

PD-L1-Expression in hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Clara-Sophie Blättermann
geboren am 09.05.1995 in Karlsruhe

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp, Jena
2. PD Dr. med. Daniel Kämmerer, Bad Berka
3. Prof. Dr. med. Jan D'Haese, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.09.2022

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
A.	Arteria
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AFP	α -Fetoprotein
Ag	Antigen
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	activator protein 1
APC	Antigen-präsentierende-Zelle
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASR	age standardised rate
BATF	basic leucine zipper ATF like transcription factor
BCLC	Barcelona-Clinic-Liver-Cancer
BMI	body mass index
CA 19-9	carbohydrate antigen 19-9
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CD	cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHB	chronische Hepatitis B
CLE	konfokale Laserendomikroskopie
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie

CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
dCCC	distales cholangiozelluläres Karzinom
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERCP	endoskopische retrograde Pankreatikografie
EUS-FNA	endoskopischer Ultraschall mit Feinnadelaspiration
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GS	Glutaminsynthetase
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIF	hypoxia inducible factor
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HSP70	Hitzeschockprotein 70
iCCC	intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom
IDUS	intraduktaler Ultraschall
IFN- γ	Interferon-gamma
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MHC	major histocompatibility complex
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure

MRT	Magnetresonanztomografie
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF-κB	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B cells
pCCC	perihiläres cholangiozelluläres Karzinom
PD-1	programmed death 1
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PD-L1	programmed death ligand 1
PD-L2	programmed death ligand 2
PI3K-AKT	Phosphoinositid-3-Kinase-Serin/Threonin-Kinase
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAS-ERK	rat sarcoma extracellular signal regulated kinases
RFA	Radiofrequenzablation
SHP2	src homology 2 phosphatase 2
SOC	Single-operator-Cholangioskopie
SSTR	Somatostatinrezeptor
TACE	transarterielle Chemoembolisation
T-Regs	regulatorische T-Zellen
US	Ultraschall
V.	Vena
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organization
ZAP70	zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
<u>2.1. Hepatozelluläres Karzinom</u>	3
2.1.1. Definition	3
2.1.2. Epidemiologie und Risikofaktoren	3
2.1.3. Symptome und Diagnostik	8
2.1.4. Klassifikation	10
2.1.5. Therapie und Prognose	11
2.1.6. Screening und Prävention	17
<u>2.2. Cholangiozelluläres Karzinom</u>	18
2.2.1. Definition	18
2.2.2. Epidemiologie und Risikofaktoren	18
2.2.3. Symptome und Diagnostik	20
2.2.4. Klassifikation	23
2.2.5. Therapie und Prognose	24
2.2.6. Screening und Prävention	27
<u>2.3. Programmed death-Rezeptor und -Ligand</u>	29
2.3.1. Übersicht	29
2.3.2. PD-L1	30
2.3.3. PD-1	30
2.3.4. Bedeutung bei Tumoren	32
2.3.5. Therapeutische Nutzung	35

3. Ziele der Arbeit	39
4. Materialien und Methodik	41
<u>4.1. Materialien</u>	41
4.1.1. Tumorproben	41
4.1.2. Materialien und Gerätschaften zur Herstellung der Gewebeschnitte	41
4.1.3. Herstellung der Gewebeschnitte	42
<u>4.2. Methoden</u>	42
4.2.1. Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie	42
4.2.2. Prinzip der Immunhistochemie	46
4.2.3. Durchführung der Immunhistochemie	47
4.2.4. Auswertung der Immunhistochemie	50
5. Ergebnisse	53
<u>5.1. Untersuchung der PD-L1-Expression in hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen</u>	53
5.1.1. Allgemeine Patientendaten	53
5.1.2. Klinische Daten	56
5.1.3. Immunhistochemische Untersuchungen	61
5.1.4. Korrelationen	70
<u>5.2. Untersuchung der PD-L1-Expression in den gesunden Resektionsrändern von Operationspräparaten verschiedener benignen und malignen Leberveränderungen</u>	73
5.2.1. Allgemeine Patientendaten	73
5.2.2. Immunhistochemische Untersuchungen	75
5.2.3. Vergleich der beiden Testpopulationen hinsichtlich der PD-L1-Expression	79

5.2.4. Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und klinischen Parametern	80
6. Diskussion	82
<u>6.1. Hepatozelluläre und cholangiozelluläre Karzinome</u>	82
6.1.1. Patientendaten und klinische Daten	82
6.1.2. Expressionscharakteristika des PD-L1	83
6.1.3. Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und klinischen sowie weiteren histopathologischen Parametern	93
<u>6.2. Gesunde Resektionsränder von Operationspräparaten verschiedener benignen und malignen Leberveränderungen</u>	95
6.2.1. Patientendaten	95
6.2.2. PD-L1 Expressionscharakteristika	95
6.2.3. Vergleich der PD-L1-Expression zwischen der ersten und zweiten Testpopulation sowie zwischen den verschiedenen Patientengruppen der zweiten Testpopulation	96
6.2.4. Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und weiteren klinischen Parametern	98
7. Schlussfolgerungen	100
8. Literaturverzeichnis	101
9. Anhang	107
<u>9.1. Ehrenwörtliche Erklärung</u>	107
<u>9.2. Danksagung</u>	108

1. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist das sechsthäufigste Karzinom weltweit mit einer der höchsten Mortalitätsraten. Nach dem HCC ist das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) der zweithäufigste primäre Tumor der Leber. Auch hier ist die Prognose ausgesprochen schlecht. Beide Krebsentitäten weisen häufig keine Frühsymptome auf, weswegen sie meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt werden. Dann ist ein palliativer Therapieansatz oftmals die einzige Option, wobei die Therapiemöglichkeiten mit Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sorafenib beim HCC und Gemcitabin und Oxaliplatin beim CCC stark eingeschränkt sind. So ist eine Verlängerung des Gesamtüberlebens meist nur um wenige Monate möglich. Die Entwicklung neuer Therapiestrategien ist also dringend erforderlich. Ein vielversprechender Ansatz ist die Immuntherapie, wobei ein mögliches therapeutisches Target der Signalweg des programmed death 1/programmed death ligand 1 (PD-1/PD-L1) darstellt. Dieser bewirkt eine Hemmung der gegen den Tumor gerichteten zytotoxischen T-Zellen und führt die Immunzellen in den Zelltod. Mit gegen den Rezeptor oder den Liganden gerichteten Antikörpern können die Krebszellen dem Immunsystem jedoch wieder zugänglich gemacht werden. Nachdem erste Studien an Patienten mit HCC und CCC vielversprechende Ergebnisse gezeigt hatten, wurden von der FDA zwei Antikörper zur Therapie des HCC zugelassen. Jedoch waren weitere Studien etwas ernüchternder, da die Immuntherapie in diesen Untersuchungen keinen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur Standardtherapie zeigte. Eine weitere Erforschung der Expression des PD-L1 bei HCC und CCC erscheint daher notwendig.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die PD-L1-Expression mittels Immunhistochemie an einer großen Serie von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten HCC- und CCC-Präparaten zu untersuchen und mit der Expression im umliegenden, noch benignen Gewebe zu vergleichen. Dabei sollten neben Lebertumoren von deutschen auch solche von chinesischen Patienten betrachtet werden, da sich diese hinsichtlich der Ätiologie unterscheiden. Um herauszubekommen, ob Lebergewebe, in dem sich ein primärer Lebertumor entwickelt hat, gegenüber solchem, in dem kein HCC oder CCC entstanden ist, eine veränderte PD-L1-Expression aufweist, wurden in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit vergleichend Proben aus dem tumorfreien Rand von Resektaten

von Lebern immunhistochemisch gefärbt, die entweder aufgrund eines HCC oder CCC einer chirurgischen Therapie zugeführt worden waren, oder weil in ihnen benigne Veränderungen oder Metastasen aus anderen Organen nachgewiesen worden waren. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde ein Antikörper eingesetzt, der sich in vorangegangenen Arbeiten in der Literatur und auch in der eigenen Arbeitsgruppe als von allen üblicherweise eingesetzten diagnostischen Antikörpern am sensitivsten herausgestellt hatte. Soweit bekannt, wurde eine Untersuchung bei HCC und CCC mit diesem Antikörper bisher noch nicht durchgeführt. Insgesamt wurden 550 Gewebeproben von 300 Patienten untersucht. Die erzielten Färbeergebnisse wurden lichtmikroskopisch semiquantitativ ausgewertet und mit den klinischen Daten der Patienten korreliert.

Im Ergebnis der Untersuchungen zeigten sich 51,2% der HCC und 42,3% der CCC PD-L1-positiv, wobei die Expression insgesamt nur schwach ausgeprägt war. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den Proben aus China und aus Deutschland festgestellt werden. Interessanterweise konnte im tumorumgebenden, noch benignen Gewebe bei beiden Tumorentitäten eine signifikant höhere PD-L1-Expression als in den Tumoren gefunden werden. Dabei zeigte sich bei HCC eine positive Korrelation zwischen der Expression des Liganden in der Tumorumgebung und im Tumor. Bei den HCC korrelierte die PD-L1-Expression in der Tumorumgebung negativ mit den Leberwerten, während bei den CCC ein positiver Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Proteins im Tumor und der Tumorgröße gefunden werden konnte. Die Expression des PD-L1 in dem tumorumgebenden Gewebe der CCC korrelierte hingegen negativ mit dem Tumormarker CA 19-9. Bei der Untersuchung der Resektionsränder im zweiten Teil der Arbeit war der PD-L1 in der Umgebung primärer Lebertumore signifikant stärker exprimiert als von benignen Leberveränderungen oder von Metastasen aus anderen Organen.

Insgesamt erscheinen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge HCC und CCC aufgrund der nur geringen PD-L1-Expression für eine Anti-PD-1/PD-L1-Therapie nicht generell geeignet. In einigen Fällen könnte es dennoch zu einem Ansprechen auf die Therapie kommen, da es bei primären Lebertumoren im umgebenden Gewebe offensichtlich zu einer Hochregulation des PD-L1 kommt.

2. Einleitung

2.1. Hepatozelluläres Karzinom

2.1.1 Definition

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist ein maligner Tumor der Leber, welcher von den Hepatozyten ausgeht. Es hat mit ungefähr 80% den größten Anteil an allen Lebertumoren. Von allen Todesursachen weltweit nimmt das HCC einen Anteil von 1% jährlich ein und ist somit eine der Krebsarten mit den höchsten Mortalitätsraten (Zhu et al. 2016).

2.1.2. Epidemiologie und Risikofaktoren

Weltweit betrachtet ist das HCC das sechsthäufigste Karzinom und die vierthäufigste tumorassoziierte Todesursache. In Ländern mit niedrigem soziodemographischen Index ist es sogar das vierthäufigste Karzinom. Insgesamt ist es für etwa 5,7% der Krebsneuerkrankungen verantwortlich. In Deutschland steht es auf der Liste der häufigsten Tumore auf Platz 13 und auf Platz 8 der häufigsten Krebstodesursachen. Die WHO schätzte die Inzidenz des Karzinoms in Deutschland im Jahr 2012 auf 7,2/100.000 Einwohner für Männer und auf 2,3/100.000 Einwohner für Frauen. Deutschland belegt mit diesen Inzidenzen das Mittelfeld in Europa. Länder mit solch niedriger Inzidenz weisen einen Erkrankungsgipfel im 7. Lebensjahrzehnt auf. In der asiatisch-pazifischen Region stellt das HCC die dritthäufigste Krebstodesursache dar. Hier können Erkrankungen schon ab dem 2. Lebensjahrzehnt verzeichnet werden. Von den 782.000 neuen Fällen im Jahr 2012 erkrankten allein 50% in China. 746.000 Menschen verstarben weltweit im selben Jahr an diesem Karzinom. Das machte einen Anteil von 9,1% der Krebstodesfälle aus (Guthle und Dollinger 2014, Goh et al. 2015, Zhu et al. 2016, Fitzmaurice et al. 2017, Robert-Koch-Institut 2019).

Hohe Inzidenzen finden sich in der Mongolei (93,7 pro 100.000 Einwohner), Gambia (23,9 pro 100.000 Einwohner) oder China (18,3 pro 100.000 Einwohner). Sehr viel geringer fällt die Anzahl an Neuerkrankungen hingegen in Deutschland (4,2 pro 100.000 Einwohner) oder Namibia (2,8 pro 100.000 Einwohner) aus (siehe Abbildung 1) (Weltgesundheitsorganisation 2018).

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, liver, both sexes, all ages

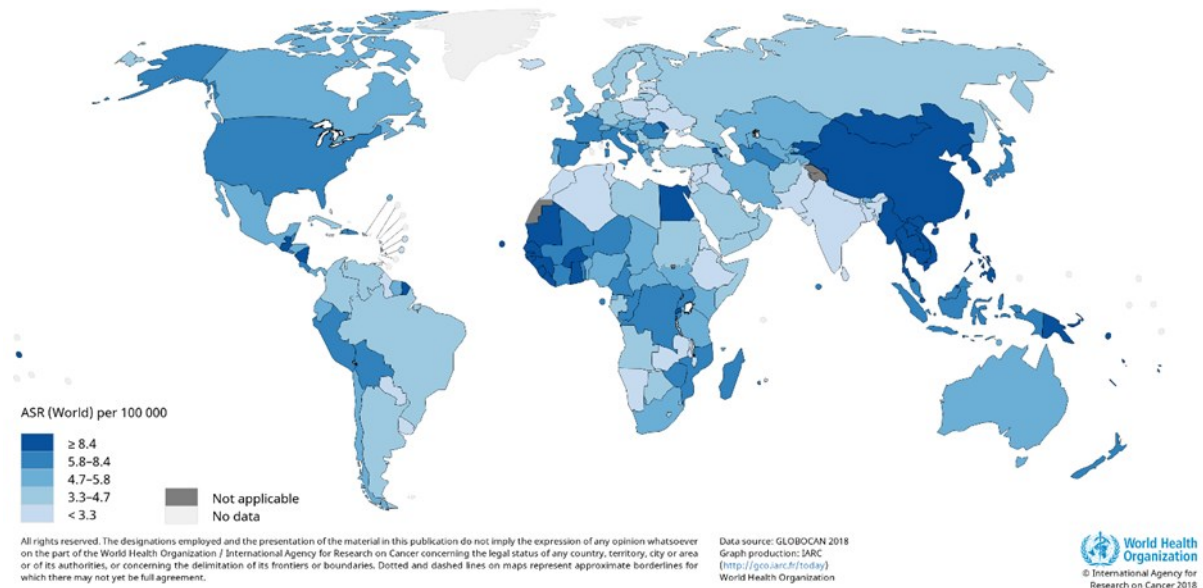


Abb. 1: Weltweite geschätzte altersstandardisierte Inzidenz von HCC pro 100.000 Personen jeglichen Alters im Jahr 2018 (Weltgesundheitsorganisation 2018)

Infolge einer chronischen Entzündung des Leberparenchyms kann eine Leberzirrhose entstehen, die als wichtigste Präkanzerose zu beachten und bei 90% der Lebertumorprienten vorzufinden ist. Etwa 4% der Patienten mit Zirrhose entwickeln jährlich ein Karzinom der Leber. Ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung einer Leberzirrhose ist dabei eine Hepatitis-B-Virusinfektion. Sie wird für 50 - 80% der HCC-Fälle verantwortlich gemacht. Bis zu 80% der weltweit beobachteten hepatozellulären Lebertumore treten im ost- und südostasiatischen sowie im west- und zentralafrikanischen Raum auf. Dies lässt sich auf die hohe Inzidenz von chronischen Hepatitis-B-Virusinfektionen in diesen Ländern zurückführen. Dabei ist eine positive Hepatitis-B-Serologie mit einem 10 - 30fach erhöhten Risiko für die Entwicklung eines malignen Lebertumors assoziiert. In der asiatischen Bevölkerung geschieht die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus am häufigsten im ersten Lebensjahr, insbesondere perinatal. Je früher man sich im Leben infiziert, desto höher ist das Risiko, an einem HCC zu erkranken. Für die perinatal Infizierten ist es also am höchsten (Venook et al. 2010, Guthle und Dollinger 2014, Goh et al. 2015, Czauderna et al. 2017).

Die chronische Hepatitis-C-Infektion und der chronische Alkoholmissbrauch sind dagegen in Europa, Nordamerika und Japan die führenden Ursachen für die Entwicklung eines HCC. Weltweit wird das Hepatitis-C-Virus (HCV) für 10 - 25% der malignen Lebertumore verantwortlich gemacht. Aufgrund der Hepatitis-C-Epidemien durch verunreinigte Blutprodukte in den 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts sowie durch kontaminierte Injektionsnadeln bei Drogenabusus konnte vor allem in den Vereinigten Staaten und Europa eine Zunahme der HCV-assoziierten malignen Lebertumore verzeichnet werden. Aktuell geht man allerdings davon aus, dass die HCV-Infektion als Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC aufgrund der mittlerweile seit einigen Jahren verfügbaren sehr effektiven antiretroviralen Therapie immer mehr an Bedeutung verlieren wird. Die Latenzzeit zwischen einer Hepatitis und der Entstehung eines HCC beträgt dabei meist mehrere Jahrzehnte, wobei der Zeitraum bei einer Hepatitis B häufig länger ist als bei einer Hepatitis C. Zudem steigt die Wahrscheinlichkeit für einen malignen Lebertumor bei einer hoch aktiven chronischen Hepatitis im Vergleich zu einer chronischen Hepatitis mit geringer Aktivität deutlich an. Die Virushepatitiden B und C gehen als Risikofaktoren mit einem hohen kumulativen Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms der Leber einher. Bei einer Koinfektion mit beiden Virushepatitiden steigt das Risiko um das 15- bis 20fache an. Das höchste Risiko für die Entwicklung eines HCC geht allerdings mit einer dekompensierten Leberzirrhose einher. Ein erhöhter Alkoholkonsum ohne Vorliegen einer Leberschädigung scheint das Risiko für ein HCC nur leicht zu vergrößern. Drastisch wird es aber gesteigert durch einen begleitenden Alkoholkonsum bei bereits vorhandener Lebererkrankung jeglicher Genese (Albrecht 2008, Venook et al. 2010, Guthle und Dollinger 2014, Czuderna et al. 2017).

Trotz antiretroviraler Therapie nimmt die Neuerkrankungsrate des HCC auch in der westlichen Welt immer weiter zu. So haben in den letzten 30 Jahren die Lebertumore bei Männern in Deutschland um 50% zugenommen. Dies lässt sich teilweise durch die Zunahme der nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) im Rahmen des metabolischen Syndroms, welches mit Diabetes mellitus und Adipositas assoziiert ist, erklären. Auch wenn keine Zirrhose vorliegt, steigt das Risiko für die Entstehung eines HCC bei Vorliegen einer NASH oder einer HBV-Infektion. Die Prävalenz der Fettlebererkrankung liegt in Europa bei 30% und scheint hier damit mittlerweile der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines HCC zu sein (Grundmann und Meyer 2014, Guthle und Dollinger 2014, Czuderna et al. 2017).

In der asiatisch-pazifischen Region, hingegen, blieben die Neuerkrankungsraten in den letzten 20 Jahren stabil. Nur in Hongkong und Singapur konnte eine Abnahme der HCC-Fälle beobachtet werden. Auffällig in Asien und in der Pazifikregion ist die Zunahme der Zahlen an chronischen Hepatitis-C-Infektionen. Insbesondere in Japan ist diese für 70% der Tumore ursächlich (Zhu et al. 2016). Zudem kann man in den asiatischen Ländern erkennen, dass die HCC-Entstehung auf dem Boden einer Hepatitis-B-Infektion abnimmt. So lag beispielsweise in einem Krankenhaus in Singapur der Anteil der in Kombination mit einer Hepatitis-B-Erkrankung aufgetretenen Lebertumore vor 2010 bei 71,9% und nach 2010 nur noch bei 57,1%. Das liegt zum einen an den guten therapeutischen Interventionsmöglichkeiten. So lässt sich durch eine Interferon- und Nucleotid-Analoga-Behandlung der chronischen Hepatitis-B (CHB) die Entwicklung eines HCC reduzieren. Zum anderen wurden nationale Impfprogramme etabliert, die die Verbreitung des Virus eindämmen konnten. Abgesehen davon stieg der Anteil der NASH an den Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC in diesen Regionen von 16,6% auf 27,8% an.

70 - 90% der hepatozellulären Karzinome weltweit entstehen auf der Grundlage einer Leberzirrhose in Kombination mit einer Virushepatitis, einer NASH oder aufgrund einer Zirrhose, die auf einen schädlichen Alkoholkonsum zurückzuführen ist. Zu den weiteren prädisponierenden Erkrankungen für eine zirrhotische Veränderung der Leber und somit für einen malignen Lebertumor zählen Erkrankungen wie die Hämochromatose, der Morbus Wilson, die Autoimmunhepatitis oder ein α 1-Antitrypsin-Mangel. Die Eisenstoffwechselstörung erhöht dabei das Risiko einer Entwicklung eines HCC um das 200fache. Eine weitere Erkrankung, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines HCC assoziiert ist, die primär biliäre Zirrhose, die häufiger bei Frauen auftritt, ist beim weiblichen Geschlecht nur mit einem niedrigen Entartungsrisiko verbunden. Betrifft die Erkrankung Männer, so ist dieses deutlich höher und die Entartung findet früher statt. Bei den primär gutartigen Lebertumoren wurde lediglich beim β -Catenin-positiven Adenom ein hohes Risiko für die Entwicklung eines Leberkarzinoms festgestellt. Deswegen ist hier eine bioptische Abklärung anzustreben. Zu den sekundären Risikofaktoren zählen das männliche Geschlecht, ein hohes Lebensalter und ein Nikotinabusus. Auch geographische Unterschiede sowie Unterschiede in Abhängigkeit von der ethnischen Zugehörigkeit zeigen sich. So liegt das kumulative Risiko, in den nächsten fünf Jahren ein Leberkarzinom zu entwickeln, in Japan bei 30% und in den Vereinigten Staaten von

Amerika dagegen lediglich bei 17% (Guthle und Dollinger 2014, Zhu et al. 2016, Czauderna et al. 2017).

Die Aflatoxine B1, B2, G1 und G2, welche durch Aspergilluspezies produziert werden, können verschiedene Lebensmittel kontaminieren. Dazu gehört das traditionelle Essen, welches in der südöstlichen Region Asiens produziert wird, wie zum Beispiel Getreide, Mais, Erdnüsse und Sojabohnen. Insbesondere Aflatoxin B1 kann zu einer DNA-Mutation führen, welche sich vor allem im Codon 249 des Tumorsuppressorgens p53 zeigt. So findet sich eine Downregulation des Tumorsuppressors in 30 - 60% aller malignen Lebertumore in dieser Region. Außerdem stellte man einen synergistischen Effekt zwischen einer Aflatoxin-Exposition und einer HBV-Infektion fest. Patienten mit einer HBV-Infektion und einer signifikanten Aflatoxin-Aufnahme hatten ein deutlich höheres Risiko, an einem Malignom der Leber zu erkranken, als Personen, die nicht zusätzlich gegenüber Aflatoxinen exponiert waren. Verbesserungen der Produktions-, Transport- und Lagerungsbedingungen führten zu einer Senkung der Aflatoxin-assoziierten malignen Leberkarzinome. Beispielsweise konnte von 1982 bis 2009 in Qidong, einer Stadt in China, die Inzidenz und Mortalität des HCC um 65% verringert werden, wobei dieser Rückgang auf die Abnahme der Aflatoxin-Exposition zurückgeführt wurde (Goh et al. 2015, Zhu et al. 2016).

Männer sind 2- bis 4-mal häufiger von einem HCC betroffen als Frauen, wobei die Differenz in der Geschlechterinzidenz in Hochrisikogebieten stärker ausgeprägt ist als in Ländern, in denen die Inzidenzzahlen generell geringer sind. Diese geschlechtsabhängig unterschiedlichen Inzidenzen können teilweise dadurch erklärt werden, dass Männer häufiger von chronischen Lebererkrankungen sowie von alkoholtoxischer Leberschädigung betroffen sind.

In den letzten Jahren sind die Inzidenzen des Lebertumors gestiegen und laut WHO soll es im Jahr 2025 zu 1.075.850 Neuerkrankungen kommen. In die Rechnungen mit einbezogen wurde bereits der verstärkte Rückgang der Inzidenzen durch die strukturierten Hepatitis-B-Impfprogramme. Nicht mit einberechnet wurde die erwartete Verminderung der Neuerkrankungen durch die verbesserten therapeutischen Möglichkeiten bei der Hepatitis-C-Infektion (Grundmann und Meyer 2014, Guthle und Dollinger 2014, Zhu et al. 2016).

2.1.3. Symptome und Diagnostik

Im frühen Stadium der Erkrankung sind meist keine spezifischen Symptome nachweisbar. Schreitet das Wachstum des Tumors voran, so kann sich dies in einer Gewichtsabnahme des Patienten äußern. Auch ein Druckschmerz im rechten Oberbauch wird beschrieben. Manchmal lässt sich hier ein Tumor tasten. Es kann zu Strömungsgeräuschen über der Leber kommen oder auch ein Aszites auftreten. Bei bereits vorbestehender Leberzirrhose kann es zu einer Dekompensation kommen. Ebenso wurde das Auftreten von paraneoplastischen Syndromen wie Fieber oder Polyglobulie beschrieben (Herold 2018).

Das gesunde Lebergewebe wird fast ausschließlich im Rahmen der Vasa publica portalvenös versorgt und zu kleinen Teilen über die A. hepatica. Im Gegensatz dazu läuft die Versorgung des Leberkarzinoms hauptsächlich über die A. hepatica und es kommt zu einer Arterialisierung sowie zur Ausbildung von arteriovenösen oder arterioportalen Shunts. Das HCC ist also insgesamt ein hypervaskularisiertes Malignom. Aufgrund des dadurch bedingten charakteristischen Kontrastmittelverhaltens ist es daher möglich, bei Patienten mit gesicherter Leberzirrhose und suspekter Läsion die Diagnose eines HCC zu stellen. So kann mit Hilfe von dynamischer, kontrastverstärkter Bildgebung wie beispielsweise einem Ultraschall (US), einer Computertomografie (CT) oder einer Magnetresonanztomografie (MRT) mit Kontrastmittel die typische früharterielle Hypervaskularisierung und das Phänomen der Auswaschung in der portalvenösen Phase dargestellt werden (siehe Abbildung 2). Mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 30% ist so auf nicht-invasive Weise eine Diagnosestellung möglich. Die Sonografie wird dabei meist in der Initialdiagnostik eingesetzt. Studien belegen, dass das MRT dem CT in der Diagnostik des HCC überlegen ist.

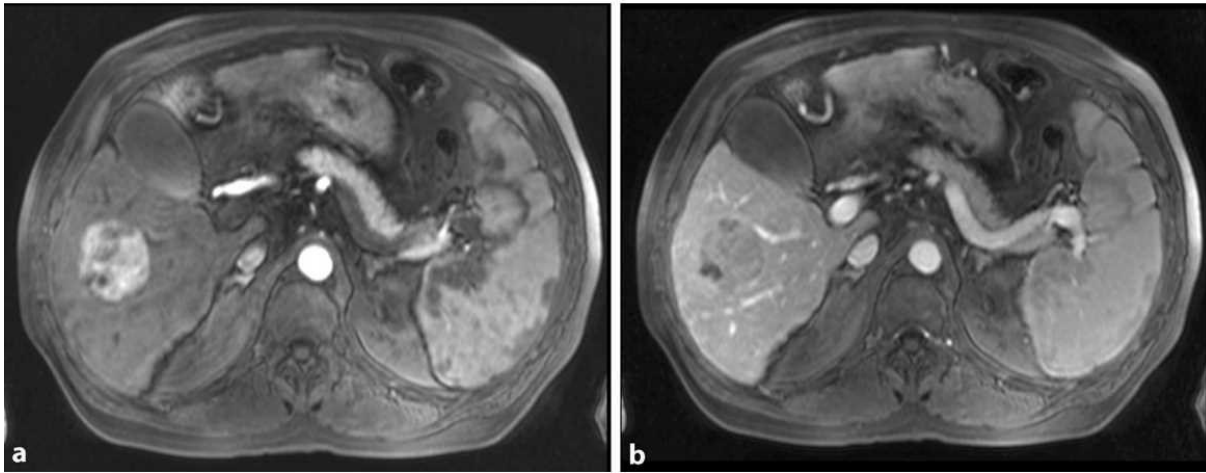


Abb. 2: Typisches Kontrastmittelverhalten im MRT bei einem HCC mit a) dem Nachweis einer Hypervaskularisation in der früharteriellen Phase und b) dem Wash-Out-Phänomen in der portalvenösen Phase (Czuderna et al. 2017)

Falls die Befunde in der Bildgebung nicht eindeutig sind, sollte bei Läsionen < 2 cm eine Biopsie durchgeführt werden, jedoch nur, wenn sich aus dem Befund therapeutische Konsequenzen ergeben würden. In 2% der Fälle kann es allerdings bei der Feinnadelpunktion zu Implantationsmetastasen kommen. Bei sehr kleinen Läsionen < 1 cm, die histologisch schlecht gesichert werden können, sollte nach drei Monaten bildgebend kontrolliert werden. Dabei muss man bedenken, dass die Sensitivität aller bildgebenden Verfahren bei diesen sehr kleinen Läsionen mit weniger als 50% sehr schlecht ist. Bei Größenkonsistenz sollte weiterhin beobachtet werden. Bei einer Vergrößerung des Befundes muss biopsiert werden. Leider kann selbst eine negative Biopsie ein HCC nicht mit Gewissheit ausschließen, sodass die suspekten Läsionen weiter beobachtet werden müssen. Bei Läsionen, die größer als 2 cm sind, sollte eine zweite kontrastmittelverstärkte Untersuchung durchgeführt werden. Falls sich diese im Kontrastverhalten typisch darstellt, ist dies zur Diagnosestellung ausreichend. Die Biopsie ist bei suspekten Läsionen in einer nichtzirrhotischen Leber obligat.

Der Tumormarker Alpha-Fetoprotein (AFP) wird in der klinischen Routine häufig nur noch zur Verlaufsbeurteilung der Erkrankung eingesetzt, für die Primärdiagnostik ist er nicht mehr Standard. Das AFP ist ein Glykoprotein, welches von der fetalen Leber und dem Dottersack produziert wird. Nach der Geburt sinken die Serumwerte auf < 10 ng/ml. HCC können zur Erhöhung der Werte führen, ebenso viele weitere

Faktoren wie beispielsweise extrahepatische Tumore wie Adenokarzinome des Magens oder Bronchialkarzinome und die akute und chronische Hepatitis. 30% der malignen hepatozellulären Lebertumore führen allerdings nicht zu einer Erhöhung des Tumormarkers. Die AFP-Werte sind häufiger bei durch eine Virushepatitis bedingten Leberkarzinomen erhöht als bei alkoholbedingten Tumoren. Der positive Vorhersagewert liegt bei 9 - 32%.

Zur histopathologischen Abgrenzung der anderen primären Lebertumore, wie der cholangiozellulären Karzinome, ist die Anwendung eines Cholangiozyten-typischen Marker-Panels (v.a. K-7, K-19, Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9)) hilfreich. Findet sich jedoch eine Expression des K-19 in mehr als 10% der Tumorzellen bei einem HCC, wird dies als unabhängiger negativer Prognosefaktor gewertet. Insbesondere zur Abgrenzung gegenüber benignen Veränderungen der Leber kann eine Markerkonstellation, die eine bestehende Zelltransformation signalisiert, die Diagnose des Leberkarzinoms unterstützen. Dafür werden die Glutaminsynthetase (GS), Glypican 3 und das Hitzeschockprotein 70 (HSP70) untersucht. Die Sensitivität beträgt 70% und die Spezifität 100%, falls 2/3 der Marker (GS, Glypican 3, HSP70) positiv ausfallen.

Um das Ausmaß und einen eventuellen Gefäßeinbruch des Tumors abschätzen zu können, sollte jedes HCC mit einem kontrastmittelverstärkten Schnittbildverfahren beurteilt werden. Tritt das Leberkarzinom multifokal auf oder hat man den Verdacht auf einen Gefäßeinbruch, sollten extrahepatische Metastasen abgeklärt werden. Dafür wird ein Thorax-CT empfohlen. Zur Abklärung von Metastasen, die intrahepatisch liegen könnten, sollte ein Kontrastmittel-MRT eingesetzt werden (Bussar-Maatz et al. 1993, Kaiser et al. 2003, Albrecht 2008, Kolligs et al. 2010, AWMFonline 2013, Czauderna et al. 2017, Herold 2018).

2.1.4. Klassifikation

Als Grundlage zur Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung wird die Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Klassifikation herangezogen. Sie berücksichtigt das Tumorstadium (pTNM-Klassifikation), die Leberfunktion (Child-Pugh-Score) und die körperliche Leistungsfähigkeit des Patienten (Eastern Cooperative Oncology Group). Beim Child-Pugh-Score werden Punkte in

Abhängigkeit von der Höhe der Albumin-, Bilirubin- und Quick-Werte im Serum vergeben. Außerdem gibt es Punkte bei Aszites oder einer Enzephalopathie (Czauderna et al. 2017, Herold 2018).

2.1.5. Therapie und Prognose

Die Überlebenswahrscheinlichkeit konnte in den letzten Jahren signifikant gesteigert werden, was zum einen auf der vermehrten Detektion des hepatozellulären Karzinoms im frühen Stadium beruht und zum anderen auf der stärkeren Nutzung kurativer Methoden. Ohne Therapie beträgt das mediane Überleben allerdings nur 1 - 8 Monate (Albrecht 2008, Njei et al. 2015).

