, wohingegen alle anderen Tumorentitäten ein zu 100% negatives Farbverhalten aufwiesen.

Zusammenfassend bestätigt ein positives Farbverhalten von Alcian PAS laut unserer Auswertung somit die Diagnose „large-duct“ Typ iCCA und hilft somit bei dessen Unterscheidung zu anderen den PLCs zugehörigen Tumorentitäten. Der Verlust des intrazellulären Muzins kann Ausdruck der geringen Tumordifferenzierung sein.

### **5.3.3. Interpretation der Ergebnisse zur Marker-Kombination LFABP und CK19**

Die dritthöchste Korrelation zum Subtypen „large-duct“ Typ iCCA weist die Marker-Kombination LFABP und CK19 auf: Alle 4 Fälle wiesen eine negative Immunhistochemie für LFABP und eine positive Immunhistochemie für CK19 auf. Diese Marker-Kombination hat mit einem CC = 0,487 unter allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Marker-Kombinationen die höchste Korrelation zur o.g. Tumorentität und übertrifft auch seine Korrelation zum „small-duct“ Typ iCCA bei CC = 0,475, bei welchem 2/8 ein unerwartetes Farbverhalten aufwiesen. Betrachtet man jedoch nun das Ensemble der PLCs, korreliert die Marker-Kombination am stärksten mit der Tumorentität HCC bei CC = 0,683 (in inverser Immunhistochemie d.h. negativ für CK19 und positiv für LFABP).

Zusammenfassend unterstützt die kombinierte Immunhistochemie von LFABP und CK19 die Diagnostik des „large-duct“ Typ iCCAs und korreliert stärker mit dieser als die einzeln betrachteten Marker ( $CC_{LFABP} = 0,461$  und  $CC_{CK19} = 0,418$ ).

#### 5.4. Ausblick

Die diagnostische Zuordnung eines Tumorpräparates zu einer den PLCs zugehörigen Entitäten kann sich aufgrund der sich häufig überlappenden hepato- und cholangiozellulären Eigenschaften als herausfordernd erweisen. Dies gilt insbesondere für schlecht differenzierte PLCs, welche die Charakteristika ihres Ursprungsgewebes in großen Teilen verloren haben. Unser Projekt illustriert die Bedeutung der Immunhistochemie zur Differenzierung dieser Entitäten, welche sich allein anhand von Bildgebung oder Standardhistologie oft nicht sicher abgrenzen lassen.

Zur Unterscheidung der Tumorentitäten HCC, „small-duct“ Typ iCCA und „large-duct“ Typ iCCA und konnten sich spezifische Marker sowie Marker-Kombinationen als besonders hilfreich erweisen.

Zur Abgrenzung hepatozellulärer Karzinome gegenüber den restlichen PLCs haben sich an erster Stelle die klassischen Antikörper HepPar1 und Arginase1 bewiesen, wobei sich keine signifikante Überlegenheit eines der beiden Antikörper feststellen ließ. Eine überraschende Erkenntnis lieferte der Marker EMA, dessen kanalikuläres Färbemuster in diesem Projekt konsistent mit einer hepatozellulären Differenzierung assoziiert war und dadurch eine wertvolle Ergänzung zu den klassischen hepatozellulären Markern darstellt. Auch LFABP erwies sich als hilfreich in der Abgrenzung von HCCs gegenüber den anderen PLCs. Da LFABP jedoch auch bei hepatischen Metastasen des Gastrointestinaltrakts eine positive Immunhistochemie aufweisen kann, sei hier auf dessen eingeschränkte Spezifität hingewiesen.

Eine hohe Trennschärfe des „small-duct“ Typ iCCAs gegenüber HCCs und „large-duct“ Typ iCCAs ermöglichten ebenso HepPar1 und Arginase1; hier galt ein *negatives* immunhistochemisches Ergebnis als Indikator. Auch sind neben ABCB11 und EMA (apikal betontes Färbemuster) die im Rahmen dieses Projekts aufgestellte Kondition 3, welche eine kombinierte Anwendung von Markern zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit repräsentiert, als immunhistochemischer Differenzierungsansatz von „small-duct“ Typ iCCAs zu erwähnen.

