

Diplomarbeit

**Immunhistochemische Klassifikation der
pankreatischen/biliären intraepithelialen Neoplasie und
des invasiven Adenokarzinoms des pankreato-biliären
Systems**

eingereicht von

Bettina Mörwald

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Pathologie

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Dr. med. univ. Karoline Lackner

Univ.-Ass. Dr. med. univ. Stephan Jahn

Allerheiligen im Mühlkreis, 27.10.2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Allerheiligen im Mühlkreis, 27.10.2014

Mörwald Bettina eh.

Danksagung

Ich möchte mich auf diesem Weg bei einigen Personen, die mich während meines Studiums und dem Erstellen meiner Diplomarbeit unterstützt haben, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen beiden Diplomarbeitbetreuern Univ.-Prof. Dr. med. univ. Karoline Lackner und Univ.-Ass. Dr. med. univ. Stephan Jahn. Während der wissenschaftlichen Arbeit und der Erstellung meiner Diplomarbeit standen mir beide mit Rat und Tat zur Seite und ich konnte mich jederzeit mit Fragen an die Beiden wenden. Auch dem Team am Institut der Pathologie möchte ich danken, die daran beteiligt waren, dass die Schnitte und immunhistochemischen Färbungen durchgeführt wurden.

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Eltern richten, Mörwald Franz und Mörwald Rosa, die mir mein Medizinstudium ermöglicht und finanziert haben. Sie gaben mir in all den Jahren großen Halt und Unterstützung. Auch meinem Freund Wahl Markus möchte ich für seine grenzenlose Geduld und Unterstützung danken. Während all den Prüfungen und Lernphasen ertrug er mich und meine Launen bravourös. Dankeschön dass es dich gibt und du bei mir bist.

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mich all die Jahre begleitet haben. Eine große Stütze waren meine Freunde in meinem Heimatort Allerheiligen. Sie holten mich regelmäßig auf den Boden der Tatsachen zurück. Sie gaben mir großen Halt, motivierten mich und unterstützten meinen Ehrgeiz. Auch meiner Schwester und ihrem Mann, Nadja und Marius Knoll möchte ich für die Begleitung während meines langen Weges durch das Medizinstudium danken.

Zuletzt einen Dank an Eva Baumgartner und Veronika Gisperg, die ich im Laufe meines Studiums kennen gelernt habe. Die beiden waren für mich meine Familie in Graz. Ich konnte mich immer auf beide verlassen und möchte mich für ihre Freundschaft und Hilfe bedanken.

Zusammenfassung

Einleitung: Die biliäre intraepitheliale Neoplasie (BillIN) stellt die Vorläuferläsion des invasiven Adenokarzinoms der extrahepatischen Gallenwege dar. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit von reaktiven und neoplastischen Veränderungen des biliären Epithels ist die Unterscheidung zwischen reaktiven und neoplastischen Läsionen mitunter schwierig.

Methoden: Schnitte von formalinfixiertem Paraffinmaterial (FFPE) von Resektaten der extrahepatischen Gallengänge und der Gallenblase wurden histologisch in reaktive Läsionen (n=33), low-grade BillIN (n=18) (low-grade Läsionen), high-grade BillIN (n=14) und invasive Adenokarzinome (n=22) (high-grade Läsionen) eingeteilt und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen pVHL, S100P, KOC1, Mesothelin, Ki-67 und p53 untersucht.

Ergebnisse: Mit einer Kombination von KOC1 und p53 Antikörpern ist die Unterscheidung neoplastischer Läsionen von reaktivem Epithel mit einer guten Sensitivität (74%) und hohen Spezifität (97%) möglich. Für die Diskriminierung von low- und high-grade Läsionen wird durch die Kombination von Mesothelin oder KOC1 mit p53 Antikörpern eine Sensitivität von 78 bzw. 96% und eine Spezifität von 100 bzw. 87% erzielt. S100P, Ki-67 und pVHL Antikörpern waren wegen geringerer oder fehlender Spezifität für die Klassifikation epithelialer, biliärer Läsionen wenig hilfreich.

Schlussfolgerung: Immunhistochemische Untersuchungen mit Mesothelin oder KOC1 in Kombination mit p53 Antikörpern sind eine hilfreiche Unterstützung bei der histologischen Klassifikation reaktiver und neoplastischer biliärer, epithelialer Läsionen, die in Folgestudien weiter evaluiert werden sollten.

Abstract

Background: Biliary intraepithelial neoplasia (BillIN) constitutes the precursor lesion to invasive adenocarcinoma in the biliary tract and gallbladder. Due to morphological similarities of reactive and neoplastic changes in the biliary epithelium classification of reactive lesions from neoplastic low- and high-grade BillIN as well as adenocarcinoma are challenging in routine pathology.

Methods: Sections of formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) tissues of resected extrahepatic bile ducts and gallbladders were classified into reactive lesions (n=33), low-grade BillIN (n=18) (low-grade lesions), high-grade BillIN (n=14) and invasive adenocarcinoma (n=22) (high-grade lesions). The lesions were investigated by immunohistochemistry using antibodies against pVHL, S100P, KOC1, mesothelin, Ki-67 und p53.

Results: Of all the antibodies tested the combination of KOC1 and/or p53 antibodies had the best sensitivity (74%) and specificity (97%) for the histological discrimination between reactive and neoplastic lesions. High-grade and low-grade lesions were discriminated by the combination of mesothelin or KOC1 and/or p53 positivity with a sensitivity of 78 and 100%, respectively and a specificity of 96 and 87%, respectively. Lack of specificity rendered S100P and Ki-67 as well as pVHL antibodies of low or no benefit for diagnostic purposes.

Conclusion: In summary combinations of mesothelin or KOC1 and p53 antibodies seem to be useful adjuncts for the histological classification of reactive and neoplastic biliary epithelial lesions. The results of our study warrant evaluation of the utility of these markers in further studies.

Glossar und Abkürzungen

APBDJ	anormale pankreato-biliäre Gangeinmündung
β-catenin	catenin, beta-1
BiIN	biliäre intraepitheliale Neoplasie
BMI	Body Mass Index
CD10	membrane metalloendopeptidase
c-myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
Claudin-18	Claudin 18
Cyclin D1	Cyclin D1
DAB	Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid
Dpc4	deleted in pancreatic carcinoma 4
e-cadherin	cadherin 1
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
EZH2	enhancer of zeste, drosophila, homolog2
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffinmaterial
FNAC	Feinnadelaspirationszytologie
HSP27	heat-shock 27-kd protein1
HSP70	heat-shock 70-kd protein1a
IHC	Immunhistochemie
IMP3	insulin-like growth factor 2mRNA-binding protein3
Ki-67	proliferation-related Ki-67 Antigen
KOC1	KH domain containing protein overexpressed in cancer
KRAS	v-ki-ras1 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

Liver-intestine-cadherin	cadherin17
MMP-7	matrix metalloproteinase 7
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MT1-MMP	membrane-type matrix metalloproteinase 1
MUC5AC	mucin5, subtypes A and C, tracheobronchial
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2a
p21	p21 protein-activated kinase2
p53	tumor protein p53
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Pdx1	pancreas/duodenum homeobox protein 1
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PTC	perkutane transhepatische Cholangiographie
pVHL	von Hippel-Lindau gene product
S100P	S100 calcium-binding protein P
TMA	Tissue-Microarray
UICC	International Union Against Cancer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge (2)	14
Abbildung 2: Reaktiv verändertes Gallenblasenepithel	50
Abbildung 3: Low-grade BillN	51
Abbildung 4: High-grade BillN	52
Abbildung 5: Invasives extrahepatisches Gallengangskarzinom	53
Abbildung 6: Reaktivität der reaktiven Epithelveränderungen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); Ki-67 (blaues Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach % pos.-gefärbten Zellen	54
Abbildung 7: Reaktivität der reaktiven Epithelveränderungen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach Score	55
Abbildung 8: Reaktivität der low-grade BillN Läsionen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); Ki-67 (blaues Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach % pos.-gefärbten Zellen	56
Abbildung 9: Reaktivität der low-grade BillN Läsionen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach Score	57
Abbildung 10: Reaktivität der high-grade Läsionen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); Ki-67 (blaues Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach % pos.-gefärbten Zellen	58
Abbildung 11: Reaktivität der high-grade Läsionen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach Score	59
Abbildung 12: Reaktivität des invasiven Karzinoms mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); Ki-67 (blaues Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach % pos.-gefärbten Zellen	60
Abbildung 13: Reaktivität des invasiven Karzinoms mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach Score	61
Abbildung 14: A - F; Zusammenfassung der Resultate der immunhistochemischen Auswertung in Bezug zur histopathologischen Diagnose und dem evaluierten Antikörper	63

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Molekularpathologische Veränderungen der biliären intraepithelialen Neoplasie (5)	16
Tab. 2: WHO histologische Klassifikation der Gallenblasentumore und Tumore der extrahepatischen Gallengänge (4)	27
Tab. 3: TNM Klassifikation des Gallenblasenkarzinoms - Primärer Tumor (T) (38)	28
Tab. 4: TNM Klassifikation des extrahepatischen Gallengangskarzinoms - Primärer Tumor (T) (38)	29
Tab. 5: TNM Klassifikation des Gallenblasenkarzinoms-Regionale Lymphknoten (N) (38)	29
Tab. 6: TNM Klassifikation des extrahepatischen Gallengangskarzinoms - Regionale Lymphknoten (N) (38)	29
Tab. 7: TNM Klassifikation des Gallenblasenkarzinoms und des extrahepatischen Gallengangskarzinoms - Fernmetastasierung (M) (38)	29
Tab. 8: Stadieneinteilung des Gallenblasenkarzinoms (38)	30
Tab. 9: Stadieneinteilung des extrahepatischen Gallengangskarzinoms (38)	30
Tab. 10: Literaturangaben der häufigsten Tumormarker des pankreato-biliären Systems	41
Tab. 11: "Consensus Classification System of BilIN" von Zen et. al. (20)	42
Tab. 12: Details der immunhistochemischen Methode für 6 Antikörper	46
Tab. 13: Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer low-grade BilIN im Vergleich zur reaktiven Epithelveränderung	64
Tab. 14: Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer neoplastischen Läsion im Vergleich zur reaktiven Epithelveränderung	66
Tab. 15: Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die einer Diagnose high-grade Läsionen im Vergleich zu low-grade Läsionen	67
Tab. 16: Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose eines invasiven Karzinom im Vergleich zur high-grade BilIN Läsion	68

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	13
1.1. Anatomie der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge	13
1.2. Histologie der Gallenblase und extrahepatischen Gallengänge	14
1.3. Vorläuferläsionen des invasiven Adenokarzinoms der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge	15
1.3.1. Karzinogenese im biliären System	15
1.3.2. Tumormarker der biliären Neoplasie	16
1.3.2.1. pVHL	16
1.3.2.2. S100P	17
1.3.2.3. KOC1	17
1.3.2.4. Mesothelin	18
1.3.2.5. Ki-67	18
1.3.2.6. p53	18
1.3.2.7. Mehrschritt - Theorie der Krebsentstehung	19
1.3.2.8. Adenom-Karzinom Sequenz oder Dysplasie-Karzinom Sequenz	19
1.3.3. Biliäre intraepitheliale Neoplasie (BilIN)	20
1.3.3.1. Makroskopische Eigenschaften	20
1.3.3.2. Histologische Eigenschaften	21
1.3.3.3. Problematik der histologischen Klassifikation von reaktiven und neoplastischen Läsionen der Gallenblase und der extra- hepatischen Gallengänge	21
1.3.3.4. Patientenmanagement	22
1.3.4. Das pankreato-biliäre System - Gemeinsamkeiten von PanIN und BilIN	22
1.4. Adenokarzinom der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge	24
1.4.1. Epidemiologie	24
1.4.2. Ätiologie	24
1.4.3. Pathologie	26

1.4.3.1. Makroskopie	26
1.4.3.2. Histopathologie	26
1.4.3.3. Staging	27
1.4.4. Metastasierung	30
1.4.5. Prognose	31
1.4.6. Diagnostik	31
1.4.7. Therapie	34
1.4.7.1. Gallenblasenkarzinom	34
1.4.7.2. extrahepatisches Gallengangskarzinom	38
2. Fragestellung	39
3. Ziele	40
4. Materialien und Methoden	41
4.1. Literaturrecherche	41
4.2. Gewebe	41
4.3. Histologische Klassifikation reaktiver und biliärer neoplastischer Läsionen	42
4.4. Codierung	43
4.5. Immunhistochemie	43
4.6. Auswertung der Färbungen nach prozentuell positiv gefärbten Zellen und Score	47
4.7. Bestimmung der cut-off Werte	47
4.8. Statistik	47
5. Ergebnisse	49
5.1. Histologische und immunhistochemische Charakteristika reaktiver und neoplastischer Läsionen	49
5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung in Bezug zur histopathologischen Diagnose	54
5.2.1. Reaktive Läsionen	54
5.2.2. Low-grade BilIN Läsionen	56
5.2.3. High-grade BilIN Läsionen	58

5.2.4. Invasives Karzinom.....	60
5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung in Bezug zur histopathologischen Diagnose und dem evaluierten Antikörper.....	62
5.4. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die histologische Klassifikation reaktiver und neoplastischer Läsionen des biliären Epithels.....	64
5.4.1. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer low-grade BilIN im Vergleich zur reaktiven Epithelveränderung.....	64
5.4.2. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer neoplastischen Läsion im Vergleich zur reaktiven Epithelveränderung.....	65
5.4.3. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer high-grade Läsion im Vergleich zur low-grade Läsion.....	66
5.4.4. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose eines invasiven Karzinoms im Vergleich zur high-grade BilIN Läsion.....	67
5.5. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse.....	68
6. Diskussion.....	69
7. Referenzen.....	73

1. Einleitung

1.1. Anatomie der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge

Die Gallenblase, oder auch Vesica biliaris genannt, präsentiert sich als birnenförmiges Hohlorgan mit einer Länge von 8 - 12 cm und einem Durchmesser von 4 - 5 cm. Dieses Organ kann bis zu 40 bis 50 ml Flüssigkeit aufnehmen. Es werden folgende Abschnitte unterschieden:

- Fundus vesicae biliaris (Gallenblasenboden)
- Corpus vesicae biliaris (Gallenblasenkörper)
- Infundibulum vesicae biliaris (Gallenblasentrichter)
- Collum vesicae biliaris (Gallenblasenhals)

Die Gallenblase befindet sich in der Fossa vesicae biliaris, wo der Corpus vesicae biliaris mit der Leber verwachsen ist. Bis auf die Verwachsungsfläche mit der Leber, ist die Gallenblase von Peritoneum bedeckt. Darüber hinaus hat die Gallenblase auch eine enge Beziehung zum Duodenum und Colon. Der Gallenblasenhals legt sich an die Pars superior duodeni und der Fundus an die Flexura coli dextra (1) (siehe Abbildung 1).

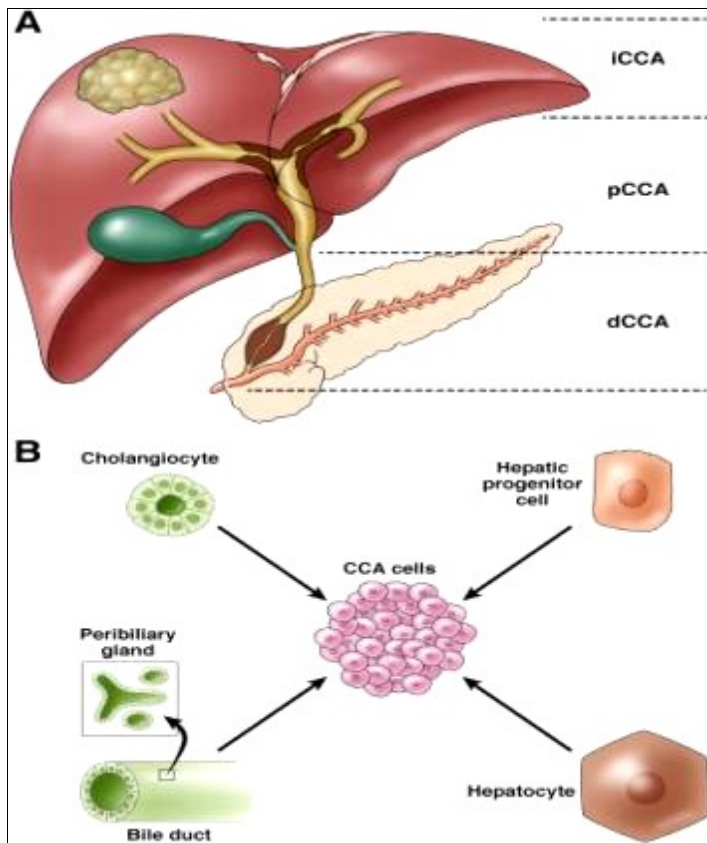


Abbildung 1: Anatomie der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge (2)

Die Gallenwege werden in intrahepatische und extrahepatische Gallenwege unterteilt.

Die Galleausscheidung der Leber erfolgt über die intrahepatischen und extrahepatischen Gallengänge ins Duodenum. Auf die intrahepatischen Gallenwege wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Die extrahepatischen Gallengänge ziehen von der Leberpforte zum Duodenum. In der Porta hepatis entsteht der Ductus hepaticus communis aus rechtem und linkem Lebergang. Der Ductus hepaticus communis vereinigt sich mit dem Ductus cysticus und bildet den Ductus choledochus. Er unterkreuzt die Pars superior duodeni, gelangt an die Rückfläche des Pankreaskopfes und vereinigt sich mit dem Ductus pancreaticus. Gemeinsam münden sie an der Papilla duodeni major in die Pars descendens duodeni (1).

1.2. Histologie der Gallenblase und extrahepatischen Gallengänge

-Gallenblase

Die Wand der Gallenblase besteht aus 4 Schichten:

-Tunica mucosa: Hier findet sich Epithel und die gefäßreiche Lamina propria, jedoch keine Muscularis mucosae. Das Gallenblasenepithel ist einschichtig-zylindrisch und trägt Mikrovilli. Es ist ein resorbierendes Epithel, welches für den Wasserentzug und Konzentrierung der Galle verantwortlich ist.

-Tunica muscularis: ist eine dünne Schicht aus glatten Muskelzellen

-Tunica subserosa: Bindegewebe unterhalb der Serosa

-Tunica serosa/Adventitia: Die Gallenblase liegt an der Leber an. Hier findet sich kein Serosa-Überzug, sondern eine breite Adventitia. Ansonsten ist die Gallenblase von Serosa überkleidet (1) (3).

-Extrahepatische Gallengänge

Die extrahepatischen Gallengänge sind von einem einschichtigen Zylinderepithel (Cholangiozyten) ausgekleidet, in denen einzelne Becherzellen eingestreut sind. Die Lamina propria setzt sich aus kollagenen und elastischen Fasern zusammen (1).

1.3. Vorläuferläsionen des invasiven Adenokarzinoms der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge

1.3.1. Karzinogenese im biliären System

Die Vorläuferläsionen des Adenokarzinoms der extra- und intrahepatischen Gallengänge werden in biliäre intraepitheliale Neoplasie, intraduktal papilläre Neoplasie, muzinös zystische Neoplasie und Adenom unterteilt. Im folgenden Abschnitt wird auf die biliäre intraepitheliale Neoplasie und das Adenom eingegangen (4). Die schrittweise Karzinogenese der BillN zeigt molekularpathologische Veränderungen in einer Reihe von biologischen Makromolekülen. Die Mutationen der verschiedenen Moleküle ist in Tab. 1 aufgelistet (5). Einige dieser Moleküle, auch Tumormarker genannt, finden Unterstützung in der zytologischen Untersuchung. Ali et al. (6) untersuchten unter anderem die Tumormarker KOC1, S100P und Mesothelin im pankreato-biliären System (6).

Mutation	Molekül
-vermehrte Expression	KRAS
	MUC5AC
	Cyclin D1
	p21
	p53
	c-myc
	S100P
	Liver-intestine cadherin
	MMP-7
	MT1-MMP
	HSP27
	HSP70
	Claudin-18
	IMP3
EZH2	
Pdx1	
-verringerte Expression	E-cadherin
	β -catenin
	Dpc4
	p16
	pVHL
CD10	

Tab. 1: Molekularpathologische Veränderungen der biliären intraepithelialen Neoplasie (5)

1.3.2. Tumormarker der biliären Neoplasie

1.3.2.1. pVHL

Von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein (pVHL) wird durch das *VHL* Gen codiert. pVHL interagiert mit drei anderen Proteinen, Elongin C, Elongin B und Cullin 2 und bildet den Komplex VCB-Cul2. Eine Hauptfunktion von pVHL ist die Regulation von Hypoxie-induzierten mRNAs, welche VEGF, EPO, PDGF und GLUT-1 kodieren. pVHL ist für die sauerstoffabhängige Degradation des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors HiF 1a verantwortlich. Das HiF 1a-Protein wird dadurch im Gewebe bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen rasch abgebaut. Bei Inaktivierung des *VHL* Gens (prototypisch im Rahmen einer Keimbahnmutation beim Von Hippel-Lindau Syndrom) oder funktioneller Downregulation von pVHL in neoplastischen Zellen, unterbleibt die Degradation von HiF 1a und es kommt zu einer abnormen Transkription hypoxieinduzierter Gene, unter anderem von VEGF (vaskular endothelial growth factor). VEGF bewirkt eine verstärkte Gefäßneubildung

(Neoangiogenese) und verbessert hierdurch die Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes. pVHL ist weiters über die Hemmung der proapoptotischen Wirkung von HIF 1a in der Regulation des Zellzyklusses involviert. Darüberhinaus ist pVHL am Aufbau der extrazellulären Fibronectin Matrix, der Regulation der Urokinasetyp Plasminogen Aktivator Systems und der Hemmung des Hepatozyten-Wachstumsfaktors beteiligt (7).

1.3.2.2. S100P

S100P Kalzium bindendes Protein P (S100P) gehört zur Familie der S100 -Proteine. S100P wird in verschiedenen normalen Geweben (zytoplasmatisch und nukleär) exprimiert wie etwa Plazenta, Lunge, Herz, Niere, Harnblase, Skelettmuskulatur, Knochenmark, Milz, Epidermis, Prostata und intestinaler Mukosa. Eine erhöhte Expression des Proteins wurde in zahlreichen malignen Geweben beobachtet (z.B. in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas, der pankreatischen intraduktalen, papillären, muzinösen Neoplasie, pulmonalen u. gastralen Adenokarzinomen sowie in Melanomen, Mammakarzinomen, Colonkarzinomen und Prostatakarzinomen. Die erhöhte Expression von S100P wird als frühes Ereignis in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms betrachtet und ist dementsprechend in der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) vermehrt. Das Protein spielt eine wichtige Rolle in der Erhaltung der strukturellen Organisation der Intermediärfilamente und des Aktin Zytoskeletts. Es wird ferner vermutet, dass *S100P* einen Beitrag zur Tumormigration, -invasion und -proliferation leistet (8).