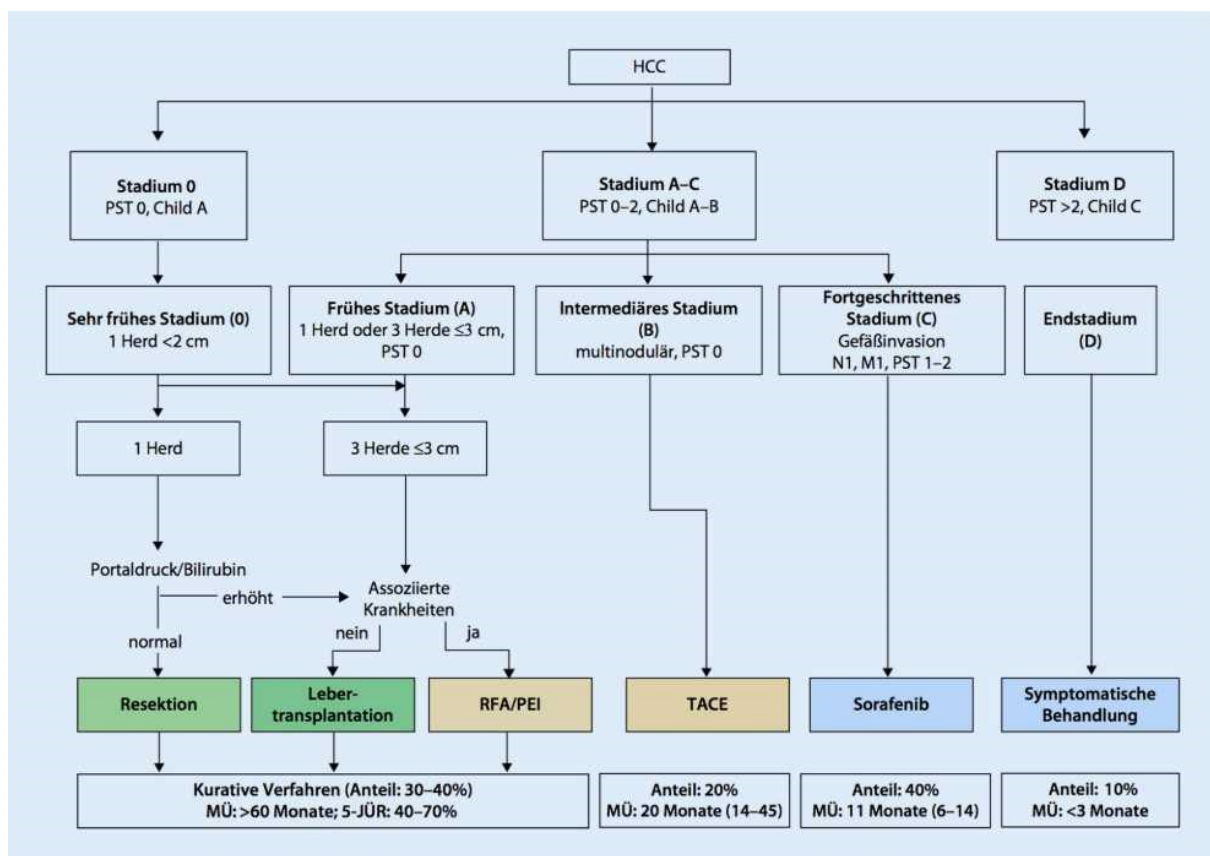


Abb. 3: BCLC-Klassifikation, Behandlungsstrategien und Prognose des hepatozellulären Karzinoms. 5-JÜR: 5-Jahres-Überlebensrate, HCC: hepatozelluläres Karzinom, MÜ: medianes Überleben, PEI: perkutane Ethanolinjektion, PST: Performance-Status, RFA: Radiofrequenzablation, TACE: transarterielle Chemoembolisation (Czauderna et al. 2017)

Die tatsächliche Behandlung weicht häufig von den Leitlinien ab und variiert weltweit je nach Region und entsprechender Expertise. Das liegt zum einen an der unterschiedlichen Verfügbarkeit von Ressourcen und zum anderen an der unzureichenden Datenlage zu den zum Teil sehr unterschiedlichen Therapiestrategien. Die optimale Therapie sollte in interdisziplinärer Zusammenarbeit entwickelt werden. Dafür gilt es die Tumorgröße, das Befallsmuster, die Leberfunktion und den Allgemeinzustand zu berücksichtigen. Supportiv sollten Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom in jedem Stadium dazu motiviert werden Sport zu treiben und es sollte einer Mangelernährung entgegengewirkt werden. Außerdem sollte ihnen die Möglichkeit einer Anschlussheilbehandlung, von Rehabilitationsmaßnahmen und professioneller psychischer Unterstützung angeboten werden. Die verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten je nach entsprechendem Stadium sind in Abbildung 3 dargestellt.

Frühstadium (BCLC 0/A)

Patienten mit und ohne Leberzirrhose, gutem Allgemeinzustand, mit erhaltener Leberfunktion und geringer Tumorausdehnung lassen sich dem Frühstadium zuordnen. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt 40 - 70%. Ein potenziell kurativer Ansatz ist möglich. Leider wird nur ein geringer Teil der Tumorpatienten in diesem Stadium erkannt. Zu den therapeutischen Möglichkeiten zählen die *chirurgische Resektion*, die *orthotope Lebertransplantation* und die *lokale Ablation*.

Eine *Resektion* kann bei Patienten mit Leberzirrhose ohne portale Hypertension und mit normalem Bilirubin, entsprechend einem Child-Pugh-Stadium A, angestrebt werden. Therapie der Wahl ist sie bei resektablen HCC ohne Leberzirrhose. Eine ausreichende Parenchymreserve der Leber muss vorhanden sein und die Möglichkeit zur R0-Resektion. Limitiert wird diese Therapiemöglichkeit durch die Tumorausdehnung, die Tumorlokalisation sowie durch eine bestehende Zirrhose und deren Komplikationen, wie z.B. einem Pfortaderverschluss oder entstandene ausgeprägte Umgehungskreisläufe. Die 30-Tagesmortalität nach Operation liegt bei 1 - 24%, wobei die meisten Patienten an einem postoperativen Leberversagen versterben. Nach fünf Jahren leben noch 50% der operierten Patienten. Allerdings geht die Methode mit einer hohen Rezidivrate von 70% einher, was an der bereits

bestehenden intrahepatischen Mikrometastasierung bei Diagnosestellung liegt. Auch ist es möglich, dass neue Tumore aufgrund der fortbestehenden Leberzirrhose entstehen können. Prinzipiell können diese erneut reseziert werden.

Die *orthotope Lebertransplantation* ist für Patienten mit einer Leberzirrhose und einem HCC und bei Erfüllen der Mailand-Kriterien das Mittel der Wahl. Innerhalb dieser Kriterien liegt ein Herd < 5 cm oder bis zu drei Herde mit jeweils ≤ 3 cm. Eine makroskopische Gefäßinvasion und eine extrahepatische Manifestation dürfen nicht vorliegen. Die Rezidivrate liegt bei unter 15% und die 5-Jahresüberlebensrate bei 70%. Vergleichbare Überlebensraten finden sich auch bei Transplantationspatienten ohne HCC. Die bessere Prognose und die geringeren Rezidivraten nach einer Lebertransplantation sind darauf zurückzuführen, dass nicht nur der maligne Tumor entfernt wird, sondern auch die Leberzirrhose und eventuell unentdeckte mikroskopisch kleine intrahepatische Metastasen. Allerdings müssen die Transplantierten lebenslang immunsuppressive Medikamente einnehmen, um das Abstoßen des Organs zu verhindern. Daher steigt das Risiko für Infektionen und die Inzidenz von De-novo-Malignomen. Aufgrund von langen Wartezeiten von über 12 Monaten auf die Spenderorgane kann es passieren, dass Patienten durch einen Progress des Tumors aus den Mailand-Kriterien herausfallen. Patienten mit einer voraussichtlichen Wartezeit von über 6 Monaten erhalten deswegen meist eine Bridging-Therapie, bestehend aus lokoregionären Therapieverfahren oder einer chirurgischen Resektion. Die Lebendspende ist in Deutschland weniger verbreitet.

Zu den am besten untersuchten und am häufigsten verwendeten lokalen Ablationsverfahren zählt die *Radiofrequenzablation (RFA)*. Sie findet Anwendung insbesondere bei bestehenden Kontraindikationen gegen eine Resektion oder eine Transplantation. Über Nadelelektroden wird Wechselstrom in den Tumor appliziert, der sich dann auf Temperaturen von 60 - 105 Grad Celsius erhitzt. Aufgrund der Denaturierung von Proteinen und dem Verschluss kleiner Gefäße kommt es zu einer Koagulationsnekrose. Die zu behandelnden Herde sollten nicht größer als 4 - 5 cm sein. Bei Herden < 2 cm ist diese Methode in Bezug auf die Rezidivrate mit den Ergebnissen einer Resektion vergleichbar. Allerdings ist bei größeren Herden die RFA mit einem höheren Rezidivrisiko bei niedrigeren Komplikationsraten assoziiert und es sollte zur Senkung der Rezidivrate eine transarterielle Chemoembolisation angeschlossen werden. Da die RFA mit höherer Effektivität zur Tumordestruktion

führt, verdrängte sie in den letzten Jahren zunehmend auch die perkutane Ethanolinjektion.

Zu den neueren lokalen Therapieverfahren zählen weiterhin die Mikrowellenablation und die irreversible Elektroporation. Letztere führt durch alternierende elektrische Felder zu einer irreversiblen Zellwandschädigung und somit zur Apoptose. Der Vorteil von diesem Verfahren liegt in der Möglichkeit der Behandlung von gefäßnahen Tumoren.

Adjuvante Therapiemöglichkeiten haben sich im Frühstadium der Erkrankung noch nicht etabliert. Jedoch sollten alle 3 - 6 Monate Nachsorgeuntersuchungen durchgeführt werden (Albrecht 2008, Kolligs et al. 2010, AWMFonline 2013, Czauderna et al. 2017).

Intermediärstadium (BCLC B)

Patienten dieses Stadiums sind in der Regel asymptomatisch und weisen einen großen Tumor oder eine multinodale Tumorausbreitung auf, jedoch ohne makroskopische Gefäßinvasion oder Manifestationen außerhalb der Leber. Sie erfüllen nicht mehr die Mailand-Kriterien. Aussichten auf kurative Therapiemöglichkeiten bestehen nicht. In diesem Stadium finden transarterielle Maßnahmen Anwendung wie die *transarterielle Chemoembolisation (TACE)* oder die *Radioembolisation*, die sich die Versorgung des Tumors durch die A. hepatica zu Nutze machen. Durch die Nutzung ersterer Methode konnte die Lebenserwartung in diesem Stadium von 16 auf 20 - 22 Monate verlängert werden.

Die *TACE* ist die Methode der Wahl im Intermediärstadium, wird aber auch in früheren oder auch fortgeschritteneren Stadien eingesetzt. Dabei werden in die tumorversorgenden Arterien Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Cisplatin oder Mitomycin injiziert, manchmal mit der Trägersubstanz Lipiodol als Kontrastmittel, wodurch das arterielle Gefäß okkludiert. Anschließend wird meist zusätzlich das Embolisat Gelatine verabreicht, wodurch eine Embolisation des Gefäßes für zwei Wochen erreicht wird. Als Hauptfaktor für das Ansprechen der Therapie wird die Embolisation angesehen, die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum scheint dabei für die Wirkung eher zweitrangig zu sein. Als häufige Nebenwirkung wird das sogenannte Postembolisationssyndrom beobachtet, mit abdominellen Schmerzen,

Fieber und erhöhten Transaminasen, welches 60 - 80% der Behandelten betrifft. Seltener treten ein Aszites, ein Leberversagen, Blutungen im gastrointestinalen Trakt, ein Nierenversagen, eine Enzephalopathie und Leberabszesse auf. Dieses konventionelle Verfahren wurde in den letzten Jahren mit Hilfe der drug-eluting beads weiterentwickelt. Dabei werden Doxorubicin-beladene Mikrosphären injiziert. Dieses Vorgehen reduziert die Toxizität durch das Chemotherapeutikum, da der Stoff langsamer und selektiver freigesetzt werden kann. Im Vergleich zur TACE wurde mit dieser Methode eine höhere Rate an Fällen mit komplettem und objektivem Ansprechen sowie einer Krankheitsstabilisierung verzeichnet. Vor allem bei fortgeschrittener Erkrankung konnte man einen signifikanten Anstieg des Ansprechens auf die Therapie verzeichnen. Kontraindikationen für die transarterielle Chemoembolisation sind ein Child-Pugh-Stadium C, eine Pfortaderthrombose oder nichtverschließbare arteriovenöse Fisteln. Eine Grundvoraussetzung für die Anwendung ist der Nachweis von vitalem Tumorgewebe. Das Verfahren kann grundsätzlich mehrfach angewendet werden. Sollte jedoch nach zwei erfolgten Behandlungen keine Besserung zu verzeichnen sein, kommen alternative Therapiemöglichkeiten wie beispielsweise die *Radioembolisation* eher in Betracht.

Die Wirkung dieses Verfahrens beruht auf einer interstitiellen Hochdosisstrahlentherapie und einer arteriellen Mikroembolisation. Dabei wird in die tumorversorgenden Gefäße ⁹⁰Yttrium, ein Beta-Strahlen emittierendes Isotop mit einer Halbwertszeit von 64,2 h, gekoppelt an Glas- oder Kunstharzpartikel, appliziert. Aufgrund der geringen Partikelgröße okkludieren die Gefäße nicht vollständig. Es kommt dennoch zu einer Abnahme der Durchblutung des HCC und zu einer Reduktion der Vitalität der Tumorzellen. Diese Methode eignet sich daher besonders bei diffuser intrahepatischer Tumormasse. Sie lässt sich außerdem auch bei Patienten mit Pfortaderthrombose durchführen. Vor der Maßnahme sollte man mittels Angiografie und anschließender Szintigrafie einen signifikanten hepatopulmonalen Shunt und einen aberranten Blutabfluss in den Gastrointestinaltrakt ausschließen, da diese als absolute Kontraindikationen gelten. Kleine aberrante Gefäße können vor der Therapie verschlossen werden. Einzelne Patienten wurden nach der Anwendung dieses Verfahrens sekundär resektabel (Kolligs et al. 2010, AWMFonline 2013, Czuderna et al. 2017).

Fortgeschrittenes Stadium (BCLC C)

In diesem Stadium sind die therapeutischen Maßnahmen aufgrund von makroskopischer Gefäßinvasion oder extrahepatischer Manifestation eingeschränkt. Es geht mit einer Überlebensrate von weniger als 50% nach einem Jahr einher. Zudem gilt das HCC als Chemotherapie-resistenter Tumor. Doxorubicin wurde lange Zeit als Standardsubstanz verwendet. Jedoch zeigte es eine hohe Toxizität und eine geringe Ansprechrate von maximal 20%. Die erste effektive Systemtherapie wurde mit dem Tyrosinkinasehemmer Sorafenib Ende 2007 gefunden. Dieser führt zu einer Hemmung der Raf-1- und B-Raf-Kinasen und der Tyrosinkinasen VEGFR und PDGFR, was mit einer Verminderung der Zellproliferation und Neoangiogenese einhergeht. Im Child-Pugh-Stadium A konnte mit dem Medikament ein signifikanter Überlebensvorteil festgestellt werden. Das Überleben konnte dabei von 7,9 auf 10,7 Monate gesteigert werden und das progressionsfreie Überleben von 2,8 auf 5,5 Monate. Regelmäßig kommt es zu einer Krankheitsstabilisierung mit abnehmender Vaskularisierung des Tumors. Seltener sind partielle Remissionen und Komplettremissionen wurden bisher nur in Fallberichten beschrieben. Im Child-Pugh-Stadium B fiel der Überlebensvorteil eher gering aus, so dass eine Therapie individuell abgewogen werden muss. Im Child-Pugh-Stadium C sollte keine Systemtherapie durchgeführt werden. Kommt es trotz Sorafenib-Therapie zu einer Progression sollte eine bestmögliche supportive Therapie erfolgen. Nach Versagen lokoregionärer Verfahren kann der Tyrosinkinaseinhibitor auch im BCLC-Stadium B eingesetzt werden. Zu den Nebenwirkungen zählen das palmar-plantare Erythrodyästhesie-Syndrom, Diarrhöen und eine arterielle Hypertonie. Durch die Gabe von Antihypertensiva, Loperamid und einer prophylaktischen Hautpflege sind diese Nebenwirkungen aber gut behandelbar. Weitere unerwünschte Wirkungen sind ein Haarausfall, eine Heiserkeit, Asthenie, ein Gewichtsverlust, eine Verschlechterung der Leberfunktion und Hypothyreosen. Selten kann es auch zur Perforation von Hohlorganen kommen. So wurde ein Fall mit Ösophagusperforation und Mediastinitis mit Todesfolge beschrieben. Mittlerweile sind mit Lenvatinib weitere Medikamente derselben Substanzklasse für die Erstlinientherapie und mit Regorafenib und Cabozantinib für die Zweit- und Drittlinientherapie durch die FDA zugelassen. Sie genehmigte darüber hinaus auch einen monoklonalen Antikörper (Ramucirumab) als Zweitlinientherapie sowie Anti-PD-1/PD-L1-Antikörper (Kolligs et al. 2010, AWMFonline 2013, Czauderna et al. 2017, Graziadei 2020, Donisi et al. 2021).

Endstadium (BCLC D)

Dieses Stadium zeichnet sich durch eine deutlich eingeschränkte Leberfunktion aus. Die Mailand-Kriterien werden nicht erfüllt. Die Behandlung sollte rein symptomatisch erfolgen. Die Patienten haben noch etwa 3 - 4 Monate zu leben (AWMFonline 2013, Czauderna et al. 2017).

2.1.6. Screening und Prävention

Für die Entstehung eines HCC gibt es eindeutig identifizierte Risikofaktoren. Im frühen Tumorstadium kann man mit kurativen Therapieoptionen gute langfristige Ergebnisse erzielen. Daher ist das Karzinom für Screeningprogramme prinzipiell geeignet (Albrecht 2008). Bisher werden allerdings lediglich 30% der Diagnosen in einem Stadium mit kurativer Therapiemöglichkeit gestellt. Deswegen sollten Hochrisikopatienten mit Möglichkeit zur kurativen HCC-Therapie einer Früherkennungsuntersuchung zugeführt werden. Zu diesen Patienten zählen Patienten mit Leberzirrhose, chronischer Hepatitis-B/C-Infektion, fortgeschrittener Fibrose und einer Fettleberhepatitis. Auch nach überstandener Virushepatitis sollten Früherkennungsuntersuchungen fortgeführt werden, denn auch hier besteht weiterhin das Risiko für die Entwicklung eines malignen Lebertumors. Hochrisikopatienten sollten halbjährlich eine Ultraschall-Untersuchung bekommen. Biomarker wie das AFP werden von den meisten Leitlinien nicht mehr als Screeningtest empfohlen, jedoch teilweise dennoch durchgeführt, um bei einem Anstieg weitere diagnostische Maßnahmen zu veranlassen (Czauderna et al. 2017).

Vor dem Hintergrund der Kenntnis der Risikofaktoren sollte auch primär- und sekundärpräventiv vorgegangen werden. Eine strikte Alkoholkarenz ist bei Lebererkrankungen geboten. Auch sollte eine HBV-Impfung durchgeführt werden. Weltweit sind immer noch 270 Millionen Menschen mit Hepatitis B infiziert. Das sind ungefähr 5% der Bevölkerung. Sekundärpräventiv sollte bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen die zugrundeliegende Erkrankung behandelt werden, um eine Progression zu verhindern. Eine Gewichtsreduktion kann helfen, das Fortschreiten einer NASH zu vermeiden. Das HCC-Risiko wird bei Patienten mit nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus durch die Behandlung mit Metformin reduziert (AWMFonline 2013, Zhu et al. 2016).

2.2. Cholangiozelluläres Karzinom

2.2.1. Definition

Nach dem HCC ist das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) der zweithäufigste primäre Tumor der Leber mit einem Anteil von 10 - 25% an allen Lebertumoren. Insgesamt zählt man 3% der gastrointestinalen Tumore zu den CCC. Das Karzinom entsteht aus entarteten Cholangiozyten, wobei es sich mehrheitlich um Adenokarzinome handelt. Anatomisch lässt sich das Karzinom in intrahepatisch (iCCC) und extrahepatisch (perihilär und distal) (pCCC; dCCC) gelegene Tumore unterteilen, wobei der Begriff „Klatskin-Tumor“ gerne für die perihilär gelegenen cholangiozellulären Tumore verwendet wird. Auch der Gallenblasentumor gehört zu der Gruppe dazu. Es ist wichtig, diese Unterscheidung zu treffen, da sich die Symptomatik und Therapie zwischen diesen Gruppen unterscheiden kann (Wengert et al. 2015, Zender und Malek 2016, Jodicke et al. 2020).

2.2.2. Epidemiologie und Risikofaktoren

Auch wenn das CCC mit 1% aller malignen Karzinome ein seltener Tumor ist, so stellt es doch laut einer Studie in England und Wales die häufigste Ursache für Todesfälle durch primäre Lebertumore dar. In Deutschland erkranken jährlich etwa 8000 Menschen an diesem Karzinom. Das entspricht etwa 1,7% aller Krebsneuerkrankungen, wobei eine steigende Tendenz vorhergesagt wird. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Auch die Mortalität ist steigend. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt zwischen 10 und 17%, wobei deutliche geografische Unterschiede bestehen. Während die Inzidenzen in der westlichen Welt bei 1 - 3/100.000 Einwohner liegen, zeigen sich zwei andere Extreme in Thailand mit 113/100.000 Einwohner und in Australien mit 0,1/100.000 Einwohner. In Teilen Thailands ist das iCCC für 80% der primären Lebertumore verantwortlich. Beim extrahepatischen cholangiozellulären Karzinom sind die regionalen Unterschiede geringer ausgeprägt. In den letzten 30 Jahren wurde ein 15facher Anstieg der CCC-Inzidenzen beobachtet, was auch an der Änderung der Altersstruktur liegen kann. Insbesondere die Inzidenz des iCCC steigt nach verschiedenen internationalen Studien an, wohin hingegen die Inzidenz und Mortalität des dCCC sinken. Allerdings sind die Zahlen nicht so eindeutig. Studien aus Frankreich und Dänemark ergaben,

dass auch die Inzidenz der iCCC sinkt. Ein Grund für diese unterschiedlichen Angaben könnte neben länderspezifischen Gegebenheiten auch eine Fehlklassifizierung der verschiedenen CCC aufgrund der Komplexität der Klassifizierung und der zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgten ICD-Änderungen sein. 91% aller pCCC sollen laut einer Studie aus den USA von 1992 bis 2002 inkorrekt als iCCC klassifiziert worden sein. Nichtsdestotrotz muss insgesamt insbesondere in der westlichen Welt von einem Anstieg der gesamten CCC-Fälle ausgegangen werden. In den asiatischen Ländern erscheint die Neuerkrankungsrate dagegen im Wesentlichen unverändert. Im Mittel beträgt das Alter bei Diagnosestellung 65 Jahre. 23% der Tumore sind Gallenblasenkarzinome, 36% liegen intrahepatisch und 41% extrahepatisch, hierzu zählen die perihilären und distalen Tumore. Frauen erkranken deutlich häufiger an Tumoren der Gallenblase, wohingegen Männer etwas häufiger von Karzinomen der Gallengänge betroffen sind (Zender und Malek 2016, Vogel und Saborowski 2017, DGHO 2019, Goeppert 2020).

Eine Zunahme der iCCC-Zahlen lässt sich zum einen auf verbesserte diagnostische Möglichkeiten zurückführen, aber auch durch eine gleichzeitige Zunahme der Leberzirrhose-Fälle erklären, wobei die Leberzirrhose einen unabhängigen Risikofaktor darstellt. Jedoch ist die Entstehung von CCC deutlich seltener auf eine Leberzirrhose zurückzuführen als die von HCC. Am häufigsten findet sich das cholangiozelluläre Karzinom in einer nichtzirrhotischen Leber. Die meisten cholangiozellulären Tumore entstehen sporadisch, d.h. ohne klar erkennbare Risikofaktoren. Nur etwa 30% der Tumore sind mit prädisponierenden Faktoren assoziiert. Der bekannteste von ihnen ist die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), mit einem kumulativen Lebenszeitrisiko insbesondere für das extrahepatische CCC von 10 - 15%. Die Zeit zwischen der Diagnose einer PSC und der Entwicklung eines Karzinoms beträgt durchschnittlich nur zweieinhalb Jahre.

Weitere Faktoren sind die alkoholische Hepatopathie, die Fettleberhepatitis, eine Porzellangallenblase und kongenitale Anomalien des biliären Trakts wie das Caroli-Syndrom. Auch eine chronische Hepatitis-C-Infektion, das Alter, biliäre Adenome, Polypen und Papillome, ein chronischer Trägerstatus für Salmonella Typhimurium und eine Exposition gegenüber dem Kontrastmittel Thorotrast, welches mittlerweile nicht mehr verwendet wird, können zur Entwicklung beitragen. Zystische

Gallengangsveränderungen sowie eine Choledocholithiasis zählen ebenso zu den prädisponierenden Faktoren. Weniger gut etablierte, aber wahrscheinliche Risikofaktoren sind die Adipositas, ein Diabetes mellitus, Alkoholkonsum, Zigarettenrauchen und eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung.

Speziell in den Ländern, in denen die Prävalenz des CCC besonders hoch ist, wie in Thailand oder in anderen ostasiatischen Ländern, wird die endemische Verbreitung von chronischen Infektionen mit Parasiten wie mit dem chinesischen Leberegel *Clonorchis sinensis* für die Entstehung von CCC verantwortlich gemacht. Der Parasit wird durch den Verzehr von rohem oder eingelegtem Fisch aufgenommen (Zender und Malek 2016, Vogel und Saborowski 2017, Lurje et al. 2018, DGHO 2019, Goeppert 2020, Jodicke et al. 2020).

2.2.3. Symptome und Diagnostik

Im frühen Stadium äußert sich die Erkrankung meist mit keinerlei Symptomatik, weswegen ein Großteil der Patienten erst in einem späteren Stadium diagnostiziert wird. Auf einen fortgeschrittenen Verlauf mit bereits bestehender cholestatischer Obstruktion deutet die Trias aus Cholestase mit schmerzlosem Ikterus, abdominellen Schmerzen und Gewichtsverlust hin. Als Komplikation der Cholestase kann es im weiteren Verlauf zu einer Cholangitis bis hin zur Cholangiosepsis kommen. Beim iCCC tritt die Cholestase jedoch nicht regelhaft auf, so dass die Verdachtsdiagnose hier häufig aufgrund einer Bildgebung aus anderen Gründen gestellt wird. Weitere mögliche Symptome sind Erbrechen, Übelkeit, Inappetenz, Fatigue und Aszites. Manchmal kann eine Raumforderung im rechten Oberbauch getastet werden, welche in Kombination mit einem schmerzlosen Ikterus als Courvoisier-Zeichen bezeichnet wird. Ein rechtsseitiger Oberbauchschmerz wäre eher für das iCCC typisch (Kubicka 2004, Herold 2018, Lurje et al. 2018, DGHO 2019, Jodicke et al. 2020).

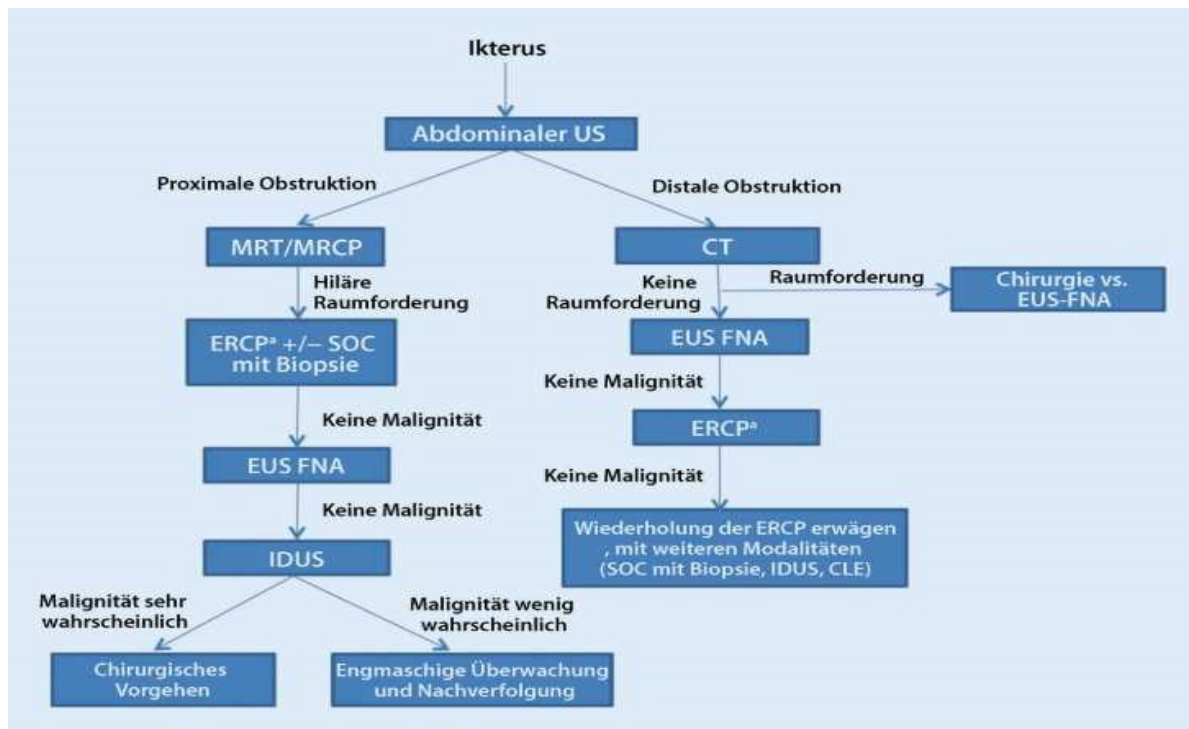


Abb. 4: Möglicher Algorithmus zur Differenzierung biliärer Strikturen. a) Zusätzlich Bürstenabstrich, fluoroskopische Biopsie, Nadelaspiration, Flüssigkeitsaspiration. CLE: Konfokale Laserendomikroskopie, CT: Computertomografie, ERCp: endoskopische retrograde Pankreatikografie, EUS-FNA: endoskopischer Ultraschall mit Feinnadelaspiration, FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, IDUS: intraduktaler Ultraschall, MRCP: Magnetresonanzcholangiopankreatikografie, MRT: Magnetresonanztomografie, SOC: Single-operator-Cholangioskopie, US: Ultraschall (Zender und Malek 2016)

Wird eine Raumforderung in einer zirrhotischen Leber detektiert, sollte erst einmal eine Unterscheidung zwischen einem HCC und einem CCC vorgenommen werden. Im Gegensatz zu den hepatozellulären Karzinomen weisen Tumore des Gallentraktes eine zunehmende Aufnahme des Kontrastmittels in der arteriellen und der venösen Phase auf.

Die Methode der ersten Wahl sind bildgebende Verfahren mit Kontrastmittel zur Abklärung des klinischen Verdachts. Das primäre Diagnoseverfahren ist meist die Sonografie. Der häufigste Befund bei einem CCC ist die Cholestase. Die Gallenwege zeigen sich dabei sonografisch echoarm bis echofrei, mit echoreichen Wandreflexen, wobei ein sogenanntes „Doppelflintenphänomen“ aufgrund des parallelen Verlaufs mit den Ästen des Pfortadersystems detektiert werden kann. Doppler- oder duplexsonografisch lässt sich über den gestauten Gallenwegen kein Fluss

ausmachen. Intrahepatische CCC imponieren diffus wachsend, echoarm bis echogleich oder echokomplex. Schwieriger zu erkennen sind die perihilär oder distal gelegenen Tumore. Häufig vereinigen sich dabei linke und rechte erweiterte Gallengänge nicht und es finden sich Wandverdickungen mit polypoiden intraluminalen Strukturen.

Auch wenn das CT die Tumorausbreitung teilweise nicht präzise erfassen kann, ist es dennoch dem Ultraschall mit einer höheren Sensitivität überlegen. Die Zahl der Fehldiagnosen ist bei letzterem deutlich höher. Das CT eignet sich außerdem sehr gut zur Detektion fernmetastasierter Tumore.

Den Goldstandard zum Nachweis von CCC stellt allerdings das MRT mit Kontrastmittel dar. Die anatomischen Verhältnisse und die intrahepatischen Metastasen lassen sich gut mit diesem bildgebenden Verfahren detektieren. Mithilfe der MR-Angiografie kann auch die Infiltration der Gefäße dargestellt werden, wohingegen sich die Infiltration der Gallengänge gut mit der Magnetresonanzcholangiopankreatikografie (MRCP) zeigt. Dennoch sollte für eine vollständige Diagnostik nach dem MRT anschließend ein CT durchgeführt werden.

Für weiter distal und extrahepatisch gelegene Obstruktionen, hiläre Raumforderungen, Auffälligkeiten der Gallenblase und der regionalen Lymphknoten bietet sich die endoskopische Sonografie an. Im Rahmen dieser Methode ist es ebenso möglich, Biopsien zu entnehmen. Die Sensitivität ist hoch, der negative Prädiktionwert dagegen niedrig. Sobald eine Malignität histologisch bestätigt wurde, sollte an die Chirurgen und Onkologen überwiesen werden.

Die endoskopische retrograde Pankreatikografie (ERCP) und der endoskopische Ultraschall (EUS) sollen vor allem bei nicht eindeutigen Fällen verwendet werden. Insbesondere bei Patienten mit hochgradigem Verdacht auf ein CCC, aber ohne Cholestase, sollte auf eine invasive Diagnostik verzichtet und die Indikation zur chirurgischen Exploration großzügig gestellt werden. Bei eindeutigem klinischen und bildgebenden Befund bei resektablem Tumor ist eine präoperative histologische Sicherung nicht notwendig (Zender und Malek 2016, DGHO 2019, Roderburg et al. 2019).

Bei Verdacht auf ein intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom, das primär nicht resektabel ist, sollte eine perkutane CT- oder ultraschallgesteuerte Biopsie

standardmäßig durchgeführt werden. Auch nach mehrmaliger Biopsie lässt sich die Diagnose nicht immer sichern. Die weiter distal gelegenen pCCC und dCCC können mit einem Bürstenabstrich während einer ERCP-Untersuchung histologisch gesichert werden. Die Sensitivität der Methode ist mit unter 50% relativ schlecht. Man kann sie auf bis zu 70% beim dCCC erhöhen, indem man Bürstenzytologie und Biopsie kombiniert anwendet. Die transpapilläre Cholangioskopie gewinnt immer mehr an Bedeutung. Studien konnten bereits belegen, dass eine bessere Unterscheidung von benignen und malignen Strikturen möglich und eine höhere Erfolgsrate der Biopsien zu verzeichnen ist. Ein möglicher diagnostischer Pfad ist in der Abbildung 4 dargestellt.

Bei iCCC sollte auch immer die Möglichkeit von intrahepatischen Metastasen bedacht werden. Eine diagnostische Koloskopie und Gastroduodenoskopie sollte bei Verdacht auf extrahepatische Metastasen zusätzlich durchgeführt werden (Kubicka 2004, Zender und Malek 2016, Jodicke et al. 2020).