Zur Erhärtung der Diagnose „large-duct“ Typ iCCA zeigten sich die Marker EMA, Alcian PAS und die gegensätzliche Marker-Kombination LFABP und CK19 als nützliche diagnostische Tools. Besonders EMA zeigte dank seines distinkten zytoplasmatischen Färbemusters beim „large-duct“ Typ iCCA eine starke Diskriminationskraft im Vergleich zu anderen Entitäten.

In Conclusio bestätigt unsere Analyse die Hypothese, dass keiner der untersuchten Antikörper separat betrachtet eine verlässliche bzw. hundertprozentige Differenzierung der verschiedenen Tumorentitäten ermöglicht., da sich diese als Teil des bereits erwähnten Spektrums nicht ausreichend voneinander unterscheiden lassen. Vielmehr bedarf es eines immunhistochemischen Panels, welches beispielsweise aus den o.g. Antikörpern zusammengestellt werden könnte. Dieses Panel sollte im Rahmen von Studien an größeren Patientenkollektiven erprobt werden, um unsere Ergebnisse zu validieren und präzisieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; **68**(6): 394-424.
2. Komuta M, Ueno A, Sakamoto M. The spectrum of primary liver cancers: heterogeneity and continuity. A foundation for diagnosis and treatment of cancer. *Hepatology* 2022.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karziome, Langversion 5.0, 2024, AWMF-Registernummer: 032-053OL, 27.07.2025) hwl-odlh-u-b-kZa.
4. Tyson GL, Ilyas JA, Duan Z, et al. Secular trends in the incidence of cholangiocarcinoma in the USA and the impact of misclassification. *Dig Dis Sci* 2014; **59**(12): 3103-10.
5. Board WCTE. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours: WHO Classification of Tumours, Volume 1: World Health Organization; 2019.
6. Komuta M, Yeh MM. A Review on the Update of Combined Hepatocellular Cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2020; **40**(2): 124-30.
7. Coulouarn C, Cavard C, Rubbia-Brandt L, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinomas exhibit progenitor features and activation of Wnt and TGFbeta signaling pathways. *Carcinogenesis* 2012; **33**(9): 1791-6.
8. Govaere O, Komuta M, Berkers J, et al. Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. *Gut* 2014; **63**(4): 674-85.
9. Zen C, Zen Y, Mitry RR, et al. Mixed phenotype hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization and liver transplantation. *Liver Transpl* 2011; **17**(8): 943-54.
10. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R. The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *Oncologist* 2010; **15 Suppl 4**: 14-22.
11. Wang Q, Luan W, Villanueva GA, et al. Clinical prognostic variables in young patients (under 40 years) with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Dig Dis* 2012; **13**(4): 214-8.
12. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol* 2009; **50**(6): 1142-54.
13. Zoller H, Tilg H. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Metabolism* 2016; **65**(8): 1151-60.
14. Chu YJ, Yang HI, Wu HC, et al. Aflatoxin B1 exposure increases the risk of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection or alcohol consumption. *Eur J Cancer* 2018; **94**: 37-46.
15. Seshachalam VP, Sekar K, Hui KM. Insights into the etiology-associated gene regulatory networks in hepatocellular carcinoma from The Cancer Genome Atlas. *J Gastroenterol Hepatol* 2018; **33**(12): 2037-47.
16. Micchelli ST, Vivekanandan P, Boitnott JK, Pawlik TM, Choti MA, Torbenson M. Malignant transformation of hepatic adenomas. *Mod Pathol* 2008; **21**(4): 491-7.
17. Degasperis E, Colombo M. Distinctive features of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2016; **1**(2): 156-64.
18. Lee YJ, Lee JM, Lee JS, et al. Hepatocellular carcinoma: diagnostic performance of multidetector CT and MR imaging-a systematic review and meta-analysis. *Radiology* 2015; **275**(1): 97-109.
19. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology* 2009; **49**(3): 1017-44.
20. Silva MA, Hegab B, Hyde C, Guo B, Buckels JA, Mirza DF. Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2008; **57**(11): 1592-6.
21. Müllhaupt B, Durand F, Roskams T, Dutkowski P, Heim M. Is tumor biopsy necessary? *Liver Transpl* 2011; **17 Suppl 2**: S14-25.