1.3.2.3. KOC1

KH domain containing protein overexpressed in cancer (KOC1) (synonymisch auch als IMP3, CT98 oder Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3(IGF2BP3) bezeichnet) ist ein nukleär lokalisiertes Protein. Es gehört zur Familie der Insulin-like growth factor-2 mRNA binding Proteine 1-3, die Transport, Translation und den Turnover der mRNA regulieren, indem sie an die kodierenden Regionen von IGF-2 (insulin-like growth factor 2) binden. KOC1 ist ein onkofetales Protein, dessen physiologische Expression dementsprechend sein Maximum während der Embryogenese aufweist (9). Die Rolle von KOC1 ist noch unzureichend geklärt, seine Expression wurde jedoch wiederholt mit erhöhter Metastasierungswahrscheinlichkeit und schlechterer Prognose in klarzelligen Nierenzellkarzinomen assoziiert. In benignen Läsionen des Pankreas, chronischer Pankreatitis und normalem Pankreasgewebe war KOC1 immunhistochemisch nicht nachweisbar (10).

1.3.2.4. Mesothelin

Mesothelin auch bekannt unter Pre-Pro-Megakaryocyte-Potentiating Factor und CAK1 Antigen wird durch das *MSLN* Gen kodiert. Das Gen kodiert ein Vorläuferprotein, welches in zwei Produkte aufgespalten wird, den "megakaryocyte potentiating factor" (MPF) und Mesothelin. Der MPF funktioniert als Zytokin, welches Kolonieformationen von Megakaryozyten im Knochenmark stimuliert. Mesothelin ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Zelloberflächenprotein, das heißt ein Zelladhäsionsprotein, das von den Mesothelzellen produziert wird. In Neoplasien ist dieses Protein in unterschiedlicher Häufigkeit u.a. in pulmonalen Adenokarzinomen, in pulmonalen Plattenepithelkarzinomen, in gastralen und cholangiozellulären Adenokarzinomen, sowie in Barrettkarzinomen, in epitheloiden Mesotheliomen, Ovarialkarzinomen und duktalem Adenokarzinomen des Pankreas überexprimiert (11).

1.3.2.5. Ki-67

Antigen identified by monoclonal Antibody Ki-67 (Ki-67) (synonymisch: Antigen Ki-67 und Proliferations-related Ki-67 Antigen) wird durch das *MKI67* Gen kodiert. Ki-67 ist ein nukleär lokalisiertes Protein, das als essentiell für die zelluläre Proliferation betrachtet wird. Während der Mitose liegt es der Oberfläche der Chromosomen an. Ki-67 ist während des Zellzyklusses in allen aktiven Phasen- G(1), S, G(2), und M-Phase nachweisbar. Hingegen ist Ki-67 in Zellen, die sich in der G(0) Phase befinden nicht exprimiert. Diese Eigenschaft macht Ki-67 zu einem in der diagnostischen Immunhistochemie routinemäßig benützten Marker der zellulären Proliferation und wird universell zur Diagnose und Graduierung neoplastischer Proliferate verwendet (12).

1.3.2.6. p53

Der Transkriptionsfaktor p53, kodiert durch das *TP53* Gen, ist ein Tumorsuppressor, dessen Protein im Kern lokalisiert ist. Dieser Transkriptionsfaktor ist in jeder normalen Zelle vorhanden. Verschiedene Arten von Stress wie DNA-Schaden, Hypoxie, Nukleotid Depletion, virale Infektion, sowie onkogene Aktivierung, führt zu posttranslationaler Modifikation und zur Aktivierung von p53. Diese Aktivierung löst einen Zellzyklusarrest aus, welcher es der Zelle ermöglicht die DNA Reparaturmechanismen zu starten und den Schaden zu beheben. Eine *TP53* Mutation kommt bei 50% aller humanen Karzinome vor. Der resultierende

Funktionsverlust ermöglicht der Tumorzelle ein ungehindertes Wachstum durch Vermeidung der regulären, apoptotischen Abschaltung (13).

1.3.2.7. Mehrschritt - Theorie der Krebsentstehung

Die Krebsentstehung ist ein Prozess, der in mehreren Schritten abläuft. Die schrittweise Akkumulation von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führt zur Entstehung des malignen Tumors. Diese Defekte können zunächst nur über molekulargenetische Analysen detektiert und im weiteren Verfahren histomorphologisch und klinisch nachgewiesen werden. Im epithelialen Gewebe ist diese Mehrschritt - Theorie am besten dokumentiert. *KRAS* Mutationen kommen bei einem Drittel der BillN Läsionen vor und treten in frühen Phasen der Karzinogenese auf. p53 wird in den späten Phasen überexprimiert (14). Die Tumorstammzelle proliferiert und die neuentstandenen Tumorzellen verdrängen und ersetzen die normalen Zellen. Im Epithel entsteht eine Dysplasie. Flache Dysplasien werden intraepitheliale Neoplasie und polypöse Dysplasien als Adenome bezeichnet (15).

1.3.2.8. Adenom-Karzinom Sequenz oder Dysplasie-Karzinom Sequenz

Es gibt zwei Theorien, wie Karzinome der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge entstehen, die Adenom-Karzinom Sequenz und die Dysplasie-Karzinom Sequenz.

Die Theorie der Adenom-Karzinom Sequenz in der Gallenblase wurde von Kozuka et al. 1982 (16) vorgestellt. Sie zeigten eine Beziehung zwischen der Größe des Adenoms und dem Vorkommen von Adenokarzinomen in diesen Adenomen. Ab einer Größe von 12 mm im Durchmesser treten gehäuft hochdifferenzierte Dysplasien im Adenom auf (16). Wistuba et al. (17) untersuchten, ob Adenome und Karzinome des pankreato-biliären Systems ähnliche molekulare Veränderungen aufweisen. Es zeigte sich, dass Gallenblasenadenomen diese molekularen Veränderungen fehlen, jedoch wiesen die dysplastischen Läsionen, Carcinoma in situ und das Adenokarzinom ähnliche Veränderungen auf (17).

Die Dysplasie-Karzinom Sequenz ist die zweite Theorie in der Karzinomentwicklung der Gallenblase und der extrahepatischen Gallenwege. Roa et. al (18) zeigten, dass bei invasiven Karzinomen im angrenzenden Gewebe Metaplasien, Dysplasien und In situ Karzinomen zu finden sind. Nur 0,14% der invasiven Karzinome zeigten ein benachbartes Gallenblasenadenom. Diese Studie verdeutlicht, dass aus morphologischer Sicht die Hypothese der Dysplasie-Karzinom Sequenz weitaus relevanter/häufiger ist, als die Adenom-

Karzinom Sequenz (18). Eine prolongierte, chronische Inflammation führt gehäuft zu einer Dysplasie (19). Die Hypothese der Dysplasie-Karzinom Sequenz kommt häufiger in Gallenblasen und extrahepatischen Gallengängen vor und wird als mögliche Karzinogenese der intraepithelialen Neoplasie betrachtet.

1.3.3. Biliäre intraepitheliale Neoplasie (BilIN)

Die flache Form der Dysplasie wird als intraepitheliale Neoplasie bezeichnet und stellt die bei weitem häufigste Vorläuferläsion von Karzinomen des Gallenblasenepithels dar. Diese Vorstufen sind charakterisiert durch morphologische Veränderungen und eine Proliferation atypischer, neoplastischer Zellen, bei noch intakter Basalmembran des Gallengangs- bzw. Gallenblasenepithels. Die Proliferation der atypischen Zellen findet innerhalb des ursprünglichen Epithelverbandes d.h. intraepithelial (synonymisch: in situ) statt und ersetzt diesen (4).

Die biliäre intraepitheliale Neoplasie wird nach dem Ausmaß der zellulären (synonymisch zytologischen) und architekturellen Atypien in drei Grade eingeteilt: BilIN-1, BilIN-2 und BilIN-3. BilIN-1 und BilIN-2 werden als low-grade Läsionen zusammengefasst und der BilIN-3 als high-grade Läsion gegenübergestellt (4).

Das zentrale Charakteristikum der intraepithelialen Neoplasie ist eine noch intakte Basalmembran, die durch das neoplastische Infiltrat nicht durchbrochen wird. Da die neoplastischen Zellen in der BilIN keinen Kontakt zu Blut oder Lymphgefäßen haben, besteht kein Metastasierungsrisiko. Da sich aus einer hochgradigen BilIN ein invasives Karzinom entwickeln kann, wird diese Läsion auch als Präkanzerose bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit der Progression steigt mit dem Grad und der Ausdehnung der intraepithelialen Neoplasie. Die Entfernung solcher Läsionen hat daher eine große Bedeutung in der Sekundärprävention, jedoch ist die histologische Zuordnung in der Praxis mitunter schwierig (15) (siehe Fragestellung).

1.3.3.1. Makroskopische Eigenschaften

Die BilIN ist bei makroskopischer Begutachtung der Gallenblasen- bzw. Gallengangsmukosa in den meisten Fällen nicht erkennbar, da sie als flache Epithelveränderung im Unterschied zu den papillären, präkanzerösen Veränderungen nicht über das Niveau der umgebenden Mukosa hervortritt. In Einzelfällen kann eine assoziierte Ulzeration des Epithels bzw. eine mit dieser assoziierten Fibrose erkennbar sein, die jedoch von der makroskopischen Differentialdiagnose

der weitaus häufigeren, nichtneoplastischen, entzündlichen Veränderungen nicht zu unterscheiden ist. Auf Grund der unauffälligen bzw. unspezifischen Makroskopie stellen BilINs Zufallsbefunde, insbesondere in der Gallenblase, dar. Zur adäquaten histologischen Aufarbeitung ist daher eine ausgedehnte histologische Einbettung bzw. Kompletteinbettung - vor allem bei hochgradiger BilIN- auch der makroskopisch unauffälligen Gallenblasen- bzw. Gallengangswandanteile erforderlich um Ausdehnung und Resektionsränder zu beurteilen und etwaige Übergänge in ein invasives Karzinom zu erfassen (4).

1.3.3.2. Histologische Eigenschaften

Die dysplastischen Veränderungen beginnen an der Oberfläche des Epithels und breiten sich nach unten hin in die Rokitansky-Aschoff Sinus aus. Die Zellen sind hochprismatisch, kuboidal und elongiert mit unterschiedlichen Graden der nukleären Atypie wie Polaritätsverlust und Mitosestadien. Die dysplastischen Zellen sind normalerweise einschichtig, können jedoch auch pseudostratifiziert erscheinen. Später können sich pseudopapilläre Strukturen, die von dysplastischem Epithel überkleidet werden, bilden. Der Kern dieser veränderten Zellen ist rund, oval oder spindelförmig mit singulären oder multiplen Nukleolen, die mitunter vergrößert sind. Das Zytoplasma ist eosinophil und zum Teil in wechselndem Ausmaß schleimbildend (teils unter Ausbildung gut erkennbarer Becherzellen). Zwischen normalem Gewebe und intraepithelialer Neoplasie ist meist ein abrupter Übergang zu sehen, ein Umstand, der als weiteres, diagnostisches Kriterium herangezogen wird. Die Zellpopulation der Dysplasie ist homogen, wohingegen die Zellpopulation der reaktiven, atypischen Zellen heterogen ist und sogenannte Stiftchenzellen eingelagert zeigt. Entsprechend der Dysplasie-Karzinom-Sequenz auf molekularer Ebene nehmen das Ausmaß der Zellatypien sowie die Mitosehäufigkeit mit zunehmendem Grad der BilIN ebenfalls zu. Auf dem Boden einer high-grade BilIN kann dann an einer, bzw. seltener an mehreren Stellen zeitgleich (synchron) bzw. zeitversetzt (metachron) ein invasives Karzinom entstehen. Zur histologischen Klassifikation der WHO siehe Tab. 2 (4).

1.3.3.3. Problematik der histologischen Klassifikation von reaktiven und neoplastischen Läsionen der Gallenblase und der extra- hepatischen Gallengänge

Reaktive Veränderungen des Epithels (Atypie oder Reparatur) weisen im Unterschied zur intraepithelialen Neoplasie folgende Charakteristika auf: Heterogene Zellpopulation mit hochprismatischen, schleimsezernierenden Zellen und niedrigen isoprismatischen Zellen, atroph erscheinendes Gewebe und zigarrenförmige Zellen sowie ein gradueller, fließender

Übergang des reaktiven Epithels zum benachbarten unauffälligen Epithel hin. Die erkennbaren Zell- und Kernauffälligkeiten (histomorphologisch deskriptiv bezeichnet als Atypien) sind oft weniger prominent als in Zellen der intraepithelialen Neoplasie. Im Rahmen schwerer, insbesondere ulzeröser Veränderungen treten jedoch auch bei entzündlichen Veränderungen hochgradige Atypien auf. Differentialdiagnostisch erschwerend kommt hinzu, dass intraepitheliale Neoplasien eine begleitende Entzündungsreaktion aufweisen können. In der Praxis ist die Unterscheidung zwischen reaktivem, insbesondere entzündlich verändertem Epithel und Läsionen einer BillIN mitunter äußerst schwierig und insbesondere in Biopsien bzw. bei eingeschränkter Materialmenge in zytologischen Ausstrichen teils ohne Zuhilfenahme immunhistochemischer Färbungen nicht verlässlich möglich. Gleiches gilt für die Unterscheidung zwischen BillINs und hochdifferenzierten, invasiven Karzinomen, die zum Teil lediglich geringe Zell- und Kernveränderungen, ein sehr geordnetes Wachstumsmuster analog zu präexistenten Drüsen bzw. das Fehlen einer auffälligen Stromadesmoplasie aufweisen. Kürzlich wurde ein Consensus Report von Zen et al. (20) mit Richtlinien zur Klassifikation von reaktiver und biliärer intraepithelialer Neoplasie veröffentlicht (siehe Tab. 11) (20).

1.3.3.4. Patientenmanagement

Es gibt derzeit noch keinen einheitlichen Konsens, wie eine BillIN zu therapieren ist, oder welches Management für die Patienten angewandt werden soll, um das Entstehen eines invasiven Karzinoms zu vermeiden. Sollte in einem Präparat eine BillIN-3 Läsion gefunden werden, sind Nacheinbettung und Evaluierung des umliegenden Gewebes erforderlich. Zeigt sich an einem Resektionsrand eine high-grade BillIN, sollte eine Nachresektion erfolgen (4).

1.3.4. Das pankreato-biliäre System - Gemeinsamkeiten von PanIN und BillIN

-Embryologie

Das ventrale Pankreas und das biliäre System entwickeln sich beinahe gleichzeitig aus dem posterioren, ventralen Vorderdarm. Die Transkriptionsfaktoren HES1, hairy and enhancer of split-1, und PDX1, pancreatic duodenal homeobox factor-1, sind in der Entwicklung des ventralen Pankreasanteiles und des extrahepatischen Gallengangssystems essentiell (21). Es gibt Differenzierungsfaktoren, die normalerweise von HES1 unterdrückt werden, welche die Entwicklung zu einer pankreatisch exokrinen Differenzierung im biliären System

unterdrücken. Die Suppression von HES1 im Mausexperiment führte zur Konversion des biliären Epithels in pankreatisches Gewebe (22).

-Anatomie

Das Gallengangssystem und das Pankreas sind anatomisch benachbart bzw. gehen ineinander über und sowohl das Epithel des biliären als auch des pankreatischen Gangsystems zeigt eine ähnliche Histologie und ein ähnliches, immunhistochemisches Markerprofil (23).

Die nahe embryologische und anatomische Beziehung des pankreato-biliären Systems könnte einen Grund für analoge, neoplastische Veränderungen des biliären Traktes und des Pankreas sein. Nakanuma et al. (24) schlugen ein gemeinsames Krankheitskonzept für biliäre Krankheiten und ihre pankreatischen Gegenstücke vor (24). Das Konzept der "biliären Krankheiten mit pankreatischen Gegenstücken" basiert auf Gemeinsamkeiten beider Organsysteme, wie ähnlicher Pathologie, Histologie, immunhistochemische und klinische Eigenschaften. Betrachtet man die pathogenetischen Mechanismen der biliären Erkrankungen mit ihren pankreatischen Gegenstücken, treten Krankheiten, die im Pankreas vorkommen, ebenso in pankreatischen Elementen des Gallengangssystems auf. Mit Hilfe dieses Konzeptes könnten in Zukunft möglicherweise Patienten, die an biliären Erkrankungen leiden, mit Therapien, die auf Erkenntnissen des pankreatischen Gegenstückes basieren, therapiert werden (24).

BilIN und PanIN bezeichnen in Analogie präinvasive, neoplastische Veränderungen des jeweiligen Gangsystems. Dementsprechend wird die PanIN ebenfalls in 3 Grade eingeteilt, in PanIN-1, PanIN-2 und PanIN-3. Sato et al. (25) konzentrierten sich auf histologische Charakteristika der BilIN im Vergleich zur PanIN. Morphologische Eigenschaften wie nukleare Polarität, erhöhte Kern/Plasmarelation, nukleare Hyperchromasie und Atypien waren in beiden Vorläuferläsionen ähnlich ausgeprägt. Muzinanfärbung mit Alcianblau zeigten, dass sowohl BilIN als auch PanIN Läsionen häufig zytoplasmatisches und/oder luminal oberflächliches Muzin besitzen. Die immunhistochemische Expression von MUC1 nimmt mit dem Grad der intraepithelialen Neoplasie zu und zwar in gleicher Form bei BilIN und PanIN. Die Expression von p53 konnte in nicht-neoplastischem Gewebe von Pankreas und Gallengängen nicht nachgewiesen werden. Auch BilIN-1/2 und PanIN-1/2 zeigten keine p53 Expression. Jedoch zeigte sich eine p53 Expression in BilIN-3 und PanIN-3 mit einer Häufung im pankreatischen System. S100P zeigte sich im Vergleich von PanIN-1 und BilIN-1 in der PanIN-1 signifikant erhöht. BilIN und PanIN zeigten in dieser Studie jedoch

insgesamt ähnliche Expressionsmuster. Dies stützt die Ansicht, dass die BilIN bzw. PanIN weitgehend analoge Veränderungen des biliären bzw. pankreatischen Gangsystems sind (25).

1.4. Adenokarzinom der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge

1.4.1. Epidemiologie

Maligne Tumore der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge sind selten.

Das Gallenblasenkarzinom ist die häufigste maligne Neoplasie des Gallengangsystems. Tatsächlich sind 80%-90% aller malignen Neoplasien des biliären Systems Gallenblasenkarzinome (26).

In den westlichen Industrieländern ist das Gallenblasenkarzinom selten. Hierorts beträgt die Inzidenz des Gallenblasenkarzinoms bei Männern 0,17 % und bei Frauen 0,49 %. Dagegen beträgt die Inzidenz des Karzinoms der extrahepatischen Gallengänge 0,01-0,2% (15). In Österreich betrug 2011 die Inzidenz der bösartigen Neubildungen der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge bei Männern 2% und bei Frauen 2,1%. Betrachtet man die Inzidenz in Österreich von 1994 bis 2011, so ist ein Rückgang bei beiden Geschlechtern zu vermerken (27).

In anderen Ländern, wie zum Beispiel Mexiko, ist das Gallenblasenkarzinom häufiger und ist dort für 20% aller gastrointestinalen Karzinome verantwortlich (15). Das Gallenblasenkarzinom kommt häufiger bei Frauen vor (w:m=2-3:1) und hat seinen Altersgipfel um das 70. Lebensjahr (15). Beim Karzinom der extrahepatischen Gallengänge sind Männer etwas häufiger betroffen als Frauen. Das Auftreten des Karzinoms liegt zumeist zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (15). In Europa nahm die Mortalität des Gallenblasenkarzinoms innerhalb des Zeitraumes 1992-2002 statistisch ab. Besonders die Sterblichkeit der Frauen in Österreich hat in dieser Periode signifikant abgenommen (28).

1.4.2. Ätiologie

Es gibt viele verschiedene Ursachen für ein Gallenblasenkarzinom bzw. ein Karzinom der extrahepatischen Gallengänge. Im folgenden Abschnitt wird hauptsächlich auf die Ätiologie des Gallenblasenkarzinoms eingegangen.

-Cholelithiasis

Es gibt viele Komponenten, die bei Gallenblasenkarzinom zusammenspielen, jedoch wird die Präsenz von Gallensteinen auf Grund der hierdurch verursachten Entzündungsaktivität als einer der wichtigsten Risikofaktoren in der Entstehung des Gallenblasenkarzinoms angenommen (29).

-Geschlecht

Auch geschlechtsbezogen zeigen sich Unterschiede. So ist das weibliche Geschlecht ein Risikofaktor, was das Gallenblasenkarzinom betrifft. Die größte Inzidenzrate weltweit zeigen Frauen, die in Delhi, Indien, Süd Karachi, Pakistan und Ecuador leben. Frauen haben ein höheres Risiko eines Tages an Gallenblasenkarzinom zu erkranken. Auch in Westeuropa z.B. in Spanien, zeigt sich eine höhere Inzidenzrate für Frauen als für Männer (30).

-Anormale pankreato-biliäre Gangverbindung (APBDJ)

Die APBDJ ist ein kongenitales Erscheinungsbild. Es ist zwar eine Verbindung zwischen dem Ductus choledochus und dem Pankreasgang vorhanden, jedoch befindet sich diese außerhalb der Dünndarmwand und hat somit auch keinen Sphinkter Oddi. Daher kann die Pankreasflüssigkeit zurück in die Gallengänge und die Gallenblase gelangen und verursacht entzündliche Veränderungen in der Gallengangsmukosa. In einer Studie (31) von 218 Patienten mit Gallenblasenkarzinom wiesen 10 eine APBDJ auf. Alle Patienten waren Frauen mit einem Durchschnittsalter von 55,4 Jahren, darüber hinaus zeigten 9 von 10 Frauen keine Gallensteine (31).

-Gallenblasenpolypen

Gallenblasenpolypen stellen einen weiteren Risikofaktor für das Gallenblasenkarzinom dar. Das Risiko für ein Karzinom ist jedoch für männliche Patienten, die über 50 Jahre alt sind und einen einzigen Polypen über 10 mm im Durchmesser haben, am größten (32).