Der am häufigsten verwendete Tumormarker CA 19-9 kann in Kombination mit Ultraschall- oder MRCP-Untersuchungen zur Überwachung von PSC-Patienten eingesetzt werden. Der Tumormarker sollte allerdings immer erst nach einer Entlastung des Gallengangssystems bestimmt werden, da auch ein Galleaufstau sowie eine bakterielle Cholangitis zu einer Erhöhung des Wertes führen können. Auf eine bereits fortgeschrittene Erkrankung weisen Werte von > 1000 U/ml hin. Bei 10% der Bevölkerung eignet sich CA 19-9 nicht als Tumormarker, da sie kein Lewis-Antigen exprimieren und somit den Tumormarker nicht bilden können. Ein weiterer recht verbreiteter Marker ist das CA 125, welches bei 65% aller Patienten mit einem cholangiozellulären Tumor zu finden ist. Allerdings kann auch ein Leberparenchymschaden zu einer Erhöhung des Wertes führen (Kolb et al. 1997, Zender und Malek 2016).

2.2.4. Klassifikation

Alle CCC, die proximal der Gallenwege liegen, bezeichnet man als intrahepatisch. Perihilär sind diejenigen Karzinome, die zwischen den Gallenwegen und der Einmündung des Ductus cysticus in den Ductus hepaticus communis wachsen. Zu den distalen cholangiozellulären Tumoren zählen alle, die sich zwischen der

Mündung des Ductus cysticus und der Ampulla Vateri befinden. Im klinischen Alltag wird zur Beschreibung der Längsausdehnung von pCCC im Gallenwegssystem häufig die Bismuth-Corlette-Klassifikation verwendet. Sie eignet sich für die Beschreibung des Ausmaßes der Infiltration der Hepatikusgabel, reicht aber für die Beurteilung der Resektabilität allein nicht aus. Darum sollte zusätzlich ein kontrastmittelbasiertes Schnittbild angefertigt werden. Zur Abschätzung der Prognose eignen sich allerdings modernere Klassifikationen wie die von DeOliveira und Kollegen besser. Darin werden die Tumorgröße, die Ausdehnung in den Ductus hepaticus communis, die Infiltration der A. hepatica oder der Pfortader, der Tumorbefall der ortsständigen Lymphknoten, das Vorliegen von Fernmetastasen und die Lebermasse, die nach der Resektion verbleibt, berücksichtigt. Die Ausdehnung des Primärtumors und die Metastasierung wird auf Basis der UICC/AJCC-TNM-Klassifikation beschrieben (Zender und Malek 2016, DGHO 2019).

2.2.5. Therapie und Prognose

Für Patienten mit *intrahepatischem* cholangiozellulären Karzinom, gutem Allgemeinzustand und einem potenziell resektablen Tumor sollte die radikale chirurgische Resektion als kurativer Therapieansatz in Betracht gezogen werden. Sie ist die Behandlung der Wahl, aber lediglich bei 25 - 35% aller Patienten möglich. Dabei wird eine Segmentresektion, eine Hemihepatektomie oder eine erweiterte Hemihepatektomie durchgeführt. Der Vorteil einer intraoperativen lokalen Lymphadenektomie konnte in Studien noch nicht bewiesen werden, sie wird aber von den meisten Autoren dennoch empfohlen. Kontraindikationen für eine Resektion könnten eine bilaterale oder multifokale Manifestation und Komorbiditäten sein. Gallefisteln, intraabdominelle Abszedierungen und eine Leberinsuffizienz können als perioperative Komplikationen auftreten. Das mittlere krankheitsfreie Überleben nach einer Resektion beträgt nur 26 Monate, die 5-JÜR liegt bei 26%. Bei 60 - 65% der Patienten kommt es zu einem Rezidiv. Bekannte Faktoren für eine schnelle Wiedererkrankung sind ein R1-Resektionsstatus, eine lymphogene Metastasierung, mehrere intrahepatische Tumore, eine Leberzirrhose sowie eine bereits stattgehabte vaskuläre Invasion und ein schlechter Differenzierungsgrad des Tumors. Liegt der wiederaufgetretene Tumor ausschließlich intrahepatisch, sollte, um das beste Langzeitüberleben zu erzielen, erneut operativ reseziert werden. Von einer

Lebertransplantation profitieren Patienten mit iCCC laut älteren Studien nicht, da der Tumor früh in die Lunge metastasiert und eine hohe intrahepatische Rezidivrate aufweist. Eine aktuelle spanische Registerstudie konnte nun aber einen klaren Überlebensvorteil für solitäre, kleine (< 2 cm) iCCC aufzeigen. Die Transplantation bleibt also ein kontrovers diskutiertes Thema. Ein anderes lokoregionäres Verfahren, die Radiofrequenzablation, stellt hingegen für Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion oder Patienten, bei denen eine vollständige Resektion nicht durchführbar ist, eine gute mögliche Therapieoption dar. Sie ist allerdings nur bei Tumoren bis zu einer Größe von 3 cm effektiv und führt zu einer 3-Jahresüberlebensrate von 40 - 50%. Befinden sich die Karzinome in der Nähe von großen Gefäßen oder wachsen subkapsulär, entfällt diese Behandlungsmöglichkeit aufgrund einer verminderten Wirksamkeit. Die Rezidivrate ist sehr hoch. Auch wenn die Datenlage zur transarteriellen Chemoembolisation eher gering ist, so kommt man bei einigen Studien dennoch zu den Ergebnissen, dass diese Methode zum einen gut verträglich ist und zum anderen zu einer Lebenszeitverlängerung auf 12 - 15 Monate im Vergleich zur „best supportive care“ mit 3,3 Monaten führt. An die Wirksamkeit wie beim hepatozellulären Karzinom reicht sie beim CCC allerdings nicht heran. Auch die Datenlage zu einer TACE mit „drug eluting beads“ ist noch nicht hinreichend. Erste Untersuchungen zeigen aber eine ähnliche Wirksamkeit wie die der klassischen TACE. Eine gleichwertige Alternative scheint auch die selektive interne Radiotherapie zu sein (Zender und Malek 2016, Vogel und Saborowski 2017, Lurje et al. 2018, DGHO 2019).

Bei *perihilären* CCC besteht die Möglichkeit der radikalen Resektion im Rahmen einer Hemihepatektomie oder einer erweiterten Hemihepatektomie, wobei teilweise große Teile der Leber, die extrahepatischen Gallenwege und lokale Lymphknoten reseziert werden. Zusätzlich kann eine Hepatikojejunostomie durchgeführt werden. Sind bereits extrahepatische Lymphknoten befallen, so stellt dies dennoch keine generelle Kontraindikation für eine Resektion dar. Es besteht die Gefahr, dass das Lebervolumen nach der Resektion zu klein ist. Dem kann entgegengewirkt werden, indem durch einen Verschluss des versorgenden Pfortaderasts oder mit Hilfe einer Drainage des Gallenwegssystems versucht wird, das Volumen des tumorfreien Leberlappens zu vergrößern. Allerdings liegt auch bei dieser Methode das Überleben nach fünf Jahren bei nur 11 - 41%. Es wird nach wie vor kontrovers diskutiert, ob präoperativ immer eine Stenteinlage zur Entlastung des Gallengangssystems

erfolgen sollte. Solange die definitive Behandlungsstrategie noch nicht feststeht, sollten aber wenn, dann nur beschichtete Metallstents oder Plastikstents verwendet werden. In der palliativen Situation können nichtbeschichtete Stents zum Einsatz kommen. Bei einer Lebenserwartung von mehr als vier Monaten sollte auf einen Metallstent zurückgegriffen werden. Diese sind zwar teurer, halten dafür aber auch länger und weisen eine bessere Durchgängigkeit auf. Außerdem konnte in dieser Situation durch den Einsatz von Metallstents eine Verlängerung des Gesamtüberlebens belegt werden. Die Implantation eines Stents in beide Gallengänge ist der einseitigen überlegen. Als Komplikation muss immer an eine eitrige Cholangitis gedacht und einem Patienten mit Stent bei Zeichen einer Infektion sofort Antibiotika verabreicht werden. Normalerweise wird der Stent mit Hilfe einer ERCP eingesetzt. Ist dies nicht möglich, erfolgt die Ableitung der Galle über eine perkutane Drainage der Gallenwege. Für Patienten mit nichtresektablem Karzinom ohne Fernmetastasen und einem maximalem Tumordurchmesser von 3 cm ist die Lebertransplantation mit neoadjuvanter Radiochemotherapie eine Therapiemöglichkeit. In einer Studie konnte dabei eine 5-JÜR von 68% erzielt werden. Auch bei Patienten mit PSC und potenzieller Resektabilität ist eine Lebertransplantation vorzuziehen (Kubicka 2004, Zender und Malek 2016, DGHO 2019).

Distale CCC werden mit einer Kausch-Whipple-Operation radikal reseziert, wobei hierbei entweder eine konventionelle Pankreaskopfresektion oder eine pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie durchgeführt wird. Von den so Operierten leben nach fünf Jahren noch 27% der Patienten.

Aufgrund der aktuellen Daten der BILCAP-Studie sollten alle Patienten mit einem malignen biliären Karzinom nach kompletter kurativ intendierter Resektion einer adjuvante Therapie mit Capecitabin über 6 Monate zugeführt werden. Neoadjuvante Therapiestrategien können Teil eines individuellen Konzepts bei grenzwertig resektablen Befunden sein und werden weiter im Rahmen von klinischen Studien untersucht (Zender und Malek 2016, Vogel und Saborowski 2017, DGHO 2019).

In der palliativen Situation des intrahepatischen, perihilären und distalen CCC ist die Therapie individuell zu bestimmen. Die Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Cisplatin stellt seit 2010 den Goldstandard für nicht resektable cholangiozelluläre Karzinome dar. Im Vergleich zur Gemcitabinmonotherapie führt sie bei guter

Verträglichkeit zu einer Verlängerung des Lebens um durchschnittlich 3,6 Monate, was in den entsprechenden Studien auch signifikant war. Nichtsdestotrotz findet die Monotherapie bei älteren und moribunden Patienten Anwendung, da sie zwar keinen Überlebensvorteil, dafür aber im Vergleich zur rein supportiven Therapie eine bessere Lebensqualität ermöglicht. Die Kontraindikationen für eine Cisplatintherapie sind eine Niereninsuffizienz, eine Cisplatin-Unverträglichkeit und Innenohrschäden. Hier besteht als alternative Möglichkeit eine Chemotherapie mit Gemcitabin und Oxaliplatin. Eine generelle Empfehlung zur Zweitlinientherapie bei palliativer Situation ist nicht möglich. Im Einzelfall kann aber bei starkem Therapiewunsch und nach Erstlinientherapie eine Therapie mit 5-Fluoruracil oder Capecitabin, eventuell in Kombination mit Irinotecan oder Oxaliplatin, angeboten werden. Auch eine Gabe von Docetaxel und Mitomycin ist denkbar. Das mediane Überleben von Patienten mit metastasiertem CCC mit den beschriebenen Chemotherapieoptionen liegt immer noch bei weniger als einem Jahr (Zender und Malek 2016, Vogel und Saborowski 2017, DGHO 2019).

In aktuellen Studien werden vor allem zielgerichtete molekulare Therapiemöglichkeiten getestet. Am besten als mögliche Zielstruktur erforscht ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Eine Überexpression dieses Rezeptors findet sich in 30% aller CCC. Die Testung eines EGFR-Antikörpers in Kombination mit Gemcitabin und platinbasierter Chemotherapie lieferte jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Diskutiert wurde hierbei die Möglichkeit, dass ein hoher Anteil an KRAS-Mutationen, die mit einer Resistenz gegenüber der EGFR-Inhibition einhergehen, zu den negativen Studienergebnissen geführt haben könnte. Weitere dazu durchgeführte Studien blieben aber nach Ausschluss aller Patienten mit KRAS-Mutation hinsichtlich der Endpunkte negativ. Sorafenib, ein Multikinaseinhibitor, der beim HCC Anwendung findet, zeigt beim CCC keine therapeutischen Effekte. Insgesamt konnte sich beim CCC bisher noch kein zielgerichteter Therapieansatz etablieren (Zender und Malek 2016, Lurje et al. 2018, DGHO 2019).

2.2.6. Screening und Prävention

Für asymptomatische Menschen gibt es keine Früherkennungsmaßnahmen. Die Bestimmung von CA 19-9 und ein MRT/MRCP alle 6 - 12 Monate kann bei Patienten

mit einer primär sklerosierenden Cholangitis erwogen werden. Eine prophylaktische Resektion der Gallenblase ist bei einer Porzellangallenblase, einem Caroli-Syndrom und bei Gallenblasenpolypen mit einem Durchmesser über 10 mm oder bei Größenprogredienz der Polypen bei sonografischer Kontrolle indiziert. Sie kann erwogen werden bei Gallenblasensteinen, die größer als 3 cm sind (DGHO 2019).

Zu den vorbeugenden Maßnahmen zählen neben einer Impfung gegen Hepatitis B auch die antivirale Therapie bei Virushepatitis. Ebenso trägt die Aufklärung der Bevölkerung hinsichtlich der Übertragungswege von Parasiten und der viralen Infektionen zu einer Eindämmung der Erkrankung bei (Vogel und Saborowski 2017).

2.3. Programmed death-Rezeptor und -Ligand

2.3.1. Überblick

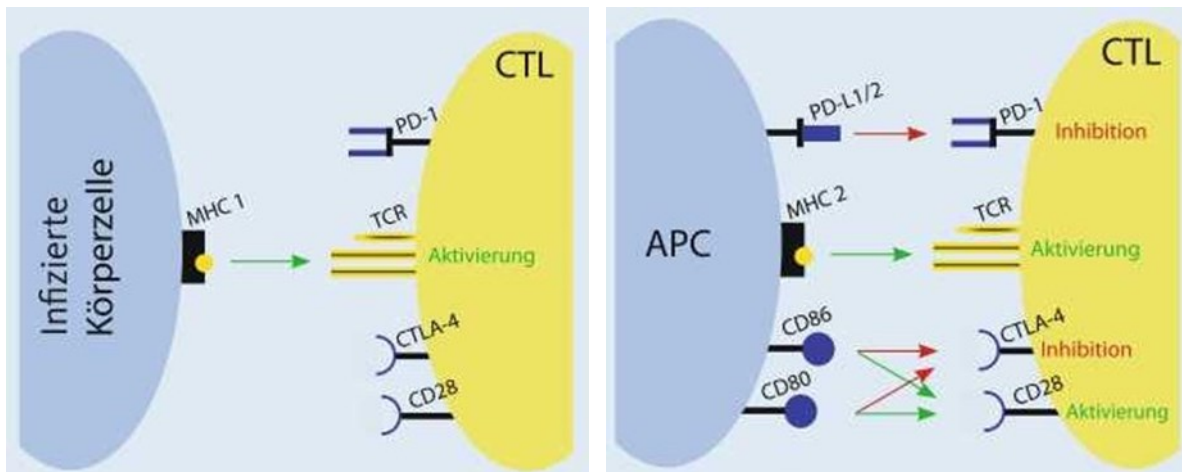


Abb. 5: Linke Abbildung: eine infizierte Zelle aktiviert einen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL); rechte Abbildung: eine antigenpräsentierende Zelle kommuniziert über Rezeptoren mit dem CTL (Roos et al. 2018)

Körperfremde und körpereigene, gealterte und geschädigte Strukturen wie auch Krankheitserreger werden durch das Immunsystem erkannt und beseitigt. Dabei präsentiert beispielsweise die virusinfizierte Körperzelle das körperfremde Antigen über das MHC-1-Molekül an den entsprechenden Rezeptor der T-Zelle (siehe Abbildung 5). Aktiv wird die T-Zelle allerdings erst durch Kostimulation des CD28-Rezeptors. Aktiviert sind die zytotoxischen T-Zellen (CTL) sehr effektiv und müssen deshalb mit natürlichen Kontrollmechanismen limitiert werden, um eine überschießende Immunreaktion oder eine Autoreaktivität zu verhindern. Dafür verantwortlich sind die regulatorischen T-Zellen (T-Reg) und antigenpräsentierende Zellen (APC). In Kontakt treten die beiden Zellgruppen über ihre transmembranären Proteine. Zu diesen sogenannten Immuncheckpoints zählen auf Seiten der CTL Rezeptoren der CD28-Gruppe wie der inhibitorisch wirkende Programmed death-Rezeptor 1 (PD-1) und der zytotoxische-T-Lymphozyten-assoziiertes-Protein-4 (CTLA-4)-Rezeptor sowie der aktivierende CD28-Rezeptor. Zu den B7-Liganden der APC und T-Regs gehören CD80 und CD86 (siehe Abbildung 5). Über den Programmed-death-Liganden (PD-L) wird die Proliferationsrate der CTL gesenkt und

die zytotoxischen Zellen können außerdem in die Apoptose getrieben werden (Berger und Pu 2018, Roos et al. 2018).

2.3.2. PD-L1

PD-L1 und PD-L2 können auch als B7-H1 bzw. B7-DC bezeichnet werden. Beide sind Typ-1-Transmembranproteine (Berger und Pu 2018).

PD-L1 wird von vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Dazu gehören T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen, aber auch Gefäßendothelzellen, Pankreasinselzellen, Keratinozyten und Plazentasynzytiotrophoblasten. Aktivierte T-Zellen können mit proinflammatorischem Interferon-gamma (IFN- γ) und anderen Zytokinen die Expression des Liganden hochregulieren. Die Expression ist wichtig, um eine immunvermittelte Schädigung während einer Entzündungsreaktion zu verhindern. Durch die Aktivierung des PD-1 werden T-Zell-Effektorfunktionen gehemmt, die sich sonst gegen die Zielzelle richten würden. Die Expression des Liganden im normalen Gewebe ist ein Hauptmechanismus bei der Entwicklung einer physiologischen Immuntoleranz. Autoimmunreaktionen des Gewebes nach Entzündungsreaktionen werden so kontrolliert. Neben der Bindung an den PD-1 kann der Ligand ebenso an CD80 binden und zu einer negativen Regulation der T-Zell-Effektorfunktion führen (Bedke et al. 2018, Berger und Pu 2018, Wu et al. 2019). In der Leber wurde dieser Ligand bereits in Hepatozyten, Kupffer-Zellen und in Endothelzellen der Lebersinusoide gefunden (Mocan et al. 2019).

Der PD-L2 wird hingegen sehr viel seltener exprimiert und findet sich hauptsächlich auf dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Als therapeutische Zielstruktur ist er in der Krebsimmuntherapie aktuell noch von geringerem Interesse (Wu et al. 2019).

2.3.3. PD-1

Entdeckt wurde der PD-1 1992. Im November 1997 wurden die vollständige DNA-Sequenz, die Genstruktur und die genomische Organisation des Rezeptors erstmalig beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein 50-55-kDa-Typ-1-Transmembranglykoprotein, dessen DNA 2106 Nukleotide lang ist und für 288

Aminosäuren kodiert. Seine extrazelluläre Domäne ist zu 21 - 33% sequenzidentisch mit dem CTLA-4 und dem CD28. Bei weiteren Untersuchungen fand man, dass Knock-out Mäuse, die keinen PD-1 exprimierten, spontan Autoimmunerkrankungen entwickelten. Deswegen wurde dem Rezeptor eine negative regulatorische Rolle in der Steuerung des Immunsystems für die Entwicklung einer peripheren Toleranz zugeschrieben. Der Rezeptor wird auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert (Finger et al. 1997, Bedke et al. 2018, Berger und Pu 2018, Wu et al. 2019).

Wenn der Rezeptor mit einem Liganden zusammenkommt, wird der PD-1 an seinem zytoplasmatischen Tyrosinrest phosphoryliert und rekrutiert daraufhin Proteintyrosinphosphatasen wie die SHP-2 (src homology 2 phosphatase 2). Diese Phosphatasen können verschiedene wichtige Kinasen in den nachgeschalteten Signalwegen dephosphorylieren und den positiven Signalereignissen durch Stimulation des T-Zellrezeptors und der CD28-Rezeptoren während der Aktivierung von T-Zellen entgegenwirken. Der hemmende Weg überwiegt dabei gegenüber dem aktivierenden. SHP2 hemmt ZAP70 (zeta chain of T-cell receptor associated protein kinase 70), PI3K-AKT (Phosphoinositid-3-Kinase-Serin/Threonin-Kinase) und RAS-ERK (rat sarcoma extracellular signal regulated kinases). Das führt zu einer verminderten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (activator protein 1), NFAT (nuclear factor of activated T cells) und NF- κ B (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B cells). Die T-Zellaktivierung wird dadurch unterdrückt. Außerdem kann die T-Zellfunktion durch die verstärkte Expression von Transkriptionsfaktoren wie BATF (basic leucine zipper ATF like transcription factor) gehemmt werden. BATF wirkt ebenso den aktivierenden Signalen entgegen (siehe Abbildung 6). Im Gegensatz zum CTLA-4, der die Immunantwort früh und hauptsächlich im Lymphknoten inhibiert, hemmen PD-1-Rezeptoren diese erst später und vor allem im peripheren Gewebe. Deswegen spricht man der Blockade dieses Signalweges eine spezifischere Wirkung bei geringerer Toxizität zu als der CTLA-4-Blockade (Berger und Pu 2018, Wu et al. 2019).

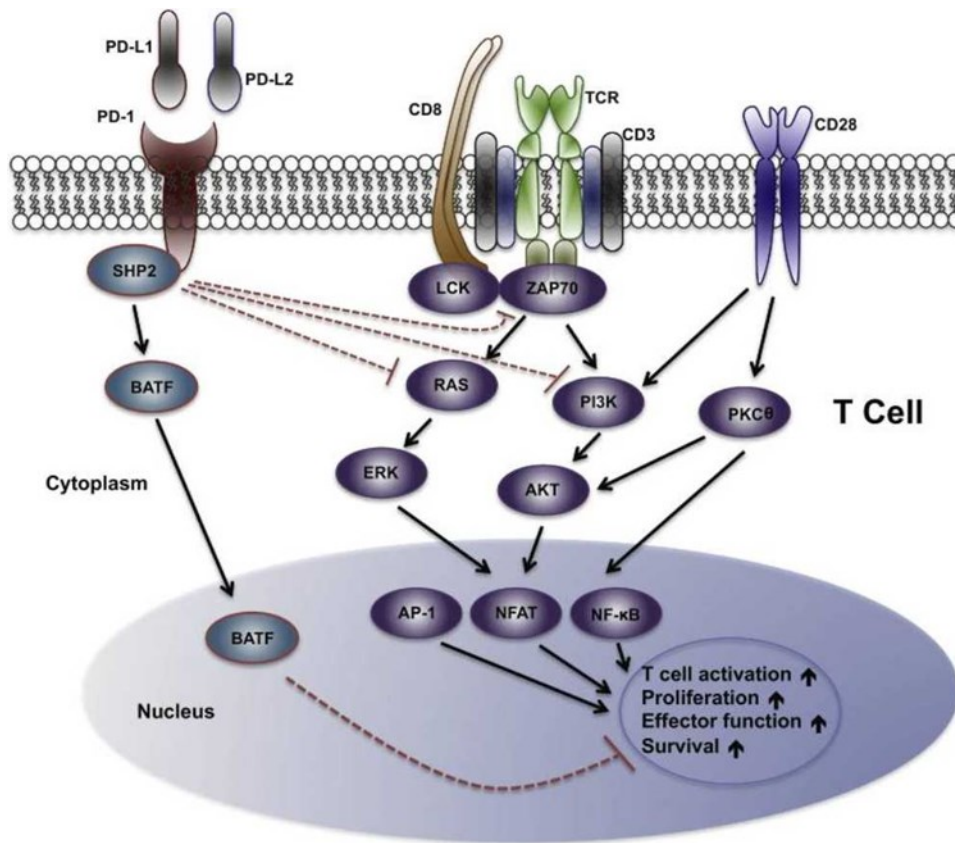


Abb. 6: PD-1-Signalweg in T-Zellen (Wu et al. 2019)

2.3.4. Bedeutung bei Tumoren

Auch Tumorzellen werden aufgrund ihrer Veränderungen im Vergleich zu gesunden Zellen gezielt erkannt und inaktiviert. Krebszellen besitzen vielfältige Mechanismen, mit denen sie dem Immunsystem ausweichen können, insbesondere durch eine Schwächung der gegen sie gerichteten zytotoxischen T-Lymphozyten. Durch das Expressieren des PD-L1 oder PD-L2 können sie über den Rezeptor PD-1 die Proliferationsrate der CTL reduzieren und diese in die Apoptose zwingen. Hinweise auf die entscheidende Rolle des PD-1-Wegs zeichneten sich erstmalig 2002 ab. Hier wurde bei einer Überexpression des PD-1-Rezeptors und der PD-Liganden eine verstärkte Tumorentstehung und Tumorerinvasivität beobachtet. Mit CD80 und CD86 können die Tumorzellen außerdem auch die Aktivität der T-Zellen über den Rezeptor CTLA-4 hemmen. Es wird angenommen, dass die Expression des PD-L1 durch Tumorzellen durch eine Antitumor-Immunantwort induziert wird. Tumorantigene, die von APC in Lymphknoten oder von Tumorzellen und Tumorstromazellen präsentiert werden, werden von Lymphozyten erkannt. Anschließend wird über die Freisetzung

von Perforin, um die Tumorzelle anzugreifen, auch IFN- γ freigesetzt. Das wiederum induziert die Expression von PD-L1, was zu einer adaptiven Immunresistenz innerhalb der Tumormikroumgebung führt. Wie genau Tumorzellen diesen Liganden produzieren können, wurde noch nicht geklärt.

Aufgrund der Hypoxie im Tumor kommt es zu einer Aktivierung des hypoxieassoziierten Signalweges des hypoxieinduzierten Faktors (HIF). Das führt zu einer erhöhten Tumorangiogenese und zum anderen über eine Akkumulation von HIF-1 α zu einer vermehrten Expression von PD-L1. Es wird vermutet, dass HIF-1 α und die Pyruvatkinase M2 an der „hypoxia-response elements“-Region binden, wo die PD-L1-Promotorregion vermutet wird.

In einer kleinen Gruppe von Tumoren sind an der Hochregulation des Liganden auch bekannte Signalwege der Tumorzellproliferation wie PTEN (phosphatase and tensin homolog), ein Schlüsselmolekül, welches an der Signalübertragung des Zellwachstums beteiligt ist, die anaplastische „lymphoma like kinase“ und EGFR-Mutationen beteiligt. In manchen Tumoren, insbesondere in B-Zell-Lymphomen, wurde auch über eine Hochregulation von PD-L2 berichtet (Maehama und Dixon 1998, Bedke et al. 2018, Berger und Pu 2018, Roos et al. 2018, Mocan et al. 2019, Wu et al. 2019).

In Karzinomen der Lunge, der Brust, des Colons, der Leber, der Haut, der Nieren und des Urothels und in einigen anderen Tumorentitäten konnte der PD-Ligand nachgewiesen werden. Die Unterdrückung des Immunsystems durch Tumorzellen könnte demnach mit einer Blockade der inhibierenden Signaltransduktion mit Checkpointinhibitoren über den PD-1 oder dessen Ligand aufgehoben werden. CTL könnten Tumorzellen somit wieder angreifen (siehe Abbildung 7) (Roos et al. 2018).

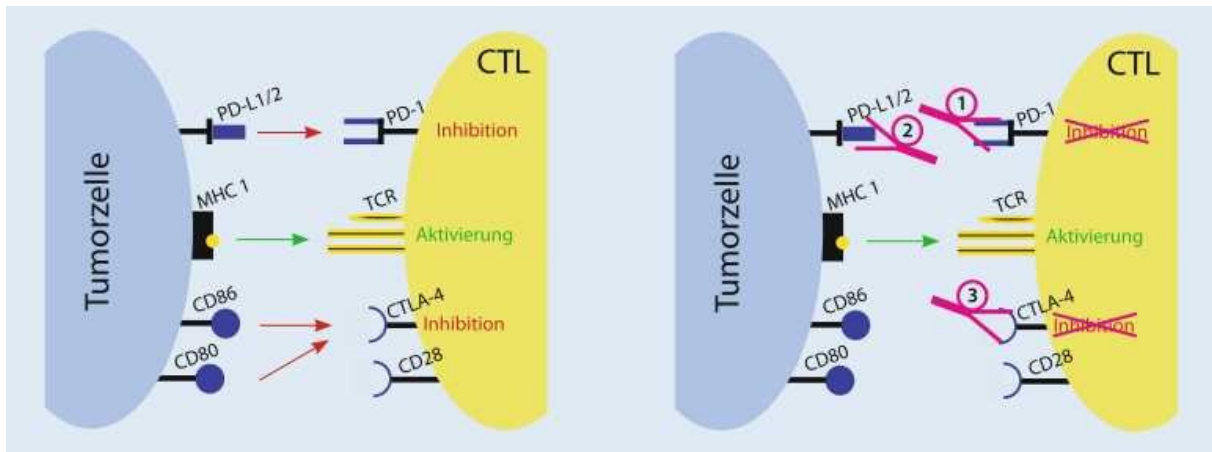


Abb. 7: Linke Abbildung: die Tumorzelle führt über MHC 1 zur Aktivierung des CTL, die T-Zelle wird aber insgesamt inhibiert aufgrund der Expression von PD-L1/2 und CD80/86 durch die Tumorzelle; rechte Abbildung: die Tumorzelle wird dem Immunsystem wieder zugänglich gemacht, aufgrund von Antikörpern, die die von der Tumorzelle ausgehende Immunblockade aufheben (Roos et al. 2018)

Die ersten Untersuchungen in Bezug auf eine PD-L1-Expression in HCC liefen bereits vor 10 Jahren. Gao et al. (2009) untersuchten Lebertumore nach chirurgischer Resektion. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Patienten, durch deren Tumor der Ligand exprimiert wurde, eine signifikant geringere Lebenserwartung und eine kürzere krankheitsfreie Zeit aufwiesen als die Patientengruppe, in deren HCC das Protein nicht nachweisbar war. Weitere Studien bestätigten diese initialen Befunde. Eine kürzlich veröffentlichte Meta-Analyse zeigte, dass PD-L1-positive Patienten ein etwa doppelt so hohes Risiko im Vergleich zu PD-L1-negativen haben, zu versterben oder ein Rezidiv zu erleiden. Allerdings existiert auch eine Studie, die eine inverse Relation zwischen der PD-L1-Expression und dem Überleben zeigte (Mocan et al. 2019). Patienten mit einer hohen Expression des Liganden im Tumor hatten ein medianes Überleben von 10 Monaten, während diejenigen mit geringer Expression ein medianes Überleben von 5 Monaten aufwiesen. Eine Expression des PD-L1 konnte auch auf Kupferzellen, die sich in der Umgebung des Tumors befanden, gezeigt werden. Dies ging mit einem schlechteren Überleben einher. Eine hohe Expression des Liganden im Tumor war außerdem mit einer vermehrten Gefäßinvasion und erhöhten Alpha-Fetoprotein-Spiegeln verbunden. Es fand sich jedoch keine Assoziation zwischen der PD-L1-Expression und der Tumorausbreitung, der Größe des Tumors, dem Geschlecht oder dem Alter

des Patienten, der Anzahl der vorhandenen Tumore oder ob der Tumor auf Grundlage einer Hepatitis entstanden war (Mocan et al. 2019). Diese Daten bezogen sich auf resezierte Patienten. Allerdings unterziehen sich nur etwa 20% der Betroffenen einer chirurgischen Therapie. Bei dem anderen Teil der Patienten wird nicht routinemäßig biopsiert und falls doch, ist die Untersuchung des Biopats teilweise schwierig. Der Ligand wird oftmals nicht gleichmäßig im Tumor exprimiert. So kann bei einer Biopsie gerade der Teil getroffen werden, der keinen PD-L1 exprimiert, was aber nicht bedeuten muss, dass der gesamte Tumor diesen nicht aufweist. PD-1 und PD-L1 können ebenso frei im Blut zirkulieren. Eine Studie zeigte, dass Patienten mit einem hohen Level an zirkulierendem PD-1 ein kürzeres krankheitsfreies Überleben von 16,3 Monaten aufwiesen als Patienten mit einem niedrigen Spiegel, bei denen dieser Zeitraum 27,2 Monate betrug (Mocan et al. 2019).

Laut einigen Studien kommt es zu einer Hemmung der Immunantwort in den Hepatozyten bereits durch eine Änderung der Expression der Checkpoint-Inhibitoren aufgrund einer chronischen Entzündung der Leber. Außerdem konnte beobachtet werden, dass das Fortschreiten der Leberzirrhose hin zum Leberzellkarzinom mit einer Hochregulation des PD-L1 verbunden ist (Tella et al. 2019).

Mehrere Untersuchungen zeigten eine hohe PD-L1-Expression in Tumoren der Gallenwege, woraufhin erste klinische Studien bei Patienten mit PD-1-Liganden-positivem Tumor anliefen. Laut Tian et al. (2020) korrelierte ein hoher Anteil an tumorinfiltrierenden PD-1- und CD8-positiven T-Zellen signifikant mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium. Diese Patienten wiesen auch ein geringeres Gesamtüberleben auf (Vogel und Saborowski 2017, Tian et al. 2020).

2.3.5. Therapeutische Nutzung

Durch die Entdeckung des PD-1-Immuncheckpoints veränderte sich die Krebsimmuntherapie (Berger und Pu 2018). Der erste Antikörper, der im September 2014 für die Therapie des malignen Melanoms zugelassen wurde, war der Anti-PD-1-Antikörper Pembrolizumab. Zu den weiteren bisher zugelassenen monoklonalen Antikörpern, die zu den PD-1/PD-L1-Inhibitoren zählen, gehören der Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab und die Anti-PD-L1-Antikörper Atezolizumab, Avelumab und

Durvalumab. Die Blockade des PD-1/PD-L1-Checkpoints ist bereits Teil der Therapie für einige maligne Erkrankungen. Zu diesen gehören das maligne Melanom, der kleinzellige und der nicht-kleinzellige Lungenkrebs, das Nierenzellkarzinom, das Urothelkarzinom, das klassische Hodgkin-Lymphom, das großzellige B-Zell-Lymphom, das Merkelzellkarzinom, die Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC), das kolorektale Karzinom und das HCC, außerdem auch der Gebärmutterhalskrebs und das Adenokarzinom des Magens und des Ösophagus (Wu et al. 2019).

Die höchsten Ansprechraten zeigten bisher Karzinome, die durch eine Virusinfektion ausgelöst werden, wie das klassische Hodgkin-Lymphom, das viral induzierte Merkelzellkarzinom der Haut, Tumore mit einer hohen Mikrosatelliteninstabilität und desmoplastische Melanome. Hierbei sprechen etwa 50 - 80% der Patienten an. Bei Karzinomen mit einer hohen Immunogenität, d.h. die mit einer starken Antwort des Immunsystems einhergehen, wie das maligne Melanom, der nicht-kleinzellige Lungenkrebs, das HCC und das Nierenzellkarzinom, konnten ebenfalls gute Ansprechraten von 20 - 40% aufgezeigt werden (Wu et al. 2019).