22. Fuks D, Cauchy F, Fusco G, Paradis V, Durand F, Belghiti J. Preoperative tumour biopsy does not affect the oncologic course of patients with transplantable HCC. *J Hepatol* 2014; **61**(3): 589-93.
23. Nzeako UC, Goodman ZD, Ishak KG. Comparison of tumor pathology with duration of survival of North American patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1995; **76**(4): 579-88.
24. Lauwers GY, Terris B, Balis UJ, et al. Prognostic histologic indicators of curatively resected hepatocellular carcinomas: a multi-institutional analysis of 425 patients with definition of a histologic prognostic index. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**(1): 25-34.
25. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954; **7**(3): 462-503.
26. Burt AD, Alves V, Bedossa P, et al. Data set for the reporting of intrahepatic cholangiocarcinoma, perihilar cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Histopathology* 2018; **73**(3): 369-85.
27. Han DH, Choi GH, Kim KS, et al. Prognostic significance of the worst grade in hepatocellular carcinoma with heterogeneous histologic grades of differentiation. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; **28**(8): 1384-90.
28. Zhou L, Rui JA, Wang SB, et al. Outcomes and prognostic factors of cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma after radical major hepatectomy. *World J Surg* 2007; **31**(9): 1782-7.
29. Lang H, Sotiropoulos GC, Brokalaki EI, et al. Survival and recurrence rates after resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic livers. *J Am Coll Surg* 2007; **205**(1): 27-36.
30. Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001; **33**(5): 1080-6.
31. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; **31**(1): 11-24.
32. van Eyken P, Sciort R, van Damme B, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ. Keratin immunohistochemistry in normal human liver. Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts and acinar gradient. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987; **412**(1): 63-72.
33. Lai YS, Thung SN, Gerber MA, Chen ML, Schaffner F. Expression of cytokeratins in normal and diseased livers and in primary liver carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 1989; **113**(2): 134-8.
34. Durnez A, Verslype C, Nevens F, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology* 2006; **49**(2): 138-51.
35. Sell S, Dunsford HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 1989; **134**(6): 1347-63.
36. Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; **33**(3): 738-50.
37. Roskams T. The role of immunohistochemistry in diagnosis. *Clin Liver Dis* 2002; **6**(2): 571-89, x.
38. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003; **163**(4): 1301-11.
39. Xiao JC, Ruck P, Adam A, Wang TX, Kaiserling E. Small epithelial cells in human liver cirrhosis exhibit features of hepatic stem-like cells: immunohistochemical, electron microscopic and immunoelectron microscopic findings. *Histopathology* 2003; **42**(2): 141-9.
40. Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol* 2000; **33**(1): 76-84.
41. Komuta M. Intrahepatic cholangiocarcinoma: Tumour heterogeneity and its clinical relevance. *Clin Mol Hepatol* 2022; **28**(3): 396-407.