-Karzinogene

Chrom, Blei, Arsen und Zink wurden als mögliche Karzinogene in einer Studie untersucht. Es wurde ein Vergleich zwischen Gallenblasenkarzinom in Indien und Gallenblasenkarzinom in Japan aufgestellt. Hier zeigte sich, dass Schwermetalle wie Chrom, Blei, Arsen und Zink potenzielle Karzinogene für Gallenblasenkarzinom in Indien sind (33).

-BMI

Ein hoher BMI spielt eine Rolle für das Gallenblasenkarzinom, besonders Frauen stellen eine Risikogruppe dar. Darüber hinaus betrifft dies in erster Linie Frauen, welche sich in einem prämenopausalen Stadium befinden. Postmenopausale Frauen mit erhöhtem BMI haben ein geringeres Risiko ein Gallenblasenkarzinom zu entwickeln (34).

-Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die PSC ist ein Krankheitsbild der intra- und extrahepatischen Gallengänge und zeigt sowohl entzündliche Prozesse mit Lymphozyten, Plasmazellen und einzelnen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, als auch fibröse Veränderungen, welche die Gallengänge zwiebelschalenartig umgeben. Patienten, die an einer PSC erkrankt sind, zeigen eine erhöhte Inzidenz von Dysplasien des biliären Epithels und von invasiven Adenokarzinomen (35).

1.4.3. Pathologie

1.4.3.1. Makroskopie

Das Gallenblasenkarzinom präsentiert sich als infiltrierende grau-weiße Masse. Einige Karzinome können zu einer diffusen Wandverdickung und Verhärtung der gesamten Gallenblase führen. Die Gallenblase kann auf Grund des Tumors aufgetrieben, oder kollabiert sein, wenn der Ductus cysticus oder der Gallenblasenhals obstruiert wird. Wächst der Tumor in den Körper und schnürt die laterale Wand ab, so entsteht eine sanduhrförmige Deformität. Papilläre Karzinome sind normalerweise festsitzende Läsionen und erscheinen polypoid oder blumenkohlartig. Muzinöse- und Siegelringzellkarzinome weisen eine mukoide oder gallertartige Schnittfläche auf. Undifferenzierte Karzinome führen gehäuft zu Nekrosen.

1.4.3.2. Histopathologie

Die Tumore der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge werden histologisch nach der WHO Klassifikation eingeteilt (siehe Tab. 2). Der Vollständigkeit halber werden auch die benignen Formen mit angeführt.

Obwohl eine Neoplasie der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge in verschiedenen histologischen Variationen auftreten kann, so ist doch das Adenokarzinom der häufigste histologische Typ (90%). Auch beim extrahepatischen Gallengangskrebs kommt das Adenokarzinom am häufigsten (80%) vor (36) (37). Das Adenokarzinom kommt in verschiedenen histologischen Formen vor. Es präsentiert sich als biliärer, gastrisch foveolärer, intestinaler Typ oder als Klarzell-, muzinöses oder Siegelringzellkarzinom (siehe Tab. 2).

WHO histologische Klassifikation der epithelialen Tumor der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge

Epitheliale Tumore**-Prämaligne Läsion**

Adenome

Tubulär

Papillär

Tubulopapillär

biliäre intraepitheliale Neoplasie, Grad 3 (BilIN-3)

Intrazystische (Gallenblase) oder intraduktale (Gallengänge) papilläre Neoplasie mit low- oder mittelgradiger intraepithelialer Neoplasie

Intrazystische (Gallenblase) oder intraduktale (Gallengänge) papilläre Neoplasie mit high-grade intraepithelialer Neoplasie

Muzinös zystische Neoplasie mit low- oder mittelgradiger intraepithelialer Neoplasie

Muzinös zystische Neoplasie mit high-grade intraepithelialer Neoplasie

-Karzinome

Adenokarzinom

Adenokarzinom, biliärer Typ

Adenokarzinom, gastrisch foveolärer Typ

Adenokarzinom, intestinaler Typ

Klarzell-Adenokarzinom

Muzinöses Adenokarzinom

Siegelringzellkarzinom

Adenosquamöses Karzinom

Intrazystische (Gallenblase) oder intraduktale (Gallengänge) papilläre Neoplasie mit einem assoziiertem invasivem Karzinom

Muzinös zystische Neoplasie mit einem assoziiertem invasivem Karzinom

Squamöses Zellkarzinom

Undifferenziertes Karzinom

Tab. 2: WHO histologische Klassifikation der Gallenblasentumore und Tumore der extrahepatischen Gallengänge (4)

1.4.3.3. Staging

Das Staging des Gallenblasenkarzinoms und des extrahepatischen Gallengangskarzinoms erfolgt nach der TNM Klassifikation (derzeit in der 7. Version) (38). Diese Klassifikation wird durch die UICC (International Union Against Cancer) festgelegt. Da es vereinzelt Unterschiede in der Klassifikation dieser zwei Malignome gibt, werden sie explizit vorgestellt. Die UICC unterteilt die Neoplasien der extrahepatischen Gallengänge nochmals in

die Gruppe der perihilären Gallengänge und die Gruppe der distalen Gallengänge. In weiterer Folge wird nur auf die Gruppe der distalen Gallengänge Bezug genommen. Der Tumor wird durch drei kardinale Variablen klassifiziert: T (Tumorausbreitung), N (regionärer Lymphknotenbefall) und M (Fernmetastasierung). Weitere Variablen werden durch V (Blutgefäßinvasion), L (Lymphgefäßinvasion), Pn (Perineurale Infiltration) und den Resektionsstatus (R-Status) klassifiziert. Da die klinisch/onkologische Stadiengruppierung (UICC Stadieneinteilung Stage 0-IV) der Gallenblasenkarzinome sowie der extrahepatischen Gallengangskarzinome aus den Grundvariablen des T, N und M Status gemäß den in der TNM Klassifikation beschriebenen Zuordnungen festgelegt wird (siehe Tab. 3 und Tab. 4), soll nachfolgend detailliert auf diese drei Variablen näher eingegangen werden:

T beschreibt wie weit ein Tumor bereits in die verschiedenen Schichten des Organs vorgedrungen ist, und ob Nachbarorgane oder andere Strukturen betroffen sind.

Gallenblasenkarzinom

TX	Primärer Tumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Hinweis auf primären Tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Lamina propria oder Muskelschicht
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria
T1b	Tumor infiltriert Muskelschicht
T2	Tumor infiltriert perimuskuläres Bindegewebe; aber keine Ausbreitung jenseits der Serosa oder in Leber
T3	Tumor durchbricht die Serosa (viszerale Peritoneum) und/oder Infiltration der Leber und/oder 1 anderes angrenzendes Organ oder Struktur wie Magen, Duodenum, Colon, Pankreas, Omentum oder extrahepatische Gallengänge
T4	Tumor infiltriert in Pfortader oder Arteria hepatica oder 2 oder mehr extrahepatische Organe oder Strukturen

Tab. 3: TNM Klassifikation des Gallenblasenkarzinoms - Primärer Tumor (T) (38)

Extrahepatisches Gallengangskarzinom

TX	Primärer Tumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Hinweis auf primären Tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf den Gallengang beschränkt
T2	Tumor infiltriert hinter Gallengangswand
T3	Tumor infiltriert die Gallenblase, Leber, Pankreas, Duodenum oder andere

angrenzende Organe

T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior
-----------	---

Tab. 4: TNM Klassifikation des extrahepatischen Gallengangskarzinoms - Primärer Tumor (T) (38)

N beschreibt ob Lymphknotenmetastasen vorhanden sind und wenn ja, wie viele Lymphknoten infiltriert sind.

Gallenblasenkarzinom

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
-----------	---

N0	Keine Metastasen der regionären Lymphknoten
-----------	---

N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen (beinhaltet Lymphknoten entlang des Ductus cysticus, Ductus choledochus, Arteria hepatica communis und Pfortader)
-----------	---

Tab. 5: TNM Klassifikation des Gallenblasenkarzinoms-Regionale Lymphknoten (N) (38)

Extrahepatisches Gallengangskarzinom

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
-----------	---

N0	Keine Metastasen der regionären Lymphknoten
-----------	---

N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
-----------	---

Tab. 6: TNM Klassifikation des extrahepatischen Gallengangskarzinoms - Regionale Lymphknoten (N) (38)

M steht für Fernmetastasen. Die häufigsten Organe, die durch ein Gallenblasenkarzinom befallen werden, sind die Leber, Peritoneum und die Lunge. Dagegen metastasiert das extrahepatische Gallengangskarzinom häufiger in umliegende Organe und Lymphknoten. Bei der Klassifikation der Fernmetastasierung (M- Status) gibt es keine Unterscheidung zwischen den beiden Karzinomen.

M0	Keine Fernmetastasierung
-----------	--------------------------

M1	Fernmetastasierung vorhanden
-----------	------------------------------

Tab. 7: TNM Klassifikation des Gallenblasenkarzinoms und des extrahepatischen Gallengangskarzinoms - Fernmetastasierung (M) (38)

Wurden die Kategorien T, N und M festgelegt und definiert, kann mit Hilfe dieser Parameter, das Gallenblasenkarzinom und das extrahepatische Gallengangskarzinom noch in UICC-Stadien eingeteilt werden, die für das weitere klinische/onkologische Management maßgeblich sind:

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3	N0	M0
IIIB	T1,T2,T3	N1	M0
IVA	T4	irgendein N	M0
IVB	irgendein T	irgendein N	M1

Tab. 8: Stadieneinteilung des Gallenblasenkarzinoms (38)

Patienten, die im Stadium I diagnostiziert werden, haben eine sehr gute Prognose. Da sich der Tumor auf die Gallenblasenwand beschränkt, kann er vollständig entfernt werden. In den Stadien II - IV ist meist die vollständige Entfernung des Tumors nicht mehr möglich (39).

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIIB	T1,T2,T3	N1	M0
III	T4	irgendein N	M0
IV	irgendein T	irgendein N	M1

Tab. 9: Stadieneinteilung des extrahepatischen Gallengangskarzinoms (38)

1.4.4. Metastasierung

-Gallenblasenkarzinom

Die Ausbreitung erfolgt lymphogen in die regionären Lymphknoten. Die hämatogene Ausbreitung betrifft hauptsächlich die Leber (15).

-Karzinom der extrahepatischen Gallengänge

Das Karzinom breitet sich primär über den Gallengang und die Perineuralscheide aus. Metastasierung in Lymphknoten und peritoneale Ausbreitung erfolgen spät (15).

1.4.5. Prognose

-Gallenblasenkarzinom

Die meisten Karzinome der Gallenblase präsentieren sich ohne assoziierte Klinik oder mit lediglich unspezifischer Klinik. Daher werden Gallenblasenkarzinome häufig in späten Stadien entdeckt, die inoperabel sind. Die Prognose ist dadurch insgesamt schlecht. Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt bei 4- 5 Monaten. Nur ca. 4% der Patienten überleben die nachfolgenden 5 Jahre (15).

-Karzinom der extrahepatischen Gallengänge

Auch beim extrahepatischen Gallengangskarzinom ist die Prognose schlecht. Die meisten Patienten versterben innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung. Häufig ist die unmittelbare Todesursache ein Leberversagen oder eine eitrige Cholangitis. Die Operabilität hängt von der Lokalisation und der Ausbreitung des Tumors ab (15). Tatsächlich spielt die Tumorausbreitung eine signifikante Rolle für die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit. Patienten mit einem Tumor im Stadium T1 haben eine 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 53,1%, bei T2 29,7%, T3 bei 24,9% und im Stadium T4 liegt die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit bei 0% (37).

1.4.6. Diagnostik

Eine frühe Diagnose ist mit einer besseren Prognose assoziiert. Wird das Karzinom in einem späten Stadium entdeckt, kann es meist nicht mehr im Gesunden entfernt werden, wodurch die Prognose signifikant verschlechtert wird.

Die initiale Untersuchung bei Patienten mit Symptomen, die Hinweis für eine biliäre Genese sein könnten, ist der Ultraschall. Die Ultraschalluntersuchung stellt keine Strahlenbelastung dar und ist vergleichsweise günstig für das Gesundheitssystem. Bach et. al. (40) zeigten 1998 den wichtigen Stellenwert der Sonographie für die Diagnosestellung des

Gallenblasenkarzinoms und extrahepatischen Gallengangskarzinoms. Es wurden 35 Patienten mit histologisch gesichertem Gallenblasenkarzinom präoperativ mit Hilfe der Sonographie untersucht und daraufhin cholezystektomiert. Hierbei zeigte sich eine Sensitivität der Sonographie von 94% bei einer Spezifität von 37%. 14 Patienten zeigten intraoperativ eine Beteiligung der übrigen Gallengänge, welche mit Hilfe des Ultraschalls bei 11 Patienten (79%) detektiert werden konnte. Hingegen ist die Sonographie in Hinblick auf die Diagnose von Metastasen im Peritoneum oder eine Lymphknotenbeteiligung unzureichend. Hier muss auf andere diagnostische Verfahren zurückgegriffen werden (s. unten) (40).

Die Computertomographie ermöglicht eine genauere Diagnostik der stagingrelevanten Veränderungen: Tumorausdehnung, -bzw. Invasionstiefe sowie Ausmaß der Metastasierung, mögliche Beteiligung der Lymphknoten, Leberinfiltration oder Fernmetastasen. Das Zweiphasen Spiral-CT wird in der präoperativen Abklärung verwendet. Mit Hilfe des CTs zeigt sich, ob eine Resektion des Karzinoms noch möglich ist, oder ob die Ausdehnung bereits zu weit fortgeschritten ist. Kumaran et al. (41) zeigten 2002 in ihrer Studie, dass mit Hilfe des CTs die Resektabilität verlässlich eingeschätzt werden kann. 9 von 10 Patienten wurden korrekt als nicht resektabel diagnostiziert. Die Sensitivität beträgt 100% mit einem positiv prädiktiven Wert von 90% für die Nicht-Resektabilität (41).

Eine weitere diagnostische Möglichkeit ist die Magnetresonanztomographie (MRT), mit überlegener Darstellung von Weichgewebsstrukturen bzw. abdominalen Organen. Das MRT zeigt jedoch Limitationen bei der Evaluierung von Lymphknotenmetastasen und peritonealer Karzinose. Kim et al. (42) zeigten in ihrer Studie eine Sensitivität, Spezifität und diagnostische Genauigkeit bei Lymphknotenmetastasen mit 56%, 89% bzw. 50% für das MRT. Von 6 Patienten mit histologisch nachgewiesener, peritonealer Karzinose, Lymphknotenmetastasen oder bilateraler intrahepatischer Infiltration, wurde kein einziger mit Hilfe des MRT richtig diagnostiziert. Bei Anwendung der Magnetresonanztomographie-Cholangiopankreatikographie (MRCP), einer nicht invasiven Untersuchungsmethode des pankreato-biliären Systems, liegt die Sensitivität und Spezifität bei 100% und 87% (42). Zusammenfassend ist das MRT jedoch nicht die Bildgebung der Wahl, da es eine teure und aufwendige Untersuchungsmethode darstellt.

Die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) ist ein Verfahren, das mittels Röntgenstrahlung das pankreato-biliäre System darstellt. Bei dieser Untersuchung wird ein Endoskop oral eingeführt und bis zum Duodenum vorgeschoben. Nun wird ein Katheter ausgefahren und in das pankreato-biliäre Gangsystem eingeführt. Über den Katheter

wird ein Kontrastmittel appliziert und daraufhin durch Röntgenaufnahmen des Gangsystems visualisiert. Wird ein Gang von einem Tumor eingeengt, so kann in gleicher Sitzung ein Stent gesetzt werden. Darüber hinaus kann im Laufe der Untersuchung auch eine Gewebeprobe (Histologie, Zytologie) entnommen werden. Die perkutane transhepatische Cholangiographie (PTC) ist der ERCP ähnlich. Mit Hilfe einer dünnen Nadel wird unterhalb der Rippen die Leber punktiert. Nach Kontrastmittelinjektion werden röntgenologisch die Gallengänge sichtbar gemacht. Auch bei diesem Verfahren kann bei einer Obstruktion der Gänge ein Stent eingesetzt werden (43). Die ERCP und PTC sind nicht initiale, diagnostische Methoden, jedoch sehr nützlich wenn es um Fragen der lokalen Ausbreitung bzw. Operationsplanung geht. Die Laparoskopie ist ein nützliches Verfahren um eine peritoneale Metastasierung festzustellen, eine Ausdehnung des Tumors zu quantifizieren und die Möglichkeit einer operativen Behandlung festzulegen. Eine operative oder laparoskopische Gallenblasenbiopsie sollte bei potentiell kurativ operablen Patienten zur Vermeidung einer Tumorzellverschleppung unterlassen werden. Auch Serummarker können eine Rolle in der Diagnostik des Gallenblasenkarzinoms spielen. Wang et. al (44) untersuchten die Marker CA242, CA125 und CA19-9 im Serum von 78 Patienten mit Gallenblasenkrebs. Diese drei Marker waren alle signifikant erhöht (44).

Die wichtige Methode um eine klinische Diagnose eines Karzinoms der Gallenblase oder der extrahepatischen Gallengänge zu diagnostizieren, ist eine histologische Untersuchung mit Hilfe des Mikroskops. Meist wird das Gewebe mittels einer Biopsie gewonnen. Es gibt verschiedene Methoden, solche Gewebeproben mittels Biopsie zu gewinnen. Während einer ERCP, PTC oder einer Laparoskopie können Proben direkt gewonnen werden. Mit Hilfe der CT-gezielten Biopsie kann ebenfalls eine Gewebeprobe entnommen werden. Grundsätzlich muss jedoch das Risiko einer Zellverschleppung bedacht und abgewogen werden (45).

Die Feinnadelaspiration ist ein wichtiges diagnostisches Werkzeug zur Dignitätsbestimmung, wobei Zellen aus fraglich tumorösem Gewebe entnommen und danach histologisch beurteilt werden können. In den meisten Fällen können hierdurch entzündliche und neoplastische Veränderungen unterschieden werden. Eine tumoröse Veränderung der Gallenblase oder der extrahepatischen Gallengänge kann mit Hilfe der Ultraschallgezielten Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) untersucht werden. Die Ultraschallgezielte FNAC ist eine sichere und effektive Methode in der Diagnose des Gallenblasenkarzinoms. Diese Untersuchung erlaubt außerdem eine Beurteilung der Morphologie und eine Klassifizierung

der Subtypen nach der WHO Klassifikation, die relevant für die Abschätzung der Prognose ist (46).

1.4.7. Therapie

Die Behandlung eines Tumorpatienten wird nicht nur durch Ausbreitung, Grad und histologischen Typs des Karzinoms sowie den assoziierten Symptomen sondern auch durch eine Vielzahl anderer Faktoren bestimmt. Alter, Ernährungsstatus, Allgemeinzustand und kardiopulmonale Funktionalität, Leberfunktion und Nierenfunktion haben Einfluss auf die Behandlung bzw. die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen.

1.4.7.1. Gallenblasenkarzinom

-Chirurgische Resektion

Die einzige kurative Therapie für das Gallenblasenkarzinom ist derzeit die operative Entfernung der Gallenblase (Cholezystektomie). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist das Karzinom jedoch meist so weit fortgeschritten, dass es nicht mehr im Gesunden entfernt werden kann. Um das operative Management leichter zu verstehen, kann es in 3 Kategorien eingeteilt werden:

-Gallenblasenkarzinome, welche während oder nach einer Laparoskopie oder konventionellen Cholezystektomie entdeckt werden. In diesem Fall war die ursprüngliche Operationsindikation eine benignen Erkrankung wie zum Beispiel eine vermutete Cholezystolithiasis.

-Gallenblasenkarzinome, welche durch klinische und präoperative Untersuchungen aufgefallen sind.

-fortgeschrittene Gallenblasenkarzinome, die durch Klinik und Untersuchungen entdeckt wurden.

Die chirurgischen Optionen sehen folgendermaßen aus:

- einfache Cholezystektomie,
- radikal oder ausgedehnte Cholezystektomie - beinhaltet die Entfernung der Gallenblase und mindestens 2 cm des umliegenden Leberparenchyms, Lymphknotendissektion um das hepatoduodenale Ligament, retroduodenal, retropankreatisch (im Pankreaskopfbereich) sowie um den Truncus coeliacus;

- radikale Cholezystektomie mit segmentaler oder lobärer Leberteileresektion;
- radikale Cholezystektomie mit ausgedehnter Lymphknotendissektion (paraaortal);
- radikale Cholezystektomie mit Resektion des Gallenganges oder Pankreatikoduodenektomie (47).

-Zufällig entdecktes Karzinom durch Laparoskopie oder konventioneller Cholezystektomie

Gallenblasenkarzinome werden in 1-2% der Fälle während einer Cholezystektomie entdeckt, welche primär auf Grund einer benignen Erkrankung durchgeführt wurde. Wird im Rahmen einer laparoskopischen Cholezystektomie, auf Grund einer vermuteten Cholezystolithiasis, ein Gallenblasenkarzinom entdeckt, liegt es am Chirurgen zu entscheiden, ob eine kurative Therapie angestrebt werden kann. Weiters sollte an ein Gallenblasenkarzinom gedacht werden, wenn die Cholezystektomie schwierig ist. Grundsätzlich sollte jede entfernte Gallenblase geöffnet und gründlich auf suspekte Läsionen untersucht werden, bevor die Operation beendet wird. Sollten dem Chirurgen suspekte Läsionen auffallen, so sollten Gewebeprobe entnommen werden und zum Schnellschnitt geschickt werden. Hierdurch kann man in kurzer Zeit die Tiefe des Tumors mittels histologischer Untersuchung bestimmen. Wird die Diagnose Gallenblasenkarzinom bestätigt, sollte eine radikale Cholezystektomie durchgeführt werden. Die Voraussetzung dafür ist, dass der Chirurg die entsprechende Operationstechnik beherrscht. Sollte dies nicht der Fall sein, so muss der Patient nach Abschluss des Ersteingriffes an ein entsprechendes Zentrum transferiert werden. Sollte die Diagnose postoperativ durch histologische Untersuchung gestellt werden, hängt das operative Management hauptsächlich von der Eindringtiefe des Tumors ab, den T-Stadien der TNM-Klassifikation. Die Information über Lymphknotenbeteiligung, das sogenannte N-Stadium, liegt meist nicht vor. T1- und T2-Tumore werden meist zufällig nach einer Cholezystektomie histologisch entdeckt. Hier sollte eine Nachresektion erfolgen. Bei T1 Tumoren sollten 2-3 cm des umliegenden Leberparenchyms entfernt werden. Bei T2 Tumoren sollte eine vollständige Resektion der Lebersegmente IV und V erfolgen. Sowohl bei T1-, als auch bei T2- Tumoren ist eine Lymphadenektomie des Lig. hepatoduodenale bzw. bis zum Truncus coeliacus angezeigt. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien (T3- bzw. T4-Tumore), welche meist bei Diagnosestellung eine Lymphknotenmetastasierung aufweisen, sollte eine Leberteileresektion mit Lymphadenektomie vorgenommen werden. Dies ist jedoch nur möglich, wenn lediglich der rechte Leberlappen infiltriert wird. Sollten noch weitere Organe vom Tumor infiltriert werden, so ist eine weitergehende Resektion der betroffenen Organe in Betracht zu ziehen. Wird während einer laparoskopischen Cholezystektomie ein

Gallenblasenkarzinom diagnostiziert, sollte auf einen offenen Operationszugang umgestiegen werden. Im Allgemeinen sollte bei Karzinomverdacht im Vorfeld eine explorative Laparotomie durchgeführt werden (47).