Die PD-1/PD-L1-Blockade wurde in den letzten Jahren zu einer der vielversprechendsten Ansätze in der Therapie des HCC. Nivolumab, ein monoklonaler G4-Antikörper, wurde im September 2017 für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem HCC von der FDA für eine Zweitlinientherapie nach Sorafenib-Versagen in den USA zugelassen, allerdings nicht in Europa durch die Europäische-Arzneimittel-Agentur (EMA). In der Phase-I/II-Studie CheckMate 040, bei der die Effektivität und Sicherheit des Antikörpers geprüft wurde, wurden Ansprechraten von 15 - 20% beschrieben, bei guter Verträglichkeit. Das mediane Überleben lag bei Patienten ohne Vortherapie mit Sorafenib bei 28,6 Monaten und bei vortherapierten Personen bei 15,6 Monaten. Das Gesamtüberleben lag nach 9 Monaten bei 74%. In einer Phase-III-Studie (CheckMate 459) konnte allerdings kein signifikanter positiver Effekt in Bezug auf das Gesamtüberleben im Vergleich zu Sorafenib festgestellt werden. Nichtsdestotrotz zeigten sich klinische Verbesserungen und eine verbesserte objektive Ansprechrate. Patienten mit Nivolumab-Behandlung hatten ein medianes Überleben von 16,4 Monaten, Sorafenib-behandelte Patienten hingegen nur von 14,7 Monaten. In der CheckMate-040-Studie wurde ebenfalls die Kombination von Nivolumab mit dem Anti-CTLA4-

Antikörper Ipilimumab bei Patienten, die zuvor mit Sorafenib behandelt worden waren, getestet. Die Ergebnisse führten zu einer Zulassung als Zweitlinientherapie durch die FDA. In der Phase-II-Studie KEYNOTE-224 mit Patienten im Stadium BCLC B oder C sprachen 17% auf einen weiteren Antikörper, Pembrolizumab, an und bei 44% kam es zu einer Stabilisierung der Tumorerkrankung. Im Mittel überlebten die Patienten 12,9 Monate. Diese Ergebnisse führten ebenfalls zu einer vorzeitigen Zulassung durch die FDA, aber wiederum nicht durch die EMA. In der Phase-III-Studie KEYNOTE-240 zeigte sich allerdings, dass die Ergebnisse im Vergleich zu einem Placebo hinsichtlich Gesamt- und tumorfreiem Überleben statistisch nicht signifikant sind. Auch ein Anti-PD-L1-Antikörper, Atezolizumab, wurde in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab in der Studie GO30140 erstmalig getestet. Erst die guten Ergebnisse hinsichtlich Verträglichkeit, Gewinn an Lebensqualität und Ansprechraten in der Phase-III-Studie IMbrave150 führten vor kurzem zu einer Etablierung der Kombination als Erstlinientherapie bei fortgeschrittenem HCC.

HCC haben eine geringe Anzahl an somatischen Mutationen in der kodierenden DNA. Deswegen werden weniger Neoantigene gebildet, so dass die Tumorzellen wiederum nicht so gut von T-Zellen detektiert werden können. Daher geht man von einem geringeren Ansprechen der Lebertumore auf die Anti-PD/PD-L1-Therapie im Vergleich zum malignen Melanom aus, welches eine höhere Rate an somatischen Mutationen aufweist. Derzeitige Studien untersuchen Kombinationstherapien aus Immuntherapien und anderen Substanzen sowie weitere Immun-Checkpoint-Inhibitoren als Monotherapie (El-Khoueiry et al. 2017, Schultheiß 2018, Schultheiss et al. 2018, Mocan et al. 2019, Tella et al. 2019, Wu et al. 2019, Graziadei 2020, Onuma et al. 2020, Donisi et al. 2021).

In einer Phase-Ib-Studie wurde PD-L1-positiven Patienten mit fortgeschrittenem cholangiozellulären Karzinom Pembrolizumab als Monotherapie verabreicht. Objektiv sprachen 17% partiell auf die Behandlung an. Insbesondere Fälle mit defizientem DNA-Mismatch-Repair oder hoher Mikrosatelliteninstabilität zeigten gute Ergebnisse. Bei weiteren 17% der Patienten kam es zu einem stabilen Krankheitsverlauf. Eine aktuelle Studie ergab ein Ansprechen auf den Antikörper unabhängig von der Expression des Liganden und auch von einer Mikrosatelliteninstabilität. Eine generelle Empfehlung zur PD-1/PD-L1-Immuntherapie kann aufgrund der Daten für

das CCC daher nicht ausgesprochen werden. Weitere Studien sind hier notwendig (Moehler und Foerster 2019, Jödicke et al. 2020).

Die Therapie über die Blockade des PD-1-Signalwegs gilt im Allgemeinen als gut verträglich, insbesondere im Vergleich zur Behandlung mit CTLA-4-Inhibitoren oder einer Chemotherapie. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen eine interstitielle Pneumonitis, ein Pruritus, Ausschlag, Fatigue, Diarrhoe und eine Nephritis. Sie treten bei 5 - 16% der behandelten Patienten auf. Seltener Nebenwirkungen sind eine Kolitis, ein Typ-1-Diabetes mellitus, eine Immunthrombozytopenie, eine Neutropenie und ein erhöhtes Risiko für eine Entwicklung einer Sepsis nach einer Kortikosteroidtherapie. Außerdem traten auch eine Enzephalopathie mit neurologischen Folgen, eine Myelitis, eine Myasthenia gravis, eine Myokarditis und eine Herz- und Nebenniereninsuffizienz auf. Mit Hilfe einer Therapiepause oder einer Immunsuppression mit Kortison können die Nebenwirkungen behandelt werden. Obwohl diese häufig mild ausfallen und meist gut behandelt werden können, können auch einige unerwünschte Wirkungen tödlich verlaufen. Deswegen ist in der Immuntherapie ein frühes Erkennen von Nebenwirkungen und ein sofortiges Eingreifen von Seiten der Ärzte von essenzieller Bedeutung (Roos et al. 2018, Wu et al. 2019).

Leider spricht auf die PD-1- oder PD-L1-Blockade mit durchschnittlich 15 - 35% generell nur ein geringer Teil der Patienten mit einer malignen Tumorerkrankung an. Dennoch fand sich ein allgemeiner Zusammenhang zwischen der Expression des PD-1-Liganden und der Wahrscheinlichkeit des Ansprechens. Die CheckMate-040-Studie zeigte ein höheres Ansprechen auf Nivolumab bei PD-L1-positiven als bei PD-L1-negativen Patienten mit HCC. Dieses Ergebnis war allerdings statistisch nicht signifikant. Bisher sind vier immunohistochemische Tests zugelassen, die Aufschluss über die PD-L1-Expression geben und somit behandlungsentscheidend für einige Karzinome sein können. Jedoch sollte ein PD-L1-negativer Status nicht sofort zum Ausschluss aus einer Antikörpertherapie führen. Beispielsweise können Melanompatienten unabhängig vom PD-L1/PD-1-Status klinisch auf die monoklonalen Antikörper ansprechen. PD-L1 eignet sich daher zwar als nützlicher, aber keinesfalls als prädiktiver Biomarker. Insbesondere beim HCC zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem objektiven Ansprechen auf die Immuntherapie (Shi et al. 2019, Wu et al. 2019, Onuma et al. 2020).

3. Ziele der Arbeit

Die Therapie des fortgeschrittenen HCC und CCC ist in ihren Möglichkeiten stark eingeschränkt. Ein kurativer Therapieansatz ist nur im Anfangsstadium möglich. Patienten in einem späteren Stadium haben eine schlechte Prognose und versterben in der Regel innerhalb weniger Monate. Deswegen besteht die dringende Notwendigkeit, weitere Therapiemöglichkeiten zu finden. Ein neuer Ansatzpunkt ist die Immuntherapie z.B. mit Anti-PD-1- oder Anti-PD-L1-Antikörpern, die in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat und bereits bei einigen Tumorentitäten routinemäßig eingesetzt wird. Auch für das HCC besteht eine Zulassung von Anti-PD-1/PD-L1-Antikörpern durch die FDA, allerdings nicht in Europa, denn in den entsprechenden Studien konnte kein eindeutiger Vorteil gegenüber der etablierten systemischen Therapie gezeigt werden. Außerdem profitieren nicht alle Patienten mit einem HCC oder CCC von der Behandlung. Jedoch scheint es aber auch so zu sein, dass ebenfalls Patienten mit einem negativen PD-L1-Status des Tumors auf eine entsprechende Therapie ansprechen können. Deswegen ist eine weitere Erforschung des PD-L1 in HCC und CCC wichtig, um ein noch besseres Verständnis über den Liganden, seine Funktion und seine Expressionsmuster zu erlangen.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Expression des PD-L1 an einer großen Serie von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben von HCC und CCC immunhistochemisch unter Verwendung eines neuen Antikörpers, 73-10, reevaluiert werden, von dem in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass er wesentlich sensitiver in der Detektion des PD-L1 ist, als die bisher in den kommerziellen diagnostischen Kits eingesetzten Antikörper (Tsao et al. 2018, Rösner et al. 2021). Neben dem Tumorgewebe sollte auch das umliegende, meist zirrhotisch veränderte Gewebe mit analysiert werden. Da die Ätiologie des Tumors auf die Expression des PD-L1 einen Einfluss haben könnte, wurden neben den HCC-Proben aus Deutschland, denen in fast allen Fällen eine alkoholtoxische Genese zugrunde liegt, auch entsprechende Proben aus China untersucht, die meist auf eine chronische Hepatitis-B- oder -C-Infektion zurückzuführen sind. Um herauszubekommen, ob Lebergewebe, in dem sich ein primärer Lebertumor entwickelt hat, im Vergleich zu Lebergewebe, in dem kein HCC oder CCC entstanden ist, eine veränderte PD-L1-Expression aufweist und ob auch andere Leberveränderungen

einen Einfluss auf die Ligandenexpression haben können, wurden in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit vergleichend Proben immunhistochemisch gefärbt. Diese stammten aus dem tumorfreien Resektionsrand von Lebern, die entweder aufgrund eines HCC oder CCC einer chirurgischen Therapie zugeführt worden waren oder in denen benigne Tumore, chronische Cholangitiden oder Metastasen aus anderen Organen nachgewiesen worden waren.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mittels des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (1987) unter dem Lichtmikroskop semiquantitativ ausgewertet und die so erhaltenen Ergebnisse mit den klinischen Daten korreliert.

4. Materialien und Methodik

4.1. Materialien

4.1.1. Tumorproben

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 550 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebestücke von 300 Patienten immunhistochemisch untersucht. Von einigen Patienten lag mehr als ein Tumorblock vor, teilweise aus demselben Tumor oder aus unterschiedlichen befallenen Geweben. Von diesen 550 Proben stammten 435 Proben von Patienten mit HCC oder CCC. Davon wurden 184 Präparate von 93 Patienten vom Universitätsklinikum Jena zur Verfügung gestellt und 181 Proben von 37 Patienten von der Zentralklinik Bad Berka. Aus dem Wenzhou Medical College und der Anhui Medical University in China stammten 70 Gewebeproben von 55 Patienten. 115 weitere Proben entstammten aus den Resektionsrändern von Lebern, die entweder aufgrund eines HCC oder CCC, einer benignen Leberveränderung oder einer Metastase aus einem anderen Organ operiert worden waren. Diese Proben kamen ebenfalls vom Universitätsklinikum Jena.

Bei den Präparaten handelte es sich um Resektate, Schnellschnitte, Probeexzisionen oder Biopsien.

Votum der Ethikkommission

Das befürwortende Votum der zuständigen Ethikkommissionen wurde eingeholt, um die entsprechenden Patientendaten verwenden zu können und an den Gewebeproben histologische und immunhistologische Untersuchungen durchführen zu dürfen.

4.1.2. Materialien und Gerätschaften zur Herstellung der Gewebeschnitte

Objektträger SuperFrost® plus	Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland
Rotationsmikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf, Deutschland
Streckbad	Medax, Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland

4.1.3. Herstellung der Gewebeschnitte

Mithilfe eines Rotationsmikrotoms wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 µm aus den Tumorblöcken angefertigt. Diese wurden anschließend auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht. Die immunhistochemischen Färbungen konnten nach vollständiger Trocknung der Schnitte beginnen.

4.2. Methoden

Von allen Blöcken wurden Schnitte sowohl mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt als auch immunhistochemisch auf das Antigen PD-L1 hin untersucht.

4.2.1. Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie

Gerätschaften für die Immunhistochemie

Analysenwaage A200S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Färbekästen (Glas)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Glas-Färbegestelle	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Magnetrührer	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Mikroskop Axio Imager A1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrowelle MW 802	Exquisit, Kaarst, Deutschland
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments, Kehl, Deutschland
Shandon Coverplates®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Shandon Sequenza®-Färbesystem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Chemikalien für die Immunhistochemie

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	BioGenex Laboratories, Fremont, CA, USA
Ammoniak-Lösung 25%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DePeX	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat \geq 99,5%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA \geq 99,5%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 99,8%	Echter Nordhäuser Spirituosen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Glycerin \geq 99,5%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid \geq 99,5%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat \geq 99,0%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayer's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol \geq 99,0%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid \geq 99,5%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin (RSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Salzsäure 37%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triethylendiamin (DABCO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trometamol (TRIS) \geq 99,9%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol \geq 98,0%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Lösungen und Standardpuffer für die Immunhistochemie

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)

8,18 g	NaCl
1,77 g	Na ₂ HPO ₄
0,2 g	KCl
0,24 g	KH ₂ PO ₄
auf 1000 ml	Aqua bidest.

PBS/1% RSA (Rinderserumalbumin)

495 ml	PBS
5 g	Rinderserumalbumin

TRIS-EDTA-Puffer

1,21 g	Tris-Base
0,37 g	EDTA
1000 ml	Aqua bidest.

Ammoniakwasser

250 ml	Aqua bidest.
1,4 ml	Ammoniak 25%

0,3% Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung

594 ml	Methanol
6 ml	Wasserstoffperoxid 30%

Färbelösung 10 ml (3-Amino-9-Ethylcarbazol)

8 ml	Aqua bidest.
2 ml	Acetat-Puffer, 5-fach konzentriert
4 Tropfen	Aminoethylcarbazol

Blockierungslösung

10 ml	PBS/1% RSA
150 µl	Ziegenserum

Sekundär-Antikörper

10 ml	PBS/1% RSA
150 µl	Ziegenserum
50 µl	Biotinylierter Sekundärantikörper (Ziegen-Anti-Kaninchen IgG)

Avidin-Biotin-Enzym-Komplex

5 ml	PBS/1% RSA
100 µl	Reagenz A (Avidin)
100 µl	Reagenz B (biotinylierte Peroxidase)

Mowiol-Eindecklösung

6 g	Glycerin
2,4 g	Mowiol 4-88
6 ml	Aqua bidest.
12 ml	Tris-HCl (pH 8,5)
25 mg/ml	Lösung DABCO (1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2)-octan)

Kits für die Immunhistochemie

AEC Substrate Pack	BioGenex, Fremont, CA, USA
VECTASTAIN® Elite ABC-Kit (Rabbit IgG)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Primärantikörper für die Immunhistochemie

Kaninchen-anti-Mensch-PD-L1, Klon 73-10 (ab228415)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
--	----------------------------------

Bei dem Antikörper 73-10 handelt es sich um einen monoklonalen Kaninchen-Antikörper gegen den PD-L1. Er gehört zum Subtyp IgG. Der Antikörper wurde 1:1000 verdünnt verwendet. Es handelt sich hierbei um einen sehr sensitiven Antikörper, der sehr viel effizienter das Antigen detektiert als andere kommerziell

verfügbare Antikörper. Der Antikörper 73-10 ist gegen die Aminosäuren 250-290 des zytoplasmatisch liegenden C-Terminus des Liganden gerichtet.

Der eingesetzte Sekundärantikörper bindet artspezifisch an den Primärantikörper und ist ein Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper, der kovalent an Biotin gekoppelt ist.

4.2.2. Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis von bestimmten Antigenen im Gewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Detektion des PD-L1 die indirekte Peroxidase-Methode verwendet. Man nutzt die Eigenschaft des Primärantikörpers aus, den Liganden mit seinem Fab-Teil erkennen zu können. Der F_c-Teil ist außerdem Bindungsstelle für einen weiteren Antikörper, den Sekundärantikörper. Da dieser Antikörper kovalent mit dem wasserlöslichen Vitamin Biotin gekoppelt ist, kann er im darauffolgenden Schritt Avidin binden, welches im Komplex mit einer Peroxidase gegeben wird. Diese Peroxidase ermöglicht die Umsetzung des gelblichen Chromogens 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zu einem rotbraunen Farbkomplex und damit den Nachweis des Antigens im Zielgewebe (siehe Abbildung 8) (Noll und Schaub-Kuhnen 2000, Lang 2013).

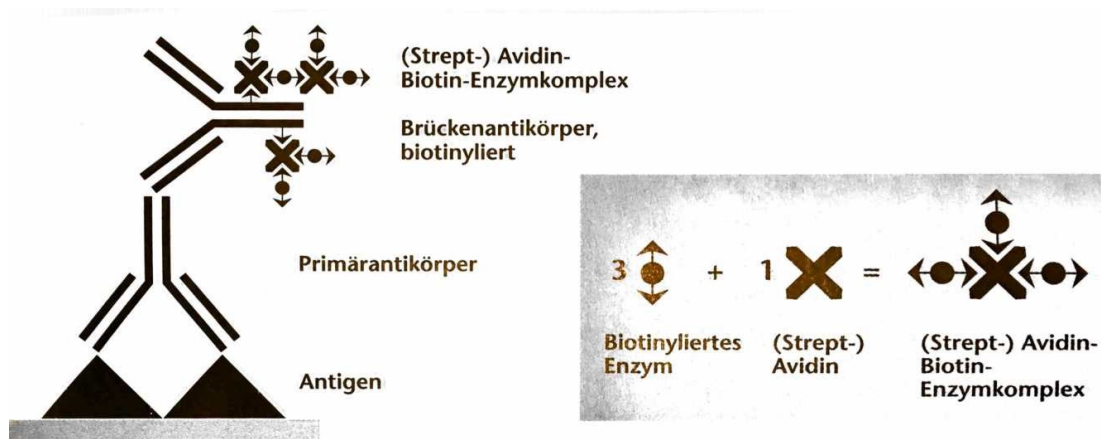


Abb. 8: Durchführung der Immunhistochemie zur Detektion des Antigens (Noll und Schaub-Kuhnen 2000)

4.2.3. Durchführung der Immunhistochemie

Entparaffinieren der Schnitte

Um eine immunhistochemische Färbung zu ermöglichen, muss das Paraffin zunächst von den Proben entfernt werden. Zum Entparaffinieren wurden die in Glasfärbegestelle einsortierten Objektträger drei Mal in eine Glasküvette mit Xylol für jeweils 20 Minuten eingetaucht. Mittels 99,8-prozentigem Ethanol wurde das Xylol anschließend wieder entfernt. Dabei wurden die Schnitte drei Mal für jeweils 20 Minuten in den Alkohol überführt.

Blockierung der endogenen Peroxidasen

Um unspezifische Färbungen zu verhindern, wurden die Objektträger danach für 45 Minuten in eine 0,3%ige Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung verbracht. Dabei werden die endogenen Peroxidasen blockiert, die im menschlichen Gewebe, z.B. in Erythrozyten, natürlich vorkommen. Sie würden sonst das Ergebnis verfälschen, da in einem späteren Schritt die Antigen-Antikörper-Bindung durch Umsetzung eines Chromogens mithilfe von exogen zugeführten Peroxidasen sichtbar gemacht wird. Im nächsten Schritt erfolgte die Rehydrierung der Präparate mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe:

- 95% Ethanol für 2 Minuten
- 95% Ethanol für 2 Minuten
- 80% Ethanol für 2 Minuten
- 70% Ethanol für 2 Minuten

Im Anschluss wurden die Glasfärbegestelle mit den Präparaten zwei Mal für jeweils fünf Minuten in Aqua bidest. gegeben.

Demaskierung der Antigene

Anschließend wurden alle Objektträger in mit Tris-EDTA-Puffer gefüllte Plastikküvetten umsortiert. Um die Signalintensität zu verstärken, empfiehlt es sich, die Antigene zu demaskieren. Aufgrund der Fixierung mit Formaldehyd, kann es zur Quervernetzung mit Methylengruppen zwischen den vorhandenen Proteinen

kommen. Finden sich diese Brücken nun an der Bindungsstelle für den Antikörper, kann die Bindung erschwert werden und das Signal wird schwächer ausgeprägt. Um das zu verhindern, wurden die Küvetten mit den Schnitten im Puffer in der Mikrowelle entsprechend dem folgenden Protokoll zum Kochen gebracht:

- 8 Minuten kochen
- 4 Minuten abkühlen lassen
- 4 Minuten kochen
- 4 Minuten abkühlen lassen
- 4 Minuten kochen

Abschließend wurden die Präparate für 30 Minuten abkühlen gelassen und dann für mindestens 5 Minuten in Aqua bidest. gestellt.

Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und Einspannen in das Färbesystem

Durch Inkubation der Präparate für 5 Minuten im Phosphat-Puffer (PBS) mit 1% Rinderserumalbumin (RSA) wurden unterschiedliche Ladungen innerhalb des Gewebes abgesättigt. Unspezifische Bindungen werden so verhindert. Anschließend wurden die Objektträger in das Sequenza[®]-Färbesystem mit Hilfe von speziellen Klammern einsortiert. Auf diese Weise entsteht ein kapillärer Spalt zwischen dem Präparat und der Klammer. Über einen kleinen Trichter am oberen Ende der Klammern können dann die weiteren Lösungen eingebracht werden. Durch die sich ausbildenden kapillaren Kräfte zwischen Klammer und Präparat kann eine optimale Kontaktzeit zwischen dem Gewebe und den zugegebenen Lösungen gewährleistet werden. Um unterschiedliche Ladungen noch einmal auszugleichen und um den korrekten Sitz der Präparate im System zu überprüfen, wurden die Präparate anschließend nochmals mit 1500 µl PBS mit 1% RSA gespült.

Antigen-Antikörper-Bindung

Um Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden dann 150 µl normales Ziegenserum auf die Proben gegeben und 20 Minuten einwirken gelassen. Elektrostatische Ladungen werden so abgesättigt. Das Serum sollte von der gleichen Spezies stammen wie der Sekundärantikörper. Zuletzt wurden

auf jedes Präparat 300 µl des Primärantikörpers gegeben und die Proben damit über Nacht bei 4 Grad Celsius im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte zweimalig mit 1500 µl PBS mit 1% RSA gewaschen und somit nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper entfernt.

Sekundärantikörper und Signalverstärkung

Zu den Schnitten wurden dann für 30 Minuten 150 µl einer Lösung mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper dazu gegeben. Dieser erkennt den F_c-Teil des Primärantikörpers als Epitop und bindet diesen. Daraufhin wurde erneut mit 1500 µl PBS mit 1% RSA gewaschen und die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Um die Farbreaktion zu ermöglichen, folgte die Zugabe von jeweils 150 µl des enzymgekoppelten Avidin-Peroxidase-Komplexes über 30 Minuten. Danach wurde erneut mit 1500 µl PBS mit 1% RSA gespült. Anschließend erfolgte das zweimalige Färben der Antikörper-gebundenen Bereiche durch die Zugabe von jeweils 150 µl des Chromogens für jeweils 15 Minuten. Hierbei findet eine Amplifikation des Signals statt, da pro erkanntem Antigen über Streptavidin und Biotin mehrere Meerrettichperoxidasen gebunden werden. Das Stoppen der Reaktion und das Entfernen der überschüssigen Farbe erfolgte mit 1500 µl Aqua bidest., bevor die Präparate wieder in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert wurden.

Gegenfärbung und Eindeckung der Präparate

Nach einem zweimaligen Waschen der Präparate mit Aqua bidest. für eine Minute folgte das Gegenfärben der Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin für 3 Minuten und anschließend ein erneutes Waschen in Aqua bidest. für 2,5 Minuten, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Hämatoxylin-Bläuung wurde durch fünfmaliges Eintauchen der Proben in Ammoniakwasser erreicht. Nach dem letzten Waschen mit Aqua bidest. für 2,5 Minuten wurden die Präparate mit Mowiol und Deckgläsern eingedeckt.

4.2.4. Auswertung der Immunhistochemie

Lichtmikroskopische Auswertung

Zur Auswertung der gefärbten Präparate wurde ein Mikroskop der Firma Carl Zeiss genutzt. Dabei kamen verschieden Vergrößerungen zum Einsatz und es wurde ein besonderes Augenmerk auf die Farbintensität und den Anteil der gefärbten Areale am gesamten Tumor, der Tumorumgebung bzw. der Gewebeprobe gelegt.

Immunreaktiver Score

Um die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate möglichst valide durchzuführen, wurde der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1987) verwendet. Das Tumorgewebe, aber ebenso das benigne Gewebe, wurden untersucht und bewertet.

Zur Ermittlung des IRS werden Punkte für die Färbeintensität vergeben. Man unterscheidet zwischen keiner Anfärbung (0), schwacher (1), mäßiger (2) und starker (3) Färbung. Auch der Anteil an positiven Zellen am gesamten Tumor bzw. Normalgewebe wird bewertet. Dabei definiert man: gar keine positiven Zellen (0), weniger als 10 Prozent positive Zellen (1), zwischen 11 und 50 Prozent an positiven Zellen (2), zwischen 51 und 80 Prozent an positiven Zellen (3) und mehr als 80 Prozent an positiven Zellen (4). Letztendlich werden die beiden vergebenen Punktwerte miteinander multipliziert, so dass eine Zahl als IRS zwischen 0 und 12 Punkten herauskommt (siehe Tabelle 1).

Manchmal war der Tumor oder das Normalgewebe ungleichmäßig gefärbt. Dann wurde der IRS entsprechend der Verteilung ermittelt. Dies soll im Folgenden anhand eines Rechenbeispiels verdeutlicht werden. Waren beispielsweise 10% der Tumorzellen schwach, 30% mäßig und 60% stark gefärbt, so ergab sich folgende Rechnung:

4 Punkte (> 80% gefärbte Tumorzellen) x (1 x 0,1 (Anteil schwach gefärbter Zellen) + 2 x 0,3 (Anteil mäßig gefärbter Zellen) + 3 x 0,6 (Anteil stark gefärbter Zellen)) = 4 x 2,5 = 10.

Ein errechneter IRS mit Kommastelle wie beispielsweise 7,1 wurde zur Vereinfachung gerundet. An den Schnitträndern konnte bei einigen Präparaten eine verstärkte Färbung beobachtet werden. Fiel diese gering aus, wurde sie als Artefakt gewertet. War sie von starker Intensität und nahm einen großen Anteil ein, da sie weit in den Tumor oder das Gewebe hineinreichte, wurde sie in die Berechnung miteinbezogen. Falls es von einem Patienten mehrere Präparate des gleichen Tumors gab, wurde das arithmetische Mittel aus den errechneten IRS-Werten gebildet.

Ab einem $IRS \geq 3$ wurde ein Gewebe als Rezeptor-positiv betrachtet. Bei IRS-Werten zwischen 3 und 5 wurde der Rezeptor als schwach, zwischen 6 und 8 als mäßig und zwischen 9 und 12 als stark exprimiert angesehen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (1987)

Färbeintensität	x Anteil positiver Zellen	IRS-Werte
0 (keine Färbung)	0 (negativ)	0 - 2 (keine Expression)
1 (schwache Färbung)	1 (< 10% positive Zellen)	3 - 5 (schwache Expression)
2 (mäßige Färbung)	2 (11 – 50% positive Zellen)	6 - 8 (mäßige Expression)
3 (starke Färbung)	3 (51 – 80% positive Zellen)	9 - 12 (starke Expression)
	4 (> 80% positive Zellen)	

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 26. Vor der statistischen Auswertung wurden die Daten mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf eine Normalverteilung hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass alle Daten in der ersten Population nicht normalverteilt waren. In der zweiten Gruppe traf das für die Mehrzahl der Daten ebenfalls zu. Daher wurden nicht-parametrische Tests wie der Mann-Whitney-U-Test oder der Chi-Quadrat-Test eingesetzt. Ab Werten $p \leq 0,05$ wurde der Test als signifikant gewertet, die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen.

Für die Berechnung der Korrelationen wurden der Spearman-Rho-Test und der Kendall-Tau-b-Test eingesetzt. Die Korrelationsstärke wurde mit dem Korrelationskoeffizienten beurteilt: keine Korrelation: $r = 0,0$, sehr schwache

Korrelation: $r > 0,0$ bis $0,2$, schwache Korrelation: $r > 0,2$ bis $0,4$, mittelstarke Korrelation: $r > 0,4$ bis $0,6$, starke Korrelation: $r > 0,6$ bis $0,8$, sehr starke Korrelation: $r > 0,8$.

5. Ergebnisse

Insgesamt wurden 550 in Paraffin eingebettete Proben von 300 Patienten untersucht. Die Gewebeproben wurden vom Universitätsklinikum Jena, der Zentralklinik Bad Berka und dem Wenzhou Medical College sowie der Anhui Medical University aus China bereitgestellt.

5.1. Untersuchung der PD-L1-Expression in hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen

5.1.1. Allgemeine Patientendaten

Klassifikation

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 435 Gewebeproben von 185 Patienten mit einem HCC oder CCC untersucht. Hiervon stammten 365 Proben von 130 Patienten aus Deutschland und 70 Proben von 55 Patienten aus China. Von den 130 deutschen Patienten hatten 94 ein HCC und 28 ein CCC. Bei 8 Patienten konnte bei der mikroskopischen Untersuchung der Präparate kein Tumor bzw. Lebergewebe festgestellt werden. Von den 55 Patienten aus China hatten 51 Patienten ein HCC und eine Person ein CCC. Bei einem weiteren Patienten konnte kein maligner Tumor bzw. Lebergewebe gefunden werden und zwei Patienten hatten ein Adenokarzinom, wobei das eine Karzinom eine Metastase aus dem Rektum darstellte und die Herkunft des anderen Karzinoms nicht näher bezeichnet wurde (siehe Tabelle 2). In die nachfolgenden Berechnungen wurden die Daten der Patienten mit Adenokarzinom oder ohne Tumor nicht mit einbezogen. Somit wurden insgesamt nur die Daten von 145 Patienten mit einem HCC (83,3%) und 29 Patienten mit einem CCC (16,7%) betrachtet. Von diesen Patienten kamen 122 (70,1%) aus Deutschland und 52 aus China (29,9%).

Tabelle 2: Verteilung der Tumorentitäten je nach Herkunftsland

Tumorentität	Deutsch	Chinesisch	Gesamt
Kein Lebergewebe	8	1	9
Adenokarzinom	0	2	2
HCC	94	51	145
CCC	28	1	29
Gesamt	130	55	185

Geschlechterverteilung und Altersverteilung

Von 169 Patienten waren das Geschlecht und das Alter bekannt, während von 4 HCC-Patienten aus China und einem HCC-Patienten aus Deutschland keine entsprechenden Angaben vorlagen. Die Informationen zu den CCC-Patienten waren diesbezüglich vollständig. Von den 169 Patienten mit **einem HCC oder einem CCC** aus Deutschland oder China, von denen das Geschlecht bekannt war, waren 134 (79,3%) männlich und 35 (20,7%) weiblich (siehe Abbildung 9). Das Verhältnis Männer zu Frauen war in beiden Ländern ähnlich. Von den Deutschen waren 80,2% der Patienten männlich und 19,8% weiblich und von den Chinesen 77,1% männlich und 22,9% weiblich. An einem **HCC** erkrankten mit 80,0% der Fälle deutlich mehr Männer als Frauen, welche 20,0% der Erkrankten ausmachten. Bei den **CCC-Patienten** waren 75,9% männlich und 24,1% weiblich.

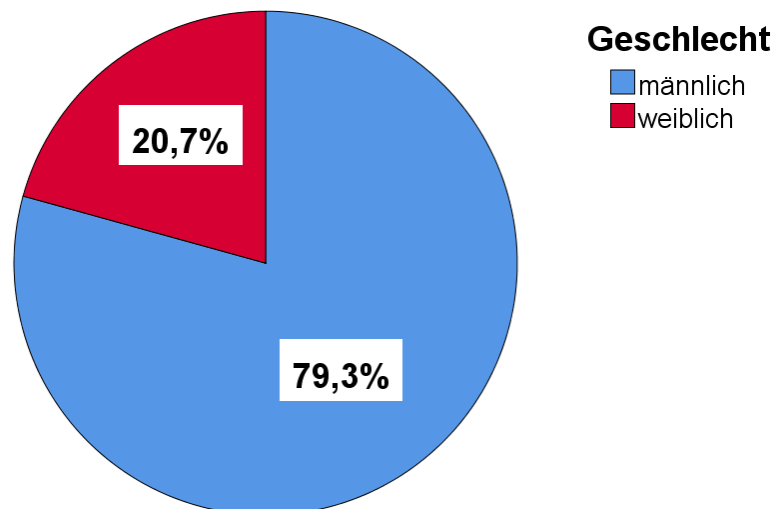


Abb. 9: Geschlechterverteilung der deutschen und chinesischen HCC- und CCC-Patienten

Von den 169 Patienten mit Angaben zum Alter waren die deutschen **HCC- und CCC-Patienten** im Schnitt etwas älter als die entsprechenden Chinesen. Nach dem Mann-Whitney-U-Test war dieses Ergebnis signifikant ($p = 0,001$). Im Mittel waren die deutschen Patienten 63,6 Jahre alt, mit einer Standardabweichung von 10,4 Jahren. Der Median betrug 65 Jahre. Der jüngste Patient war 25 Jahre, der älteste 87 Jahre alt. Bei den Chinesen betrug das mittlere Alter 56,8 Jahre, mit einer Standardabweichung von 12,1 Jahren. Der Median lag bei 59 Jahren. Das Alter des jüngsten chinesischen Patienten betrug 19 Jahre, der älteste Patient war 79 Jahre alt (siehe Abbildung 10).

Die deutschen und chinesischen **HCC-Patienten** waren im Durchschnitt 61,0 Jahre alt. Die Standardabweichung betrug 11,6 Jahre und der Median 63 Jahre. Der jüngste Patient unter ihnen war 19 Jahre alt, der älteste 87 Jahre. Die deutschen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom waren signifikant älter als die entsprechenden chinesischen Patienten (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,002$). Deutsche Patienten mit HCC waren durchschnittlich 63,4 Jahre alt und chinesische Patienten 56,9 Jahre. Die **CCC-Patienten** waren im Schnitt 63,8 Jahre alt mit einer Standardabweichung von 9,6 Jahren. Der Median lag bei 66 Jahren. Der jüngste Patient war 44,5 Jahre alt und der älteste 79 Jahre. Der einzige Patient mit einem CCC aus China war 54 Jahre alt.