42. Akita M, Fujikura K, Ajiki T, et al. Dichotomy in intrahepatic cholangiocarcinomas based on histologic similarities to hilar cholangiocarcinomas. *Mod Pathol* 2017; **30**(7): 986-97.
43. Liao JY, Tsai JH, Yuan RH, Chang CN, Lee HJ, Jeng YM. Morphological subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma: etiological, clinicopathological, and molecular features. *Mod Pathol* 2014; **27**(8): 1163-73.
44. Komuta M, Spee B, Vander Borgh S, et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* 2008; **47**(5): 1544-56.
45. Khuntikeo N, Chamadol N, Yongvanit P, et al. Cohort profile: cholangiocarcinoma screening and care program (CASCAP). *BMC Cancer* 2015; **15**: 459.
46. Valls C, Gumà A, Puig I, et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: CT evaluation. *Abdom Imaging* 2000; **25**(5): 490-6.
47. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2014; **60**(6): 1268-89.
48. Vilana R, Forner A, Bianchi L, et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. *Hepatology* 2010; **51**(6): 2020-9.
49. Rimola J, Forner A, Reig M, et al. Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; **50**(3): 791-8.
50. Chong YS, Kim YK, Lee MW, et al. Differentiating mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma from atypical hepatocellular carcinoma using gadoxetic acid-enhanced MRI. *Clin Radiol* 2012; **67**(8): 766-73.
51. Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, et al. Histological diversity in cholangiolocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* 2012; **55**(6): 1876-88.
52. Nakanuma Y, Kakuda Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2015; **29**(2): 277-93.
53. Brunt E, Aishima S, Clavien PA, et al. cHCC-CCA: Consensus terminology for primary liver carcinomas with both hepatocytic and cholangiocytic differentiation. *Hepatology* 2018; **68**(1): 113-26.
54. Sempoux C, Paradis V, Saxena R. Variant differentiation patterns in primary liver carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 2017; **34**(2): 176-82.
55. Akiba J, Nakashima O, Hattori S, et al. Clinicopathologic analysis of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma according to the latest WHO classification. *Am J Surg Pathol* 2013; **37**(4): 496-505.
56. Park SH, Lee SS, Yu E, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: Gadoxetic acid-enhanced MRI findings correlated with pathologic features and prognosis. *J Magn Reson Imaging* 2017; **46**(1): 267-80.
57. Choi SH, Jeon SK, Lee SS, et al. Radio-pathologic correlation of biphenotypic primary liver cancer (combined hepatocellular cholangiocarcinoma): changes in the 2019 WHO classification and impact on LI-RADS classification at liver MRI. *Eur Radiol* 2021; **31**(12): 9479-88.
58. Gigante E, Ronot M, Bertin C, et al. Combining imaging and tumour biopsy improves the diagnosis of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2019; **39**(12): 2386-96.
59. Kim H, Park C, Han KH, et al. Primary liver carcinoma of intermediate (hepatocyte-cholangiocyte) phenotype. *J Hepatol* 2004; **40**(2): 298-304.
60. Sasaki M, Sato H, Kakuda Y, Sato Y, Choi JH, Nakanuma Y. Clinicopathological significance of 'subtypes with stem-cell feature' in combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2015; **35**(3): 1024-35.
61. Aishima S, Oda Y. Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2015; **22**(2): 94-100.
62. Bagante F, Spolverato G, Cucchetti A, et al. Defining when to offer operative treatment for intrahepatic cholangiocarcinoma: A regret-based decision curves analysis. *Surgery* 2016; **160**(1): 106-17.

63. Farges O, Fuks D, Boleslawski E, et al. Influence of surgical margins on outcome in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter study by the AFC-IHCC-2009 study group. *Ann Surg* 2011; **254**(5): 824-29; discussion 30.
64. Hayashi A, Misumi K, Shibahara J, et al. Distinct Clinicopathologic and Genetic Features of 2 Histologic Subtypes of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2016; **40**(8): 1021-30.
65. Jiang BG, Sun LL, Yu WL, Tang ZH, Zong M, Zhang YJ. Retrospective analysis of histopathologic prognostic factors after hepatectomy for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer J* 2009; **15**(3): 257-61.
66. Saha SK, Parachoniak CA, Ghanta KS, et al. Mutant IDH inhibits HNF-4 $\alpha$  to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. *Nature* 2014; **513**(7516): 110-4.
67. Hanna RF, Aguirre DA, Kased N, Emery SC, Peterson MR, Sirlin CB. Cirrhosis-associated hepatocellular nodules: correlation of histopathologic and MR imaging features. *Radiographics* 2008; **28**(3): 747-69.
68. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; **19**(6): 1513-20.
69. Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB. Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* 1993; **143**(4): 1050-4.
70. Butler SL, Dong H, Cardona D, et al. The antigen for Hep Par 1 antibody is the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1. *Lab Invest* 2008; **88**(1): 78-88.
71. Takahashi Y, Dungubat E, Kusano H, et al. Application of Immunohistochemistry in the Pathological Diagnosis of Liver Tumors. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(11).
72. Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2002; **33**(12): 1175-81.
73. Nguyen T, Phillips D, Jain D, et al. Comparison of 5 Immunohistochemical Markers of Hepatocellular Differentiation for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2015; **139**(8): 1028-34.
74. Krings G, Ramachandran R, Jain D, et al. Immunohistochemical pitfalls and the importance of glypican 3 and arginase in the diagnosis of scirrhous hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2013; **26**(6): 782-91.
75. Mac MT, Chung F, Lin F, Hui P, Balzer BL, Wang HL. Expression of hepatocyte antigen in small intestinal epithelium and adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2009; **132**(1): 80-5.
76. Maitra A, Murakata LA, Albores-Saavedra J. Immunoreactivity for hepatocyte paraffin 1 antibody in hepatoid adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Am J Clin Pathol* 2001; **115**(5): 689-94.
77. Fujikura K, Yamasaki T, Otani K, et al. BSEP and MDR3: Useful Immunohistochemical Markers to Discriminate Hepatocellular Carcinomas From Intrahepatic Cholangiocarcinomas and Hepatoid Carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2016; **40**(5): 689-96.
78. Yan BC, Gong C, Song J, et al. Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2010; **34**(8): 1147-54.
79. Timek DT, Shi J, Liu H, Lin F. Arginase-1, HepPar-1, and Glypican-3 are the most effective panel of markers in distinguishing hepatocellular carcinoma from metastatic tumor on fine-needle aspiration specimens. *Am J Clin Pathol* 2012; **138**(2): 203-10.
80. Fujiwara M, Kwok S, Yano H, Pai RK. Arginase-1 is a more sensitive marker of hepatic differentiation than HepPar-1 and glypican-3 in fine-needle aspiration biopsies. *Cancer Cytopathol* 2012; **120**(4): 230-7.
81. Choi WT, Ramachandran R, Kakar S. Immunohistochemical approach for the diagnosis of a liver mass on small biopsy specimens. *Hum Pathol* 2017; **63**: 1-13.
82. Kakar S, Gown AM, Goodman ZD, Ferrell LD. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: hepatocellular carcinoma versus metastatic neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2007; **131**(11): 1648-54.
83. Chu PG, Ishizawa S, Wu E, Weiss LM. Hepatocyte antigen as a marker of hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison to carcinoembryonic antigen, CD10, and alpha-fetoprotein. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**(8): 978-88.