-Präoperativ entdecktes Karzinom durch klinische und diagnostische Untersuchung

Bei Gallenblasenkarzinomen, welche präoperativ diagnostisch auffällig wurden, ist die diagnostische Laparoskopie ein wichtiges Werkzeug zur Einschätzung von Fernmetastasen und kann mitunter eine unnötige Laparotomie ersetzen.

Die meisten Karzinome sind lokal ausgebreitet, wenn sie präoperativ entdeckt werden. Hier wird die radikale Cholezystektomie der simplen Cholezystektomie vorgezogen. Kriterien die zur Beurteilung der Operabilität herangezogen werden können sind insbesondere:

- multiple Lebermetastasen
- Aszites
- Peritonealmetastasen
- Fernmetastasen
- ausgedehnte Beteiligung des hepatoduodenalen Ligaments
- Umhüllung oder Okklusion von großen Gefäßen
- stark reduzierter Allgemeinzustand

Invasion in Colon, Duodenum oder Leber sind keine absoluten Kontraindikationen für eine Operation (47).

-Inoperables Karzinom

Patienten, die ein inoperables Karzinom der Gallenblase aufweisen, werden palliativ behandelt. In dieser Phase entsteht häufig ein Ikterus auf Grund einer Obstruktion in einem der Gallengänge. Früher wurden operativ biliäre Bypässe gesetzt, um verschlossene Gänge zu umgehen und den Gallenabfluss ins Duodenum zu gewährleisten. Während der letzten Jahre wurden sowohl in der Endoskopie als auch interventionellen Radiologie enorme Fortschritte gemacht. Somit kann heute ein Stent entweder endoskopisch oder perkutan unter radiologischer Bildgebung gesetzt werden um den Gallengang offen zu halten. Zusätzlich benötigen Patienten in diesem Stadium der Krankheit eine palliative Schmerztherapie. Schmerzen stellen eines der größten Probleme bei palliativen Erkrankungen dar und sollten daher adäquat behandelt werden (47).

-Chemotherapie

Die adjuvante Chemotherapie wird bei resektablen Gallenblasenkarzinom eingesetzt. Die Chemotherapie wird nach der Operation verabreicht, um ein Rezidiv zu vermeiden. Auch bei fortgeschrittenen Stadien kann eine Chemotherapie zum Einsatz kommen. Ziel ist die Symptomkontrolle um Komplikationen wie Stenosen und Ikterus zu vermeiden und die Lebensdauer zu verlängern. Dies gelingt jedoch meist nur einige Monate. Die Verabreichungsform der Chemotherapie gliedert sich in oral, intravenös und arteriell. Mit Hilfe der hepato-arteriellen Infusion erreicht die Chemotherapie den Gallenblasentumor auf direktem Weg. Darüber hinaus verstoffwechselt die Leber den größten Teil des Chemotherapeutikums und minimiert somit die systemische Nebenwirkung der Therapie. Die Technik erfordert einen operativen Eingriff, um einen Katheter in die Arterie einzuführen. Voraussetzung hierfür ist ein guter Allgemeinzustand, den die Patienten im fortgeschrittenen Stadium nicht mehr aufweisen. In manchen Fällen wird eine Kombination von 2 Chemotherapeutika (Kombinationstherapie) verabreicht, um den therapeutischen Effekt zu erhöhen. Eine Kombinationstherapie von Gemcitabin mit Cisplatin führt dabei zu einem verlängerten Gesamtüberleben verglichen mit Gemcitabin alleine (48). Wird die Chemotherapie und Radiotherapie kombiniert, wird meist 5-Fluorouracil oder Capecitabin als Chemotherapeutikum verwendet. Durch die Chemotherapie können folgende Nebenwirkungen auftreten: Haarverlust, Mundsoor, Appetitverlust, Übelkeit und Erbrechen, Diarrhö, Leukopenie mit dem Risiko einer erhöhten Infektionsgefahr, Thrombozytopenie sowie Müdigkeit auf Grund einer Anämie. Cisplatin und Oxaliplatin können zusätzlich Nervenschädigung verursachen. Dies führt meist zu einer Neuropathie an Händen und Füßen (48).

-Zielgerichtete Therapie (targeted Therapie)

Neue Medikamente werden entwickelt, um gezielt spezielle molekulare Abläufe ("Pathways") im Karzinom zu unterdrücken oder zu hemmen. Eine dieser zielgerichteten Therapien legt den Fokus auf tumoröse Blutgefäße. Der Gallenblasentumor benötigt neue Blutgefäße um Wachstum zu gewährleisten. Bevacizumab (Avastin) hemmt das durch den Tumor induzierte Wachstum von Blutgefäßen. Ein weiterer Angriffspunkt ist ein Wachstumsrezeptor an der Tumoroberfläche, nämlich der Rezeptor EGFR des epithelialen Wachstumsfaktors (=EGF), der in hohen Mengen an der Oberfläche der Karzinomzellen gefunden wurde und in tumorbedingt gesteigertem Ausmaß das Wachstum der Tumorzelle fördert. Zwei

monoklonale Antikörper (Cetuximab und Lapatinib) hemmen durch ihre Bindung an EGFR dessen Aktivierung und haben somit einen antiproliferativen Effekt im Tumorgewebe (49).

1.4.7.2. extrahepatisches Gallengangskarzinom

-Operative Resektion

Bei Tumoren der extrahepatischen Gallengänge, die das proximale und mittlere Drittel des Gallengangs infiltrieren, wird eine vollständige Resektion der extrahepatischen Gallengänge mit ausgedehnter Lymphadenektomie des Ligamentum hepatoduodenale und eine Cholezystektomie durchgeführt. Erreicht ein proximal wachsender Tumor bereits die Leber, so wird der Eingriff um eine rechts- oder linksseitige Hemihepatektomie oder eine zentrale Leberresektion erweitert. Die Rekonstruktion, um den Gallenabfluss in den Intestinaltrakt zu gewährleisten, erfolgt über eine Y-Roux- Schlinge, die mit dem proximalen Gallenwegstümpfen anastomosiert wird.

Bei distal infiltrierenden Gallengangskarzinomen wird eine partielle Duodenopankreatektomie mit Lymphadenektomie angestrebt (Whipple-Operation) (50).

-Radiotherapie

Kann ein extrahepatisches Gallengangskarzinom nicht mehr im Gesunden entfernt werden, wird eine Afterloadingtherapie versucht. Bei dieser Methode werden operativ oder perkutan eine oder mehrere Führungskatheter in den Gallengang eingelegt. Über diese erfolgt dann die Bestrahlung mit der Strahlenquelle (Iridium). Mit dieser Methode kann in einigen Fällen der Gallenabfluss temporär wieder hergestellt werden. In der palliativen Therapie des extrahepatischen Gallengangskarzinoms ist es wichtig für eine Entlastung der gestauten Gallengänge zu sorgen. Dies ist endoskopisch über eine Pigtaildrainage oder perkutan möglich. Drainagen, die perkutan gelegt werden, können entweder nach außen abgeleitet oder über die Stenose bis in den Dünndarm vorgeschoben werden, um eine innere Galleableitung zu gewährleisten.

Ein weiteres palliatives Therapieverfahren ist die photodynamische Therapie, bei der ein Photosensitizer intravenös appliziert wird. Dieser reichert sich in den malignen Zellen an. Mittels ERCP erfolgt über einen speziellen Lichtleiter die Photoaktivierung, wodurch eine Tumorzellnekrose induziert wird. Diese Maßnahme wird mit einer Stentanlage kombiniert und muss alle 3-6 Monate wiederholt werden (50).

-Chemotherapie

Bei fortgeschrittenen extrahepatischen Gallengangskarzinomen werden Chemotherapeutika (als Monotherapie bzw. Kombinationstherapie) als palliative Therapie verwendet (51).

-Chemoradiotherapie und Lebertransplantation

Die Lebertransplantation ist eine kurative Option für das Karzinom der extrahepatischen Gallengänge. Dieses Verfahren wird jedoch als kontrovers angesehen. Im Vorfeld ist eine Chemoradiotherapie bei Karzinomen, deren Sitz an der Leberpforte ist, indiziert um danach die Lebertransplantation durchzuführen. Diese Methode wird nur in vereinzelten Zentren durchgeführt (2).

2. Fragestellung

Die histologische Unterscheidung zwischen nichtneoplastischem, extrahepatischem Gallenblasen- bzw. Gallengangsepithel, präinvasiver Vorläuferläsionen (low-grade bzw. high-grade BilIN) und invasivem Karzinom der Gallenblase und extrahepatischen Gallengängen ist rein auf Basis der Hämatoxylin-Eosin Färbung ohne zusätzliche immunhistochemische Färbungen mitunter schwierig. Diese Problematik wird einerseits durch geringe Materialmengen, wie bei kleinen Biopsaten, oder zytologischen Abstrichen bedingt. Die zytologische Gewinnung von Zellmaterial in Gallengängen während einer ERCP ist essentiell zur histologischen Diagnostik eines Cholangiokarzinoms. Die Spezifität der zytologischen Untersuchung beträgt 100%, jedoch schwankt die Sensitivität zwischen 23% und 80% (52) (53) (54). Die niedrige Sensitivität kann durch die geringe Zellzahl der Gallengangstumore und durch den Stromareichtum des Karzinoms des pankreato-biliären Systems bedingt sein. Ein wiederholter Abstrich der Zytologie verbessert die Sensitivität nur gering (35%-44%) (52). Andererseits sind auch bei reichlich und gut beurteilbarem Zellmaterial entzündlich-reaktive Epithelveränderungen, die üblicherweise im Rahmen einer Infektion bzw. Cholezystolithiasis bzw. Choledocholithiasis verursacht werden, schwer von einer BilIN zu unterscheiden. Bei beiden Läsionen sind Veränderungen am Zellkern mit Verschiebung der Kern/Zytoplasmarelation und gehäuft Mitosen vor allem in der Nachbarschaft von Ulzerationen zu finden. In manchen Fällen kommt es zu einer ausgeprägten Ausdehnung der BilIN im gesamten Gallengangssystem (sogenannter "field change"). Bei Nachweis von low-grade BilIN in der Zytologie ist deshalb eine engmaschige Kontrolle der Patienten nötig. Liegt hingegen eine high-grade BilIN vor, ist diese als Präkanzerose zu werten und ist mit

einem erhöhtem Risiko für das Auftreten eines invasiven Karzinoms assoziiert. Besondere Bedeutung kommt der BilIN bei Auftreten am Resektatrand von operativen Gewebsschnitten oder Whipple-Resektaten zu. Da es sich um eine Präkanzerose (Carcinoma in situ) handelt, ist hier eine Nachresektion erforderlich.

Obwohl für die zytologische Untersuchung eine 100% Spezifität berichtet wurde, ist die Sensitivität für die Diagnose eines Karzinoms gering. Daten aus der Literatur belegen, dass mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden oder der In-situ-Hybridisierung die Sensitivität der zytologischen Untersuchung verbessert werden. So konnte in einer Studie (55) mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) die Sensitivität des Karzinomnachweises von 15% auf 44% verbessert werden, mit Proben, die gegen perizentrale Regionen der Chromosome 3, 7, 17 und gegen 9p21 gerichtet sind.

Weiters kann der Nachweis von Biomarkern neoplastischer Läsionen im pankreato-biliären System zur Verbesserung der Sensitivität herangezogen werden. In einer kürzlich durchgeführten Metaanalyse wurden als Tumormarker des pankreato-biliären Systems die Proteine KOC1, S100P und Mesothelin an pankreato-biliären Adenokarzinomen beschrieben (6).

In unserer Studie wurde daher untersucht, ob die Sensitivität und Spezifität der histologischen Klassifikation von biliären neoplastischen Läsionen mit Hilfe von Antikörpern, die gegen die Tumormarker pVHL, S100P, KOC1, Mesothelin, Ki-67 und p53 gerichtet sind, verbessert werden kann.

3. Ziele

Ziel dieser Studie ist es die Sensitivität und Spezifität immunhistochemischer Untersuchungen mit Antikörpern gegen die Tumormarker pVHL, S100P, KOC1, Mesothelin, Ki-67 und p53 für die Diagnose der low-grade, high-grade BilIN, des invasiven Adenokarzinoms sowie reaktiver Veränderungen des Gallengangsepithels zu untersuchen.

Diese Untersuchungen sollen an histologischen Schnitten von 56 Gewebeproben durchgeführt werden. Insgesamt werden 33 reaktive Läsionen, 18 low-grade BilIN, 14 high-grade BilIN Läsionen und 22 invasive Karzinome untersucht.

Zusätzlich soll ermittelt werden, ob durch Kombination von Antikörpern eine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der Diagnose der oben angeführten Läsionen ermöglicht wird.

4. Materialien und Methoden

4.1. Literaturrecherche

Es wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, die sich sowohl auf die biliäre, als auch auf die pankreatische Neoplasie des Gangsystems (BillIN, PanIN, extrahepatische Gallengangskarzinom, Gallenblasenkarzinom sowie duktales Adenokarzinom des Pankreas stützte. Da es eine größere Anzahl von Publikationen gibt, die sich auf die PanIN bzw. das duktales Adenokarzinom beziehen, wurden diese Tumormarker in die Evaluation einbezogen. Die Publikationen wurden in Pubmed mit den Schlagwörtern PanIN, BillIN, Adenokarzinom und Tumormarkern, sowie durch die in diesen Publikationen genannten Referenzen aufgesucht. Insgesamt wurden 72 Publikationen gesichtet und die am häufigsten beschriebenen Tumormarker identifiziert. Die ausgewählten Publikationen werden in Tab. 10 nach den entsprechenden Tumormarkern aufgelistet.

Tumormarker	Publikationen
pVHL	(56) (57) (58)
S100P	(56) (59) (57) (58)
Mesothelin	(60) (61)
Ki-67	(62) (63)
KOC1	(57) (58)
P53	(64) (65)

Tab. 10: Literaturangaben der häufigsten Tumormarker des pankreato-biliären Systems

4.2. Gewebe

Nach Erhalt eines entsprechenden Votums durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz wurden Schnitte und Formalin-fixiertes Paraffinmaterial (FFPE-Material) durch die der Biobank der Medizinischen Universität Graz aus ihrem Archiv bereitgestellt. Untersucht wurden Resektate, die zwischen 1988 und 2012 an der Pathologie der Medizinischen Universität Graz befundet wurden. In der Primärphase der Studie wurden insgesamt 89 Präparate von Gallenblasen und extrahepatischen Gallengängen histologisch evaluiert. 56 Gewebeproben waren für die weiterführende Analyse geeignet.

4.3. Histologische Klassifikation reaktiver und biliärer neoplastischer Läsionen

Die histologischen Schnitte der Gewebeproben wurden auf das Vorliegen reaktiver Läsionen, biliärer intraepithelialer Neoplasie und invasivem Karzinom von 2 Pathologen am Diskussionsmikroskop nach Zen et al. (20) im Konsens klassifiziert (siehe Tab. 11).

Diagnostische Kriterien für reaktive Veränderung des biliären Epithels und der biliären intraepithelialen Neoplasie

Hyperplasie oder regenerative Veränderungen

Diese Läsionen sind meist flach; eine low-papillär oder mikropapilläre Architektur wird oft im Zusammenhang mit Hepatolithiasis oder Choledochuszyste entdeckt, große papilläre Strukturen sind selten; Zellularität leicht erhöht im Vergleich zu normalem biliärem Epithel. Zellkerne sind rund oder oval, leicht vergrößert mit glatter Kernmembran. Chromatin ist fein und gleichmäßig verteilt. Intraepithelial finden sich neutrophile Granulozyten. Mitosen können vorkommen. (Wenn Mitosen gefunden werden ist eine Abgrenzung zur Dysplasie wichtig. Mitosen in BilIN kommen insbesondere bei BilIN-3 vor.)

BilIN-1 (low-grade BilIN)

Diese Läsionen sind flach oder zeigen mikropapilläre Architektur. Zellkerne sind an der Basis lokalisiert. Manche Läsionen zeigen fokale nukleäre Pseudostratifizierung; die Zellkerne verbleiben in den untersten 2/3 des Epithels. Eigenschaften der Zelle: milde nukleäre Abnormalitäten wie dezente Unregelmäßigkeit der Zellkernmembran, große Kern/Plasmarelation und Kernelongation. Kerngröße und Form sind relativ einheitlich, Präsenz von großen Zellkernen leitet zu der Diagnose BilIN-2 oder BilIN-3.

BilIN-2 (low-grade BilIN)

Diese Läsionen zeigen flache, pseudopapilläre oder mikropapilläre Architektur. Verlust der Zellpolarität - ist jedoch kein durchgehendes Charakteristikum. Zellkern-Pseudostratifizierung kann die luminale Oberfläche erreichen; Eigenschaften der Zelle: dysplastische Kernveränderungen wie Vergrößerung, Hyperchromasie und Unregelmäßigkeit der Zellkernmembran. Variationen in Zellkerngröße und Form kommen vor. Peribiliäre Drüsen können mitbeteiligt sein. Mitosen sind selten.

BilIN-3 (high-grade BilIN, Carcinoma in Situ)

Diese Läsionen zeigen pseudopapilläre oder mikropapilläre Architektur, sind selten flach. Die Zytologie ähnelt Karzinomen, aber keine Invasion durch die Basalmembran. Zellpolarität ist diffus und verzerrt - Kerne reichen an die luminale Oberfläche ran. Ein "Ausknospen" von Zellgruppen ins Lumen und kribriiforme Ausstülpung kommt vor. Maligne zytologische Eigenschaften wie starke Unregelmäßigkeit der Zellkernmembran, Hyperchromasie oder abnorm vergrößerte Zellkerne sind typisch. Mitosen kommen vor. Peribiliäre Drüsen können mitbeteiligt sein.

Tab. 11: "Consensus Classification System of BilIN" von Zen et. al. (20)

Tubuläre Adenokarzinome wurden anhand der Kriterien Invasion in das umliegende Gewebe, Lymphgefäß- und Nerveneinbrüche identifiziert.

Weiters wurden Begriffe definiert, um die klinisch relevanten Fragestellungen miteinander vergleichen zu können:

Neoplastische Läsionen: low-grade BilIN, high-grade BilIN, invasives Karzinom

Low-grade Läsionen: reaktive Läsionen, low-grade BilIN

High-grade Läsionen: high-grade BilIN, invasives Karzinom

4.4. Codierung

Um die Anonymität der Patienten zu wahren wurde eine Codierung durch Vergabe des initialen Buchstabens „B“- entsprechend Proben der „BilIN“ Studie gefolgt von einer fortlaufenden Nummer entworfen. Wurden mehrere Proben des gleichen Falles ausgewählt wurde dies durch einen Schrägstrich und nachgestellter Subnummerierung gekennzeichnet.

4.5. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) nützt die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen zur genauen Lokalisation von Epitopen gesuchter Antigene. Ein Epitop ist eine Sequenz von 5-10 Aminosäuren. Die Antigenbindungsstellen des eingesetzten Antikörpers sind gegen diese Epitope gerichtet. Die IHC hat in den letzten Jahren maßgeblich zur Tumordiagnostik und Forschung beigetragen. Die IHC besteht aus 2 Schritten:

- Als erstes wird ein primärer Antikörper eingesetzt, welcher sich an das Epitop des gesuchten Antigens im Gewebe oder der Zelle bindet. Es gibt polyklonale und monoklonale Antikörperpräparationen. Da Epitope durch die Formalinfixierung oft verändert werden und dadurch der Primärantikörper nicht oder nur suboptimal gebunden wird, wird häufig ein sogenanntes Epitopretrieval durchgeführt, dass das Epitop wieder in einen für den Primärantikörper bindungsfähigen Zustand zurückversetzen soll (meist durch Wärmeeinwirkung in Pufferlösungen unterschiedlichen pH Werts).
- Diese gebundenen, primären Antikörper werden mit direkter oder indirekter Methode sichtbar gemacht. Bei der direkten Methode trägt der primäre Antikörper ein Markermolekül, welches nach der Immunreaktion wieder nachgewiesen werden kann. Bei

der überwiegend und in der histopathologischen Routine praktisch ausschließlich verwendeten indirekten Methode werden an den primären Antikörper ein bzw. mehrere Zweitantikörper (Sekundärantikörper) gebunden. Der Sekundärantikörper ist seinerseits in der Lage in einer chromogenen Reaktion mit der Chemie des nachfolgend aufgebracht Detektionssystems die Epitop-Primärantikörperbindung mit hohem Verstärkungsfaktor am Schnitt zu visualisieren (15).

Für die immunhistochemische Analyse wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und hernach in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) überführt. Für jeweiliges Antigenretrieval bzw. verwendeten Primär- und Sekundärantikörper siehe nachfolgende Ausführungen zum jeweiligen Antikörper. Zur Visualisierung kam entweder ein 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Detektionssystem oder ein 3-Amino-9-EthylCarbazole(AEC)-Detektionssystem zum Einsatz, wodurch der Antigen-Antikörperkomplex durch eine braune Färbung markiert wurde. Im Folgenden wird jeder Antikörper einzeln beschrieben. Die technischen Bedingungen sind in Tab. 12 für jeden Antikörper zusammengefasst.