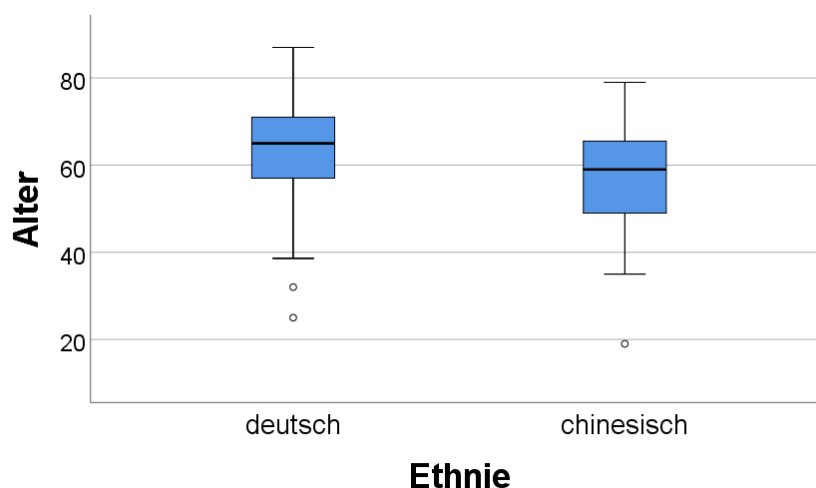


Abb. 10: Alter aller HCC- und CCC-Patienten gemeinsam betrachtet in Abhängigkeit von der Ethnie. Dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer (zweifache Standardabweichung; Kreise)

5.1.2. Klinische Daten

Überleben

Zu 83 Personen mit einem HCC aus Deutschland gab es Angaben zum Überleben, bei 11 nicht. Auch bei 26 der CCC-Patienten aus Deutschland konnten Informationen bezüglich des Weiterlebens gefunden werden, bei 2 dagegen nicht. Die 83 Patienten mit einem **HCC**, zu denen die entsprechenden Daten vorlagen, lebten durchschnittlich noch 25,4 Monate (Standardabweichung 24,0 Monate) und somit länger als die 26 Patienten mit einem **CCC** mit 15,1 Monaten (Standardabweichung 14,1 Monate). Allerdings war dieses Ergebnis nach dem Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p = 0,067$). Bei den chinesischen Patienten fehlten die Informationen zum Überleben vollständig.

TNM-Klassifikation

Von 86 deutschen Patienten mit einem **HCC** konnten Angaben zum T-Status ihres Tumors aus den Unterlagen entnommen werden, von 8 nicht. Von denjenigen, von denen der Status bekannt war, hatten 28 (32,6%) einen als T1, 27 (31,4%) einen als T2, 23 (26,7%) einen als T3 und 8 (9,3%) einen als T4 klassifizierten Tumor. Außerdem fehlten von 40 HCC-Patienten aus Deutschland Angaben bezüglich des Lymphknotenstatus und bei 19 deutschen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom Informationen über mögliche Fernmetastasen. Lediglich 2 (3,7%) der 54 Patienten mit HCC aus Deutschland, zu denen Angaben bezüglich des Lymphknotenstatus vorlagen, hatten bei Diagnosestellung bereits einen Lymphknotenbefall und bei 4 (5,3%) der 75 Patienten, bei denen das Vorliegen bzw. Nicht-Vorliegen von Fernmetastasen dokumentiert worden war, konnte eine extrahepatische Metastase festgestellt werden. Bei den Chinesen war von 42 Patienten der T-Status des Tumors bekannt, ebenso der Lymphknotenstatus sowie mögliche Fernmetastasen, jedoch fehlten von 9 Chinesen die diesbezüglichen Angaben. Von den 42 chinesischen HCC-Patienten mit bekanntem T-Status waren 35 (83,3%) der Tumore in einem T1-, 3 (7,1%) in einem T2-, 2 (4,8%) in einem T3- und 2 (4,8%) in einem T4-Stadium. Somit befanden sich die deutschen HCC in einem signifikant höheren T-Stadium als die entsprechenden Tumore der Chinesen (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$) (siehe Abbildungen 11 und 12). Von den 42 chinesischen Patienten mit hepatozellulärem

Tumor, bei denen Angaben bezüglich des Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus vorlagen, waren bei keiner Person Lymphknotenmetastasen festgestellt worden, allerdings konnte bei einem (2,4%) Patienten eine Fernmetastase gefunden werden.

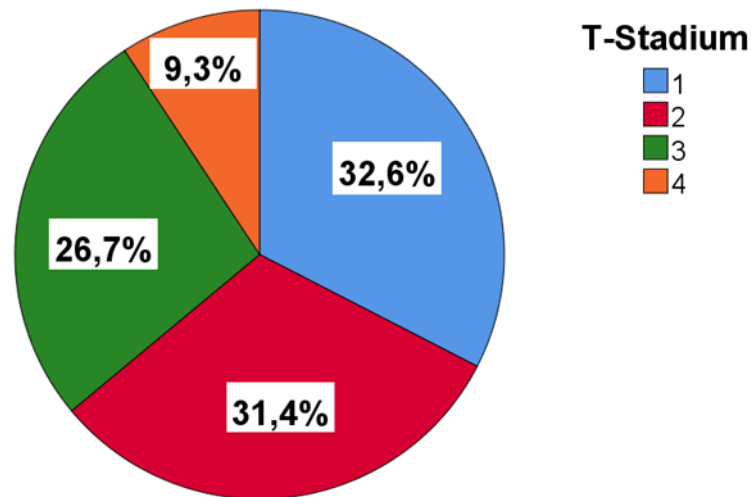


Abb. 11: Verteilung der T-Stadien der HCC aus Deutschland

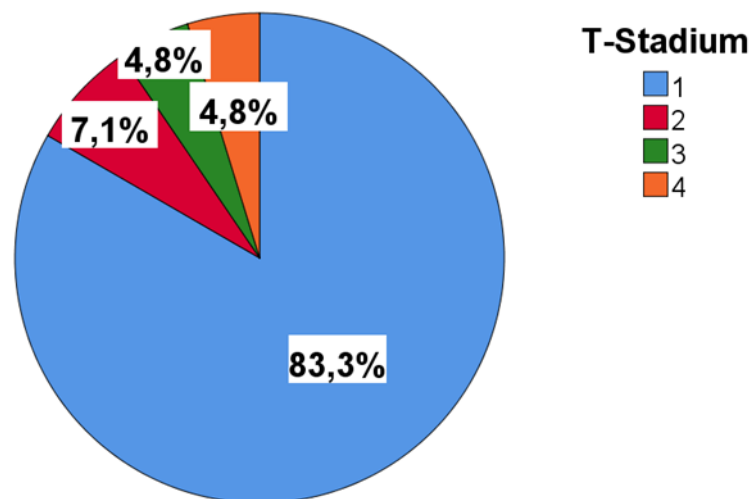


Abb. 12: Verteilung der T-Stadien der HCC aus China

Bei 27 deutschen Patienten mit **cholangiozellulärem Karzinom** lagen Informationen bezüglich des T-Stadiums und zu Fernmetastasen vor, bei einer Person fehlten diese. Von den 27 deutschen CCC-Patienten mit entsprechenden Angaben befanden sich 12 (44,4%) im T1-Stadium, 11 (40,7%) im T2-Stadium, 3 (11,1%) im T3-Stadium

und ein Patient (3,7%) im T4-Stadium. Bei 2 (7,4%) der 27 Patienten mit entsprechenden Angaben war außerdem bereits bei Diagnosestellung eine Fernmetastase entdeckt worden. Von 23 Patienten gab es Daten zum Lymphknotenbefall, bei 5 nicht. Bei diesen 23 Deutschen konnte in 5 (21,7%) Fällen ein Lymphknotenbefall nachgewiesen werden. Das einzige CCC aus China wurde mit T1 klassifiziert und der Patient hatte keinen Lymphknotenbefall und keine Fernmetastasen.

Die aufgeführten Ergebnisse lassen erkennen, dass bei den deutschen Patienten in der Tendenz die HCC im T-Stadium etwas weiter vorangeschritten waren als die CCC. Dieser Unterschied war allerdings nach dem Chi-Quadrat-Test nicht signifikant ($p = 0,066$).

Tumorgröße

Die Tumorgröße war bei 47 deutschen und 40 chinesischen Patienten mit einem **HCC** bekannt, während die entsprechenden Angaben bei 47 deutschen und 11 chinesischen Patienten fehlten. Bei den Karzinomen mit bekannter Tumorgröße waren die Malignome der deutschen Patienten mit einem HCC im Schnitt größer als die der Chinesen. So lag die durchschnittliche Größe bei den deutschen HCC bei $970,1 \text{ cm}^3$ (Standardabweichung $2064,7 \text{ cm}^3$). Der kleinste Tumor war $8,00 \text{ cm}^3$ groß und der größte $10648,0 \text{ cm}^3$. Bei den Chinesen betrug die Tumorgröße hingegen im Durchschnitt $356,3 \text{ cm}^3$ (Standardabweichung $625,7 \text{ cm}^3$). Das kleinste Karzinom wurde mit $1,8 \text{ cm}^3$ angegeben und das größte mit $3087,0 \text{ cm}^3$. Dieser Unterschied zwischen den deutschen und den chinesischen Patienten war jedoch nach dem Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p = 0,097$).

Bei den **CCC** gab es bei 9 deutschen Patienten und dem einen chinesischen Patienten Angaben zur Größe des Tumors. Sie fehlten somit bei 19 deutschen CCC-Patienten. Die durchschnittliche Tumorgröße lag bei $421,2 \text{ cm}^3$ (Standardabweichung $413,9 \text{ cm}^3$). Das kleinste cholangiozelluläre Karzinom war 1 cm^3 groß und das größte $1000,0 \text{ cm}^3$.

Staging

Informationen bezüglich des Staging gab es bei 47 Patienten aus Deutschland mit einem **HCC**, die entsprechenden Angaben fehlten somit bei 47 weiteren deutschen HCC-Patienten. Das Staging der HCC der deutschen und der chinesischen Patienten unterschied sich nach dem Chi-Quadrat-Test signifikant ($p < 0,001$). Bei den Deutschen befanden sich 14 (29,8%) der 47 Patienten mit bekanntem Staging-Status im ersten Stadium, 16 (34,0%) im Stadium 2, 16 (34,0%) im Stadium 3 und einer (2,1%) im vierten Stadium. Bei den Chinesen waren die Daten von 26 Personen bekannt, wohingegen sie bei 25 Patienten fehlten. Chinesische Patienten mit einem HCC befanden sich, abgesehen von einem Patienten (3,8%) im Stadium 2, in der Mehrheit (25 Patienten (96,2%)) im ersten Stadium und somit tendenziell eher in einem geringeren Stadium als die deutschen Patienten. Das Staging für das **CCC** war lediglich bei 13 deutschen Patienten angegeben und fehlte somit bei dem chinesischen und 15 deutschen CCC. Sechs (46,2%) der 13 Patienten mit Informationen bezüglich des Stagings waren im Stadium 1, 4 (30,8%) von ihnen im zweiten Stadium, 1 (7,7%) im dritten Stadium und 2 (15,4%) im vierten Stadium der Erkrankung.

Grading

18 (16,8%) von 107 **HCC**, von denen Angaben zum Grading vorlagen, wiesen eine Grad-1-, 64 (59,8%) eine Grad-2- und 25 (23,4%) eine Grad-3-Histologie auf. Bei 38 HCC fehlten die Angaben zum Grading. Chinesische und deutsche Leberkarzinome unterschieden sich dabei nach dem Chi-Quadrat-Test nicht signifikant ($p = 0,846$) voneinander. Weiterhin unterschied sich das Grading der **CCC** nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test $p = 0,111$) von dem der HCC. Von den 19 CCC mit bekanntem Grading befand sich ein CCC (5,3%) im Grad 1. Mit insgesamt 11 Tumoren (57,9%) hatte die Mehrzahl der deutschen Fälle zusammen mit dem einzigen chinesischen CCC eine Grad-2- und der Rest (7 deutsche CCC (36,8%)) eine Grad-3-Histologie. Bei 10 CCC fehlten die Angaben zum Grading.

Child-Pugh-Stadium

Hinsichtlich des Child-Pugh-Stadiums unterschieden sich die deutschen von den chinesischen **HCC-Patienten** nach dem Chi-Quadrat-Test signifikant ($p < 0,001$). 14 (46,7%) der 30 Patienten aus Deutschland mit Angaben zum Child-Pugh-Stadium befanden sich im Stadium Child A, 11 (36,7%) von ihnen im Stadium Child B und 5 (16,7%) im Stadium Child C. Bei 64 deutschen HCC-Patienten gab es keine Informationen zum Child-Pugh-Stadium. Alle 43 chinesischen Patienten mit Angaben zum Stadium waren im Child-A-Stadium. Bei 8 Patienten aus China fehlten die Informationen bezüglich des Child-Pugh-Stadiums. Bei den Patienten mit **CCC** war das Stadium nur bei einem Karzinom angegeben. Dieser Patient kam aus China und befand sich im Stadium Child A. Zu den 28 deutschen Patienten mit einem CCC fehlten die entsprechenden Daten.

Zirrhose

Bei 41 (56,9%) der 72 deutschen Patienten mit einem **HCC** und mit Angaben bezüglich des Vorhandenseins einer Zirrhose, war das HCC in einer zirrhotisch veränderten Leber entstanden. Bei den chinesischen Patienten war dies bei 25 von 43 Tumoren (58,1%), zu denen eine entsprechende Information vorlag, der Fall. Bei 22 deutschen und 8 chinesischen HCC fehlten die diesbezüglichen Angaben. **CCC**-Patienten entwickelten das Karzinom nur in 2 (11,8%) der 17 Fälle, bei denen die entsprechenden Daten bekannt waren, aus einer Zirrhose heraus. Einer der beiden Patienten war der einzige Chinese mit einem CCC. Bei den restlichen 15 Patienten (88,2%) lag keine Leberzirrhose vor. Zu 12 CCC-Patienten waren keine Informationen vorhanden. Nach dem Chi-Quadrat-Test war dieser Unterschied in Bezug auf das gleichzeitige Vorliegen einer Zirrhose zwischen den HCC und den CCC signifikant ($p < 0,001$).

Zugrundeliegende Ätiologie

Die Ursache der Zirrhose bzw. der **hepatozellulären Karzinome** war bei den Deutschen bei 14 Tumoren bekannt. Diese Information fehlte allerdings bei 80 deutschen HCC. Bei 11 (78,6%) der 14 Patienten, zu denen eine entsprechende

Angabe vorlag, war ein übermäßiger Alkoholkonsum für die Leberveränderungen ursächlich, bei einem Patienten (7,1%) lag eine chronische Hepatitis-B-Infektion zugrunde und 2 Patienten (14,3%) hatten den Tumor auf dem Boden einer Autoimmunerkrankung entwickelt. Bei den chinesischen Patienten sah das Verteilungsbild anders aus. Hier war bei 26 Patienten der Tumor vor dem Hintergrund einer Hepatitis-B-Infektion entstanden, bei den restlichen 25 HCC war die zugrundeliegende Ätiologie nicht bekannt. Nach dem Chi-Quadrat-Test war der Unterschied in den Ursachen zwischen den Deutschen und den Chinesen signifikant ($p < 0,001$). Bei den **cholangiozellulären Karzinomen** war die Ursache nur bei einem CCC, dem Karzinom des Patienten aus China, bekannt. Der Tumor hatte sich hier ebenso wie die chinesischen HCC auf dem Boden einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus entwickelt. Bei den 28 deutschen CCC konnten keine Angaben zur zugrundeliegenden Ätiologie in den zur Verfügung gestellten Unterlagen gefunden werden.

5.1.3. Immunhistochemische Untersuchungen

PD-L1-Expression in hepatozellulären Karzinomen

Bei 51,2% der deutschen und chinesischen HCC konnte eine Positivität ($IRS \geq 3$) für den PD-L1 nachgewiesen werden, wobei sich die Expression sowohl membranständig als auch zytoplasmatisch zeigte (siehe Abbildung 14). Der Ligand war dabei häufig nicht homogen im gesamten Tumor nachweisbar. Insgesamt zeigte sich somit nicht nur eine erhebliche inter- sondern auch intraindividuelle Variabilität. Von den 94 HCC aus Deutschland konnte bei 82 Präparaten der Tumor gefunden werden und bei 12 Präparaten nicht, da entweder nur das benigne tumorumgebende Gewebe angeschnitten oder das Präparat aus technischen Gründen nicht auswertbar war. Der PD-L1 wurde bei 43 (52,4%) der 82 Tumore gefunden, sie wiesen also einen $IRS \geq 3$ auf, während 39 (47,6%) der Malignome PD-L1-negativ waren. Nur bei 47 von 51 HCC-Präparaten aus China konnte aus den bereits genannten Gründen ein Tumor festgestellt werden. Bei 23 (48,9%) dieser 47 chinesischen Leberkarzinome konnte der PD-L1 nachgewiesen werden, bei 24 (51,1%) konnte das Protein nicht gefunden werden. Nach dem Chi-Quadrat-Test war der Unterschied in der PD-L1-Positivität zwischen den beiden Ländern nicht

signifikant ($p = 0,421$). Von den 43 deutschen Lebertumoren, die PD-L1-positiv ($IRS \geq 3$) waren, war die Expression bei 24 (55,8%) der HCC nur schwach, bei 12 (27,9%) der Leberkarzinome mäßig und bei 7 (16,3%) stark ausgeprägt. Die chinesischen Lebertumore zeigten in 11 (47,8%) der 23 Fälle eine schwache PD-L1-Expression, bei 5 (21,7%) wurde das Immunsignal als mäßig eingestuft und bei 7 (30,4%) als stark ausgeprägt (siehe Abbildungen 13 und 14). Die deutschen und die chinesischen Proben unterschieden sich in der Intensität ihrer PD-L1-Expression ebenfalls nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,288$).

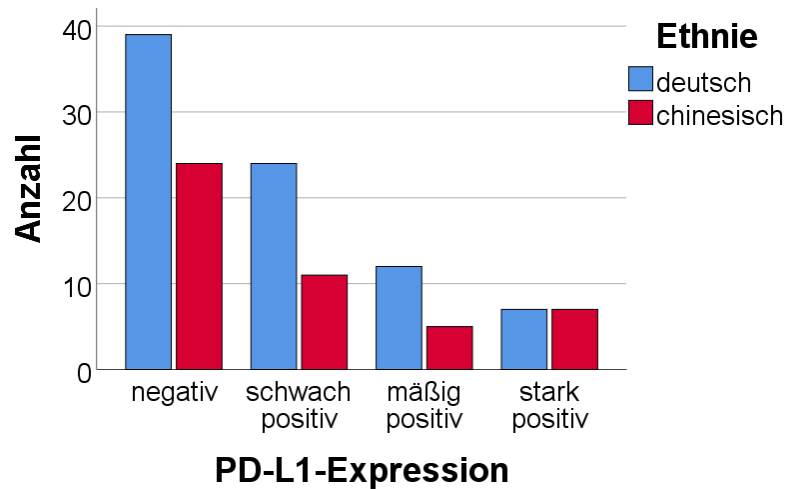
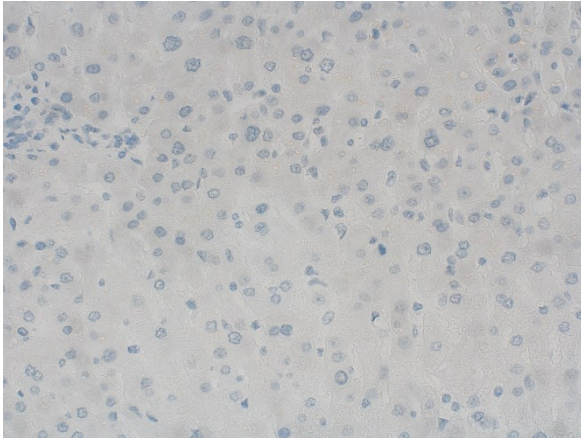
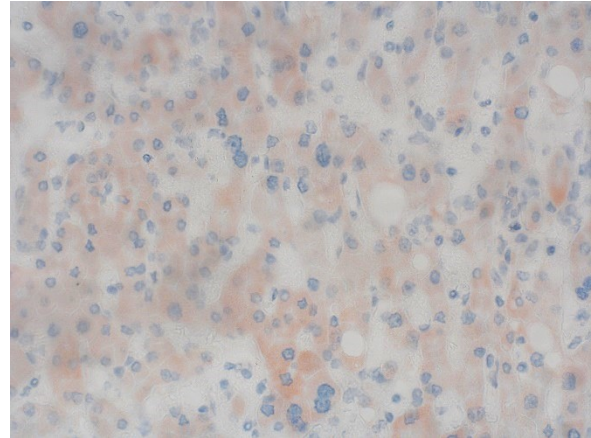


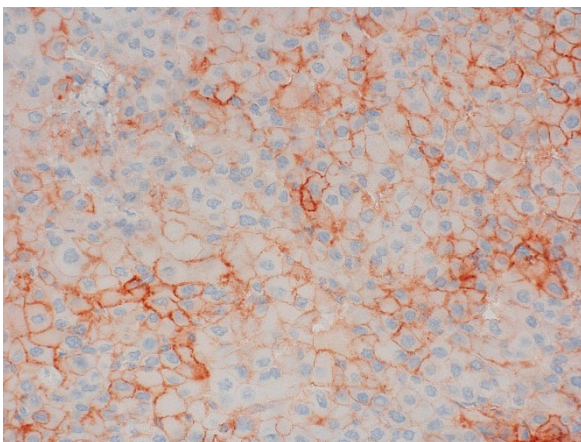
Abb. 13: Stärke der PD-L1-Expression in den untersuchten HCC-Proben, aufgliedert nach deutschen und chinesischen Patienten



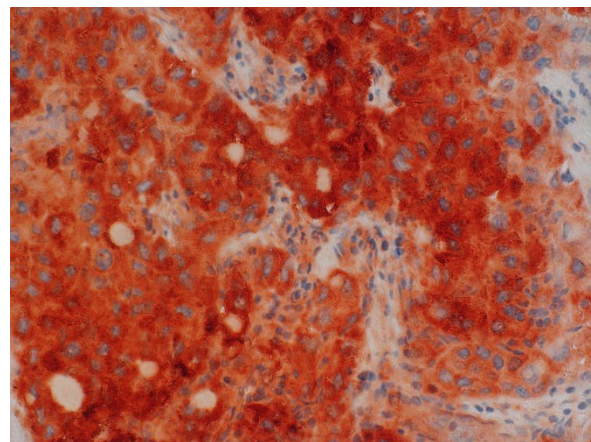
A PD-L1-Expression in HCC: keine Färbung



B PD-L1-Expression in HCC: schwache Färbung



C PD-L1-Expression in HCC: mäßige Färbung



D PD-L1-Expression in HCC: starke Färbung

Abb. 14: PD-L1-Expression (rotbraune Färbung) in HCC. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: 400fach. C: membranständiges Immunsignal in den Tumorzellen; B/D: zytoplasmatisches Immunsignal in den Tumorzellen

Um herauszufinden, wie intensiv die PD-L1-Expression in den Tumoren war, wenn sie als positiv gewertet wurde, wurde der durchschnittliche IRS der als positiv für den Liganden bewerteten Tumore gebildet. Er lag dabei für die HCC der deutschen Patienten bei 5,6 (Standardabweichung 2,6) und der Median bei 5,0. Nach dem Mann-Whitney-U-Test zwar nicht signifikant ($p = 0,254$), allerdings dennoch tendenziell einen höheren IRS-Wert hatten die HCC der chinesischen Patienten. Hier lag der durchschnittliche IRS der PD-L1-positiven HCC bei 6,4 (Standardabweichung 3,0) und der Median bei 6,0.

PD-L1-Expression in der Tumorumgebung von hepatozellulären Karzinomen

Auch in die Leberkarzinome umgebenden, noch nicht maligne entarteten Lebergewebe, welches in einigen Präparaten neben dem Tumor mit angeschnitten war, konnte eine Expression des PD-L1 festgestellt werden. So konnte eine PD-L1-Positivität ($IRS \geq 3$) von den 124 Präparaten, bei denen eine nicht entartete Tumorumgebung nachgewiesen werden konnte, bei 75 (60,5%) der chinesischen und deutschen Lebern auch im tumorfreien Gewebe verzeichnet werden. In den restlichen 49 Präparaten (39,5%) konnte das Protein im umgebenden Lebergewebe nicht nachgewiesen werden und bei 21 Gewebeproben war kein nicht maligne verändertes Gewebe angeschnitten. Beim Vergleich zwischen den deutschen und den chinesischen Patienten zeigte sich, dass 52 (69,3%) der 75 Deutschen und somit prozentual mehr Patienten den Liganden in der Tumorumgebung exprimierten als bei den Chinesen, bei denen er nur in 23 (46,9%) der 49 Präparate im nicht-malignen Gewebe nachweisbar war. Nach dem Chi-Quadrat-Test war dieser Unterschied in der PD-L1-Expression zwischen den deutschen und den chinesischen Patienten sogar signifikant ($p = 0,011$).

Bei den chinesischen Patienten war die PD-L1-Expression im tumorfreien, PD-L1-positiven Lebergewebe dafür signifikant intensiver ausgeprägt als bei den Deutschen (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,047$). 11 (47,8%) der 23 chinesischen Patienten, bei denen der PD-L1 exprimiert war, hatten eine starke Expression des Liganden im nicht-malignen Lebergewebe und bei jeweils 6 (26,1%) fand sich eine mäßige oder schwach ausgeprägte PD-L1-Expression. Bei den deutschen Lebern zeigte sich hingegen nur bei 10 (19,2%) der 52 Patienten in der Tumorumgebung ein starkes Immunsignal, bei 23 (44,2%) war dieses mäßig stark und bei 19 (36,5%) eher schwach ausgeprägt (siehe Abbildungen 15 und 16). Wurde der IRS nur von den Liganden-positiven Tumorumgebungen in die Berechnungen mit einbezogen, betrug er im Schnitt bei den chinesischen Lebern 8,3, mit einem Median von 8,0. Die Werte waren somit höher als in den Lebern der deutschen Patienten, mit einem durchschnittlichen IRS von 7,0 und einem Median von 6,6. Dieser Unterschied war nach dem Mann-Whitney-U-Test allerdings nicht signifikant ($p = 0,092$).

Unter Einbeziehung aller IRS-Werte, also der als positiv bewerteten ebenso wie der als negativ bewerteten Präparate deutscher und chinesischer Patienten, lag der durchschnittliche IRS in den HCC bei 3,4 (Standardabweichung 3,3) und im

umliegenden Bereich bei 5,1 (Standardabweichung 3,6). Sowohl bei den Tumoren als auch beim umgebenden Lebergewebe reichte die Spannweite des IRS von 0 bis 12. Nach dem Mann-Whitney-U-Test war der durchschnittliche IRS der Tumorumgebungen insgesamt signifikant ($p < 0,001$) höher als in den Tumoren selbst. In Abbildung 16 wird die stärkere Anfärbung der Tumorumgebung im Vergleich zum Tumor dargestellt.

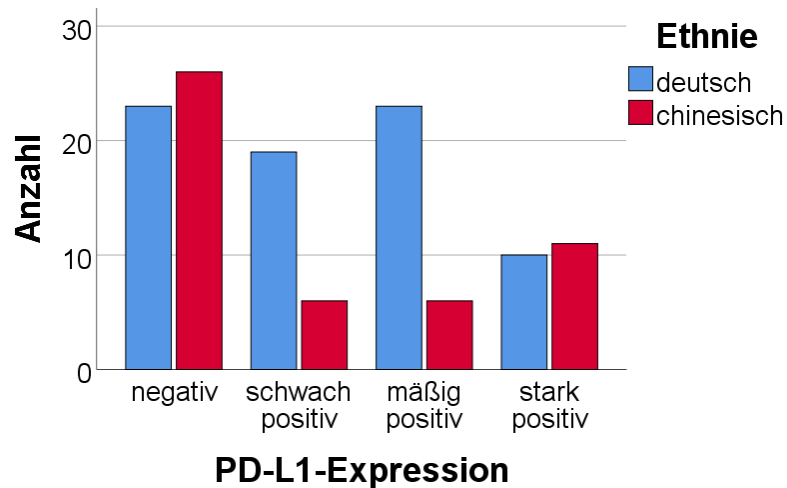
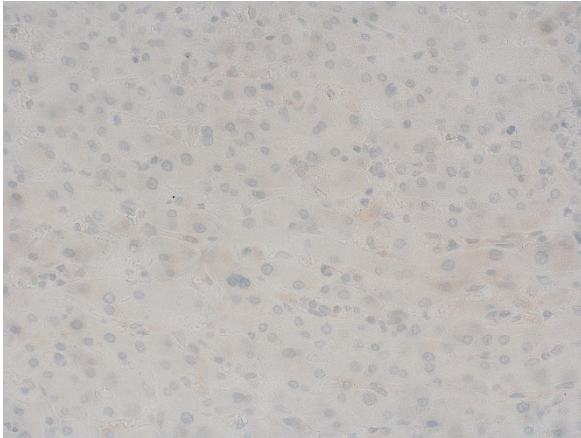
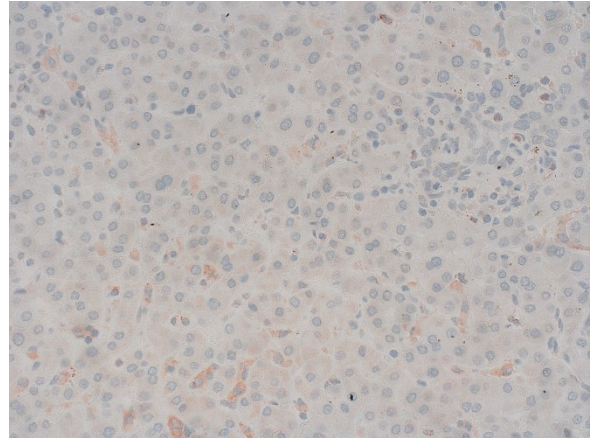


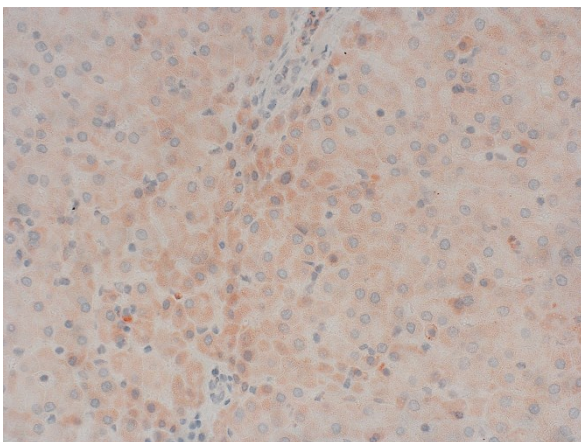
Abb. 15: Ausmaß der PD-L1-Expression im die HCC umgebenden tumorfreien Lebergewebe, aufgegliedert nach deutschen und chinesischen Patienten



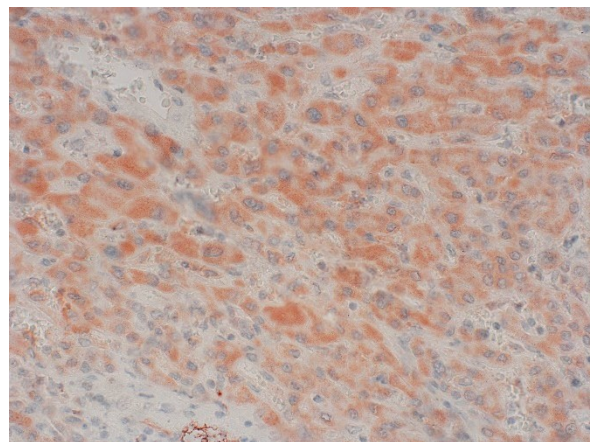
A PD-L1-Expression in Tumorumgebung:
keine Färbung



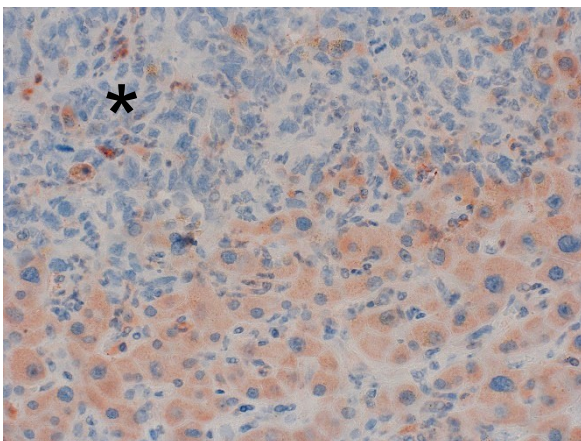
B PD-L1-Expression in Tumorumgebung:
schwache Färbung



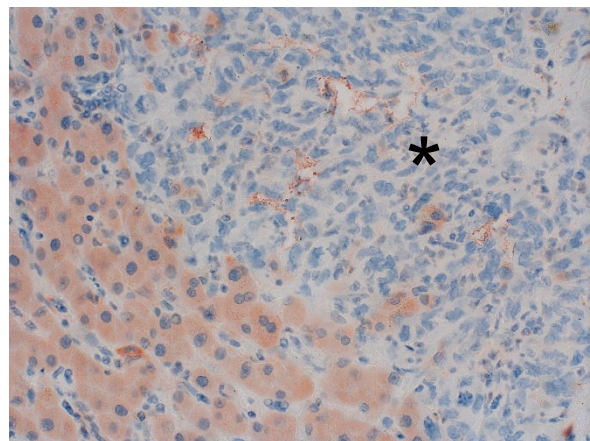
C PD-L1-Expression in Tumorumgebung:
mäßige Färbung



D PD-L1-Expression in Tumorumgebung:
starke Färbung



E Unterschied Anfärbung Tumor und Umgebung



F Unterschied Anfärbung Tumor und Umgebung

Abb. 16: PD-L1-Expression (rotbraune Färbung) in der Tumorumgebung von HCC. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400fach. E/F Verdeutlichung der unterschiedlichen Anfärbung des Tumors (Stern) und dessen Umgebung

PD-L1-Expression in cholangiozellulären Karzinomen

Elf (42,3%) der untersuchten CCC der deutschen Patienten waren positiv für den PD-L1. Bei den restlichen 15 (57,7%) Karzinomen, darunter auch das des chinesischen Patienten, konnte der Ligand nicht nachgewiesen werden und bei 3 Präparaten konnte der Tumor nicht gefunden werden. Von den 11 als positiv gewerteten cholangiozellulären Karzinomen war die Expression bei 9 (81,8%) CCC eher schwach und bei jeweils einem (9,1%) mäßig bzw. stark ausgeprägt (siehe Abbildungen 17 und 18). Der IRS-Mittelwert der Tumore, die als PD-L1-positiv bewertet worden waren, lag bei 4,7 (Standardabweichung 2,1) und der Median bei 4,5.