84. Borscheri N, Roessner A, Röcken C. Canalicular immunostaining of neprilysin (CD10) as a diagnostic marker for hepatocellular carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2001; **25**(10): 1297-303.
85. Wang HL, Kim CJ, Koo J, et al. Practical Immunohistochemistry in Neoplastic Pathology of the Gastrointestinal Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 2017; **141**(9): 1155-80.
86. Wang L, Luo Q, Zeng S, et al. Disordered farnesoid X receptor signaling is associated with liver carcinogenesis in Abcb11-deficient mice. *J Pathol* 2021; **255**(4): 412-24.
87. Xie G, Wang X, Huang F, et al. Dysregulated hepatic bile acids collaboratively promote liver carcinogenesis. *Int J Cancer* 2016; **139**(8): 1764-75.
88. Stroescu C, Herlea V, Dragnea A, Popescu I. The diagnostic value of cytokeratins and carcinoembryonic antigen immunostaining in differentiating hepatocellular carcinomas from intrahepatic cholangiocarcinomas. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; **15**(1): 9-14.
89. Wu PC, Fang JW, Lau VK, Lai CL, Lo CK, Lau JY. Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers. Clinical and biological implications. *Am J Pathol* 1996; **149**(4): 1167-75.
90. Sloane JP, Ormerod MG. Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer* 1981; **47**(7): 1786-95.
91. Storch J, Thumser AE. Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *J Biol Chem* 2010; **285**(43): 32679-83.
92. Vergani L, Fanin M, Martinuzzi A, et al. Liver fatty acid-binding protein in two cases of human lipid storage. *Mol Cell Biochem* 1990; **98**(1-2): 225-30.
93. Wang G, Bonkovsky HL, de Lemos A, Burczynski FJ. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J Lipid Res* 2015; **56**(12): 2238-47.
94. Dum D, Ocokoljic A, Lennartz M, et al. FABP1 expression in human tumors: a tissue microarray study on 17,071 tumors. *Virchows Archiv* 2022; **481**(6): 945-61.
95. Inoue M, Takahashi Y, Fujii T, Kitagawa M, Fukusato T. Significance of downregulation of liver fatty acid-binding protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014; **20**(46): 17541-51.
96. Shvartsur A, Bonavida B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications. *Genes Cancer* 2015; **6**(3-4): 84-105.
97. Sawanyawisuth K, Tantapotin N, Wongkham C, et al. Suppression of trophoblast cell surface antigen 2 enhances proliferation and migration in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Ann Hepatol* 2016; **15**(1): 71-81.
98. Wood GS, Warnke R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* 1981; **29**(10): 1196-204.
99. Geramizadeh B, Seirfar N. Diagnostic Value of Arginase-1 and Glypican-3 in Differential Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocarcinoma and Metastatic Carcinoma of Liver. *Hepat Mon* 2015; **15**(7): e30336.
100. Atta IS. Efficacy of expressions of Arg-1, Hep Par-1, and CK19 in the diagnosis of the primary hepatocellular carcinoma subtypes and exclusion of the metastases. *Histol Histopathol* 2021; **36**(9): 981-93.
101. Wang C, Shao X, Zhang X, et al. Diagnostic value of glypican-3, arginase-1 and hepatocyte paraffin antigen -1 in differentiating hepatocellular carcinoma from intrahepatic cholangiocarcinoma. *Transl Cancer Res* 2020; **9**(1): 128-36.
102. Sang W, Zhang W, Cui W, Li X, Abulajiang G, Li Q. Arginase-1 is a more sensitive marker than HepPar-1 and AFP in differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from nonhepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2015; **36**(5): 3881-6.
103. Sasaki M, Nakanuma Y. Expression of mucin core protein of mammary type in primary liver cancer. *Hepatology* 1994; **20**(5): 1192-7.
104. Cao Y, Karsten U, Otto G, Bannasch P. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and alpha2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Arch* 1999; **434**(6): 503-9.