-Mesothelin

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit einem Mesothelin-Primärantikörper der Firma Novocastra (m-a-Mesothelin clone 5B2, Novocastra NCL-MESO). Nach Deparaffinierung in Xylol, Rehydratation in absteigender Alkoholreihe und PBS (pH 7.3) Waschung folgte ein Epitopretrieval. Dieses erfolgte durch Erhitzen in DakoTRS 9,0 Puffer (Mikrowelle, 40 Minuten), Abkühlen für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Hernach Spülung mit PBS und endogene Peroxidasenblockierung mittels H₂O₂ für 5 Minuten. Der Primärantikörper (Verdünnung 1:50) wurde für 60 Minuten inkubiert. Die Sekundärantikörperbindung erfolgte mittels EnVision™ (DAKO) für 30 Minuten. Dieses biotinfreie Detektionssystem besteht aus einem Sekundärantikörper mit einem durch multiple Peroxidase-Moleküle enzymkonjugierten Polymer-Rückgrat (sog. labeled polymer). Danach erfolgte die Visualisierung durch 10 minütige Inkubationen mit DAB. Nach abschließender Gegenfärbung mit Hämalaun und Entwässerung in einer Alkoholreihe, sowie Immersion in Butylacetat wurde der Schnitt mit Eindeckmedium und Deckglas versehen.

-p53

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem Primärantikörper der Firma DAKO m-a-h-P53 Protein clone DO-7 IgG2b. Deparaffinierung und Rehydratation bis in PBS (pH 7.3) Puffer wie für Mesothelin beschrieben. Epitopretrieval (Mikrowelle, 98,5°C in Epitope Retrieval Buffer pH6,0 (DAKO) für 40 Minuten, danach 20 minütige Abkühlphase. PBS-Spülung und endogener Peroxidaseblocke wie oben beschrieben. Primärantikörperinkubation für 60 Minuten (Verdünnung 1:100). Anschließend jeweils 15 Minuten Inkubation mit ChemMate™ Kit (DAKO) der Sekundär und Tertiärantikörper beinhaltet. Hernach 10 minütige Inkubationen mit AEC, Gegenfärbung mit Hämalaun und Eindeckung des Schnittes.

-pVHL

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem Primärantikörper der Firma Abcam: Antibody 52A11 (clone L-181). Deparaffinierung und Rehydratation bis in PBS (pH 7.3) Puffer wie für Mesothelin beschrieben. Anschließend erfolgte ein Epitopretrieval (Wasserbad, 40 Minuten in DakoTRS 9,0 Puffer). Danach 20 minütige Abkühlphase, PBS Spülung und endogene Peroxidaseblockierung durch H₂O₂ für 5 min. Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 Minuten (Verdünnung 1:50). Die Sekundärantikörperbindung erfolgte mittels EnVision™ (DAKO) für 30 Minuten, danach 10 minütige Inkubation mit DAB, Gegenfärbung mit Hämalaun, Entwässerung in Eindecken des Schnittes wie oben beschrieben.

-KOC1

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem Primärantikörper der Firma DAKO antihuman L523S, clone 69.1. Deparaffinierung und Rehydratation bis in PBS Puffer wie für Mesothelin beschrieben. Anschließend erfolgte ein Epitopretrieval (Mikrowelle, 40 Minuten in DakoTRS 9,0 Retrieval Puffer). Danach 20 minütige Abkühlphase, PBS Spülung und endogene Peroxidaseblockierung durch H₂O₂ für 5 min. Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 Minuten (Verdünnung 1:100). Die Sekundärantikörperbindung erfolgte mittels EnVision™ (DAKO) für 30 Minuten, danach 10 minütige Inkubation mit DAB, Gegenfärbung mit Hämalaun, Entwässerung in Eindecken des Schnittes wie oben beschrieben.

-S100P

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem Primärantikörper der Firma BD Biosciences, S100P (clone 16/S100P). Deparaffinierung und Rehydratation bis in PBS (pH

7.3) Puffer wie für Mesothelin beschrieben. Diese Schnitte wurden mit Hilfe des Systems Ventana Benchmark gefärbt. Das Epitopretrieval erfolgte im Gerät mittels CC1mild (Ventana), gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:100) für 32 Minuten. Danach erfolgte die Inkubation mit dem direkt Peroxidase-konjugierten, biotinfreien Sekundärantikörper mittels des UltraViewDetectionKit System (Ventana). Nach 10 minütiger Inkubation mit DAB Gegenfärbung mit Hämalaun, Entwässerung in Eindecken des Schnittes wie oben beschrieben.

-Ki-67

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem Primärantikörper der Firma Ventana, Confirmanti Ki67 (clone 30-9). Die Schnitte wurden mit Hilfe des Systems Ventana Benchmark gefärbt. Das Epitopretrieval erfolgte im Gerät mittels CC1mild (Ventana), gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper (gebrauchsfertig) für 32 Minuten. Danach erfolgte die Inkubation mit dem direkt Peroxidase-konjugierten, biotinfreien Sekundärantikörper mittels des IViewDetections-Kit (Ventana). Nach 10 minütiger Inkubation mit DAB Gegenfärbung mit Hämalaun, Entwässerung in Eindecken des Schnittes wie oben beschrieben.

Antikörper	Firma	Clone des Antikörpers	Wirtstier	Antigen Retrieval	Antikörper-verdünnung	Dauer der Inkubation
Mesothelin	Novocastra	5B2	Mouse Monoclonal	DakoTRS (Puffer pH 9,0)	1:50	60 min
p53	DAKO	DO-7 IgG2b	Mouse Monoclonal	DAKO (Puffer pH 6,0)	1:100	60 min
pVHL	Abcam	L-181	Mouse Monoclonal	DakoTRS (Puffer pH 9,0)	1:50	60 min
KOC1	DAKO	L523S, 69.1	Mouse Monoclonal	DakoTRS (Puffer pH 9,0)	1:100	60 min
S100P	BD Biosciences	16	Mouse Monoclonal	CC1mild (Ventana)	1:100	32 min
Ki-67	Ventana	30-9	Rabbit Monoclonal	CC1mild (Ventana)	Gebrauchsfertig	32 min

Tab. 12: Details der immunhistochemischen Methode für 6 Antikörper

4.6. Auswertung der Färbungen nach prozentuell positiv gefärbten Zellen und Score

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung wurden als Prozent der antikörpermarkierten Zellen angegeben. Zusätzlich wurde ein Score zur Auswertung herangezogen. Dieser Score setzt sich aus dem Produkt der Intensität der immunhistochemischen Färbung mal den Prozent der positiv markierten Zellen: $\text{Score} = \text{Intensität} * \text{Prozent}$ zusammen. Die Intensität wird in 3 Kategorien eingeteilt: 0 - keine Reaktivität; 1 - geringe Reaktivität; 2 - starke Reaktivität. Der Score kann somit Werten zwischen 0 und 200 entsprechen. Für die p53 bzw. die Ki-67 Färbungen erfolgte die Auswertung ausschließlich in Prozent positiv markierter Zellen.

4.7. Bestimmung der cut-off Werte

Es wurden ausgehend von der Analyse der Datenpunkte Schwellenwerte („cut-offs“) für beide Variablen (bzw. im Fall von p53 und Ki-67 lediglich für die ausgewertete Variable -Prozent positive Tumorzellen) gesetzt. Ein Ergebnis über dem Schwellenwert wurde als positives Ereignis, eines darunter als negatives Ereignis gewertet. Positive Ereignisse der Färbungen wurden dann statistisch hinsichtlich Sensitivität und Spezifität in Bezug auf die jeweilige Fragestellung ausgewertet.

Folgende Schwellenwerte wurden analysiert:

- 1.) pVHL % : >20 % pVHL Score >20
- 2.) S100P % : >10% S100P Score >20
- 3.) KOC1 % : >20% KOC1 Score >50
- 4.) Mesothelin % : >10% Mesothelin Score >20
- 5.) Ki-67 % : >50%
- 6.) p53 % : >1%

4.8. Statistik

Die Sensitivität und Spezifität wird für jeden verwendeten Antikörper für die Diagnosen neoplastische Läsionen im Vergleich zu reaktiver Läsion, high-grade Läsionen im Vergleich

zu low-grade Läsionen und invasives Karzinom im Vergleich zu high-grade BiIN berechnet.

Für die Berechnung gilt folgende Formel:

Sensitivität: tatsächlich positive Fälle / (tatsächlich positive Fälle + falsch negative Fälle)

Spezifität: tatsächlich negative Fälle / (tatsächlich negative Fälle + falsch positive Fälle)

5. Ergebnisse

Die 56 ausgewählten Blöcke wurden mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und bewertet. Insgesamt wurden 33 reaktive Läsionen, 18 low-grade BilIN, 14 high-grade BilIN Läsionen und 22 invasive Karzinome untersucht, die vor Durchführung der Immunhistochemie klassifiziert und mit Antikörpern gegen pVHL, S100P, KOC1, Ki-67, Mesothelin und p53 immunhistochemisch untersucht wurden.

5.1. Histologische und immunhistochemische Charakteristika reaktiver und neoplastischer Läsionen

In den folgenden Abbildungen werden typische Reaktivitäten der verwendeten Antikörper illustriert.

Abbildung 2: Reaktiv verändertes Gallenblasenepithel: A: HE Färbung: Geringgradig reaktiv vergrößerte, hyperchromatische Zellkerne in Umgebung einer Ulceration; B: Ki-67 Antikörper zeigt keine gesteigerte Proliferation; C und D: Reaktive Epithelabschnitte ohne KOC1 und S100P Positivität; E: pVHL Antikörper markiert normales Epithel; F und G: Mesothelin und p53 sind negativ im reaktiven Epithel

Abbildung 3: Low-grade BilIN: A: HE-Färbung zeigt pseudostratifizierte, längliche, hyperchromatische, polarisierte Zellkerne; B: Ki-67 zeigt keine gesteigerte Proliferation; C: KOC1 und S100P sind negativ in der low grade BilIN; E: pVHL Antikörper markiert normales Epithel und läSIONALES Epithel; F und G: Mesothelin und p53 sind negativ

Abbildung 4: High-grade BilIN: A: HE-Färbung zeigt depolarisierte, massiv hyperchromatische, anisomorphe Zellkerne; B: Ki-67: Massiv gesteigerte Proliferation mit abruptem Übergang zur Umgebung; C: Starke KOC1-Positivität in 80% der Zellen; D: Starke S100P-Positivität in sämtlichen Zellen der BilIN; E: pVHL Antikörper markiert normales Epithel und läSIONALES Epithel; F: Mesothelin-Positivität in 90% der BilIN; G: p53-Positivität lediglich in Einzelzellen (als negativ gewertet)

Abbildung 5: Invasives extrahepatisches Gallengangskarzinom: A: HE- Färbung zeigt karzinomatöse Drüse umgeben von desmoplastischem Tumorstroma; B: Proliferationsfraktion von 95% mit Ki-67; C: KOC1-Positivität in 80% des karzinomatösen Epithels; D: S100P zeigt 100% positive Zellen; E: pVHL Antikörper markiert normales Epithel und läSIONALES

Epithel; F: Mesothelin-Positivität in 100% des Epithels; G: p53-Positivität lediglich in Einzelzellen (als negativ gewertet)