Die Intensität der PD-L1-Expression war bei allen ausgewerteten Tumoren zwischen HCC und CCC nicht signifikant verschieden (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,399$). Allerdings wurde der Ligand in HCC etwas häufiger exprimiert als in CCC (51,2% vs. 42,3%). Statistisch war dieses Ergebnis jedoch ebenfalls nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,272$).

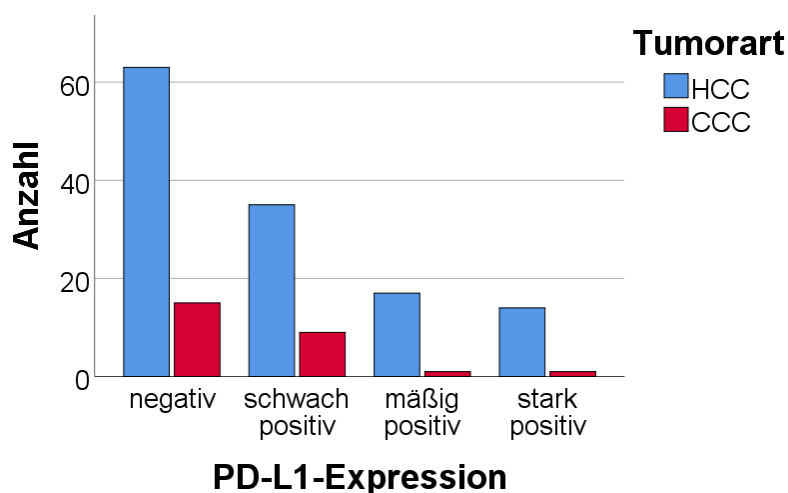
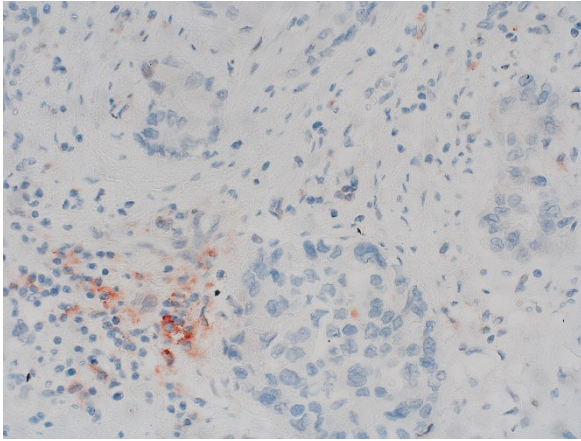
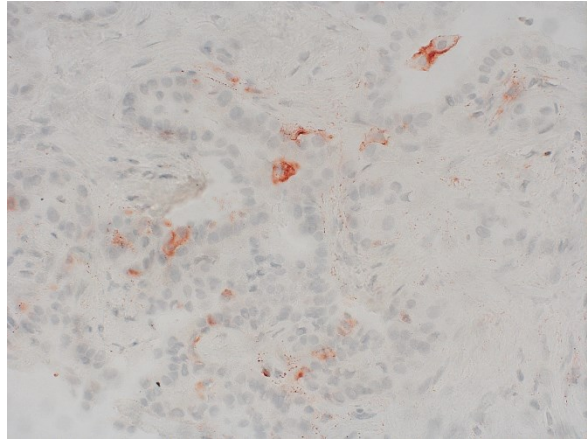


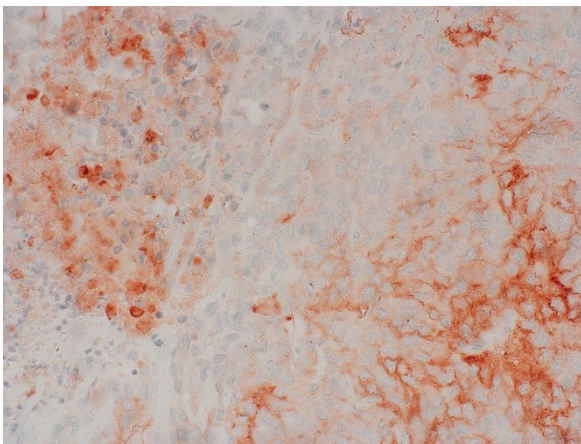
Abb. 17: PD-L1-Expression in HCC und CCC im Vergleich



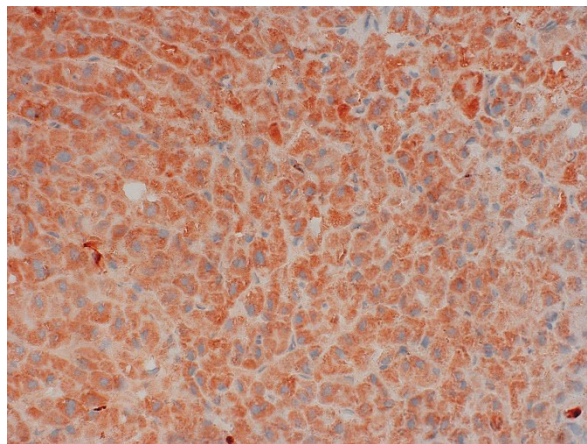
A PD-L1-Expression in CCC: keine Färbung



B PD-L1-Expression in CCC: schwache Färbung



C PD-L1-Expression in CCC: mäßige Färbung



D PD-L1-Expression in CCC: starke Färbung

Abb. 18: PD-L1-Expression (rotbraune Färbung) in CCC. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400fach

PD-L1-Expression in der Tumorumgebung von cholangiozellulären Karzinomen

Auch bei den cholangiozellulären Karzinomen wurde umgebendes, noch nicht entartetes Lebergewebe auf die Expression des Liganden hin untersucht. Hierbei war eine positive Expression des PD-L1 ($IRS \geq 3$) in 15 (62,5%) von 24 vorhandenen nicht neoplastisch veränderten Tumorumgebungen des CCC nachweisbar. Bei 9 Präparaten (37,5%) konnte er nicht aufgefunden werden und bei 5 Proben konnte kein nicht-malignes Gewebe ausgemacht werden. Fünf (33,3%) der 15 PD-L1-positiven Gewebeanschnitte in der Umgebung des Tumors waren in Hinsicht auf den Liganden schwach positiv, 6 (40,0%) exprimierten den PD-L1 mäßig stark und 4 (26,7%) stark. Der IRS, der als positiv für den Liganden bewerteten

Tumorumgebungen lag durchschnittlich bei 6,9 (Standardabweichung 2,9) und der Median bei 6,0.

Wurden alle, nicht nur die Liganden-positiven, untersuchten CCC und deren Umgebung aus Deutschland und China betrachtet, so lag der IRS bei den 26 CCC bei 2,6 (Standardabweichung 2,4), mit einem Median von 2,5, einem Minimum von 0 und einem Maximum von 10,5. Bei 24 Tumoren war auch die Tumorumgebung auswertbar. Der IRS lag bei 4,9 (Standardabweichung 3,4) und der Median bei 3,8. Der geringste IRS wurde mit 1,0 angegeben und der höchste mit 12,0. Auch hier lag der IRS der Tumorumgebungen nach dem Mann-Whitney-U-Test signifikant ($p = 0,012$) höher als in den Tumoren selbst.

Nach dem Mann-Whitney-U-Test war der IRS zwischen den Tumorumgebungen von HCC und CCC nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,992$). Im Gegensatz zum Tumor selbst, war die Umgebung bei den CCC häufiger PD-L1-positiv als bei den HCC (62,5% vs. 60,5%). Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant ($p = 0,522$).

Einfluss des Geschlechts auf die PD-L1-Expression

Weder beim HCC ($p = 0,444$) oder CCC ($p = 0,188$) noch bei deren Tumorumgebungen (Tumorumgebungen HCC: $p = 0,177$, Tumorumgebungen CCC: $p = 0,871$) hatte das Geschlecht nach dem Mann-Whitney-U-Test einen Einfluss auf die Expressionsstärke des PD-L1. Auch auf die PD-L1-Positivität hatte es keinen Einfluss (Chi-Quadrat-Test: HCC: $p = 0,360$, HCC Tumorumgebungen: $p = 0,243$, CCC: $p = 0,313$, CCC Tumorumgebungen: $p = 0,397$).

Einfluss einer Leberzirrhose auf die PD-L1-Expression

Das Vorliegen einer Leberzirrhose schien ebenfalls keinen Einfluss auf die Expressionsstärke des Liganden (Mann-Whitney-U-Test: HCC: $p = 0,520$, HCC Tumorumgebungen: $p = 0,492$, CCC: $p = 0,933$, CCC Tumorumgebungen: $p = 0,615$) und die Liganden-Positivität (Chi-Quadrat-Test: HCC: $p = 0,510$, HCC Tumorumgebungen: $p = 0,203$, CCC: $p = 0,733$, CCC Tumorumgebungen: $p = 0,385$) auszuüben.

5.1.4. Korrelationen

Mithilfe des Spearman-Rho-Tests wurden signifikante Zusammenhänge zwischen der PD-L1-Expression und der Expression von anderen, typischerweise in HCC oder CCC nachweisbaren Rezeptoren wie den Somatostatinrezeptoren 1-5 (SSTR 1-5), und dem Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) sowie mit dem Proliferationsindex Ki-67 und klinischen Parametern wie der Größe des Tumors, dem Überleben der Patienten, Leberwerten (Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Bilirubin) und Tumormarkern (AFP, CA 19-9, Carcinoembryonales Antigen (CEA)) untersucht. Ebenfalls wurde auf Korrelationen zwischen der Expression des Liganden und der Ausprägung des TNM-Stadiums, des Stagings und des Gradings mit dem Kendall-Tau-b-Test getestet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Folgenden hauptsächlich die signifikanten Zusammenhänge dargestellt. Es konnten keine Korrelationen zwischen den PD-L1-IRS-Werten der HCC oder CCC oder deren Tumorumgebungen mit dem T-Stadium, dem Staging oder dem Grading gefunden werden.

Zusammenhang in der PD-L1-Expression zwischen den Lebertumoren und der jeweiligen Tumorumgebung

Bei der Auswertung der **HCC** der deutschen und der chinesischen Patienten konnte ein mittlerer ($r = 0,394$, $p < 0,01$) Zusammenhang zwischen der Expression des PD-L1 im Tumor selbst und seiner Tumorumgebung gefunden werden (siehe Abbildung 19). Ebenfalls konnte bei HCC eine Korrelation zwischen der Ausprägung des Liganden im Tumor und der Expression in seiner Tumorumgebung sowohl bei der Betrachtung lediglich der deutschen Patienten ($r = 0,388$, $p = 0,001$) als auch nur der chinesischen Patienten ($r = 0,413$, $p = 0,004$) verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei **CCC** kein Zusammenhang zwischen der Expression des PD-L1 im Tumor und der Expression des Liganden in der Tumorumgebung bei deutschen Patienten und dem einen chinesischen Patienten zusammengenommen festgestellt werden.

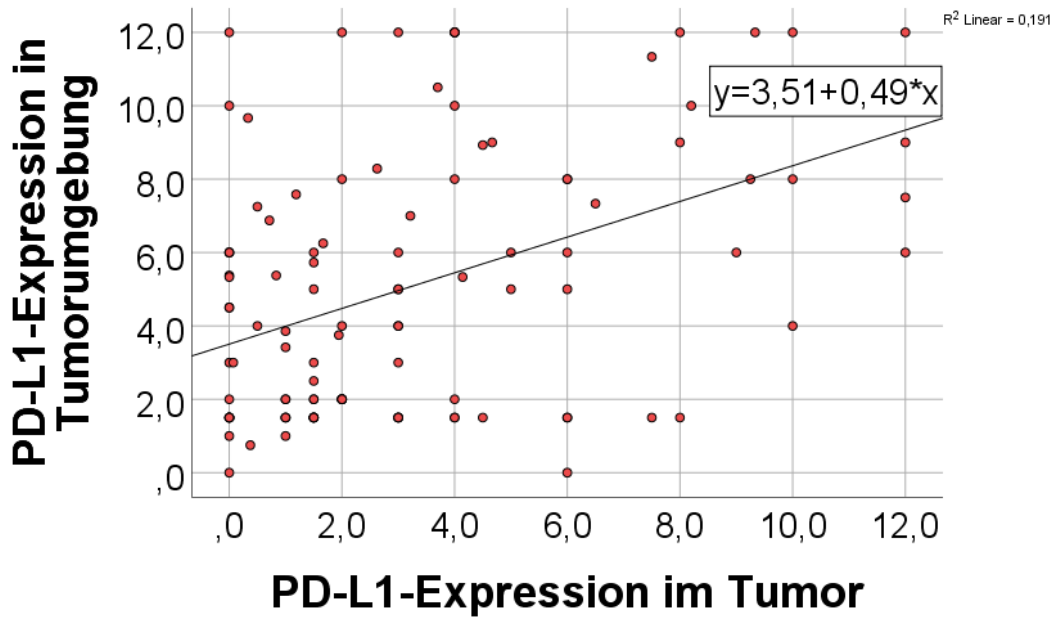


Abb. 19: Korrelation der PD-L1-Expression in den HCC der deutschen und chinesischen Patienten zusammengenommen mit der PD-L1-Expression in der entsprechenden Tumorumgebung

Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und den klinischen Daten, der Expression anderer Rezeptoren, der Expression von Tumormarkern und dem Proliferationsindex

Die IRS-Werte für die PD-L1-Expression in den **HCC** der deutschen und chinesischen Patienten zusammengenommen korrelierten weder mit den spezifischen Leber-Laborwerten noch mit den entsprechenden, in vorangegangenen Arbeiten ermittelten Expressionsdaten der anderen Rezeptoren (SSTR 1-5, CXCR4). Die Tabellen 3 und 4 veranschaulichen die signifikanten Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression in den HCC mit den klinischen Daten, nun aufgegliedert nach der ethnischen Herkunft der Patienten. Hier zeigte sich dann bei den deutschen Patienten eine signifikante positive Korrelation zwischen der PD-L1- und der CXCR4-Expression, während bei den chinesischen Patienten ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der PD-L1- und der SSTR5- oder CXCR4-Expression und eine positive Korrelation mit dem Ki-67-Index beobachtet wurden.

Die Ausprägung des Liganden in der **Tumorumgebung der HCC** deutscher und chinesischer Patienten zusammengenommen zeigte einen negativen Zusammenhang mit der Höhe der ASAT ($r = -0,397$, $p = 0,001$), der ALAT ($r = -0,365$, $p < 0,001$) und der GGT ($r = -0,375$, $p = 0,001$). Aufgegliedert nach ethnischer Herkunft der Patienten konnte keine Korrelation zwischen der PD-L1-Expression in den Tumorumgebungen und den klinischen Daten, der Expression anderer Rezeptoren, der Expression von Tumormarkern und dem Proliferationsindex der entsprechenden Tumore gefunden werden.

Tabelle 3: Korrelationen der PD-L1-Expression in den HCC der deutschen Patienten mit der Expression anderer Rezeptoren

Korrelationen	r	p
PD-L1-Expression Tumor/CXCR4-Expression Tumor	0,232	0,036

Tabelle 4: Korrelationen der PD-L1-Expression in den HCC der chinesischen Patienten mit der Expression anderer Rezeptoren und mit dem Ki-67-Index

Korrelationen	r	p
PD-L1-Expression Tumor/SSTR5-Expression Tumor	-0,309	0,034
PD-L1-Expression Tumor/CXCR4-Expression Tumor	-0,313	0,032
PD-L1-Expression Tumor/Ki-67-Index	0,513	0,012

Die Ausprägung des PD-L1 im Tumor in den **CCC** der deutschen und des einen chinesischen Patienten zusammengenommen korrelierte lediglich stark mit der Größe des Tumors ($r = 0,720$, $p = 0,029$). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression des Proteins im Tumor bzw. der Tumorumgebung mit den Laborparametern festgestellt werden. Lediglich die Höhe der Expression des Liganden in der **Tumorumgebung** korrelierte negativ ($r = -0,415$, $p = 0,044$) mit den IRS-Werten für den SSTR3 im Tumor und stark negativ ($r = -0,782$, $p = 0,038$) mit der Höhe der CA-19-9-Serumwerte.

5.2. Untersuchung der PD-L1-Expression in den gesunden Resektionsrändern von Operationspräparaten verschiedener benignen und malignen Leberveränderungen

5.2.1. Allgemeine Patientendaten

Klassifikation

Im zweiten Teil der vorliegenden Untersuchungen wurden 115 Gewebeproben aus dem Resektionsrand von Operationspräparaten der Leber von 115 Patienten aus dem Universitätsklinikum Jena, die aus unterschiedlichen Gründen einer operativen Therapie unterzogen worden waren, untersucht (siehe Tabelle 5). Dabei stammten 11 Gewebeproben von Patienten mit einem Adenom und 5 von Patienten mit einer chronischen Cholangitis, 6 von Patienten mit einem HCC, 10 von Patienten mit einem CCC und 4 von Patienten mit einem Gallenblasenkarzinom. Die große Mehrheit der untersuchten Proben war jedoch von Lebern mit Metastasen von Tumoren aus unterschiedlichen Organen wie dem Magen-Darm-Trakt (58 Proben), der Niere (7 Proben), der Brustdrüse (6 Proben), den Ovarien (1 Probe), des Pankreaskopfes (1 Probe) oder von neuroendokrinen Tumoren (6 Proben).

Tabelle 5: Anzahl und Verteilung der dem operativen Eingriff jeweils zugrundeliegenden Diagnosen. MTS: Metastase(n)

Diagnose	Häufigkeit	Prozent
Adenom	11	9,6
Chronische Cholangitis	5	4,3
HCC	6	5,2
Gallenblasenkarzinom	4	3,5
CCC	10	8,7
MTS kolorektales Karzinom	58	50,4
MTS Nierenkarzinom	7	6,1
MTS Mammakarzinom	6	5,2
MTS Ovarialkarzinom	1	0,9
MTS neuroendokriner Tumor	6	5,2
MTS Pankreaskopfkarzinom	1	0,9
Gesamt	115	100,0

Geschlechterverteilung und Altersverteilung

Von den 115 Patienten waren 60 (52,2%) weiblich und 55 (47,8%) männlich. Sie waren im Schnitt 58,9 Jahre alt, wobei die Frauen mit 57,3 Jahren (Standardabweichung 13,1 Jahre) etwas jünger waren als die Männer mit 60,6 Jahren (Standardabweichung 12,4 Jahre). Der jüngste Patient war 26 Jahre und der älteste von ihnen 80 Jahre alt.

BMI, Nikotinkonsum, Alkoholkonsum

Bezüglich des BMI, des Nikotin- und des Alkoholkonsums waren die Daten aller Patienten vollständig. Bei den weiblichen Patienten lag der BMI im Durchschnitt bei 26,7 mit einer Standardabweichung von 5,0. Der geringste BMI betrug 17,3 und der höchste 43,3. Der BMI der männlichen Patienten war im Schnitt 27,0, mit einer Standardabweichung von 3,4. Bei ihnen betrug der niedrigste BMI 21,5 und der höchste 34,4. 90 (78,3%) Patienten waren Nichtraucher, 10 (8,7%) hatten das Rauchen vor kurzer Zeit aufgegeben und 15 (13,0%) weitere Patienten waren noch aktive Raucher. 76 (66,1%) Patienten tranken keinen, 27 (23,5%) nur gelegentlich und 12 (10,4%) häufig Alkohol.

Pfortaderembolisation

Von den 112 Patienten mit Angaben bezüglich der Durchführung einer Pfortaderembolisation war bei 17 (15,2%) Patienten vor der Operation eine Embolisation des Pfortaderasts des zu resezierenden Leberabschnitts durchgeführt worden, um bessere Bedingungen für die Operation zu schaffen. 95 (84,8%) der Patienten wurden dieser Methode nicht unterzogen. Bei 3 Patienten gab es dazu keine Informationen.

5.2.2. Immunhistochemische Untersuchungen

In dieser Population wurden insgesamt 24 (20,9%) der Gewebeproben als PD-L1-positiv eingestuft, da sie einen IRS-Wert ≥ 3 aufwiesen, während 91 (79,1%) der Resektate PD-L1-negativ waren. Das Geschlecht der Patienten (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,452$), ebenso wie der Alkoholkonsum ($p = 0,177$) oder eine Embolisation des entsprechenden Pfortaderasts ($p = 0,277$) hatten keinen Einfluss auf die PD-L1-IRS-Werte. Der IRS aller untersuchten Proben lag im Durchschnitt bei 1,8, mit einer Standardabweichung von 2,2. Der Median betrug 1,5. Der höchste IRS-Wert lag bei 9,0 und war einem Patienten mit chronischer Cholangitis zuzuordnen. Auch hier wurde der Durchschnitt des IRS nur der PD-L1 positiven Gewebeproben ermittelt. Er lag bei 5,3 (Standardabweichung 1,9). Der Median betrug 5,0. Eine genaue Übersicht über die Anzahl der PD-L1-positiven Präparate, die IRS-Werte und die entsprechende Expressionsstärke je nach dem operativen Eingriff zugrundeliegenden Diagnose ist der Tabelle 6 und den Abbildungen 20 und 22 zu entnehmen.

Bei der Betrachtung der Expressionshäufigkeit zeigte sich, dass der Ligand insbesondere in Lebern, die aufgrund eines HCC oder CCC oder eines Gallenblasenkarzinoms reseziert worden waren, exprimiert wurde. Allerdings konnte eine PD-L1-Expression auch in Lebern, die eine Metastase eines neuroendokrinen Tumors aufgewiesen hatten, in 50,0% der Fälle nachgewiesen werden. Auch die Leber, in der sich eine Metastase eines Ovarialkarzinoms befunden hatte, war PD-L1-positiv.

Wurden allerdings die medianen und durchschnittlichen IRS-Werte der PD-L1-positiven Gewebe betrachtet, zeigte sich wiederum ein hoher IRS besonders in den Resektionsrändern der HCC, CCC und Gallenblasenkarzinome (siehe Abbildung 21).

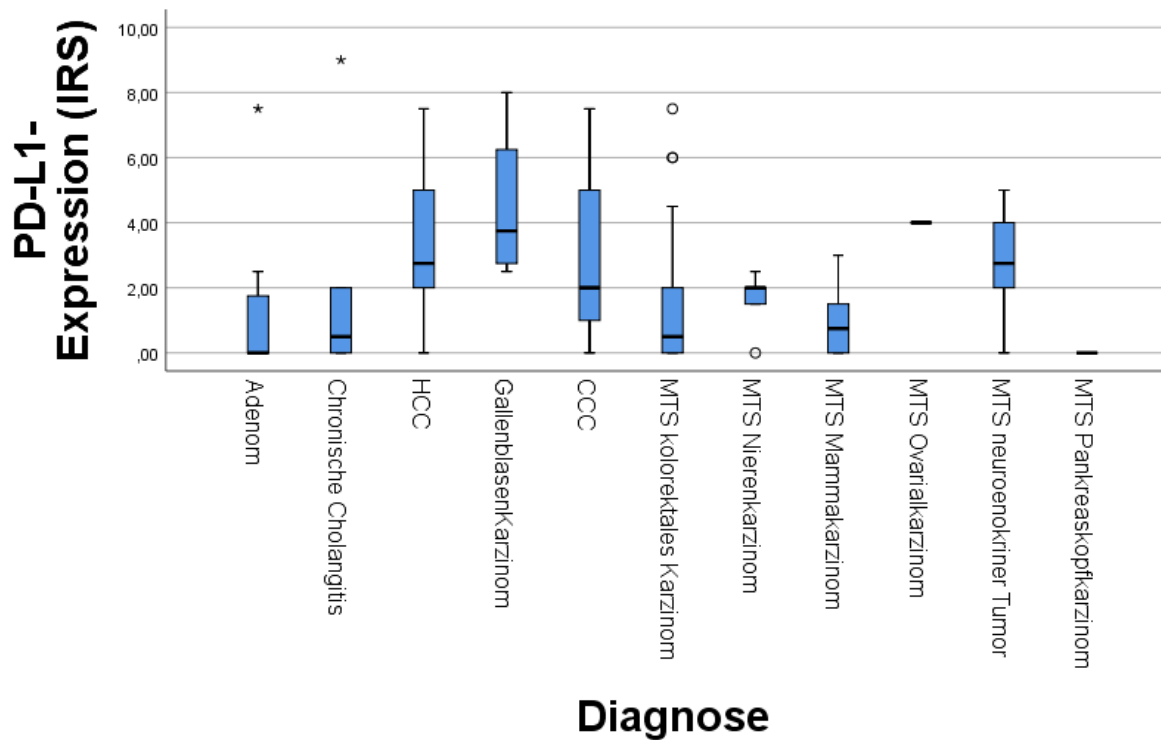
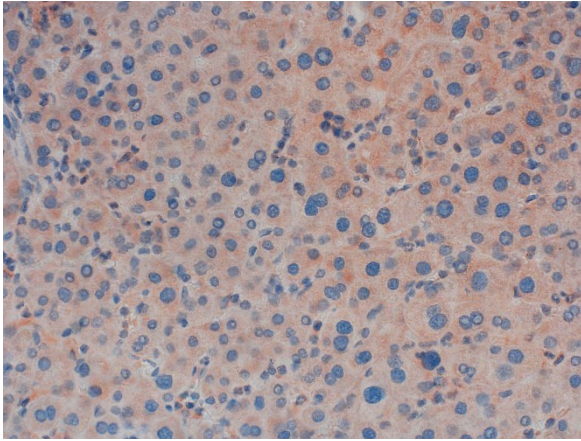
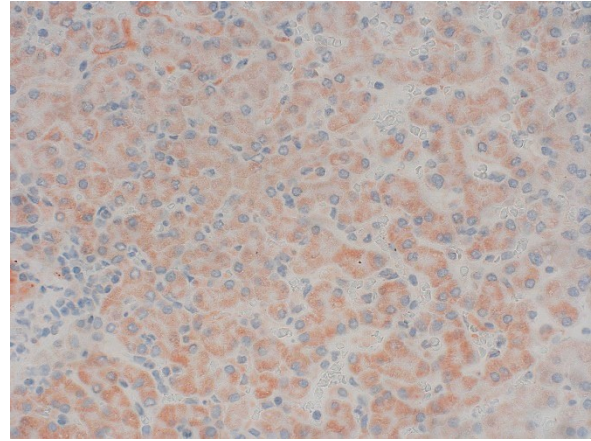


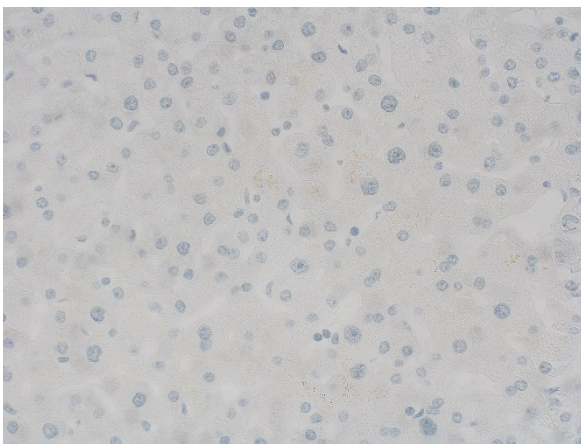
Abb. 20: PD-L1-Expression (IRS-Werte) in den verschiedenen Gewebeproben, aufgliedert nach der dem operativen Eingriff zugrundeliegenden Diagnose. Dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer (zweifache Standardabweichung; Kreise) und extreme Ausreißer (dreifache Standardabweichung; Sterne). MTS: Metastase



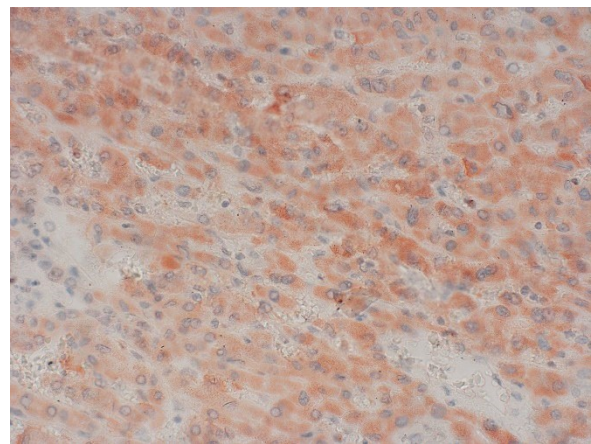
A PD-L1- Expression im Resektionsrand einer chronischen Cholangitis



B PD-L1-Expression im Resektionsrand eines Adenoms



C PD-L1-Expression im Resektionsrand einer kolorektalen Metastase



D PD-L1-Expression in Tumorumgebung eines HCC

Abb. 21: PD-L1-Expression (rotbraune Färbung) in gesunden Resektionsrändern nach operativer Entfernung von Lebergewebe aufgrund einer chronischen Cholangitis (A), eines Adenoms (B), oder einer kolorektalen Metastase (C). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400fach. (D) Vergleichend eine Tumorumgebung eines HCC aus der vorangegangenen, ersten Testpopulation

Tabelle 6: Anzahl der PD-L1-positiven Gewebeproben, PD-L1-Expressionsstärke und durchschnittlicher IRS, aufgliedert nach der dem operativen Eingriff zugrundeliegenden Diagnose. MTS: Metastase

Diagnose	Anzahl PD-L1-positiv	Expressionsstärke schwach/mittel/stark	Anzahl PD-L1-negativ	IRS gesamt	IRS nur Positive
Adenom	1 (9,1%)	0/1/0	10 (90,9%)	1,4	7,5
Chronische Cholangitis	1 (20,0%)	0/1/0	4 (80,0%)	2,3	9,0
HCC	3 (50,0%)	2/1/0	3 (50,0%)	3,3	5,2
Gallenblasenkarzinom	3 (75,0%)	2/1/0	1 (25,0%)	4,5	5,2
CCC	4 (40,0%)	2/2/0	6 (60,0%)	3,3	6,3
MTS kolorektales Karzinom	7 (12,1%)	4/3/0	51 (87,9%)	1,3	5,0
MTS Nierenkarzinom	-	0/0/0	7 (100,0%)	1,6	-
MTS Mammakarzinom	1 (16,7%)	1/0/0	5 (83,3%)	1,0	3,0
MTS Ovarialkarzinom	1 (100,0%)	1/0/0	-	4,0	4,0
MTS neuroendokriner Tumor	3 (50,0%)	3/0/0	3 (50,0%)	2,8	4,0
MTS Pankreaskopfkarzinom	-	0/0/0	1 (100,0%)	0,0	-
Gesamt	24 (20,9%)	15/9/0	91 (79,1%)	1,8	5,3

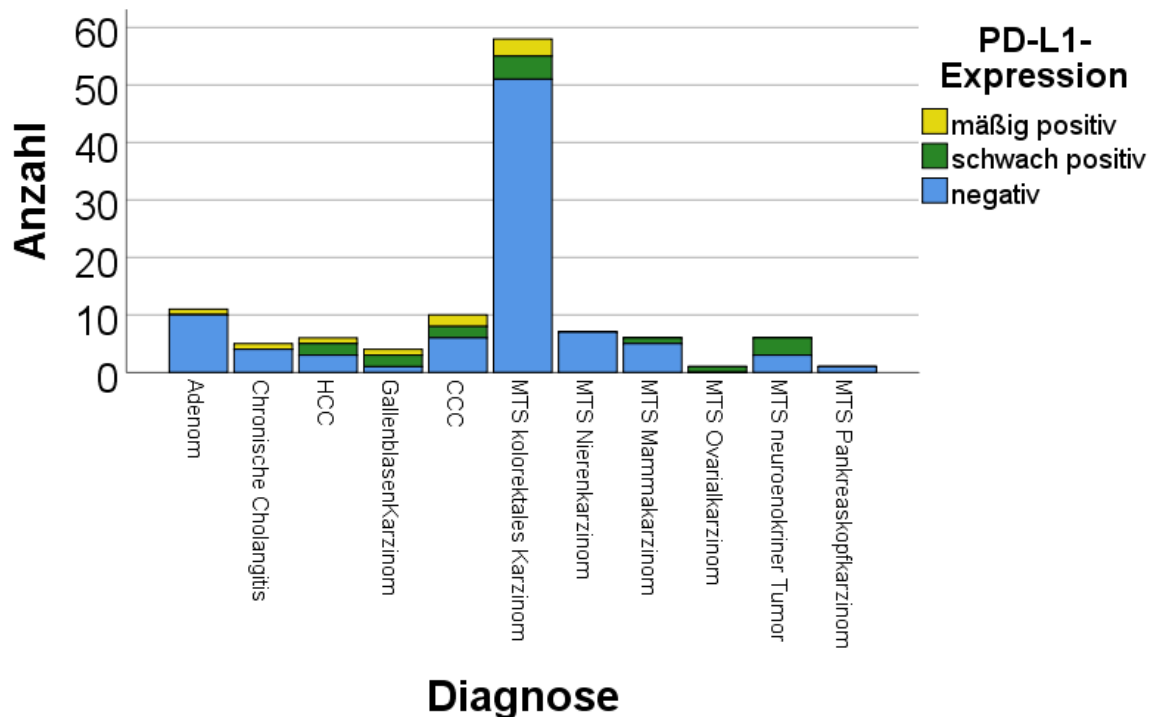


Abb. 22: Anteil der PD-L1-negativen sowie der schwach oder mäßig Liganden-positiven Gewebe, aufgegliedert nach der dem operativen Eingriff zugrundeliegenden Diagnose

5.2.3. Vergleich der beiden Testpopulationen hinsichtlich der PD-L1-Expression

In der vorliegenden Arbeit sollte auch ein Vergleich der PD-L1-Expression zwischen den Tumorumgebungen der ersten Testpopulation und den Gewebeproben der zweiten Testpopulation vorgenommen werden. Allerdings sollte angemerkt werden, dass nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen den entsprechenden Gewebebereichen der beiden Testpopulationen gegeben ist. In der ersten Gruppe wurde die Expression des PD-L1 in der unmittelbaren Umgebung des Tumors ermittelt, welche im Präparat mitangeschnitten war. In der zweiten Gruppe handelte es sich um Resektionsränder, die räumlich etwas mehr Abstand zur benignen oder malignen Veränderung der Leber hatten. Der durchschnittliche IRS in der **zweiten Testpopulation** der 20 tumorfreien Resektionsränder *der HCC, der CCC und der Gallenblasenkarzinome* lag bei 3,5 (Standardabweichung 2,6) und der Median bei 2,8. Die PD-L1-Expression unterschied sich somit nicht signifikant hinsichtlich der Intensität der Expression des Liganden (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,100$) und auch nicht in Bezug auf die Expressionshäufigkeit des PD-L1 (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,246$) von der **ersten Testpopulation** mit einem durchschnittlichen IRS von 5,0

(Standardabweichung 3,6), bei denen die unmittelbar umliegende noch nicht maligne veränderte Tumorumgebung bei 148 Proben von HCC und CCC untersucht worden war.

Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der tumorfreien Resektionsränder *primärer, maligner Leberveränderungen* mit den Resektionsrändern *der Adenome, der chronischen Cholangitiden und der Metastasen* **innerhalb der zweiten Testpopulation** in Hinsicht auf die Expressionsintensität (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$) und die Expressionshäufigkeit (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,001$) des PD-L1 gefunden werden.

5.2.4. Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und klinischen Parametern

Gewebeproben von den tumorfreien Resektionsrändern der HCC, der CCC und der Gallenblasenkarzinome

Bei Betrachtung der Resektionsränder der HCC, der CCC und der Gallenblasenkarzinome zusammengenommen gab es positive Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der PD-L1-Expression in den Proben und der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), der Höhe des aktivierten Fibrinogens und dem C-reaktiven Protein (CRP). Negative Korrelationen fanden sich zwischen der PD-L1-Expression und der Höhe des Albumins und des Laktats im Serum der Patienten (siehe Tabelle 7). Kein Zusammenhang fand sich zwischen der Expression des Liganden und dem Geschlecht ($p = 0,393$), dem Alkoholkonsum ($p = 0,904$), der Höhe der ASAT- ($r = -0,044$, $p = 0,854$), ALAT- ($r = -0,013$, $p = 0,957$), GGT- ($r = 0,051$, $p = 0,829$), Cholinesterase- ($r = -0,491$, $p = 0,217$) und Bilirubin-Werte im Serum ($r = 0,240$, $p = 0,308$) oder dem Quick-Wert ($r = -0,435$, $p = 0,055$). Ebenfalls konnten keine Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und dem mittleren korpuskulären Hämoglobin (MCH) ($r = 0,024$, $p = 0,920$) oder der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) ($r = -0,297$, $p = 0,203$) aufgezeigt werden.

Tabelle 7: Korrelationen der PD-L1-Expression in den Resektionsrändern der HCC, der CCC und des Gallenblasenkarzinoms zusammengenommen mit den Laborwerten der Patienten

Korrelationen	r	p
PD-L1-Expression/Albuminkonzentration im Serum	-0,565	0,009
PD-L1-Expression/Höhe der aPTT	0,566	0,009
PD-L1-Expression/Höhe des aktivierten Fibrinogens	0,522	0,018
PD-L1-Expression/CRP-Konzentration im Serum	0,624	0,004
PD-L1-Expression/Laktat-Konzentration im Serum	-0,898	0,002

Gewebeproben von den Resektionsrändern der Adenome, der chronischen Cholangitiden und der Lebermetastasen

Die Expression des PD-L1 in den Gewebeproben der Adenome, der chronischen Cholangitiden und der Lebermetastasen zusammengenommen zeigte eine negative Korrelation mit der Höhe des Albumins im Serum sowie dem MCH, der MCHC und der Höhe der Cholinesterase-Werte im Serum (siehe Tabelle 8). Hier fand sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Expression des Liganden und dem Geschlecht ($p = 0,743$), dem Alkoholkonsum ($p = 0,372$), der Höhe der ASAT- ($r = 0,027$, $p = 0,792$), ALAT- ($r = -0,125$, $p = 0,229$), GGT- ($r = -0,065$, $p = 0,529$) und Bilirubin-Werte im Serum ($r = 0,047$, $p = 0,653$) oder dem Quick-Wert ($r = 0,042$, $p = 0,695$).

Tabelle 8: Korrelationen der PD-L1-Expression in den Resektionsrändern der Adenome, der chronischen Cholangitiden und der Metastasen mit den Laborwerten der Patienten

Korrelationen	r	p
PD-L1-Expression/Albuminkonzentration im Serum	-0,258	0,013
PD-L1-Expression/Höhe des MCH	-0,277	0,008
PD-L1-Expression/Höhe der MCHC	-0,236	0,024
PD-L1-Expression/ Höhe der Cholinesterase im Serum	-0,323	0,048

6. Diskussion

6.1. Hepatozelluläre und cholangiozelluläre Karzinome

6.1.1. Patientendaten und klinische Daten

Laut Zhu et al. (2016) sind Männer 4mal häufiger von einem HCC betroffen als Frauen. Dies spiegelte sich auch in den Patientendaten der vorliegenden Arbeit wider. 80,0% der deutschen und chinesischen HCC-Patienten waren männlich und nur 20,0% weiblich. Nach der Literatur erkrankt das männliche Geschlecht zudem 1,5mal häufiger an einem Karzinom der Gallengänge als das weibliche (Shaib und El-Serag 2004). In der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Population war der Anteil an Männern mit 75,9% der Fälle jedoch noch höher.

Die deutschen HCC- oder CCC-Patienten der vorliegenden Studie befanden sich bei Diagnosestellung im Durchschnitt in ihrem 7. Lebensjahrzehnt. Diese Beobachtung deckt sich mit der vorhandenen Literatur (Guthle und Dollinger 2014, Goepfert 2020). Die chinesischen Patienten mit einem HCC waren bei der Erstdiagnose allerdings signifikant jünger als die entsprechenden deutschen Patienten. Guthle et al. (2014) beschreiben erste Erkrankungsfälle schon ab dem 2. Lebensjahrzehnt in Ländern mit hoher Hepatitis-B- und -C-Prävalenz und somit hoher HCC-Inzidenz. Tatsächlich entwickelten alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten chinesischen Patienten mit Angaben bezüglich der Ätiologie ein HCC bzw. das CCC ausgehend von einer Infektion mit Hepatitis B. Bei Patienten mit einem malignen Leberkarzinom aus Deutschland entstand eine zirrhotisch bzw. maligne veränderte Leber hauptsächlich aufgrund von schädlichem Alkoholkonsum. Diese unterschiedlichen Ursachen für die Entstehung eines Lebertumors je nach Herkunftsregion waren signifikant und wurden bereits durch Czauderna et al. (2017) beschrieben.

Nach Czauderna et al. (2017) entwickeln Patienten mit HCC in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle ihr Karzinom aus einer zirrhotisch veränderten Leber heraus. In der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Population war dies bei 56,9% der deutschen und bei 58,1% der chinesischen HCC der Fall, wobei sich diese Daten nur auf die Patienten mit vorhandenen Angaben zu einem Vorliegen oder Nicht-Vorliegen einer zirrhotisch veränderten Leber bezogen. Patienten mit einem CCC entwickelten ihr Karzinom nur in 11,8% und somit zu einem signifikant geringeren Anteil aus einer

Zirrhose heraus. Dieser Unterschied im Vergleich zu HCC-Patienten wird auch in der Literatur beschrieben (Jodicke et al. 2020).

Den aktuellen Forschungsergebnissen entsprechend konnte auch in der vorliegenden Population bei Patienten mit einem HCC ein längeres Überleben nachgewiesen werden als bei Patienten mit einem CCC (Schönfeld und Kraywinkel 2018).

Den deutschen HCC wurde ein signifikant höheres T-Stadium, Staging sowie Child-Pugh-Stadium zugewiesen als den chinesischen HCC. Jedoch unterschieden sich die deutschen und chinesischen Lebertumore im Grading nicht signifikant voneinander. Daraus lässt sich schließen, dass die Chinesen zwar offensichtlich einen weniger weit fortgeschrittenen und kleineren Tumor besaßen, der aber bereits genauso entartet war. Einen möglichen Erklärungsansatz für diese Beobachtung stellt das engmaschige Screening bei den chinesischen Hochrisikopatienten dar, welches ein Erkennen des Karzinoms bereits im frühen Stadium ermöglicht. Seit 1970 haben sich in China verschiedene Früherkennungskonzepte etabliert, wobei vor allem Männer ab dem vierten Lebensjahrzent mit positiver Hepatitis-B-Serologie als Patienten mit hohem Risiko gelten und regelmäßigen Ultraschalluntersuchungen zugeführt werden (Chen et al. 2019). Chinesische Hochrisikopatienten sind aufgrund der Ätiologie des potenziellen Malignoms zusätzlich möglicherweise leichter identifizierbar, nehmen Screening-Angebote vermutlich eher wahr und können somit in einem niedrigeren Stadium detektiert werden. Die Ursache der HCC deutscher Patienten lag bei den Personen mit bekannter Ätiologie hauptsächlich im schädlichen Alkoholkonsum, welcher generell mit einer geringen Compliance gegenüber medizinischen Maßnahmen verbunden ist und somit mit einem verminderten Wahrnehmen von Früherkennungsprogrammen (Feuerlein 1982). Dies hat offensichtlich zur Folge, dass das HCC erst in einem späteren Stadium detektiert wird.

6.1.2. Expressionscharakteristika des PD-L1

Hepatozelluläre Karzinome

In der vorliegenden Arbeit wurden 51,2% der untersuchten HCC-Präparate mit histologisch auffindbarem Tumor als PD-L1-positiv ($IRS \geq 3$) gewertet. Chinesische

und deutsche Patienten unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Häufigkeit und Intensität der Expression des Liganden. Von den deutschen Patienten mit HCC exprimierten 55,8% den Liganden schwach, 27,9% mäßig und 16,3% stark. Bei den chinesischen Patienten mit HCC wurde der PD-L1 in 47,8% der Fälle als schwach, in 21,7% der Fälle als mäßig und in 30,4% der Fälle als stark ausgeprägt gewertet. Allerdings sollten diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden unter dem Aspekt, dass sich die Tumore der chinesischen Patienten in einem signifikant geringeren T-Stadium, Staging und Child-Pugh-Stadium befanden. Eine weitere Untersuchung, in der sich die klinischen Daten der Patienten bzw. der Tumore bei beiden Nationalitäten entsprechen, könnte eventuell andere Ergebnisse hervorbringen. Allerdings erscheint dies unwahrscheinlich, da die Höhe der PD-L1-Expression in der vorliegenden Population weder mit dem T-Stadium noch dem Staging oder dem Child-Pugh-Stadium korrelierte.

Jung et. al (2017) untersuchten Gewebeproben von Patienten mit HCC, die sich einer Resektion mit kurativem Therapieansatz unterzogen hatten, wobei sie die Herkunft oder die Bezeichnung des Anti-PD-L1-Antikörpers nicht in ihrer Studie erwähnten. Ihre Testpopulation entsprach in Bezug auf die Geschlechts- und Altersverteilung derjenigen der vorliegenden Arbeit. Bei 87,1% der Patienten in der Studie von Jung et. al. konnte eine Virushepatitis nachgewiesen werden. Die Autoren verwendeten für die Auswertung der von ihnen erzielten Färbungen einen Score, der sich jedoch von dem, der in der vorliegenden Arbeit benutzt wurde, unterschied. Sie bildeten die Summe aus den Punkten für die Färbeintensität (keine Färbung = 0 Punkte, schwache Färbung = 1 Punkt, mäßige Färbung = 2 Punkte, starke Färbung = 3 Punkte) und den Punkten für die Häufigkeit der Anfärbung von maligne entarteten Hepatozyten (< 10% = 0 Punkte, 10 - 50% = 1 Punkt, > 50% = 2 Punkte). Die PD-L1-Expression wurde bei einer Summe von 0 - 2 Punkten als niedrig und von 3 - 5 Punkten als hoch klassifiziert. Dabei ordneten sie mit ihrem Score 73,0% der von ihnen untersuchten HCC in Tumore mit einer geringen und 27,0% der analysierten HCC in Tumore mit einer hohen PD-L1-Expression ein. 25,9% der Tumore erreichten dabei eine Summe von 0-1, 47,1% 2 Punkte, 21,2% 3-4 Punkte und 5,8% 5 Punkte. Würde man bei den Färbeergebnissen von Jung et. al. den IRS der vorliegenden Arbeit anwenden, so würden lediglich 27,0% der HCC als positiv betrachtet werden, mit einer überwiegend schwachen Ausprägung des PD-L1. Die von Jung et al. (2017) beobachtete im Mittel nur schwache Expression des Liganden zeigte sich auch in

den Daten der vorliegenden Untersuchung (IRS-Mittelwert: 3,4). Der in der vorliegenden Arbeit allerdings im Vergleich zu der Studie von Jung et al. (2017) gefundene höhere Anteil an PD-L1-positiven HCC (51,2%) ist wahrscheinlich auf die höhere Sensitivität des Antikörpers 73-10 im Vergleich zu anderen kommerziellen Antikörpern wie SP142, 22C3, SP263 und 28-8 zurückzuführen (Jung et al. 2017, Tsao et al. 2018, Rösner et al. 2021).

Sideras et al. (2017) verwendeten in ihren Untersuchungen den Antikörper 405.9A11. Sie beschrieben eine Expression des PD-L1 in 82,9% der von ihnen analysierten HCC. Bei der immunhistochemischen Auswertung wurden jedoch bereits nur sehr schwach angefärbte HCC als positiv gewertet. Dabei gaben sie an, dass der Ligand in ihren Gewebeproben homogen exprimiert wurde, weswegen in den Untersuchungen lediglich die Intensität mit Punkten zwischen 0 und 3 bewertet wurde. Wie die Punkte vergeben wurden, wurde nicht weiter definiert, sondern anhand von histochemischen Bildern dargestellt (Sideras et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich der PD-L1 dagegen meist heterogen exprimiert. Die Verwendung dieses anderen Scores bei Sideras et al. (2017), welcher auf der Annahme einer homogenen Expression des Liganden basierte, hat vermutlich zu der höheren ermittelten Expressionsrate geführt. Ein weiterer Grund für die beobachteten Differenzen könnte auch im verwendeten Antikörper 405.9A11 liegen, der möglicherweise zu einer unterschiedlichen Anfärbung der Präparate geführt haben könnte. Die Daten von Sideras et al. (2017) bestätigen jedoch ebenfalls die eher schwache Ausprägung des Liganden in den HCC, da auch bei ihnen der durchschnittliche Score-Wert lediglich bei 0,5 lag.

Calderaro et al. (2016) klassifizierten Tumore als Liganden-positiv, wenn > 1% der maligne entarteten Hepatozyten angefärbt waren. Sie verwendeten für ihre Untersuchungen den Antikörper E1L3N, welcher nach den Angaben der Forschergruppe ausschließlich zu einer membranösen Färbung der Zellen führte. 17,0% der Tumore waren in dieser Studie positiv für den Liganden, mit einer im Mittel eher schwachen Expression (Calderaro et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorzellen allerdings sowohl membranständig als auch zytoplasmatisch angefärbt. In einer weiteren Studie, in der mehrere Anti-PD-L1-Antikörper (E1L3N, SP142, SP263, 22C3, 28-8) in Bezug auf den immunhistochemischen Nachweis des PD-L1 in HCC verglichen wurden, erbrachte der Antikörper E1L3N das schwächste

Immunsignal und zeigte eine geringere Sensitivität als die anderen untersuchten Antikörper (Smith et al. 2016, Pinato et al. 2019). In Verbindung mit den Ergebnissen von Tsao et al. (2018), die im Vergleich zu anderen Anti-PD-L1-Antikörpern eine sehr hohe Sensitivität des Klons 73-10 zeigen konnten, liefert das die Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete stärkere Anfärbung der HCC-Proben im Vergleich zu den mit dem Antikörper E1L3N erzielten Ergebnissen von Calderaro et al. (2016).

In die Metaanalyse von He et al. (2021) wurden insgesamt 13 Studien zu einer Anti-PD-L1- bzw. Anti-PD-1-Immuntherapie an HCC eingeschlossen. Sie berichteten über Ansprechraten bei den Patienten von durchschnittlich 17%, wobei die Raten in den unterschiedlichen Studien von 12% bis 64% reichten (12%, 12%, 12%, 13%, 15%, 15%, 15%, 17%, 17%, 18%, 20%, 64%). Bei 58% der Patienten konnte eine Krankheitsstabilisierung beobachtet werden. Diese lag in den unterschiedlichen Studien zwischen 35% und 82% (35%, 39%, 44%, 49%, 50%, 51%, 58%, 62%, 62%, 64%, 73%, 82%) (He et al. 2021). Bei jeweils einer Studie fehlten entweder die Angaben zu den Ansprechraten oder zur Krankheitsstabilisierung. Diese Zahlen lassen vermuten, dass zumindest 58% der Patienten den Liganden exprimiert haben müssen, um von der Immuntherapie profitieren zu können. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wonach 51,2% der HCC den Liganden exprimierten. Das spricht zum einen für eine gute Sensitivität des in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Antikörpers 73-10 und zum anderen für die Validität des verwendeten IRS-Scores von Remmele und Stegner sowie des gewählten Cut-off-Werts für eine PD-L1-Positivität. Die Unterschätzung der PD-L1-Expression durch die bisher verfügbaren Antikörper könnte auch eine mögliche Erklärung dafür liefern, dass sich beim HCC in den entsprechenden Studien bisher kein Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem objektiven Ansprechen auf die Immuntherapie gezeigt hat wie in CheckMate 040, Keynote 224 und weiteren Studien (Onuma et al. 2020). Die mit dem Antikörper 73-10 erzielten Ergebnisse scheinen dagegen dem wahren Wert der PD-L1-Expression im HCC sehr nah zu kommen.

In einer Studie an Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte bei der Untersuchung der PD-L1-Expression mit dem Antikörper 73-10 eine Anfärbung bei 21 der 43 Tumore (48,8% der Fälle) mit einem

durchschnittlichen IRS-Wert von 3,53 beobachtet werden. Diese Expression des Liganden beim Lungenkarzinom entspricht ungefähr der PD-L1-Ausprägung beim HCC in der vorliegenden Arbeit (51,2% PD-L1-positive Fälle, IRS-Mittelwert: 3,4). Laut der Literatur profitieren 20 bis 40% der Patienten mit einem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom von einer Anti-PD-L1- oder Anti-PD-1-Immuntherapie (Rösner et al. 2021). In einer weiteren Untersuchung wurde mit dem Klon 73-10 die PD-L1-Expression in bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien charakterisiert. Hierbei wurden 82 der 97 Tumore (84,5% der Fälle) als PD-L1-positiv eingestuft, mit einer durchschnittlich mäßigen Expression (Mittelwert: 5,67) (Rösner et al. 2021). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der PD-L1 in anderen Tumorentitäten sehr viel häufiger und intensiver exprimiert wird als in HCC. Die im Vergleich seltenere und nur leichte Expression des Liganden in der vorliegenden Arbeit in Kombination mit den oben aufgeführten, eher geringen Ansprechraten des HCC (im Mittel 17%) auf eine entsprechende Immuntherapie, wirft die Frage auf, inwieweit der PD-L1 als Target bei der Therapie des hepatozellulären Karzinoms sinnvoll ist. Eine Monotherapie mit einem Anti-PD-1- oder Anti-PD-L1-Antikörper erscheint vor dem Hintergrund der vorliegenden Zahlen nicht ausreichend, weswegen es einer weiteren Erforschung der Immuntherapie als Kombinationstherapie bedarf.

Letztlich bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit das Vorkommen des PD-L1 in hepatozellulären Karzinomen und stimmen mit den Angaben in der vorhandenen Literatur auch insofern überein, dass die Expression des Liganden in HCC eher schwach ausgeprägt ist. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen den HCC zugrundeliegenden Ätiologien bzw. den Herkunftsländern der Gewebeproben gefunden werden.

Insgesamt sind die Angaben in der Literatur hinsichtlich der Häufigkeit und der Intensität der Expression des PD-L1 in HCC keinesfalls einheitlich. Dies lässt sich durch die verschiedenen verwendeten Scores und Antikörper sowie die unterschiedlichen Cut-off-Werte für eine Positivität erklären. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen der in den verschiedenen Studien vorgefundenen PD-L1-Negativität der Tumore und dem dennoch eingetretenen Ansprechen auf die Immuntherapie könnte die geringe Sensitivität der eingesetzten Antikörper sein. Durch die Verwendung des Klons 73-10 könnte in Zukunft durch eine sensitivere Bestimmung der PD-L1-Expression möglicherweise eine exaktere Vorhersage

getroffen werden, welche Patientengruppe von der Anti-PD1-/PD-L1-Antikörpertherapie profitieren könnte. Aufgrund der eher geringen Expression des Liganden in HCC im Vergleich zu anderen Tumorentitäten sollte aber ein Einsatz dieser Therapie als Monotherapie, wie bereits oben erwähnt, eher kritisch gesehen werden. Der Fokus sollte in Zukunft eher auf Kombinationstherapien liegen.

Tumorumgebung der hepatozellulären Karzinome

In der Tumorumgebung von HCC konnte mit 60,5% aller untersuchten Gewebeproben häufiger eine PD-L1-Positivität verzeichnet werden als im Tumor selbst, mit 51,2% der Fälle. In den Lebern der deutschen Patienten war der PD-L1 signifikant öfter ausgeprägt als in den Lebern der Chinesen (69,3% vs. 46,9% der Fälle). Möglicherweise lässt sich dieser deutliche Unterschied auf die unterschiedliche Ätiologie der Tumore zurückführen. Dies würde jedoch den Forschungsergebnissen von Sideras et al. (2017) widersprechen, die keinen Unterschied hinsichtlich der Ausprägung des Liganden im den Tumor umgebenden Gewebe in Abhängigkeit von der Ursache des HCC feststellen konnten. In der vorliegenden Arbeit war der Ligand bei den Tumorumgebungen der chinesischen Patienten, wenn er ausgeprägt war, zwar statistisch nicht signifikant, aber dennoch stärker exprimiert. So lag der durchschnittliche IRS der in Bezug auf den Liganden als positiv ($IRS \geq 3$) klassifizierten Tumorumgebungen bei den chinesischen Patienten bei 8,3 und bei den deutschen Patienten bei 7,0. Auch der durchschnittliche IRS aller tumorumgebenden Gewebe der deutschen und chinesischen Patienten war mit 5,1 signifikant höher als der IRS im Tumor selbst (durchschnittlicher IRS: 3,4). Hier findet sich eine weitere mögliche Erklärung dafür, dass einige Patienten von der Immuntherapie profitieren, obwohl eine Expression des Liganden im Tumor selbst nicht nachgewiesen werden konnte. Das tumorumgebende Gewebe könnte bei diesen Liganden-negativen Patienten dennoch den PD-L1 exprimiert haben und somit die Wirksamkeit der Immuntherapie erklären.

Sideras et al. (2017) bemerkten unter Verwendung des Antikörpers 405.9A11 in den nicht maligne entarteten Hepatozyten, die den Tumor umgaben, ebenfalls eine höhere Expression des PD-L1 als im Tumor selbst. So zeigte sich der Ligand in 95,8% der Tumorumgebungen und nur in 82,9% der Fälle in den eigentlichen

Tumoren. Die von Sideras et al. (2017) beobachtete hohe Ausprägung des Liganden nicht nur im Tumor, sondern auch in der Tumorumgebung lässt sich dadurch erklären, dass bereits sehr schwach positiv gefärbte Präparate als PD-L1-positiv gewertet wurden, eine homogene Expression des Liganden angenommen und dementsprechend auch ein anderes immunhistochemisches Auswertungssystem genutzt wurde (siehe oben). Aufgrund ihrer Ergebnisse untersuchten Sideras et al. (2017) in einer weiteren Kohorte von HCC-Patienten die Expression der mRNA des PD-L1 sowohl in den Tumorzellen als auch in dem tumorumgebenden Gewebe. Auch hier zeigte sich, dass die mRNA des Liganden mindestens genauso stark in der Tumorumgebung auftritt wie im Tumor. Darüber hinaus fanden sie, wie auch die vorliegende Arbeit, dass die Tumorumgebung auf Proteinebene eine statistisch signifikant stärkere Intensität der PD-L1-Expression aufweist als der Tumor selbst.

Den vorliegenden Ergebnissen leicht widersprechende Beobachtungen machten dagegen Shi et al. (2011). Sie fanden zwar ebenfalls eine PD-L1-positive Tumorumgebung vor, die HCC selbst hatten allerdings den Liganden deutlich häufiger ausgeprägt. Anders als in der vorliegenden Arbeit waren die von ihnen analysierten Tumorumgebungen jedoch immer zirrhotisch verändert. Auch lagen sie 5-10 cm vom Tumor entfernt und befanden sich nicht wie in der vorliegenden Arbeit in unmittelbarer Umgebung des HCC. Weiterhin unterschied sich der von Shi et al. verwendete Antikörper von Biolegend (San Diego, CA, USA) von dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper (Shi et al. 2011).

Dai et al. (2017) fanden mit dem monoklonalen Antikörper 2B11D11 in 31,1% der Gewebeproben den Liganden im tumorumgebenden Gewebe vor, was deutlich niedriger als in der vorliegenden Arbeit ist. Allerdings ist der von ihnen benutzte Antikörper weniger sensitiv als der Klon 73-10 (Rösner et al. 2021).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen also die in der Literatur vorgefundenen Ergebnisse hinsichtlich einer PD-L1-Expression im tumorumgebenden Gewebe eines HCC und liefern einen weiteren Erklärungsansatz für das Ansprechen der Immuntherapie bei PD-L1-negativen Tumorpatienten.

Cholangiozelluläre Karzinome

Insgesamt 42,3% aller CCC waren in der vorliegenden Arbeit positiv für den PD-L1. Die CCC exprimierten somit den PD-L1 seltener als die HCC, die in 51,2% der Fälle PD-L1-positiv waren. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Im Mittel war der PD-L1 in den CCC nur schwach exprimiert (IRS = 2,6).

Die prozentuellen Angaben zu den Liganden-positiven CCC in den Untersuchungen in der Literatur variieren zwischen 10 und 70% (Rizzo et al. 2021). Sabbatino et al. (2016) untersuchten mit dem monoklonalen Antikörper 22C3 27 iCCC hinsichtlich einer Expression des PD-L1. Dabei konnten sie das Protein nur in 8 (29,6%) der Tumore nachweisen. Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen benutzten sie ein anderes Klassifikationssystem als das in der vorliegenden Arbeit. Sie vergaben Punkte von 0 bis 5: 0 Punkte = PD-L1-negativ, 1 Punkt = sehr geringe Expression, 2 Punkte = geringe Expression, 3 Punkte = moderate Expression, 4 Punkte = hohe Expression, 5 Punkte = sehr hohe Expression. Dabei klassifizierte die Arbeitsgruppe die Expression in den 8 PD-L1-positiven Tumoren in 1 Fall als sehr gering, in 2 Tumoren als gering, in 2 CCC als moderat, in 2 Tumoren als hoch und in 1 Fall als sehr hoch (Sabbatino et al. 2016).

Lin et al. (2018) konnten den Liganden in 18,0% der von ihnen untersuchten CCC nachweisen. Sie verwendeten dabei den Anti-PD-L1-Antikörper E1L3N, den schon Calderaro et al. (2016) für die Untersuchungen der HCC verwendet hatten, und definierten den Tumor als PD-L1-positiv, wenn mehr als 5% der Tumorzellen angefärbt waren (Lin et al. 2018).

Kitano et al. (2020) verwendeten den gleichen Antikörper-Klon wie Lin et al. (2018) und definierten das CCC als PD-L1-positiv, wenn in allen malignen Zellen eine leichte Färbung zu verzeichnen war oder mindestens 25% der Tumorzellen sich mäßig anfärbten. In ihrer Untersuchung exprimierten 30,5% der CCC den Liganden (Kitano et al. 2020).

Alle drei Autorengruppen, Sabbatino et al. (2016), ebenso wie Lin et al. (2018) und Kitano et al. (2020), verwendeten in ihren Untersuchungen mit den Klonen 22C3 und E1L3N Antikörper, die sich in der Literatur an anderen Tumorentitäten als weniger sensitiv herausgestellt hatten (Tsao et al. 2018, Rösner et al. 2021).

Auch in der Immuntherapie des CCC konnte wie beim HCC kein Zusammenhang zwischen dem PD-L1-Status und dem Therapieerfolg ausgemacht werden. In der Literatur gibt es nur wenige Studien zur Monotherapie mit einer Anti-PD-1- oder Anti-PD-L1-Immuntherapie bei CCC. In einer Phase-II-Studie an einer japanischen Kohorte konnte eine Ansprechrates von 3% ausgemacht werden. In einer weiteren Phase-II-Studie aus Amerika wurden dagegen Ansprechrates von 22% beobachtet, wobei sich bei 60% der Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung erzielen ließ. In einer dritten Phase-II-Studie wurden Patienten mit fortgeschrittenem cholangiozellulären Karzinom eingeschlossen. Dabei sprachen 5,8% der Patienten auf die Therapie an und bei 16% stabilisierte sich die Erkrankung. Die Patienten der drei Studien waren zuvor erfolglos mit mindestens einer Standardtherapie behandelt worden (Jakubowski und Azad 2020). Anhand dieser wenigen Zahlen ist es nur schwer möglich, das wahre Ausmaß der PD-L1-Expression in CCC abzuschätzen. Dieses bewegt sich vermutlich im Bereich zwischen 16% und 60%. Mit einer Expression des PD-L1 in 42,3% der untersuchten CCC widerspricht der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Wert also nicht der Literatur. Aufgrund der noch geringeren Ansprechrates (3%, 22%, 5,8%) bei CCC-Patienten im Vergleich zu Patienten mit einem HCC (durchschnittliche Ansprechrates 17%) kann aber davon ausgegangen werden, dass der Ligand in CCC geringer exprimiert wird als in HCC, was sich auch in der vorliegenden Arbeit zeigte. Es bedarf allerdings weiterer Untersuchungen zur Immuntherapie und zur PD-L1-Expression in CCC.

Abschließend lässt sich also in der Zusammenschau der Literatur und den vorliegenden Ergebnissen sagen, dass der PD-L1 in CCC geringer exprimiert wird als in HCC. Die Expression in CCC ist vermutlich nicht ausreichend für eine suffiziente Behandlung des Karzinoms mit einer Anti-PD-1- oder Anti-PD-L1-Monotherapie.

Tumorumgebung der cholangiozellulären Karzinome

In der Tumorumgebung der CCC konnte eine Positivität für den PD-L1 in 62,5% der Gewebeproben nachgewiesen werden und somit ebenfalls in mehr Proben als im Tumor selbst, mit einer Positivität von 42,3% der Präparate. Von den positiven Proben waren 33,3% schwach, 40,0% mäßig und 26,7% stark angefärbt. Mit 4,9

unterschied sich der durchschnittliche IRS aller Gewebeproben der Tumorumgebung der CCC dabei signifikant vom durchschnittlichen IRS der Tumore selbst, der bei 2,6 lag.

In der Literatur lassen sich keine vergleichbaren Ergebnisse hinsichtlich der PD-L1-Expression in dem die CCC umgebenden Gewebe finden. Lediglich Sabbatino et al. (2016) beschreiben in 70,4% der Tumorumgebungen eine Positivität für den PD-L1. Sie definieren ihre Tumorumgebungen allerdings als tumorinfiltrierende Lymphozyten und fibröse Septen, so dass keine Vergleichbarkeit mit den vorliegenden Daten gegeben ist.

Ebenso wie beim HCC findet sich auch hier eine mögliche Erklärung dafür, dass auch PD-L1-negative Tumore auf eine Immuntherapie ansprechen können, da das tumorfreie umgebende Gewebe den Liganden exprimieren kann. Eine weitere Erforschung der PD-L1-Expression im tumorumgebenden Gewebe beim CCC kann hier weitere Erkenntnisse bringen.

Die aufgeführten Studien lassen erkennen, dass ein Vergleich hinsichtlich der Expressionscharakteristika des PD-L1 zwischen den Studien sowie mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur schwer gezogen werden kann. Es lässt sich allerdings ableiten, dass der Ligand in HCC wohl eher nur schwach exprimiert wird. In CCC scheint die Expression noch geringer auszufallen. Unterschiedliche Bewertungssysteme können zu anderen Ergebnissen hinsichtlich der Positivität von Präparaten für den Liganden führen und es kommt durch die Verwendung von verschiedenen Antikörpern zu unterschiedlichen Färbeargebnissen. Literaturdaten und die Ergebnisse der eigenen Forschungsgruppe legen nahe, dass der Antikörper 73-10 eine höhere Sensitivität aufweist als andere kommerziell verfügbare Antikörper (Tsao et al. 2018, Rösner et al. 2021). Um vergleichbare Ergebnisse zu schaffen, wären weitere Untersuchungen anzustreben, die den Antikörper 73-10 und optimalerweise ein einheitliches Bewertungssystem für die Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen verwenden.

6.1.3. Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und klinischen sowie weiteren histopathologischen Parametern

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es unter anderem auch, Zusammenhänge zwischen der Expression des PD-L1 und klinischen Parametern sowie weiteren in HCC oder CCC typischerweise exprimierten Rezeptoren zu finden.

Hepatozelluläre Karzinome

Die Ausprägung des Liganden in den **HCC** der deutschen Patienten zeigte dabei einen positiven Zusammenhang mit der Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR4 ($r = 0,232$, $p = 0,036$), wohingegen bei den chinesischen HCC eine negative Korrelation zwischen der Expression des PD-L1 und des CXCR4 gefunden wurde ($r = -0,313$, $p = 0,032$). Der Rezeptor CXCR4 wird vor allem in hochmalignen HCC exprimiert. Er besitzt außerdem einen negativen prognostischen Aussagewert (Neve Polimeno et al. 2015). Darüber hinaus konnte bei den chinesischen Patienten auch ein negativer Zusammenhang zwischen der Expression des Liganden und dem Somatostatin-Rezeptor SSTR5 ($r = -0,309$, $p = 0,034$) sowie eine positive Korrelation mit dem Proliferationsmarker Ki-67 ($r = 0,513$, $p = 0,012$) gefunden werden. Die Expression des SSTR5 im HCC ist mit einem längeren Überleben assoziiert (Liu et al. 2013), wohingegen ein hoher Proliferationsindex Ki-67 mit einem kürzeren Überleben einhergeht und somit einen negativen prognostischen Aussagewert besitzt (Luo et al. 2015). Insgesamt scheint die PD-L1-Expression im HCC bei den deutschen Patienten eher mit negativen und bei den chinesischen Patienten sowohl mit negativen als auch mit positiven Prognosefaktoren assoziiert zu sein, so dass in der Zusammenschau die Datenlage hier nicht eindeutig ist. In Untersuchungen aus der eigenen Forschungsgruppe an bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien, in denen ebenfalls der Antikörper 73-10 sowie der gleiche Score für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen verwendet wurde wie in der vorliegenden Arbeit, konnten negative Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und der Expression der Somatostatinrezeptoren sowie positive Korrelationen zwischen dem PD-L1- und der CXCR4- sowie der Ki-67-Expression gefunden werden, so dass zumindest in dieser Tumorentität die Expression des PD-L1 tendenziell eher mit einer negativen Prognose assoziiert zu sein scheint (Rösner et al. 2021). Weitere

Untersuchungen mit höheren Fallzahlen sind daher für eine abschließende Beurteilung der prognostischen Wertigkeit des PD-L1 bei HCC und eventueller Unterschiede in Abhängigkeit von der der Erkrankung zugrundeliegenden Ätiologie oder der Ethnie notwendig.