105. Kim GJ, Rhee H, Yoo JE, et al. Increased expression of CCN2, epithelial membrane antigen, and fibroblast activation protein in hepatocellular carcinoma with fibrous stroma showing aggressive behavior. *PLoS One* 2014; **9**(8): e105094.
106. Yuan SF, Li KZ, Wang L, et al. Expression of MUC1 and its significance in hepatocellular and cholangiocarcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2005; **11**(30): 4661-6.
107. Radwan NA, Ahmed NS. The diagnostic value of arginase-1 immunostaining in differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma and cholangiocarcinoma as compared to HepPar-1. *Diagn Pathol* 2012; **7**: 149.
108. Shiran MS, Isa MR, Sherina MS, Rampal L, Hairuszah I, Sabariah AR. The utility of hepatocyte paraffin 1 antibody in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma and metastatic carcinoma. *Malays J Pathol* 2006; **28**(2): 87-92.
109. Leong AS, Sormunen RT, Tsui WM, Liew CT. Hep Par 1 and selected antibodies in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma, combined tumours and metastatic carcinoma. *Histopathology* 1998; **33**(4): 318-24.
110. Lagana SM, Salomao M, Remotti HE, Knisely AS, Moreira RK. Bile salt export pump: a sensitive and specific immunohistochemical marker of hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2015; **66**(4): 598-602.
111. Gerber TS, Müller L, Bartsch F, et al. Integrative Analysis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Subtypes for Improved Patient Stratification: Clinical, Pathological, and Radiological Considerations. *Cancers (Basel)* 2022; **14**(13).
112. Li Z, Huang N, Du Q, et al. Role of immunophenotypic characterisation in prognostic subtyping of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Pathology* 2023; **55**(7): 979-88.
113. Nepal C, O'Rourke CJ, Oliveira D, et al. Genomic perturbations reveal distinct regulatory networks in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2018; **68**(3): 949-63.
114. Zou S, Li J, Zhou H, et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* 2014; **5**: 5696.
115. Shroff RT, Javle MM, Xiao L, et al. Gemcitabine, Cisplatin, and nab-Paclitaxel for the Treatment of Advanced Biliary Tract Cancers: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2019; **5**(6): 824-30.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 1</b> HE Übersicht eines schlecht differenzierten HCC.                                                 | 64 |
| <b>Abbildung 2</b> HE Übersicht eines schlecht differenzierten iCCA                                                 | 64 |
| <b>Abbildung 3</b> Immunhistochemische Färbung eines schlecht differenzierten HCC mit<br>EMA (kanalikuläres Muster) | 65 |
| <b>Abbildung 4</b> HE Färbung eines cHCC-CCA                                                                        | 65 |
| <b>Abbildung 5</b> Immunhistochemische Färbung eines cHCC-CCA mit HepPar1                                           | 66 |
| <b>Abbildung 6</b> Immunhistochemische Färbung eines cHCC-CCA mit Arginase1                                         | 66 |
| <b>Abbildung 7</b> Immunhistochemische Färbung eines cHCC-CCA mit ABCB11                                            | 67 |
| <b>Abbildung 8</b> Immunhistochemische Färbung eines cHCC-CCA mit CK19                                              | 67 |
| <b>Abbildung 9</b> Immunhistochemische Färbung eines cHCC-CCA mit EMA                                               | 68 |