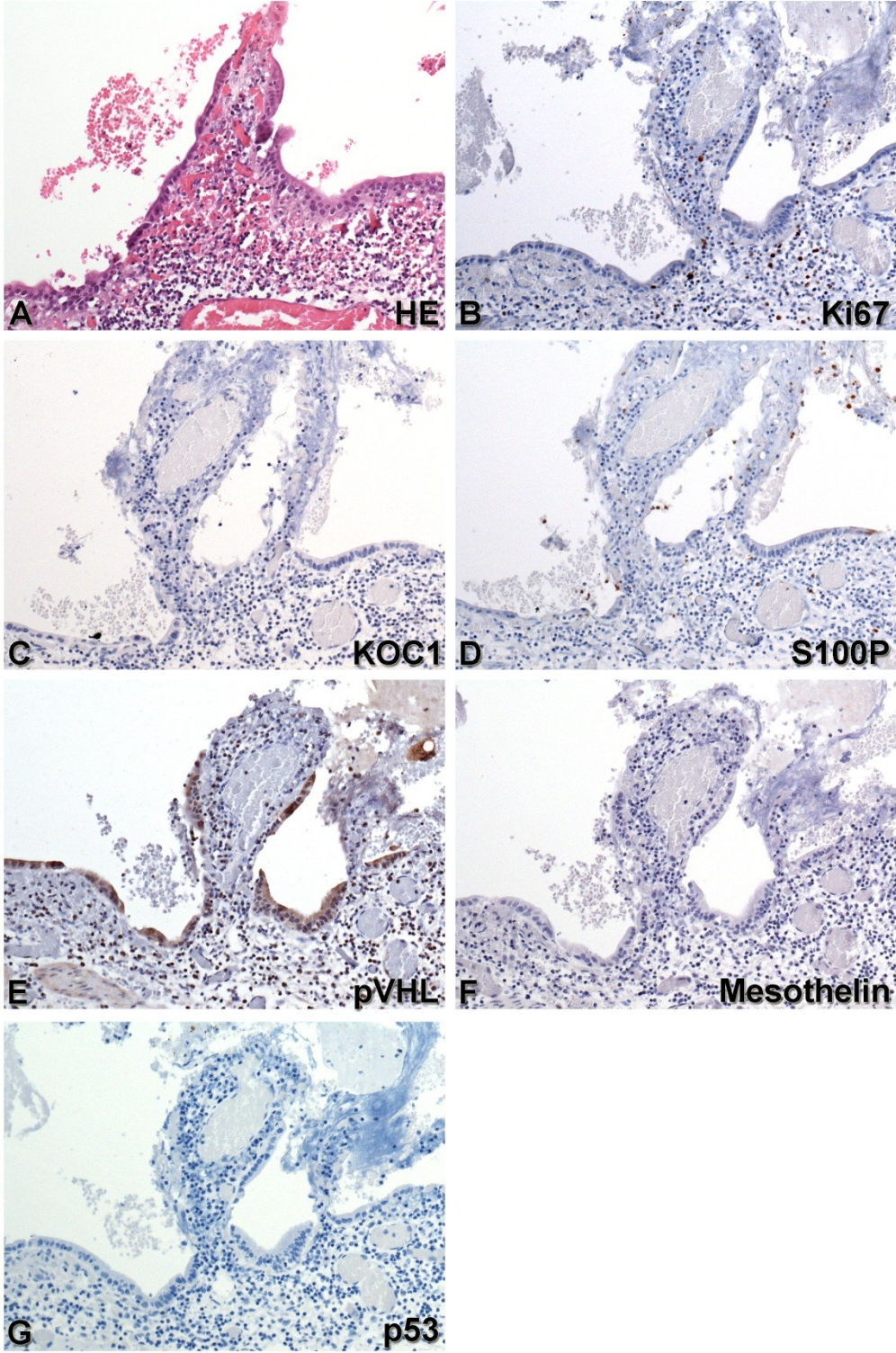


Abbildung 2: Reaktiv verändertes Gallenblasenepithel

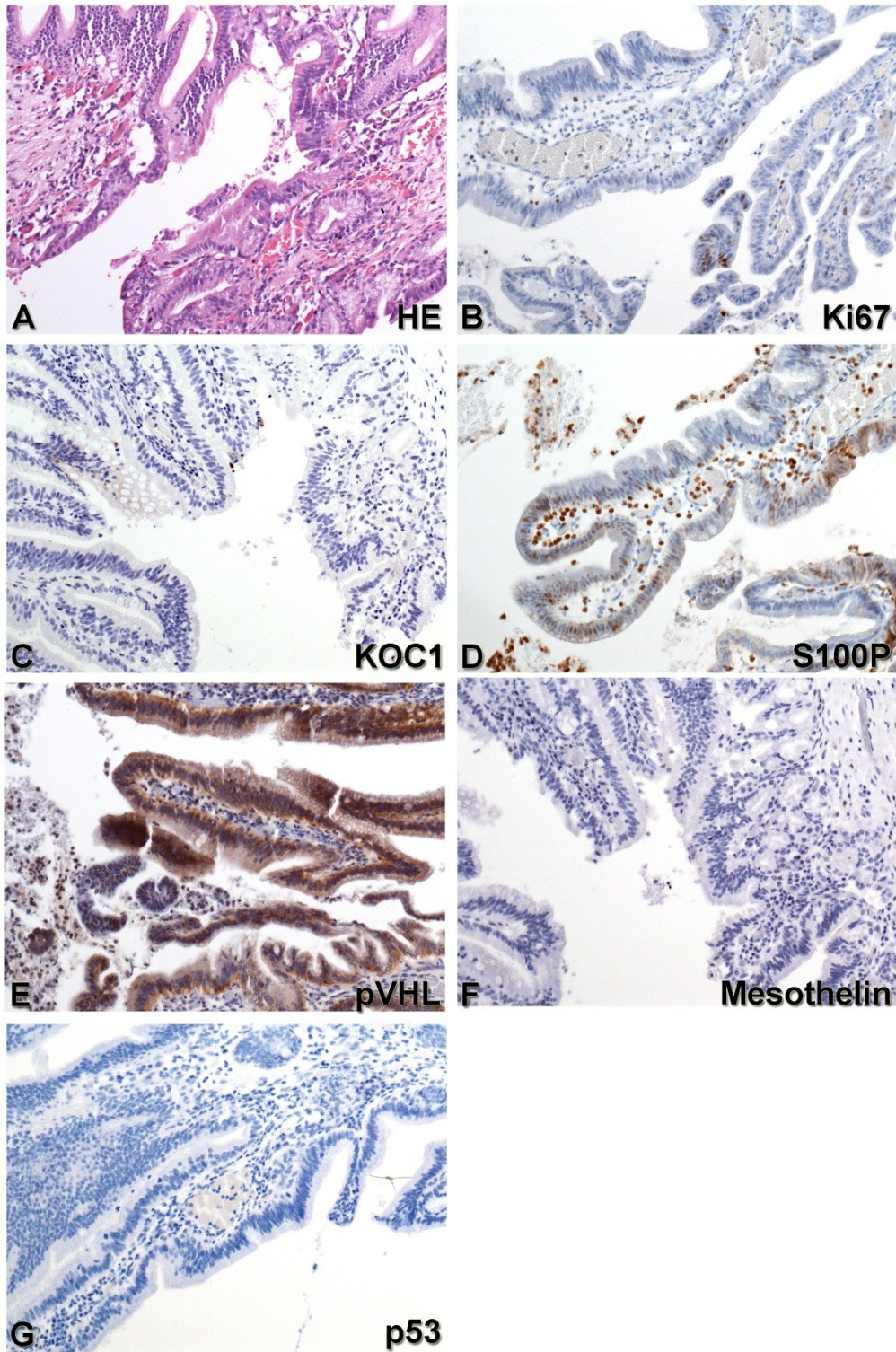


Abbildung 3: Low-grade BilIN

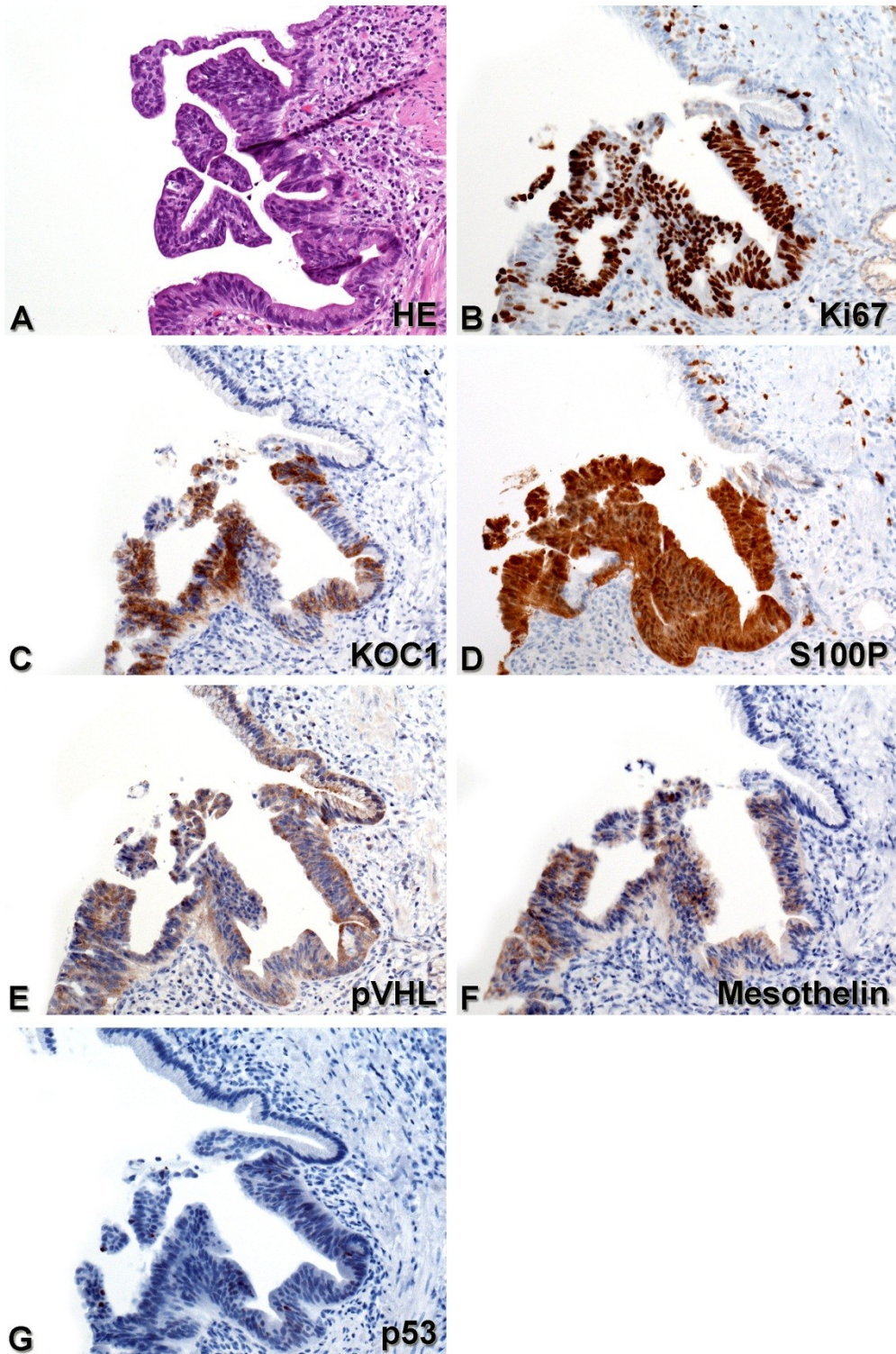


Abbildung 4: High-grade BILIN

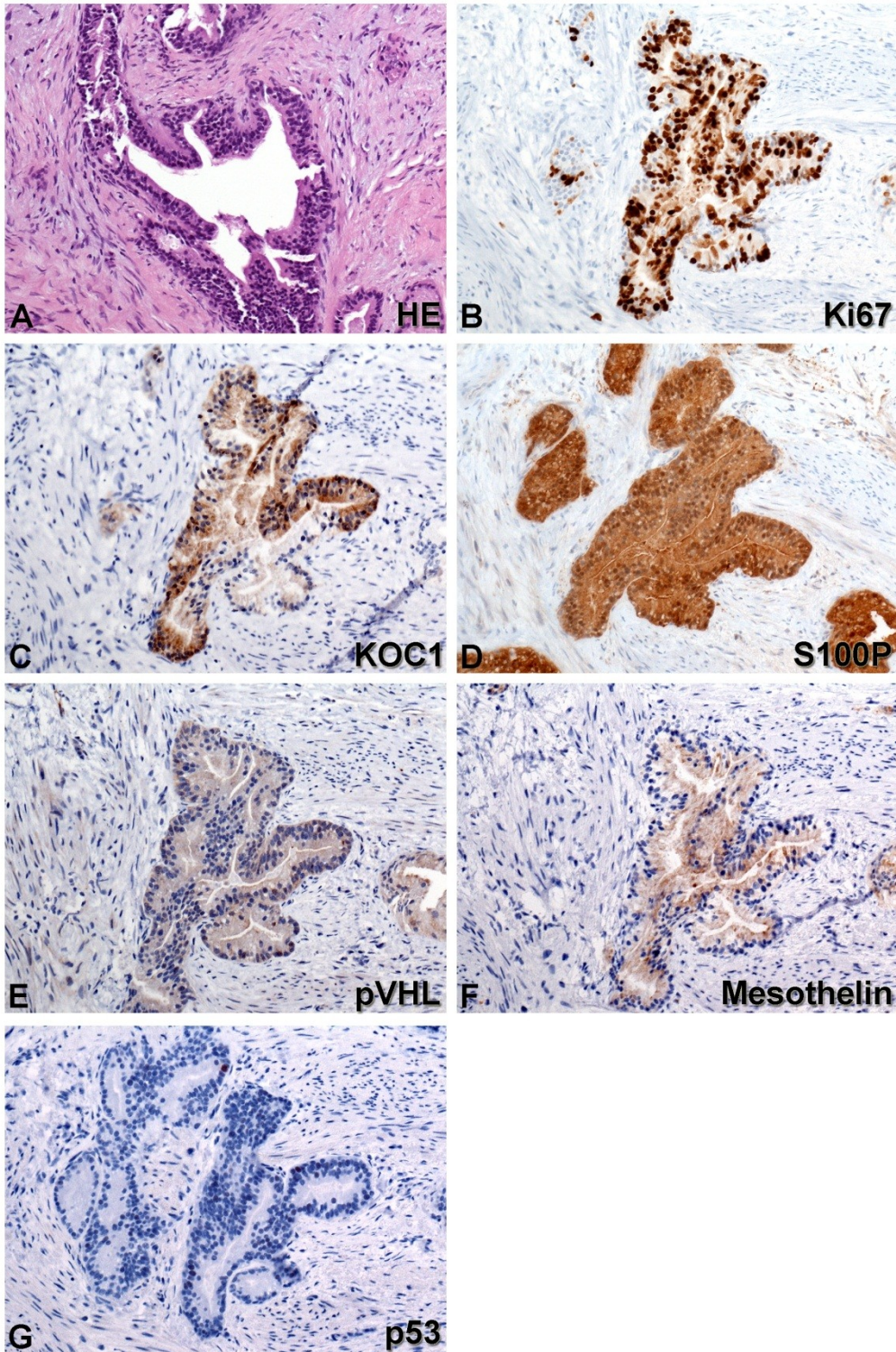


Abbildung 5: Invasives extrahepatisches Gallengangskarzinom

5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung in Bezug zur histopathologischen Diagnose

Die folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen (Auswertung in Prozent und als semiquantitativer Score) für alle sechs Antikörper und für alle histopathologischen Läsionstypen zusammengefasst.

5.2.1. Reaktive Läsionen

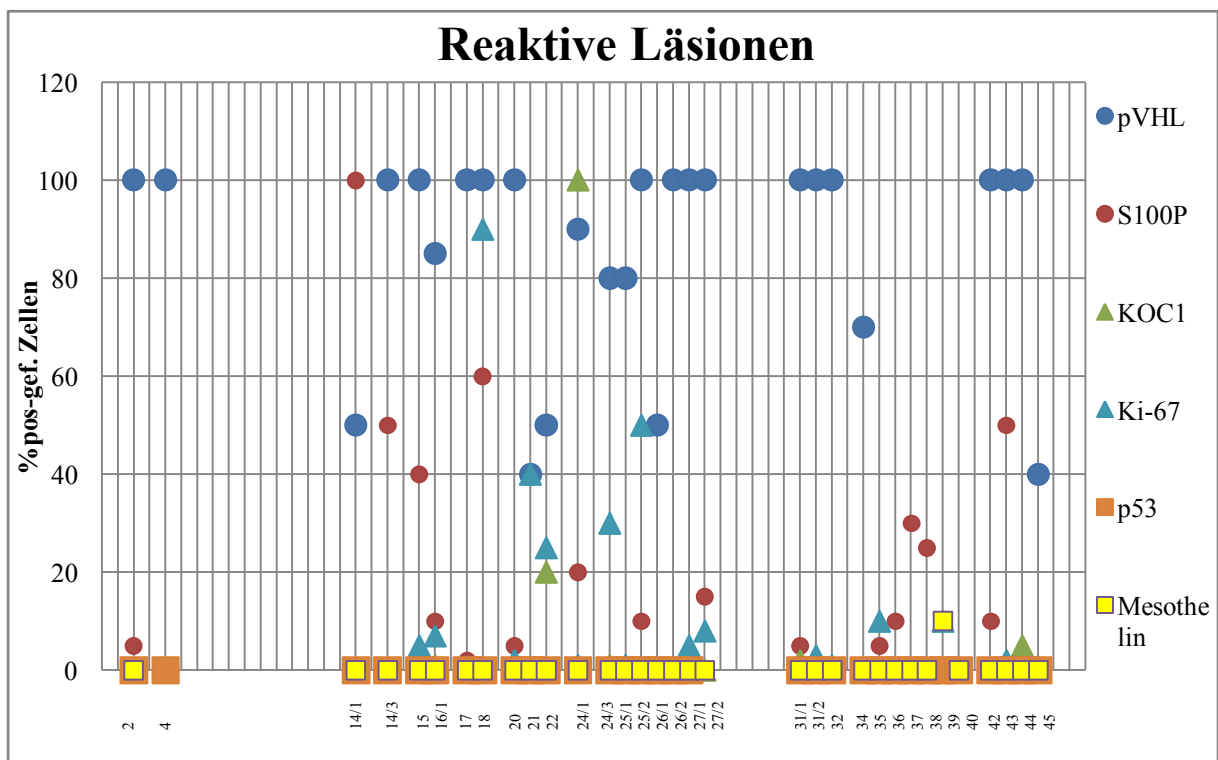


Abbildung 6: Reaktivität der reaktiven Epithelveränderungen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); Ki-67 (blaues Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach % pos.-gefärbten Zellen

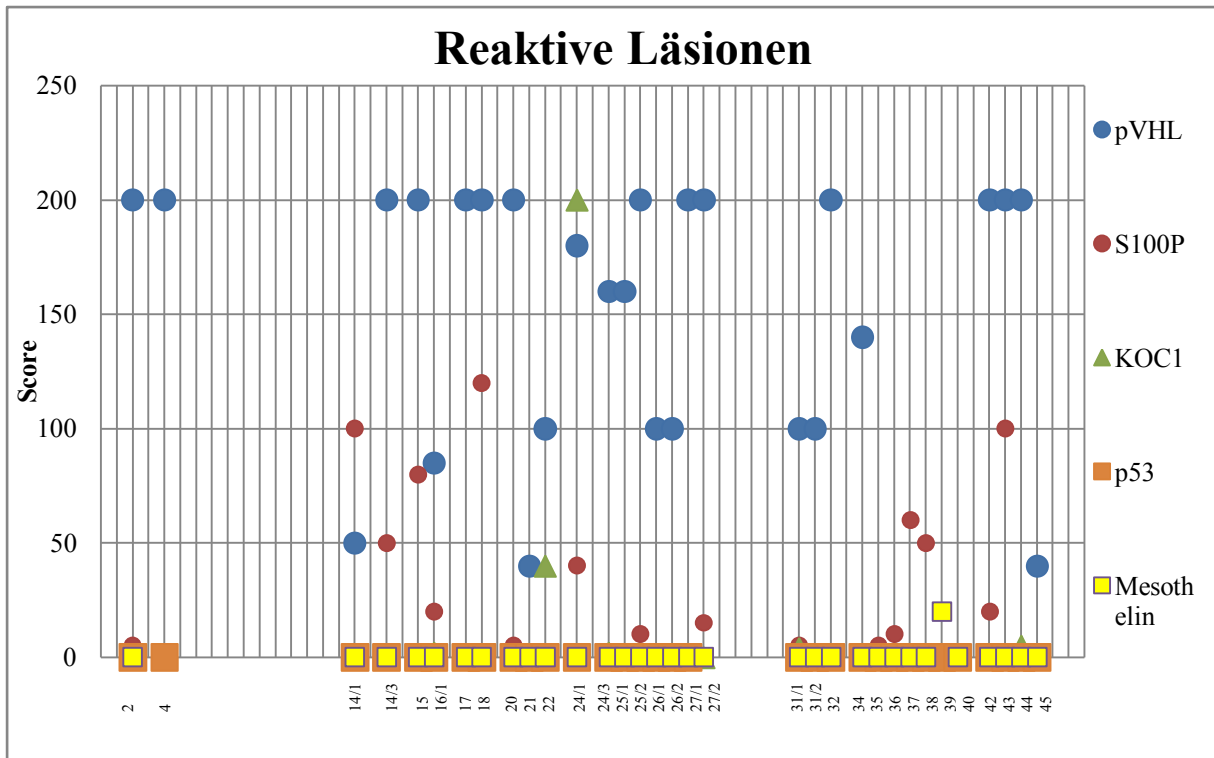


Abbildung 7: Reaktivität der reaktiven Epithelveränderungen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach Score

Die reaktiven Läsionen werden alle (Ausnahme Läsion B39) nicht mit Mesothelin- und p53 Antikörper (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7) markiert. KOC1 wird in beinahe allen Fällen negativ detektiert, ausgenommen die Läsion B24/1, die ebenfalls keine Reaktion mit Antikörpern gegen Mesothelin und p53 zeigt.

5.2.2. Low-grade BilIN Läsionen

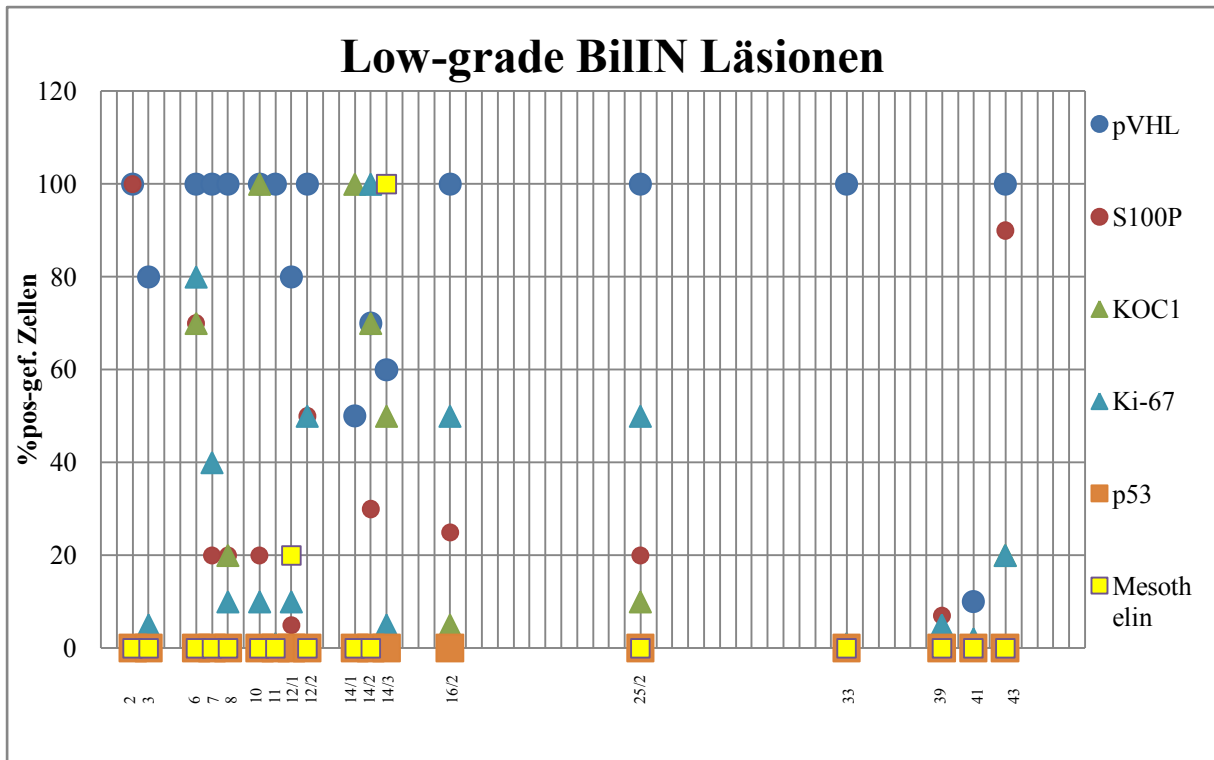


Abbildung 8: Reaktivität der low-grade BilIN Läsionen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); Ki-67 (blaues Dreieck); p53 (orange Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach % pos.-gefärbten Zellen

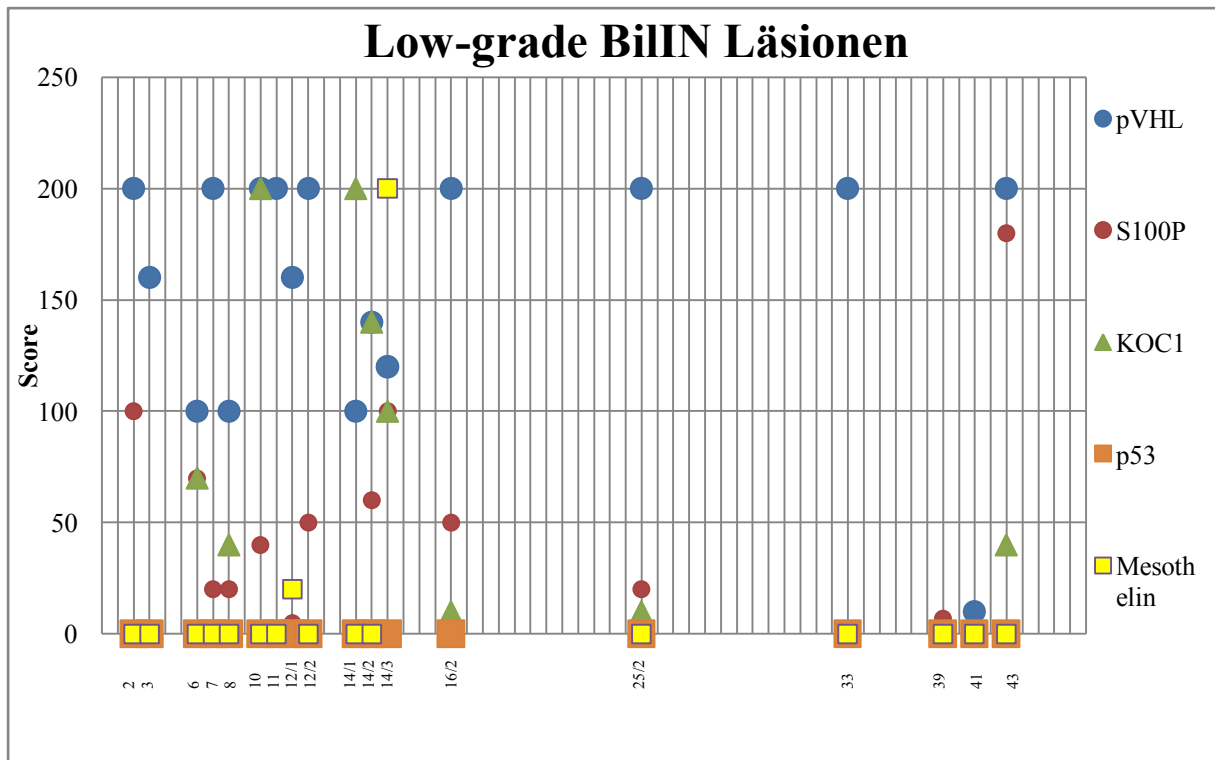


Abbildung 9: Reaktivität der low-grade BiIN Läsionen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach Score

Low-grade BiINs werden nicht mit Antikörper gegen p53 und Mesothelin markiert, mit Ausnahme der Läsionen B14/3 und B12/1 (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). Die Läsion B14/3 zeigt eine 100% positive Markierung der Zellen mit Mesothelin, jedoch keine Reaktion mit p53.

5.2.3. High-grade BilIN Läsionen

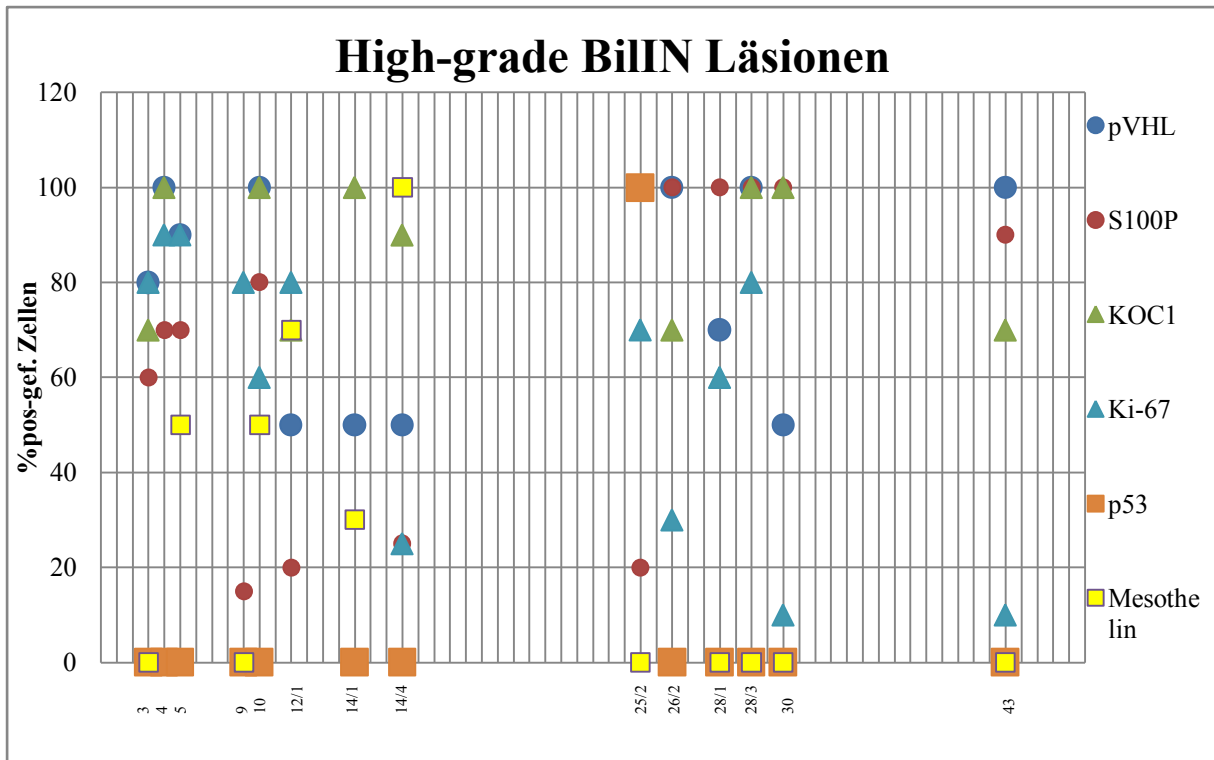


Abbildung 10: Reaktivität der high-grade BilIN Läsionen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); Ki-67 (blaues Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach % pos.-gefärbten Zellen

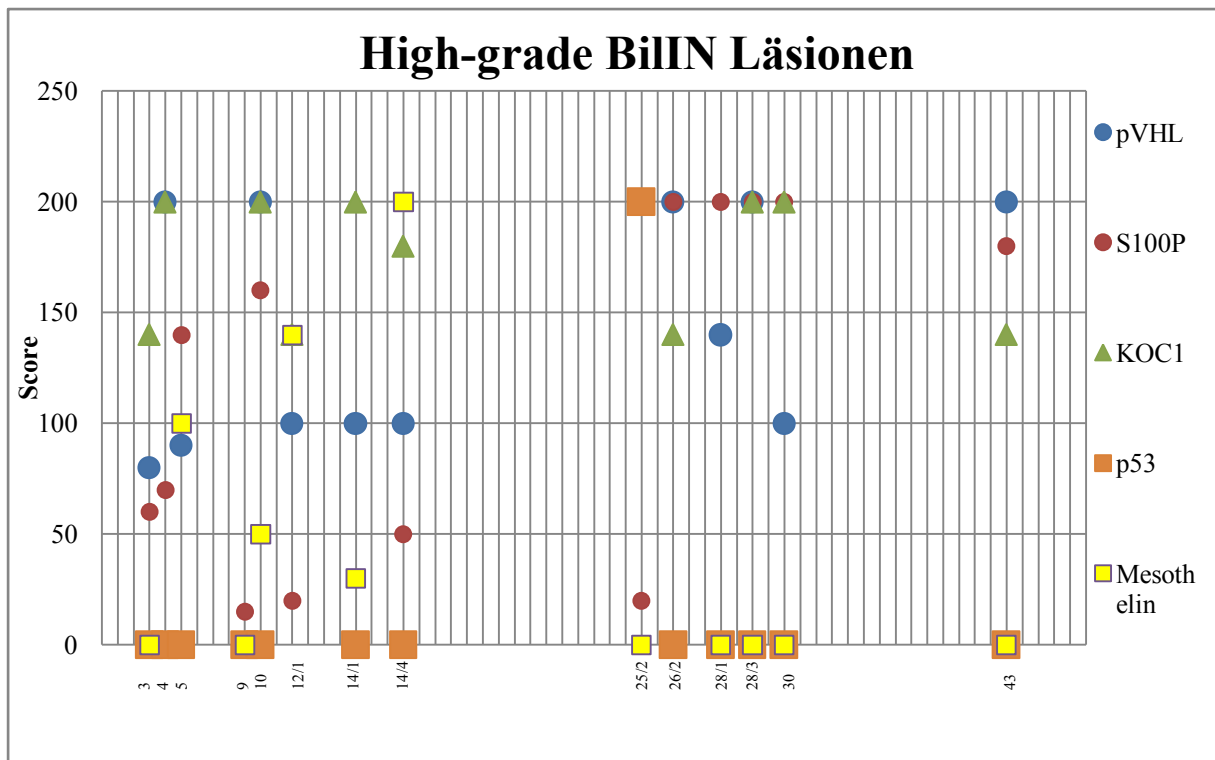


Abbildung 11: Reaktivität der high-grade BilIN Läsionen mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach Score

High-grade BilINs zeigen keine positive Reaktivität mit p53, ausgenommen Läsion B25/2 (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Jedoch zeigt diese Läsion keine Reaktivität gegen Mesothelinantikörper. Antikörper gegen KOC1 und Mesothelin markieren eine große Anzahl von Läsionen, die keine Reaktivität auf Antikörper gegen p53 zeigen.