### 7.2. Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabelle 1</b> Übersicht über das Desmet Scoring-System nach Desmet et al. <sup>68</sup>                                                   | 26 |
| <b>Tabelle 2</b> Übersicht der verwendeten Primärantikörper                                                                                  | 27 |
| <b>Tabelle 3</b> Übersicht der Teilschritte der Bond Polymer Refine Detection                                                                | 32 |
| <b>Tabelle 4</b> Verwendetes Scoring-System                                                                                                  | 34 |
| <b>Tabelle 5</b> Übersicht der Färbemuster bzw. Zielstrukturen der verwendeten<br>Primärantikörper und Farbstoffe                            | 34 |
| <b>Tabelle 6</b> Übersicht der Grunderkrankungen unter den verschiedenen Tumorentitäten                                                      | 37 |
| <b>Tabelle 7</b> Übersicht der Fibrosestadien nach Desmet Score unter den verschiedenen<br>Tumorentitäten                                    | 37 |
| <b>Tabelle 8</b> Übersicht über das Vorhandensein einer Kapsel unter den verschiedenen<br>Tumorentitäten                                     | 38 |
| <b>Tabelle 9</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * HepPar1, Arginase1 sowie<br>Kombination HepPar1 und Arginase1 Immunoreaktivität | 39 |
| <b>Tabelle 10</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * CD10, ABCB11 sowie<br>Kombination CD10 und ABCB11 Immunoreaktivität            | 41 |
| <b>Tabelle 11</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * AFP Immunoreaktivität                                                          | 43 |
| <b>Tabelle 12</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * LFABP Immunoreaktivität                                                        | 44 |
| <b>Tabelle 13</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * CK19, CK7 sowie Kombination<br>CK19 und CK7 Immunoreaktivität                  | 45 |
| <b>Tabelle 14</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * EMA Immunoreaktivität                                                          | 47 |
| <b>Tabelle 15</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC * EMA Immunoreaktivität (für HCC mögliche<br>Färbemuster)                                     | 48 |
|                                                                                                                                              | 86 |

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabelle 16</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * Alcian PAS Immunoreaktivität                                                          | 48 |
| <b>Tabelle 17</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * TROP2 Immunoreaktivität                                                               | 49 |
| <b>Tabelle 18</b> Übersicht der Kontingenzkoeffizienten zwischen den unterschiedlichen Tumorentitäten und Immunoreaktivität der analysierten Marker | 50 |
| <b>Tabelle 19</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC * gegensätzliche Marker-Kombinationen                                                                | 52 |
| <b>Tabelle 20</b> Erweiterte Kreuztabelle: SDT * gegensätzliche Marker-Kombinationen                                                                | 53 |
| <b>Tabelle 21</b> Erweiterte Kreuztabelle: LDT * gegensätzliche Marker-Kombinationen                                                                | 54 |
| <b>Tabelle 22</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC, SDT und LDT * Kondition 1, 2 und 3                                                                  | 56 |
| <b>Tabelle 23</b> Erweiterte Kreuztabelle: HCC * fokales und diffuses Färbeverhalten der stärksten Marker                                           | 58 |
| <b>Tabelle 24</b> Erweiterte Kreuztabelle: SDT * fokales und diffuses Färbeverhalten der stärksten Marker                                           | 59 |
| <b>Tabelle 25</b> Erweiterte Kreuztabelle: LDT * fokales und diffuses Färbeverhalten der stärksten Marker                                           | 61 |
| <b>Tabelle 26</b> Übersicht absolute Werte der immunhistochemischen Auswertung der cHCC-CCA                                                         | 63 |