5.2.4. Invasives Karzinom

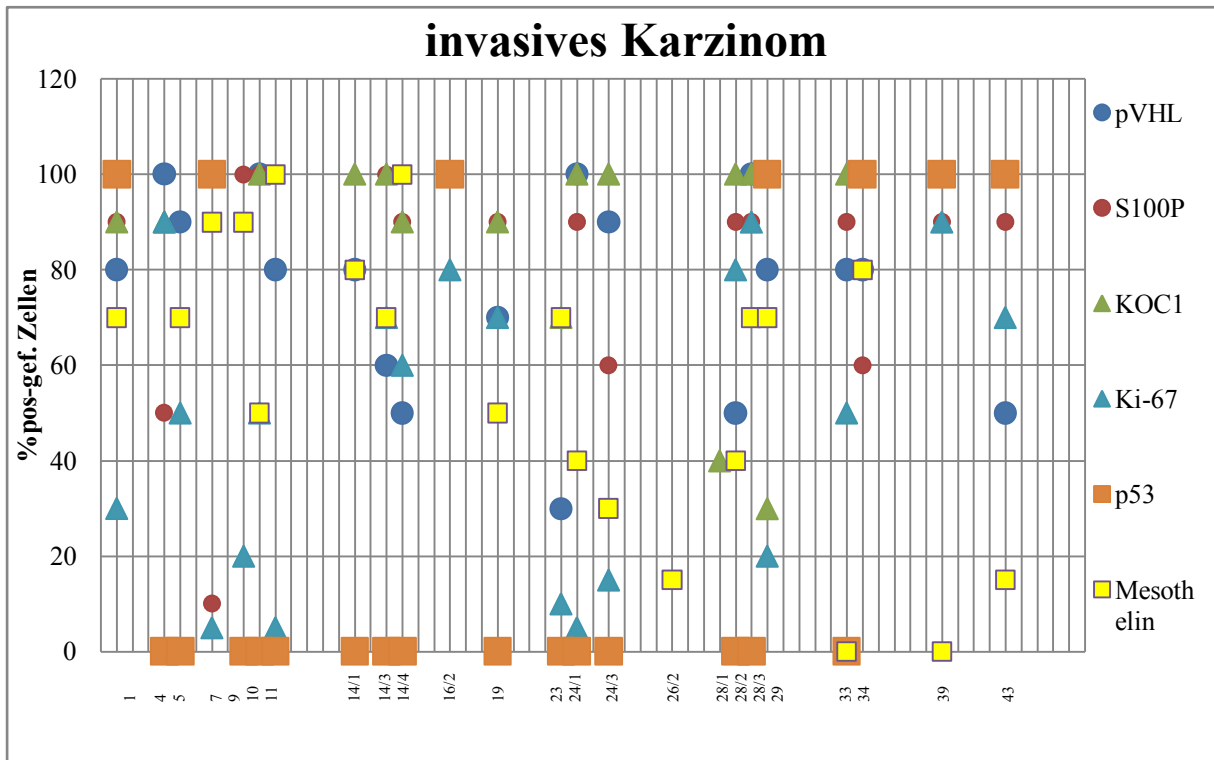


Abbildung 12: Reaktivität des invasiven Karzinoms mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); Ki-67 (blaues Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach % pos.-gefärbten Zellen

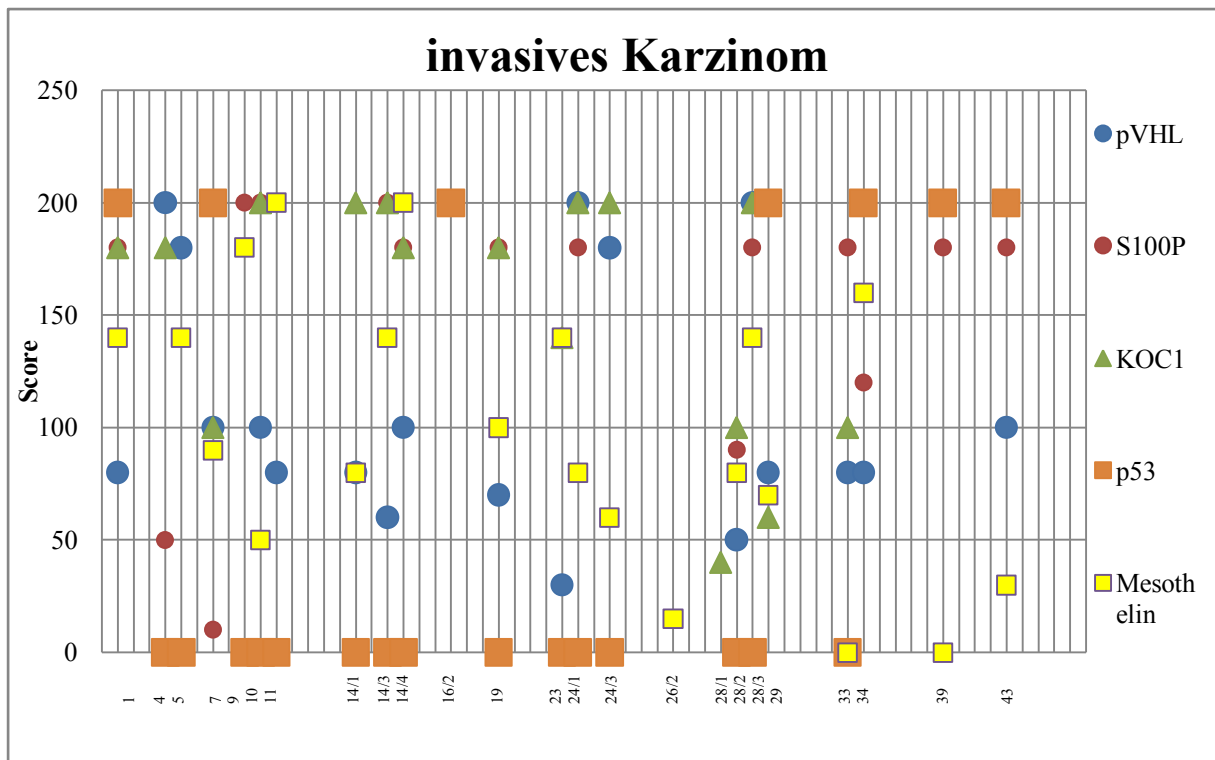


Abbildung 13: Reaktivität des invasiven Karzinoms mit Antikörpern gegen pVHL (blaue Kugel) S100P (rote Kugel); KOC1 (grünes Dreieck); p53 (oranges Quadrat); Mesothelin (gelbes Quadrat) nach Score

Mit Ausnahme von 2 Läsionen werden alle invasiven Karzinome mit Mesothelinantikörper erfasst (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13). Die 2 Läsionen zeigen jedoch eine positive Reaktion mit Antikörper gegen p53. Antikörper gegen KOC1 markieren einen Großteil der invasiven Karzinome.

5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung in Bezug zur histopathologischen Diagnose und dem evaluierten Antikörper

Der Antikörper gegen pVHL markiert alle Läsionen der reaktiven, high-grade BillIN Läsionen und der invasiven Karzinome (siehe Abbildung 14:A1 und Abbildung 14:A2).

Der Antikörper gegen S100P markiert 95% der invasiven Karzinome, jedoch reagieren ebenso 27% der reaktiven Läsionen und 61% der low-grade BillIN Läsionen positiv (siehe Abbildung 14:B1). Unter Verwendung des Scores werden ebenso 95% der invasiven Karzinome, 24% der reaktiven Läsionen und 44% der low-grade BillIN Läsionen als positiv gewertet (siehe Abbildung 14:B2).

Der Antikörper gegen KOC1 markiert 100% der high-grade BillIN und invasiven Karzinome, jedoch nur 3% der reaktiven Läsionen (siehe Abbildung 14:C1). Der Score wertet 90% der high-grade BillIN, 100% der invasiven Karzinome und 3% der reaktiven Läsionen als positiv markiert (siehe Abbildung 14:C2).

90% der invasiven Karzinome reagieren positiv auf den Antikörper gegen Mesothelin (siehe Abbildung 14:D1). Es werden 46% der high-grade BillIN Läsionen positiv markiert, hingegen wird keine reaktive Läsion mit Mesothelin als positiv bewertet. Mit Hilfe des Scores werden 35% der high-grade BillIN und keine der reaktiven Läsionen als positiv bewertet (siehe Abbildung 14:D2).

Der Tumormarker p53 markiert 32% der invasiven Karzinome (siehe Abbildung 14:E1) und 7 % der high-grade BillIN Läsionen. Reaktive und low-grade BillIN reagieren nicht positiv mit Antikörper gegen p53.

Antikörper gegen Ki-67 markiert 43% der invasiven Karzinome und 64% der high-grade BillIN Läsionen als positiv (siehe Abbildung 14:F). Es werden auf Grund des hohen cut-off Wertes wenige reaktive (3%) und low-grade BillIN Läsionen (11%) positiv gewertet. 64% der high-grade BillIN und 43% der invasiven Karzinome zeigen eine positive Markierung.

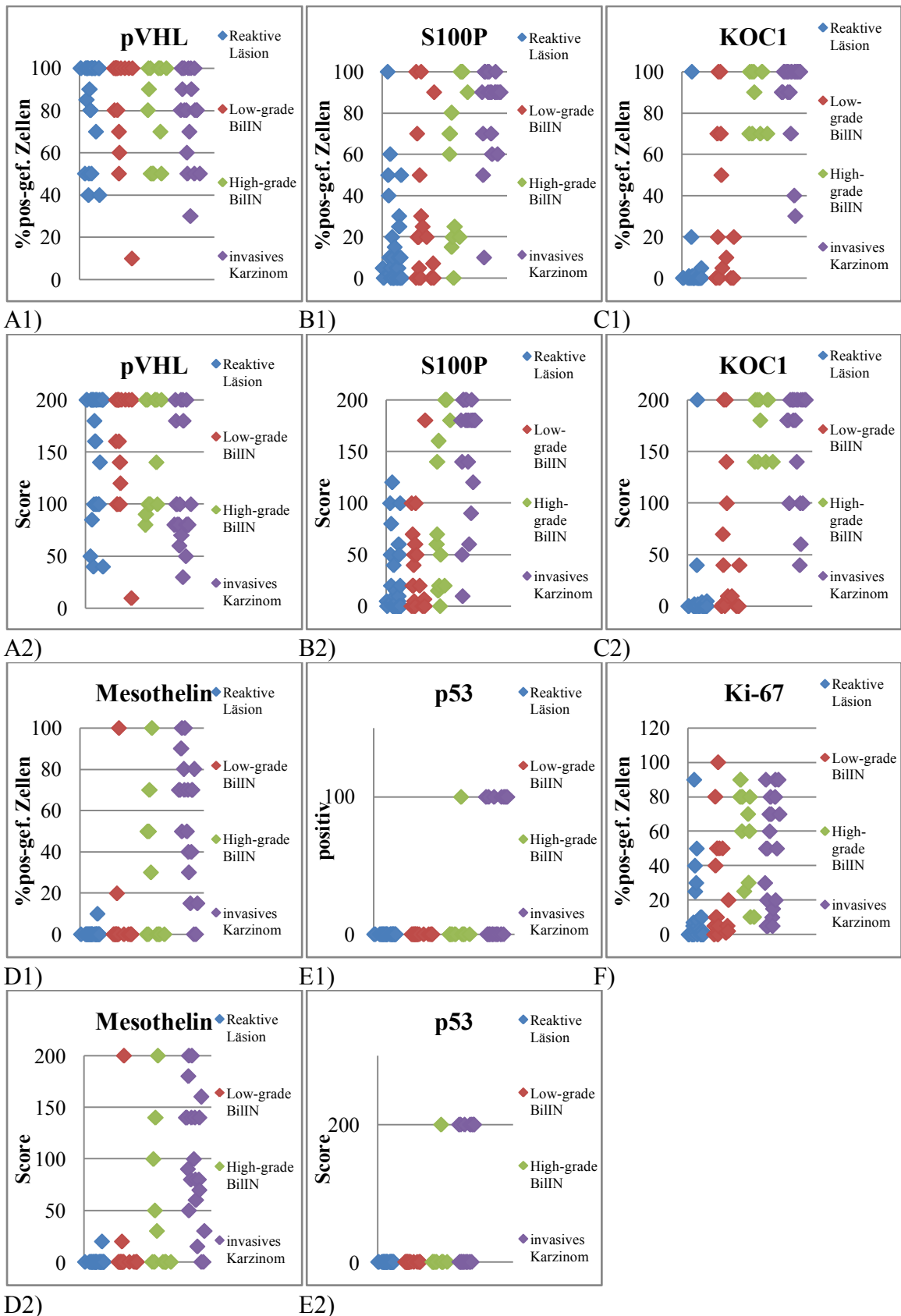


Abbildung 14: A - F; Zusammenfassung der Resultate der immunhistochemischen Auswertung in Bezug zur histopathologischen Diagnose und dem evaluierten Antikörper

5.4. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die histologische Klassifikation reaktiver und neoplastischer Läsionen des biliären Epithels

5.4.1. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer low-grade BillN im Vergleich zur reaktiven Epithelveränderung

Der Antikörper gegen pVHL zeigt eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 0% sowohl in Prozent als auch im Score (siehe Tab. 13). S100P Antikörper zeigt eine Sensitivität von 61% mit einer Spezifität von 73% in der Kategorie prozentueller Anteil der positiv gefärbten Zellen. Der Score verringert die Sensitivität (44%) bei beinahe gleichbleibender Spezifität (75%). Der Antikörper gegen KOC1 zeigt eine hochspezifische Unterscheidung der low-grade BillN Läsionen von reaktiven Läsionen, jedoch eine geringe Sensitivität sowohl in Prozent (29% Sensitivität und 97% Spezifität) als auch im Score (29% Sensitivität und 96% Spezifität). Mesothelinantikörper zeigt eine 100% Spezifität, hingegen eine sehr geringe Sensitivität. Der Score verringert die Sensitivität nochmals (5%), bei gleichbleibender Spezifität (100%). Mit Antikörper gegen p53 wurde keine der low-grade BillNs markiert (0% Sensitivität), und zeigt eine 100% Spezifität. Die Sensitivität der low-grade BillN für den Antikörper gegen Ki-67 beträgt 11%, mit einer hohen Spezifität von 97%.

Tumormarker	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
pVHL %	94	0
pVHL Score	94	0
S100P %	61	73
S100P Score	44	75
KOC1 %	29	97
KOC1 Score	29	96
Mesothelin %	12	100
Mesothelin Score	5	100
P53 pos.	0	100
Ki-67 (>50%)	11	97

Tab. 13: Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer low-grade BillN im Vergleich zur reaktiven Epithelveränderung

5.4.2. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer neoplastischen Läsion im Vergleich zur reaktiven Epithelveränderung

Sowohl das prozentuelle Ergebnis, als auch der Score ergeben ein hochsensitives Ergebnis (98%) für den Antikörper gegen pVHL, wo hingegen keine Spezifität (0%) gezeigt werden kann (siehe Tab. 14). S100P zeigt ein gutes Ergebnis in der Sensitivität (83%) bei 72% Spezifität, jedoch verringert der Score die Sensitivität (72%), bei vergleichbarer Spezifität (75%). KOC1 Antikörper zeigt sich hochsensitiv (74%) und -spezifisch (96%) für neoplastische Läsionen. Der Score zeigt ähnliche Ergebnisse (72% Sensitivität und 96% Spezifität). Der Mesothelinantikörper zeigt mäßige Sensitivität (55%), ist jedoch hochspezifisch (100%). Der Score verringert die Sensitivität (46%), bei gleicher Spezifität (100%). Der Antikörper gegen p53 zeigt sich mit einer geringen Sensitivität (15%), jedoch mit einer Spezifität von 100%. Die Sensitivität für Ki-67 der neoplastischen Läsionen liegt bei 37% und 96% Spezifität.

Die Kombination der Antikörper gegen KOC1 mit p53 oder Ki-67 positiver Reaktion zeigt keine Verbesserung der Sensitivität oder Spezifität (siehe Tab. 14). Die positive Reaktion der Antikörper gegen KOC1 oder p53 zeigt eine 74% Sensitivität mit 97% Spezifität. Der Score zeigt ähnliche Ergebnisse (73% Sensitivität und 97% Spezifität). Die Antikörperkombination gegen KOC1 oder Ki-67 zeigen sowohl in Prozent als auch im Score vergleichbare Ergebnisse (74% Sensitivität und 93% Spezifität). Mesothelin- oder Ki-67 Antikörper in Kombination ergibt eine Erhöhung der Sensitivität auf 67% bei 96% Spezifität. Unter Verwendung des Scores ergibt sich eine Sensitivität von 65% mit 97% Spezifität.

Tumormarker	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
pVHL%	98	0
pVHL Score	98	0
S100P %	83	72
S100P Score	72	75
KOC1 %	74	96
KOC1 Score	72	96
KOC1 % oder p53 pos.	74	97
KOC1 Score oder p53 pos.	73	97
KOC1% oder Ki-67>50%	74	93
KOC1 Score oder Ki-67>50%	74	93

Mesothelin %	55	100
Mesothelin Score	46	100
Mesothelin % oder p53 pos.	55	100
Mesothelin Score oder p53 pos.	49	100
Mesothelin % oder Ki-67>50%	67	96
Mesothelin Score oder Ki-67>50%	65	97
P53 pos.	15	100
Ki-67(>50%)	37	96

Tab. 14: Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer neoplastischen Läsion im Vergleich zur reaktiven Epithelveränderung

5.4.3. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose einer high-grade Läsion im Vergleich zur low-grade Läsion

Der Antikörper gegen pVHL ist sowohl in Prozent als auch im Score zu 100% sensitiv, jedoch nur 2% spezifisch (siehe Tab. 15). S100P Antikörper zeigt sich hochsensitiv (94%) mit einer mäßigen Spezifität (60%). Der Score ergibt eine geringere Sensitivität (85%) mit erhöhter Spezifität (68%). Der Antikörper gegen KOC1 zeigt eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 87%. Der Score verringert die Sensitivität (96%) bei gleicher Spezifität (87%). Der Mesothelinantikörper ist bei einer 72% Sensitivität hochspezifisch (95%). Unter Verwendung des Scores verringert sich die Sensitivität auf 66% mit einer 98% Spezifität. Der Antikörper gegen p53 zeigt sich hochspezifisch (100%) mit einer geringen Sensitivität von 23%. Ki-67 ergibt eine 94% Spezifität, hingegen eine mittelmäßige Sensitivität (51%).

Die Antikörperkombination gegen KOC1 oder p53 positiv ergeben eine 100% Sensitivität mit 87% Spezifität. Der Score verringert die Sensitivität auf 96% bei gleichbleibender Spezifität (87%). Die Kombination der Antikörper gegen Mesothelin oder p53 detektiert eine 78% Sensitivität und 96% Spezifität. Unter Verwendung des Scores erhöht sich die Spezifität (98%), jedoch verringert sich die Sensitivität (71%).

Tumormarker	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
pVHL %	100	2
pVHL Score	100	2
S100P %	94	60

S100P Score	85	68
KOC1 %	100	87
KOC1 Score	96	87
KOC1 % oder p53 pos.	100	87
KOC1 Score oder p53 pos.	96	87
KOC1 % oder Ki-67(>50%)	100	84
KOC1 Score oder Ki-67(>50%)	100	84
Mesothelin %	72	95
Mesothelin Score	66	98
Mesothelin % oder p53 pos.	78	96
Mesothelin Score oder p53 pos.	71	98
Mesothelin % oder Ki-67(>50%)	91	89
Mesothelin Score oder Ki-67(>50%)	88	91
P53 pos.	23	100
Ki-67(>50%)	51	94

Tab. 15: Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die einer Diagnose high-grade Läsionen im Vergleich zu low-grade Läsionen

5.4.4. Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose eines invasiven Karzinoms im Vergleich zur high-grade BilIN Läsion

Der Antikörper gegen pVHL ist hochsensitiv, jedoch zeigt er keine Spezifität (0%) sowohl für Prozent als auch Score (siehe Tab. 16). Der S100P Antikörper ist hochsensitiv (95%), bei geringer Spezifität (7%). Der Score erhöht die Spezifität (28%) bei gleichbleibender Sensitivität. Der Antikörper gegen KOC1 ist hochsensitiv (100%) mit einer Spezifität von 0%. Unter Verwendung des Scores erhöht sich die Spezifität auf 9% bei gleicher Sensitivität. Der Mesothelinantikörper ist ein hochsensitiver Tumormarker mit 90%. Die Spezifität liegt bei 54%. Der Score zeigt eine geringere Sensitivität (86%) mit erhöhter Spezifität (64%). Der Antikörper gegen p53 ist hochspezifisch (92%), jedoch gering sensitiv (32%). Der Antikörper gegen Ki-67 zeigt sowohl eine geringe Sensitivität (43%) als auch Spezifität (36%).

Tumormarker	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
pVHL %	100	0
pVHL Score	100	0
S100P %	95	7

S100P Score	95	28
KOC1 %	100	0
KOC1 Score	100	9
Mesothelin %	90	54
Mesothelin Score	86	64
P53 pos.	32	92
Ki-67(>50%)	43	36

Tab. 16: Sensitivität und Spezifität der Antikörper für die Diagnose eines invasiven Karzinom im Vergleich zur high-grade BilIN Läsion

5.5. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse

- Der Antikörper gegen S100P zeigt die besten Ergebnisse zur Diagnose der low-grade BilIN im Vergleich zur reaktiven Läsion (Sensitivität 61%; Spezifität 73%). Die Verwendung des Scores erhöht die Spezifität (75%) und kann nützlich zur Unterscheidung sein.
- Neoplastische Läsionen im Vergleich zu reaktiven Läsionen werden am Besten mit der Antikörperkombination gegen KOC1 oder p53 positiv detektiert (Sensitivität 74%; Spezifität 97%).
- High-grade Läsionen zeigen für die Antikörperkombination gegen Mesothelin/KOC1 oder p53 positive Markierung gute Sensitivität und Spezifität (78%/96% ; 100%/87%) zur Unterscheidung von low-grade Läsionen.
- Der Mesothelinantikörper detektiert mit einer 90% Sensitivität und 54% Spezifität, mit Verwendung des Scores 64%, invasive Karzinome von high-grade BilIN Läsionen.

6. Diskussion

Gallenblasenkarzinome und extrahepatische Gallengangskarzinome haben im fortgeschrittenen Stadium eine schlechte Prognose, daher ist die histologische Untersuchung von tumorverdächtigen Läsionen für das Patientenmanagement von großer Bedeutung. In der Praxis erweist sich die histologische oder zytologische Klassifikation reaktiver und neoplastischer Läsionen auf Grund geringer Materialmengen wie bei Biopsien und zytologischen Abstrichen und wegen der morphologischen Ähnlichkeit reaktiver und neoplastischer Epithelveränderungen als schwierig. Zytologische Untersuchungen von Abstrichen aus den extrahepatischen Gallenwegen und Aspirationszytologien des Pankreas spielen bei der Abklärung von tumorverdächtigen Läsionen eine wichtige Rolle. Besondere Bedeutung kommt der Diagnose der biliären intraepithelialen Neoplasien als Vorläuferläsionen des invasiven Adenokarzinoms auch bei der Gefrierschnittuntersuchung zu. So erfordert zum Beispiel der Nachweis einer hochgradigen BilIN (entspricht einem Carcinoma in situ) oder eines Adenokarzinoms am Resektatrand bei Whipple Operationspräparaten eine Nachresektion des Ductus choledochus/hepaticus communis. Antikörper gegen bestimmte Tumormarker und immunhistochemische oder immunzytologische Untersuchungen können hier ein wichtiges Hilfsmittel bei der Klassifikation neoplastischer und reaktiver epithelialer Läsionen des pankreato-biliären Systems darstellen.

In einer Studie von Levy et al. (57) wurden Biopsien aus Adenokarzinomen und reaktiven epithelialen Läsionen mit Antikörpern gegen die Tumormarker S100P, pVHL und KOC1 untersucht. Die S100P und KOC1 Antikörper zeigten eine gute Sensitivität von 77,5-90% und eine Spezifität von 84-94% für die histologische Diagnose eines Adenokarzinoms. Die Resultate der Untersuchungen mit pVHL Antikörpern waren jedoch wegen technischer Artefakte und/oder mangelnder Spezifität der Antikörper problematisch. Während Levy et al. (57) sich in ihrer Studie auf die Unterscheidung von reaktiven epithelialen Läsionen und Adenokarzinomen beziehen, untersucht unsere Studie den Nutzen immunhistochemischer Analysen mit diesen Antikörpern für die Klassifikation biliärer intraepithelialer Neoplasien, invasiver Karzinome und reaktiver epithelialer Läsionen. Wegen des unterschiedlichen Studiendesigns sind die Ergebnisse beider Studien nicht im Detail vergleichbar, jedoch konnten wir für die Unterscheidung von high-grade (BilIN3 und Adenokarzinom) und low-grade (BilIN1/2 und reaktive Epithelveränderungen) Läsionen vergleichbare Werte für Sensitivität (KOC1: 100%, S100P: 94%) aber etwas geringere Spezifität vor allem für S100P

Antikörper nachweisen (KOC1:87%; S100P:60%).Im Gegensatz zur Studie von Levy et al. (57) zeigten pVHL Antikörper in unserer Untersuchung keinerlei Spezifität für die Detektion reaktiver oder neoplastischer epithelialer biliärer Läsionen.

Ali et al. (6) untersuchten Sensitivität und Spezifität von KOC1, S100P und Mesothelinantikörpern für die Diagnose pankreato-biliärer Adenokarzinome im Vergleich zu normalem Epithel. Antikörper gegen KOC1, S100P und Mesothelin zeigten eine 83 -88% Sensitivität und eine 92 -100% Spezifität für die Diagnose eines Adenokarzinoms. Unterschiede im Design unserer Studie ermöglichen keinen direkten Vergleich der Ergebnisse, jedoch wurde für S100P und KOC1 Antikörper eine ähnliche Sensitivität (94-100%) aber geringere Spezifität (60-87%) für die Diagnose von high-grade Läsionen im Vergleich zu low-grade Läsionen gefunden. Die Sensitivität der Mesothelinantikörper war bei guter Spezifität (95%) etwas geringer (72%). Abgesehen vom divergenten Studiendesign betreffend die Auswahl der untersuchten Entitäten beeinträchtigt auch die unterschiedliche Probenauswahl die Vergleichbarkeit der beiden Studien. Ali et al (6) untersuchten in ihrer Studie sogenannte tissue microarrays (TMAs). Diese Methode verwendet ausgestanzte Zylinder aus dem zu untersuchenden Gewebe, z.B. Adenokarzinome und normales oder reaktiv verändertes Epithel, die auf einem Paraffinblock zusammengesetzt werden. Es können mehrere Proben auf einen Objektträger aufgetragen und mittels Immunhistochemie untersucht werden (6). Dies hat den Vorteil eines geringen Materialverbrauches, jedoch ist der ausgestanzte Gewebeausschnitt mitunter nicht repräsentativ für die gesamte Probe. In unserer Studie wurden repräsentative vollständige Gewebeschnitte des Untersuchungsmaterials untersucht.

Um die Sensitivität und Spezifität der Antikörper zu erhöhen, wurden Kombinationen der Antikörper analysiert. Ali et al (6) kombinierten Antikörper gegen KOC1, S100P und Mesothelin in einem Markerpanel. Bei mindestens 2 von 3 positiven Antikörperreaktionen konnten die Sensitivität und Spezifität für die Diagnose eines Adenokarzinoms auf 100% beziehungsweise auf 99% gesteigert werden (6). Auch in unserer Studie wurde der Nutzen von Kombinationen von Antikörpern gegen KOC1, Mesothelin, p53 und Ki-67 für die Klassifikation von high-grade versus low-grade epithelialen Läsionen untersucht. P53 ist ein etablierter Tumormarker mit hoher Spezifität aber geringer Sensitivität für die Detektion einer high-grade intraepithelialen Neoplasie oder eines Adenokarzinoms des pankreato-biliären Systems. In unserer Studie wurde eine kleine Anzahl von high-grade Läsionen identifiziert, die mit p53 Antikörpern markiert, aber mit Antikörpern gegen KOC1 und Mesothelin nicht

detektiert wurden. Die Einbeziehung des hochspezifischen p53 Antikörpers in ein Markerpanel könnte deshalb zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität des immunhistochemischen Tests beitragen. Durch die Kombination von Mesothelin oder KOC1 mit p53 Antikörpern konnten Sensitivität und eine Spezifität für die Diagnose einer high-grade Läsion gesteigert werden.

Antikörper gegen Ki-67, einem nukleären Phosphoprotein, das im Zellkern aller Zellen nachweisbar ist, die sich nicht in der G0 Phase des Zellzyklusses befinden, werden in der Routine häufig zur Evaluation der Proliferationsfraktion (Prozentsatz der Zellen, die proliferieren) verwendet (12). Ki-67 wird in höhergradig dysplastischen epithelialen Läsionen des pankreato-biliären Systems aber auch in reaktivem Epithel exprimiert. Klein et al. (62) untersuchten die Expression von Ki-67 in PanINs, invasiven Adenokarzinomen und normalen Pankreasgewebeproben mit Hilfe eines sogenannten Ki-67-labeling Indexes (Ki-67 positive Zellen/gesamte Zellzahl x100). Normales Gewebe zeigte einen Index von 0,41%, high-grade PanIN 22,01% und invasives Karzinom 36,99% (62). Ki-67 wird als Proliferationsmarker von reaktiven und in höherem Ausmaß von high grade Läsionen exprimiert, weshalb auch Kombinationen von KOC1- oder Mesothelin- mit Ki67 Antikörpern getestet wurden. Unsere Ergebnisse zeigen bei 3% der reaktiven Epithelläsionen, bei 64% der high-grade BilIN-Fälle und bei 43% der invasiven Karzinome eine Proliferationsfraktion von >50%. Durch die Kombination von KOC1 bzw. Mesothelin mit Ki-67 Antikörpern (cut off von >50%) wird die Sensitivität für die Klassifikation einer low grade versus high grade Läsion bei gering verminderter Sensitivität deutlich erhöht.

Zusammenfassend zeigen Antikörper gegen Mesothelin und KOC1 in unserer Studie die höchste Sensitivität und Spezifität für die Unterscheidung einer high-grade von einer low-grade epithelialen Läsion des pankreato-biliären Systems. Mit der Kombination dieser Antikörper mit einem Antikörper gegen p53 oder Ki-67 (cut off >50%) ist die Diagnose einer BilIN mit hoher Sensitivität und Spezifität möglich.

Es wurden verschiedene cut-off Werte und immunhistochemische Scores für die Interpretation der immunhistochemischen Resultate beschrieben (6) (57) (58). Das Fehlen standardisierter Scores und einheitlicher cut-off Werte ist problematisch und einer der wichtigsten limitierenden Faktoren für die breitere Anwendung der oben beschriebenen Antikörper oder Antikörperpanels in der diagnostischen Routine.

Die in unserer und anderen Studien evaluierten Antikörper und Antikörperkombinationen sollten im nächsten Schritt an einer größeren Anzahl von reaktiven und neoplastischen Läsionen des pankreato-biliären Systems immunhistologisch und -zytologisch untersucht und eine Vereinheitlichung der Interpretation der immunhistochemischen Untersuchungen angestrebt werden. Dadurch könnte eine breitere Nutzung der immunhistochemischen oder -zytologischen Untersuchung zur Unterstützung der häufig schwierigen Klassifikation reaktiver und neoplastischer Läsionen des pankreato-biliären Systems in der diagnostischen Routine ermöglicht werden.

7. Referenzen

1. **Waldeyer, Anton und Anderhuber, Friedrich.** Waldeyer - Anatomie des Menschen. Berlin : de Gruyter, 2012, S. 546-548.
2. **Rizvi, Sumera und Gores, Gregory J.** Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*. 2013, 145, S. 1215-1229.
3. **Lüllmann-Rauch, Renate und Paulsen, Friedrich.** Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart : Thieme, 2012, S. 407.
4. **Bosman, F. T., et al.** *WHO classification of tumours of the digestive system, fourth edition*. s.l. : Lyon, 2010. S. 264.
5. **Sato, Y., et al.** Pathological diagnosis of flat epithelial lesions of the biliary tract with emphasis on biliary intraepithelial neoplasia. *J Gastroenterol*. 2014, 49, S. 64-72.
6. **Ali, Asif, et al.** Expression of KOC, S100P, mesothelin and MUC1 in pancreato-biliary adenocarcinomas: development and utility of a potential diagnostic immunohistochemistry panel. *BMC Clinical Pathology*. 2014, 14.
7. **Richard, Stephane.** Atlas of Genetic and Cytogenetics in Oncology and Haematology. [Online] [Zitat vom: 21. 07 2014.] www.atlasgeneticsoncology.org/Genes/VHLID132.
8. **Barry, Sayka und Crnogorac-Jurcevic, Tatjana.** Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. [Online] [Zitat vom: 21. 07 2014.] www.atlasgeneticsoncology.org/Genes/S100PID42196ch4p16.html.
9. **Yaniv, Karina und Yisraeli, Joel K.** The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. *Gene*. 2002, 287, S. 49-54.
10. **Schaeffer, David F., et al.** Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma correlates with poor survival. *BMC Cancer*. 2010.
11. GeneCards. [Online] [Zitat vom: 22. 07 2014.] www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSLN.

12. **Scholzen, Thomas und Gerdes, Johannes.** The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol.* 2000, 182, S. 311-322.
13. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. [Online] [Zitat vom: 28. 07 2014.] www.atlasgeneticsoncology.org/Genes/P53ID88.html.
14. **Hsu, Maylee, et al.** KRAS and GNAS Mutations and p53 Overexpression in Biliary Intraepithelial Neoplasia and Intrahepatic Cholangiocarcinomas. *Cancer.* 2013, 119.
15. **Böcker, Werner und Denk, Helmut.** Pathologie. s.l. : Elsevier, Urban und Fischer, 2012.
16. **Kozuka, Sadao, et al.** Relation of Adenoma to Carcinoma in the Gallbladder. *Cancer.* 1982, 50, S. 2226-2234.
17. **Wistuba, Ignacio I., et al.** Gallbladder Adenomas Have Molecular Abnormalities Different From Those Present in Gallbladder Carcinomas. *Human Pathol.* 1999, 30, S. 21-25.
18. **Roa, Ivan, et al.** Preneoplastic Lesions in Gallbladder Cancer. *J Surg Oncol.* 2006, 93, S. 615-623.
19. **Adsay, Volkan N.** Neoplastic Precursors of the Gallbladder and Extrahepatic Biliary System. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007, 36, S. 889-900.
20. **Zen, Yoh, et al.** Biliary intraepithelial neoplasia: an international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria. *Mod Pathol.* 2007, 20, S. 701-709.
21. **Eberhard, D., Tosh, D. und Slack, J. M.W.** Origin of pancreatic endocrine cells from biliary duct epithelium. *Cell Mol life Sci.* 2008, 65, S. 3467-3480.
22. **Sumazaki, Ryo, et al.** Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nat Genet.* 2004, 36, S. 83-87.
23. **Gandou, Chihiro, et al.** Hilar cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma share similar histopathologies, immunophenotypes, and development-related molecules. *Human Pathol.* 2013, 44, S. 811-821.
24. **Nakanuma, Yasuni, et al.** Proposal of a new disease concept "biliary diseases with pancreatic counterparts". Anatomical and pathological bases. *Histol Histopathol.* 2014, 29, S. 1-10.

25. **Sato, Yasunori, et al.** Histological Characterization of Biliary Intraepithelial Neoplasia with respect to Pancreatic Intraepithelial Neoplasie. *Int J Hepatol.* 2014, 2014.
26. **Lazcano-Ponce, Eduardo und Miquel, J. F.** Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *CA Cancer J Clin.* 2001, 51, S. 349-364.
27. **Austria, Statistik.** Statistik Austria. *Jahrbuch der Gesundheitsstatistik 2012.* [Online] 2013. [Zitat vom: 06. Juni 2014.]
28. **Hariharan, D., Saied, A. und Kocher, H. M.** Analysis of mortality rates for gallbladder cancer across the world. *HPB.* 2008, 10, S. 327-331.
29. **Zatonski, W. A., et al.** Epidemiologic Aspects of Gallbladder Cancer: a Case-Control Study of the SEARCH Program of the International Agency for Research on Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 1997, 89, S. 1132-1138.
30. **Randi, Giorgia, Franceschi, Silvia und La Vecchia, Carlo.** Gallbladder cancer worldwide: Geographical distribution and risk factors. *Int. J. Cancer.* 2006, 118, S. 1591-1602.
31. **Kang, Chang Moo, et al.** Gallbladder carcinoma associated with anomalous pancreaticobiliary duct junction. *Can J Gastroenterol.* 2007, 21, S. 383-387.
32. **Sakrut, Pinar, et al.** Gallbladder polyps: Factors affecting surgical decision. *World J Gastroenterol.* 2013, 19, S. 4526-4530.
33. **Chhabra, Depak, et al.** Chronic Heavy Metal Exposure and Gallbladder Cancer Risk in India, a Comparative Study with Japan. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2012, 13, S. 187-190.
34. **Borena, Wegene, et al.** A Prospective Study on Metabolic Risk Factors and Gallbladder Cancer in the Metabolic Syndrome and Cancer (Me-Can) Collaborative Study. *PLoS One.* 2014, 9.
35. **Lewis, Jason T., et al.** Prevalence and Risk Factors for Gallbladder Neoplasia in Patients With Primary Sclerosing Cholangitis: Evidence for a Metaplasia-Dysplasia-Carcinoma Sequence. *Am J Surg Pathol.* 2007, 31, S. 907-913.

36. **Cariati, Andrea, Piromalli, Elisa und Cetta, Francesco.** Gallbladder cancers: associated conditions, histological types, prognosis, and prevention. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2014, 26, S. 562-569.
37. **Hong, Seung-Mo, et al.** Analysis of Extrahepatic Bile Duct Carcinomas According to the New American Joint Committee on Cancer Staging System Focused on Tumor Classification Problems in 222 Patients. *Cancer.* 2005, 104, S. 802-810.
38. **Sobin, Leslie H., Gospodarowicz, Mary K. und Wittekind, Christian.** *The TNM classification of Malignant Tumours 7th edition.* 7. Wiley-Blackwell : s.n., 2009.
39. National Cancer Institute. [Online] [Zitat vom: 13. 06 2014.]
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/gallbladder/HealthProfessional/page3>.
40. **Bach, Ariadne M., et al.** Gallbladder cancer: can ultrasonography evaluate extent of disease? *J Ultrasound Med.* 1998, 17, S. 303-309.
41. **Kumaran, Vinay, et al.** The role of dual-phase helical CT in assessing resectability of carcinoma of the gallbladder. *Eur Radiol.* 2002, 12, S. 1993-1999.
42. **Kim, Jung Hoon, et al.** Preoperative evaluation of gallbladder carcinoma: efficacy of combined use of MR imaging, MR cholangiography, and contrast-enhanced dual-phase three-dimensional MR angiography. *J Magn Reson Imaging.* 2002, 16, S. 676-684.
43. National Cancer Institute. [Online] [Zitat vom: 21. 06 2014.]
www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/gallbladder/Patient/page1.
44. **Wang, Yun-Feng, et al.** Combined detection tumor markers for diagnosis and prognosis of gallbladder cancer. *WorldJGastroenterol.* 2014, 20, S. 4085-4092.
45. American Cancer Society. [Online] [Zitat vom: 13. 06 2014.]
<http://www.cancer.org/cancer/gallbladdercancer/detailedguide/gallbladder-diagnosis>.
46. **Yadav, Rajni, et al.** Gallbladder carcinoma: An attempt of WHO histological classification on fine needle aspiration material. *CytoJournal.* 2013, 10, S. 12.
47. **Sanjeev, Misra, et al.** Carcinoma of the gallbladder. *The Lancet Oncology.* 2003, 4, S. 67-76.

48. American Cancer Society. [Online] [Zitat vom: 05. 07 2014.]
www.cancer.org/cancer/gallbladdercancer/detailedguide/gallbladder-treating-chemotherapy.
49. American Cancer Society. [Online] [Zitat vom: 05. 07 2014.]
www.cancer.org/cancer/gallbladdercancer/detailedguide/gallbladder-new-research.
50. **Henne-Bruns, Doris und Barth, Eberhard.** Chirurgie. s.l. : Thieme, 2012, S. 484-485.
51. **Croitoru, Adina, et al.** Fluoropyrimidines plus Cisplatin versus Gemcitabine/Gemcitabine plus Cisplatin in locally advanced and metastatic Biliary Tract Carcinoma - A Retrospective Study. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2012, 21, S. 277-284.
52. **Tamada, Kiichi, Ushio, Jun und Sugano, Kentaro.** Endoscopic diagnosis of extrahepatic bile duct carcinoma: Advances and current limitations. *World J Clin Oncol.* 2011, 2, S. 203-216.
53. **Strongin, A., et al.** Role of endoscopic ultrasonography in the evaluation of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Endosc Ultrasound.* 2013, 2, S. 71-76.
54. **Ehlken, Hanno und Schramm, Christoph.** Primary Sclerosing Cholangitis and Cholangiocarcinoma: Pathogenesis and Modes of Diagnostics. *Dig Dis.* 2013, 31, S. 118-125.
55. **Barr Fritcher, E. G., et al.** Correlating routine cytology, quantitative nuclear morphometry by digital image analysis, and genetic alterations by fluorescence in situ hybridization to assess the sensitivity of cytology for detecting pancreatobiliary tract malignancy. *Am J Clin Pathol.* 2007, 128, S. 272-279.
56. **Lin, F., et al.** Diagnostic utility of S100P and von Hippel-Lindau gene product (pVHL) in pancreatic adenocarcinoma-with implication of their roles in early tumorigenesis. *Am J Surg Pathol.* 2008, 32, S. 78-91.
57. **Levy, M., et al.** S100P, von Hippel-Lindau gene product, and IMP3 serve as a useful immunohistochemical panel in the diagnosis of adenocarcinoma on endoscopic bile duct biopsy. *Hum Pathol.* 2010, 41, S. 1210-1219.
58. **Liu, H., et al.** Reevaluation and identification of the best immunohistochemical panel (pVHL, Maspin, S100P, IMP-3) for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med.* 2012, 136, S. 601-609.

59. **Aishima, S, et al.** Different roles of S100P overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma: carcinogenesis of perihilar type and aggressive behavior of peripheral type. *Am J Surg Pathol.* 2011, 35, S. 590-598.
60. **Shimizu, A., et al.** Coexpression of MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2012, 103, S. 739-746.
61. **Zhao, H, et al.** S100A4 protein and mesothelin expression in dysplasia and carcinoma of the extrahepatic bile duct. *Am J Clin Pathol.* 2007, 127, S. 374-379.
62. **Klein, W M, et al.** Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod Pathol.* 2002, 15, S. 441-447.
63. **Takeshita, A, et al.** Clinicopathologic study of the MIB-1 labeling index (Ki67) and postoperative prognosis for intraductal papillary mucinous neoplasms and ordinary ductal adenocarcinoma. *Pancreas.* 2012, 41, S. 114-120.
64. **Koorstra, J B, et al.** Widespread activation of the DNA damage response in human pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol.* 2009, 22, S. 1439-1445.
65. **Nakanishi, Y, et al.** Expression of cell cycle-related molecules in biliary premalignant lesions: biliary intraepithelial neoplasia and biliary intraductal papillary neoplasm. *Hum. Pathol.* 2008, 39, S. 1153-1161.