Die PD-L1-Expression in der **Tumorumgebung** deutscher und chinesischer HCC korrelierte negativ mit den Laborparametern ASAT ($r = -0,397$, $p = 0,001$), ALAT ($r = -0,365$, $p < 0,001$) und GGT ($r = -0,375$, $p = 0,001$). Durch die Literatur ließ sich die negative Korrelation der Expression des Liganden in der Tumorumgebung mit der Höhe der ALAT nicht bestätigen. So zeigte sich keine Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und der Höhe der ALAT (Dai et al. 2017). Für die beiden anderen Werte fand sich keine entsprechende Literatur. Hohe Werte der ALAT in einer zirrhotisch veränderten Leber sind häufiger mit der Entwicklung eines HCC assoziiert als niedrige Werte (Miyakawa et al. 2009). Daraus lässt sich wiederum ableiten, dass die Expression des PD-L1 in der Tumorumgebung mit einer besseren Prognose einhergehen könnte.

Cholangiozelluläre Karzinome

Zwischen der Expression des PD-L1 in den **CCC** bzw. in den umliegenden nicht-malignen Zellen und den klinischen oder anderen histologischen Parametern fanden sich fast keine Korrelationen. Es konnte lediglich ein positiver Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression im Karzinom und der Tumogröße verzeichnet werden ($r = 0,720$, $p = 0,029$). In der Literatur konnte eine entsprechende Korrelation allerdings nicht gefunden werden (Xie et al. 2020). Große CCC gehen mit einem schlechteren Überleben einher als kleine (Kong et al. 2021). Die Expression des Liganden im CCC scheint daher eher mit einer negativen Prognose assoziiert zu sein.

Die Ausprägung des Liganden in der **Tumorumgebung** der CCC zeigte einen starken negativen Zusammenhang mit der Höhe des Tumormarkers CA 19-9 im Serum ($r = -0,782$, $p = 0,038$). Da hohe CA 19-9-Spiegel bei cholangiozellulären Karzinomen mit einer schlechteren Prognose verbunden sind als niedrigere Konzentrationen (Paik et al. 2008), lässt dies daraus schließen, dass die Expression des PD-L1 in der Tumorumgebung eines CCC wie auch bei HCC eher mit einer

günstigen Prognose assoziiert zu sein scheint, was der oben gemachten Aussage widerspricht und die Uneindeutigkeit der Datenlage zur prognostischen Wertigkeit der PD-L1-Expression in CCC ebenso wie bei den HCC unterstreicht. Für eine abschließende Beurteilung sind auch hier weitere Studien mit deutlich größeren Fallzahlen notwendig.

6.2. Gesunde Resektionsränder von Operationspräparaten verschiedener benignen und malignen Leberveränderungen

6.2.1. Patientendaten

Die Patientendaten zeigen hinsichtlich der Alters- und Geschlechterverteilung und des BMI einen repräsentativen Querschnitt der deutschen Bevölkerung. Der Nikotin- und Alkoholkonsum war dagegen sogar etwas geringer ausgeprägt als in der Allgemeinbevölkerung (Glaesmer und Brähler 2002, Robert-Koch-Institut 2017b, Robert-Koch-Institut 2017a, Wiessner et al. 2020).

6.2.2. PD-L1-Expressionscharakteristika

In den im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben war der PD-L1 in den gesunden Resektionsrändern von HCC, CCC und Gallenblasenkarzinomen am häufigsten exprimiert und auch der durchschnittliche PD-L1-IRS war hier von allen untersuchten Gewebeproben am höchsten. Dabei lag der Prozentsatz der PD-L1-positiven Lebergewebe mit 50,0% der Resektionsränder bei den HCC, 40,0% der Fälle bei den CCC und 75,0% der Proben bei den Gallenblasenkarzinomen weitestgehend auf dem Niveau der PD-L1-Positivität der Tumorumgebungen in der ersten Testpopulation, was für eine gute Reliabilität der vorliegenden Untersuchungen spricht. Die leichten Abweichungen sind vermutlich der geringen Anzahl an Proben geschuldet. Aber auch in den gesunden Anteilen der Lebern mit einer Metastase eines neuroendokrinen Tumors war der Ligand in 50,0% der Gewebeproben aufzufinden. Die Datenlage in der Literatur in Hinblick auf die Expression des PD-L1 in neuroendokrinen Tumoren selbst ist widersprüchlich und zudem wenig erforscht. Manche Studien konnten eine hohe Expression zeigen (PD-L1-Positivität in 75,0% der Fälle) (Hasegawa et al. 2021), während andere

Literaturangaben nur von einer geringen Präsenz des Liganden berichten (lediglich 3,0% PD-L1-positive Tumore) (Ali et al. 2020). Untersuchungen zur Ausprägung des PD-L1 im tumorumgebenden, benignen Gewebe bei neuroendokrinen Tumoren bzw. deren Metastasen gibt es in der Literatur nicht. Eine genauere Erforschung der Expression des Liganden in den neuroendokrinen Tumoren, ihren Metastasen und im tumorumgebenden Gewebe erscheint lohnend. Schließlich könnte die Hochregulation des Liganden in der Tumorumgebung ebenfalls therapeutisch genutzt werden. Interessant wäre es auch, weitere Proben von gesunden Resektionsrändern von Lebern mit Metastasen eines Ovarialkarzinoms zu untersuchen, um die in der einzigen verfügbaren Gewebeprobe vorgefundene PD-L1-Expression entweder weiter untermauern oder aber relativieren zu können.

Eine Gewebeprobe einer Leber mit chronischer Cholangitis erreichte in der zweiten Testpopulation mit einem IRS von 9,0 den Höchstwert. Auch ein weiterer gesunder Schnittrand von einer Leber mit einem Adenom wies einen hohen IRS von 7,5 auf. Welche Art von Adenom der Patient hatte und ob es sich dabei womöglich um ein β -Catenin-positives Adenom gehandelt hat, welches mit einem hohen Risiko einer malignen Entartung einhergeht, geht aus den Daten nicht hervor. Beide Patienten wiesen jedoch auch erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins auf, welches meist mit einem entzündlichen Geschehen einhergeht (Bogner 2021). Die verstärkte Expression des Liganden kann daher auch auf einen in beiden Proben vorliegenden entzündlichen Prozess zurückgeführt werden. Diese Hypothese wird durch Befunde in der Literatur gestützt, in denen bereits eine Hochregulation des PD-L1 bei entzündlichen Prozessen in der Leber aufgezeigt werden konnte (Kassel et al. 2009). Diese Hochregulation kann wiederum durch die physiologische Funktion des PD-L1 erklärt werden, eine überschießende Immunantwort bei vorliegender entzündlicher Veränderung des Gewebes zu verhindern (Yang et al. 2009, Roos et al. 2018).

6.2.3. Vergleich der PD-L1-Expression zwischen der ersten und zweiten Testpopulation sowie zwischen den verschiedenen Patientengruppen der zweiten Testpopulation

Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, ist ein Vergleich zwischen dem die Tumore umgebenden nicht-malignen Lebergewebe der **ersten Testpopulation** und den

gesunden Resektionsrändern der **zweiten Testpopulation** nur bedingt möglich. Die Gewebe der ersten Testgruppe befanden sich direkt um den Tumor herum und standen somit in direkter Wechselwirkung mit diesem. Die Leber-Resektionsränder der zweiten Gruppe von Patienten hatten jedoch räumlich etwas mehr Abstand zur benignen oder malignen Veränderung oder den Metastasen. Aus Gründen der Gefäßversorgung werden bei der Leber immer ganze Segmente reseziert oder eine Hemihepatektomie durchgeführt, weswegen die Gewebeproben der zweiten Patientengruppe nicht aus der unmittelbaren Umgebung der benignen oder malignen Veränderung stammten. Vergleicht man die Häufigkeit und die Intensität der PD-L1-Expression der Tumorumgebungen der ersten Testpopulation mit den Resektionsrändern *der HCC, der CCC und der Gallenblasenkarzinome* der zweiten Patientengruppe, so fand sich allerdings kein signifikanter Unterschied.

Innerhalb der **zweiten Testpopulation** konnte dagegen ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Intensität und Häufigkeit der Expression des PD-L1 zwischen den Resektionsrändern *der HCC, der CCC und der Gallenblasenkarzinome* und den *Resektionsrändern der Adenome, der chronischen Cholangitiden und der Metastasen* gefunden werden, mit höheren Werten bei den Gewebeproben der ersteren Gruppe. In verschiedenen Studien konnte bereits eine Hochregulation des PD-1 bzw. des PD-L1 mit dem Fortschreiten der Leberzirrhose hin zum Leberzellkarzinom festgestellt werden (Shi et al. 2011, Makarova-Rusher et al. 2015). Interessant wäre es zu erforschen, ab wann es genau zu dieser verstärkten Ligandenexpression kommt. Falls diese sich bereits vor der eigentlichen malignen Entartung im Lebergewebe nachweisen lassen sollte, könnte die vermehrte PD-L1-Expression als prognostischer Faktor dienen und die Immuncheckpointinhibitoren eventuell sogar präventiv eingesetzt werden.

6.2.4. Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression und weiteren klinischen Parametern

Tumorfreie Resektionsränder der HCC, CCC und Gallenblasenkarzinome

Die Expression des PD-L1 in den tumorfreien Resektionsrändern von HCC, CCC und Gallenblasenkarzinomen korrelierte positiv mit der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit ($r = 0,566$, $p = 0,009$), dem aktivierten Fibrinogen ($r = 0,522$, $p = 0,018$) und dem CRP ($r = 0,624$, $p = 0,004$). Negativ korrelierten die PD-L1-IRS-Werte dagegen mit der Albumin- ($r = -0,565$, $p = 0,009$) und der Laktatkonzentration im Serum ($r = -0,898$, $p = 0,002$). Der negative Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression im tumorumgebenden Gewebe und der Albuminkonzentration lässt sich durch die Literatur bestätigen (Dai et al. 2017). Niedrige Albuminspiegel können Zeichen einer Leberschädigung sein, z.B. im Rahmen von entzündlichen Prozessen, der Entstehung einer Leberzirrhose oder von toxischen Einflüssen. Sie können aber auch durch ausgedehnte maligne Tumore bedingt sein (Gressner und Gressner 2019). Die erhöhte PD-L1-Expression in den untersuchten Leberproben könnte daher ein indirekter Hinweis auf das Vorliegen entzündlicher, zirrhotischer oder maligner Prozesse sein. Wie bereits oben erwähnt, konnte in der Literatur bereits eine Hochregulation des PD-L1 bei entzündlichen Prozessen in der Leber aufgezeigt werden (Kassel et al. 2009). Die in der vorliegenden Arbeit vorgefundene positive Korrelation der PD-L1-Expression mit der Höhe des CRP in den Resektionsrändern von HCC, CCC und Gallenblasentumoren ist daher wahrscheinlich auf diesen Zusammenhang zurückzuführen, da diese Tumore häufig auf dem Boden einer chronischen Entzündung der Leber und einer daraus sich entwickelnden Leberzirrhose entstehen. Die positive Korrelation der PD-L1-Expression mit der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit und dem aktivierten Fibrinogen, welche bei einer Leberzirrhose häufig erhöht sind (Caspary et al. 2013), in den Resektionsrändern der HCC, der CCC und der Gallenblasenkarzinome war daher zu erwarten. In den Untersuchungen von Nie et al. (2021) konnte bei Patienten mit Hepatitis-B-assoziiierter dekompensierter Leberzirrhose eine Korrelation zwischen der Höhe des Laktats und der Überlebenswahrscheinlichkeit festgestellt werden. Patienten mit hohen Laktat-Werten verstarben mit größerer Wahrscheinlichkeit innerhalb der nächsten 6 Monate (Nie et al. 2021). Auch andere Forschergruppen konnten den negativen Prognosewert von hohen Laktatkonzentration in Hinblick auf

das Überleben sowie eine Assoziation der Laktatwerte mit der Entwicklung von Metastasen aufzeigen (Walenta et al. 2000, Walenta und Mueller-Klieser 2004). Aufgrund der in der vorliegenden Untersuchung beobachteten negativen Korrelation zwischen der PD-L1-Expression im Resektionsrand der primären Lebertumore und der Laktatkonzentration scheint die PD-L1-Ausprägung im gesunden Lebergewebe bei primären Lebertumoren möglicherweise mit einer positiveren Prognose assoziiert zu sein. Dieser Zusammenhang wurde auch bereits oben bei der Auswertung der an den direkten Tumorumgebungen der HCC und CCC erhobenen Befunde vermutet.

Tumorfremie Resektionsränder der Adenome, der chronischen Cholangitiden und der Metastasen

Der PD-L1-IRS in den Resektionsrändern der Adenome, der chronischen Cholangitiden und der Metastasen zeigte eine negative Korrelation mit der Höhe der Albuminkonzentration im Serum ($r = -0,258$, $p = 0,013$) sowie mit dem MCH ($r = -0,277$, $p = 0,008$) und dem MCHC ($r = -0,236$, $p = 0,024$). Wie bereits oben erwähnt, werden niedrige Albumin-Werte mit chronischen Entzündungen, aber auch malignen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Gressner und Gressner 2019). Niedrige MCH- oder MCHC-Konzentrationen finden sich häufig bei einer Anämie aufgrund einer chronischen Erkrankung. So entwickeln 50% der Patienten mit soliden Tumoren diese Anämieform (Link 2009, Burdach 2015).

7. Schlussfolgerungen

Die in der vorliegenden Arbeit mit dem Antikörper 73-10 ermittelte PD-L1-Positivität in HCC und CCC stimmt insgesamt mit den in der Literatur berichteten therapeutischen Ansprechraten besser überein als die mit den bisher eingesetzten diagnostischen Antikörpern erzielten Färbeergebnisse. Dies spricht sehr für die Sensitivität und Spezifität des Antikörpers 73-10 und bestätigt somit die ersten Untersuchungsergebnisse von verschiedenen Arbeitsgruppen. Möglicherweise haben die bisher in den therapeutischen Studien eingesetzten Antikörper zu einer Unterschätzung der PD-L1-Expression im Gewebe geführt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den in der Literatur aufgeführten Widerspruch zwischen einem Ansprechen auf die Immuntherapie trotz PD-L1-negativem Tumor sein. Mit einer jedoch durchschnittlich nur schwachen Expression des Liganden sowohl in den HCC als auch insbesondere in den CCC, sollte die Immuntherapie als Monotherapie bei beiden Tumorentitäten allerdings kritisch betrachtet werden. Der Fokus sollte in Zukunft daher eher auf der Erforschung von Kombinationstherapien liegen.

Eine signifikant häufigere und intensivere PD-L1-Expression als im Tumor selbst zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung jedoch im tumorumgebenden, nicht-malignen Gewebe. Bei der Untersuchung von Patienten auf eine mögliche Eignung für eine Immuntherapie sollte also unbedingt das tumorumgebende Gewebe mitbetrachtet werden. Unter Verwendung des sensitiven Antikörpers 73-10 könnte die Identifikation derjenigen Patienten ermöglicht werden, die von einer Anti-PD-L1-Immuntherapie tatsächlich profitieren.

In Bezug auf die prognostische Aussagekraft der PD-L1-Expression bei HCC oder CCC sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und auch die bisherige Datenlage in der Literatur nicht eindeutig. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig. Darüber hinaus scheint der PD-L1 bei entzündlichen Prozessen verstärkt exprimiert zu sein. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Präsenz und möglicherweise auch die Entstehung eines HCC oder CCC mit einer vermehrten Expression des Liganden im tumorumgebenden, (noch) nicht maligne entarteten Lebergewebe assoziiert zu sein scheint. Interessant wäre es, zu erforschen, ab wann der PD-L1 exprimiert und ob dieser möglicherweise bereits vor der Entartung verstärkt ausgeprägt wird. In diesem Fall könnte die Immuncheckpointtherapie bereits präventiv eingesetzt werden.

8. Literaturverzeichnis

- Albrecht T. 2008. [HCC screening]. *Radiologe*, 48 (1):33-38.
- Ali AS, Langer SW, Federspiel B, Hjortland GO, Grønabæk H, Ladekarl M, Welin S, Weber Vestermark L, Arola J, Osterlund P, Knigge U, Sørbye H, Micke P, Grimelius L, Grönberg M, Tiensuu Janson E. 2020. PD-L1 expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms grade 3. *PLOS ONE*, 15 (12):e0243900.
- AWMFOonline. 2013. S3-Leitlinie des hepatozellulären Karzinoms. https://www.wmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-053OLI_S3_Hepatozellul%C3%A4res_Karzinom_Diagnostik_Therapie_2013-abgelaufen.pdf.
- Bedke J, Stuhler V, Todenhofer T, Stenzl A. 2018. [Mode of action, new targets and potential biomarkers in modern immunotherapy]. *Urologe A*, 57 (11):1301-1308.
- Berger KN, Pu JJ. 2018. PD-1 pathway and its clinical application: A 20 year journey after discovery of the complete human PD - 1 gene. *Gene*, 638:20-25.
- Bogner JR. 2021. C-reaktives Protein (CRP). *MMW - Fortschritte der Medizin*, 163 (5):52-53.
- Burdach S. 2015. Differenzialdiagnose der Anämie. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 163 (1):18-27.
- Bussar-Maatz R, Weissbach L, Dahlmann N, Mann K. 1993. [The "false positive" tumor marker in malignant testicular tumor]. *Urologe A*, 32 (3):177-182.
- Calderaro J, Rousseau B, Amaddeo G, Mercey M, Charpy C, Costentin C, Luciani A, Zafrani E-S, Laurent A, Azoulay D, Lafdil F, Pawlotsky J-M. 2016. Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship With clinical and pathological features. *Hepatology*, 64 (6):2038-2046.
- Caspary, Leuschner, Zeuzem. 2013. Therapie von Leber-und Gallekrankheiten.
- Chen J-G, Zhang Y-H, Lu L-L, Chen H-Z, Shen A-G, Zhu Y-R. 2019. Liver cancer screening in China: practices and its extended questions. *Hepatoma Research*, 2019.
- Czauderna C, Marquardt JU, Galle PR, Wörns MA. 2017. [Hepatocellular carcinoma]. *Internist (Berl)*, 58 (5):469-479.
- Dai X, Xue J, Hu J, Yang S-L, Chen GG, Lai PBS, Yu C, Zeng C, Fang X, Pan X, Zhang T. 2017. Positive Expression of Programmed Death Ligand 1 in Peritumoral Liver Tissue is Associated with Poor Survival after Curative Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Translational Oncology*, 10 (4):511-517.
- DGHO. 2019. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/maligne-biliaere-tumoren/@@guideline/html/indexhtml>.
- Donisi C, Puzzoni M, Zirano P, Lai E, Mariani S, Saba G, Impera V, Dubois M, Persano M, Migliari M, Pretta A, Liscia N, Astara G, Scartozzi M. 2021. Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of HCC. *Frontiers in Oncology*, 10.
- El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, Kim T-Y, Choo S-P, Trojan J, Welling 3rd TH. 2017. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *The Lancet*, 389 (10088):2492-2502.
- Feuerlein W. 1982. Ärztliche Forderungen zur Bekämpfung des Alkoholismus. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg, 79 (2):71-74.
- Finger LR, Pu J, Wasserman R, Vibhakar R, Louie E, Hardy RR, Burrows PD, Billips LG. 1997. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. *Gene*, 197 (1-2):177-187.
- Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, Dicker DJ, Chimed-Orchir O, Dandona R, Dandona L, Fleming T, Forouzanfar MH, Hancock J, Hay RJ, Hunter-Merrill R, Huynh C, Hosgood HD, Johnson CO, Jonas JB, Khubchandani J, Kumar GA, Kutz M, Lan Q, Larson HJ, Liang X, Lim SS, Lopez AD, MacIntyre MF, Marczak L, Marquez N, Mokdad AH, Pinho C, Pourmalek F, Salomon JA, Sanabria JR, Sandar L, Sartorius B, Schwartz SM,

- Shackelford KA, Shibuya K, Stanaway J, Steiner C, Sun J, Takahashi K, Vollset SE, Vos T, Wagner JA, Wang H, Westerman R, Zeeb H, Zoeckler L, Abd-Allah F, Ahmed MB, Alabed S, Alam NK, Aldahri SF, Alem G, Alemayohu MA, Ali R, Al-Raddadi R, Amare A, Amoako Y, Artaman A, Asayesh H, Atnafu N, Awasthi A, Saleem HB, Barac A, Bedi N, Bensenor I, Berhane A, Bernabe E, Betsu B, Binagwaho A, Boneya D, Campos-Nonato I, Castaneda-Orjuela C, Catala-Lopez F, Chiang P, Chibueze C, Chitheer A, Choi JY, Cowie B, Damtew S, das Neves J, Dey S, Dharmaratne S, Dhillon P, Ding E, Driscoll T, Ekwueme D, Endries AY, Farvid M, Farzadfar F, Fernandes J, Fischer F, TT GH, Gebru A, Gopalani S, Hailu A, Horino M, Horita N, Husseini A, Huybrechts I, Inoue M, Islami F, Jakovljevic M, James S, Javanbakht M, Jee SH, Kasaeian A, Kedir MS, Khader YS, Khang YH, Kim D, Leigh J, Linn S, Lunevicius R, El Razek HMA, Malekzadeh R, Malta DC, Marcenes W, Markos D, Melaku YA, Meles KG, Mendoza W, Mengiste DT, Meretoja TJ, Miller TR, Mohammad KA, Mohammadi A, Mohammed S, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nand D, Le Nguyen Q, Nolte S, Ogbo FA, Oladimeji KE, Oren E, Pa M, Park EK, Pereira DM, Plass D, Qorbani M, Radfar A, Rafay A, Rahman M, Rana SM, Soreide K, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou SG, Shaikh MA, She J, Shiue I, Shore HR, Shrima MG, So S, Soneji S, Stathopoulou V, Stroumpoulis K, Sufiyan MB, Sykes BL, Tabares-Seisdedos R, Tadese F, Tedla BA, Tessema GA, Thakur JS, Tran BX, Ukwaja KN, Uzochukwu BSC, Vlassov VV, Weiderpass E, Wubshet Terefe M, Yeboyo HG, Yimam HH, Yonemoto N, Younis MZ, Yu C, Zaidi Z, Zaki MES, Zenebe ZM, Murray CJL, Naghavi M. 2017. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 3 (4):524-548.
- Glaesmer H, Brähler E. 2002. Schätzung der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas auf der Grundlage subjektiver Daten zum Body-Mass-Index (BMI). *Das Gesundheitswesen*, 64 (03):133-138.
- Goeppert B. 2020. [Cholangiocarcinoma-diagnosis, classification, and molecular alterations]. *Pathologe*, 41 (5):488-494.
- Goh GB-B, Chang P-E, Tan C-K. 2015. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in Asia. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 29 (6):919-928.
- Graziadei I. 2020. Systemische Therapie beim fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinom. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 18 (3):72-78.
- Gressner AM, Gressner OA. 2019. Albumin. Springer Berlin Heidelberg, 55-58.
- Grundmann RT, Meyer F. 2014. [Gender-specific influencing factors on incidence, risk factors and outcome of carcinoma of the liver, gallbladder, extrahepatic bile duct and pancreas]. *Zentralbl Chir*, 139 (2):184-192.
- Guthle M, Dollinger MM. 2014. [Epidemiology and risk factors of hepatocellular carcinoma]. *Radiologe*, 54 (7):654-659.
- Hasegawa S, Kobayashi N, Okubo N, Tokuhisa M, Goto A, Kurita Y, Sato T, Hosono K, Endo I, Nakajima A, Ichikawa Y. 2021. Pathological Findings of the Host Immune Reaction in the Tumor Microenvironment of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Internal Medicine*.
- He S, Jiang W, Fan K, Wang X. 2021. The Efficacy and Safety of Programmed Death-1 and Programmed Death Ligand 1 Inhibitors for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*, 11.
- Herold G. 2018. *Innere Medizin*.
- Herold G. 2018. *Innere Medizin*.
- Jakubowski CD, Azad NS. 2020. Immune checkpoint inhibitor therapy in biliary tract cancer (cholangiocarcinoma). *Chinese Clinical Oncology*, 9 (1):2-2.
- Jodicke L, Zender L, Malek NP. 2020. [Personalized treatment of cholangiocellular carcinoma (CCA)]. *Internist (Berl)*, 61 (2):170-174.
- Jödické L, Zender L, Malek NP. 2020. Personalisierte Therapie des cholangiozellulären Karzinoms. *Der Internist*, 61 (2):170-174.

- Jung HI, Jeong D, Ji S, Ahn TS, Bae SH, Chin S, Chung JC, Kim HC, Lee MS, Baek M-J. 2017. Overexpression of PD-L1 and PD-L2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research and Treatment*, 49 (1):246-254.
- Kaiser U, Zugmaier G, Frank M, Riedel I, Neubauer A, Moll R. 2003. Das AFP-positive Adenokarzinom des Magens. *Der Pathologe*, 24 (2):141-145.
- Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, Taylor NA, Pruett TL, Hahn YS. 2009. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology*, 50 (5):1625-1637.
- Kitano Y, Yamashita Y-I, Nakao Y, Itoyama R, Yusa T, Umezaki N, Tsukamoto M, Yamao T, Miyata T, Nakagawa S, Okabe H, Imai K, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. 2020. Clinical Significance of PD-L1 Expression in Both Cancer and Stroma Cells of Cholangiocarcinoma Patients. *Annals of Surgical Oncology*, 27 (2):599-607.
- Kolb G, Safi F, Beckh K, Beger HG. 1997. [Clinical value of the CA 19-9 tumor marker with special reference to the Lewis phenotype]. *Med Klin (Munich)*, 92 (4):228-232.
- Kolligs FT, Hoffmann RT, op den Winkel M, Bruns CJ, Herrmann K, Jakobs TF, Lamerz R, Trumm C, Zech CJ, Wilkowski R, Graeb C. 2010. [Diagnosis and multimodal therapy for hepatocellular carcinoma]. *Z Gastroenterol*, 48 (2):274-288.
- Kong J, Cao Y, Chai J, Liu X, Lin C, Wang J, Liu J. 2021. Effect of Tumor Size on Long-Term Survival After Resection for Solitary Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Kubicka S. 2004. [Cholangiocellular and gallbladder carcinoma]. *Z Gastroenterol*, 42 (5):397-402.
- Lang G. 2013. *Immunhistochemie. Histotechnik*. Springer, 269-304.
- Lin J, Long J, Wan X, Chen J, Bai Y, Wang A, Yang X, Wu Y, Robson SC, Sang X, Zhao H. 2018. Classification of gallbladder cancer by assessment of CD8+ TIL and PD-L1 expression. *BMC Cancer*, 18 (1).
- Link H. 2009. Anämie bei Krebs. *Der Onkologe*, 15 (2):129-141.
- Liu Y, Jiang L, Mu Y. 2013. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 are associated with better survival in operable hepatitis B-related hepatocellular carcinoma following octreotide long-acting release treatment. *Oncology Letters*, 6 (3):821-828.
- Luo Y, Ren F, Liu Y, Shi Z, Tan Z, Xiong H, Dang Y, Chen G. 2015. Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8 (7):10235.
- Lurje G, Bednarsch J, Roderburg C, Trautwein C, Neumann UP. 2018. [Intrahepatic cholangiocarcinoma - current perspectives and treatment algorithm]. *Chirurg*, 89 (11):858-864.
- Maehama T, Dixon JE. 1998. The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (22):13375-13378.
- Makarova-Rusher OV, Medina-Echeverz J, Duffy AG, Greten TF. 2015. The yin and yang of evasion and immune activation in HCC. *Journal of Hepatology*, 62 (6):1420-1429.
- Miyakawa K, Tarao K, Ohshige K, Morinaga S, Ohkawa S, Okamoto N, Shibuya A, Adachi S, Miura Y, Fujiyama S. 2009. High serum alanine aminotransferase levels for the first three successive years can predict very high incidence of hepatocellular carcinoma in patients with Child Stage A HCV-associated liver cirrhosis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 44 (11):1340-1348.
- Mocan T, Sparchez Z, Craciun R, Bora CN, Leucuta DC. 2019. Programmed cell death protein-1 (PD-1)/programmed death-ligand-1 (PD-L1) axis in hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic perspectives. *Clin Transl Oncol*, 21 (6):702-712.
- Moehler M, Foerster F. 2019. Checkpoint-Inhibitoren: Die neue Immuntherapie bei gastrointestinalen Karzinomen. *TumorDiagnostik & Therapie*, 40 (02):121-131.
- Neve Polimeno M, Ierano C, D'Alterio C, Simona Losito N, Napolitano M, Portella L, Scognamiglio G, Tatangelo F, Maria Trotta A, Curley S, Costantini S, Liuzzi R, Izzo F, Scala S. 2015. CXCR4 expression affects overall survival of HCC patients whereas CXCR7 expression does not. *Cellular & Molecular Immunology*, 12 (4):474-482.

- Nie Y, Liu L-X, Chen T, Zhang Y, Zhu X. 2021. Serum lactate level predicts 6-months mortality in patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis: a retrospective study. *Epidemiology and Infection*, 149:1-13.
- Njei B, Rotman Y, Ditah I, Lim JK. 2015. Emerging trends in hepatocellular carcinoma incidence and mortality. *Hepatology*, 61 (1):191-199.
- Noll, Schaub-Kuhnen. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer:17.
- Onuma AE, Zhang H, Huang H, Williams TM, Noonan A, Tsung A. 2020. Immune Checkpoint Inhibitors in Hepatocellular Cancer: Current Understanding on Mechanisms of Resistance and Biomarkers of Response to Treatment. *Gene Expression*, 20 (1):53-65.
- Paik KY, Jung JC, Heo JS, Choi SH, Choi DW, Kim YI. 2008. What prognostic factors are important for resected intrahepatic cholangiocarcinoma? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23 (5):766-770.
- Pinato DJ, Mauri FA, Spina P, Cain O, Siddique A, Goldin R, Victor S, Pizio C, Akarca AU, Boldorini RL, Mazzucchelli L, Black JRM, Shetty S, Marafioti T, Sharma R. 2019. Clinical implications of heterogeneity in PD-L1 immunohistochemical detection in hepatocellular carcinoma: the Blueprint-HCC study. *British Journal of Cancer*, 120 (11):1033-1036.
- Rizzo A, Ricci AD, Brandi G. 2021. PD-L1, TMB, MSI, and Other Predictors of Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Biliary Tract Cancer. *Cancers*, 13 (3):558.
- Robert-Koch-Institut. 2017a. Alkoholkonsum bei Erwachsenen in Deutschland: Riskante Trinkmengen.
https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsJ/FactSheets/JoHM_2017_02_Alkoholkonsum_Erwachsenepdf?__blob=publicationFile.
- Robert-Koch-Institut. 2017b. Rauchen bei Erwachsenen in Deutschland.
https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsJ/FactSheets/JoHM_2017_02_Rauchen_Erwachsenepdf;jsessionid=C4BB35F71768EC161F32E72FA45434FCinternet102?__blob=publicationFile.
- Robert-Koch-Institut ZfK. 2019.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c22_leber.pdf?__blob=publicationFile.
- Roderburg C, Loosen SH, Bruners P, Luedde T. 2019. [Unknown liver lesions]. *Dtsch Med Wochenschr*, 144 (23):1651-1664.
- Roos FC, Becker C, Stope MB, Tsaour I, Fachgruppe Molekulare Urologie der Arbeitsgruppe urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für U. 2018. [Systemic immune checkpoint inhibition : A promising treatment for urological tumors?]. *Urologe A*, 57 (5):583-590.
- Rösner E, Kaemmerer D, Neubauer E, Sängler J, Lupp A. 2021. Prognostic value of PD-L1 expression in bronchopulmonary neuroendocrine tumours. *Endocrine Connections*.
- Sabbatino F, Villani V, Yearley JH, Deshpande V, Cai L, Konstantinidis IT, Moon C, Nota S, Wang Y, Al-Sukaini A, Zhu AX, Goyal L, Ting DT, Bardeesy N, Hong TS, Fernandez-Del Castillo C, Tanabe KK, Lillemoe KD, Ferrone S, Ferrone CR. 2016. PD-L1 and HLA Class I Antigen Expression and Clinical Course of the Disease in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 22 (2):470-478.
- Schönfeld I, Kraywinkel K. 2018. Epidemiologie des hepatozellulären Karzinoms in Deutschland. *Der Onkologe*, 24 (9):653-658.
- Schultheiß M. 2018. Nivolumab in der Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *InFo Onkologie*, 21 (3):18-19.
- Schultheiss M, Bettinger D, Fichtner-Feigl S, Thimme R. 2018. [Hepatocellular Carcinoma: New multimodal therapy concepts]. *Dtsch Med Wochenschr*, 143 (11):815-819.
- Shaib Y, El-Serag H. 2004. The Epidemiology of Cholangiocarcinoma. *Seminars in Liver Disease*, 24 (02):115-125.

- Shi F, Shi M, Zeng Z, Qi R-Z, Liu Z-W, Zhang J-Y, Yang Y-P, Tien P, Wang F-S. 2011. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8+ T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *International Journal of Cancer*, 128 (4):887-896.
- Shi L, Zhang S-J, Chen J, Lu S-X, Fan X-J, Tong JH-M, Chow C, Tin EK-Y, Chan SL, Chong CC-N, Lai PB-S, To K-F, Wong N, Chan AW-H. 2019. A comparability study of immunohistochemical assays for PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma. *Modern Pathology*, 32 (11):1646-1656.
- Sideras K, Biermann K, Verheij J, Takkenberg BR, Mancham S, Hansen BE, Schutz HM, De Man RA, Sprengers D, Buschow SI, Verseput MCM, Boor PPC, Pan Q, Van Gulik TM, Terkivatan T, Ijzermans JNM, Beuers UHW, Sleijfer S, Bruno MJ, Kwekkeboom J. 2017. PD-L1, Galectin-9 and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes are associated with survival in hepatocellular carcinoma. *Oncolimmunology*, 6 (2):e1273309.
- Smith J, Robida MD, Acosta K, Vennapusa B, Mistry A, Martin G, Yates A, Hnatyszyn HJ. 2016. Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagnostic Pathology*, 11 (1).
- Tella SH, Mahipal A, Kommalapati A, Jin Z. 2019. Evaluating the Safety and Efficacy of Nivolumab in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: Evidence to Date. *Onco Targets Ther*, 12:10335-10342.
- Tian L, Ma J, Ma L, Zheng B, Liu L, Song D, Wang Y, Zhang Z, Gao Q, Song K, Wang X. 2020. PD-1/PD-L1 expression profiles within intrahepatic cholangiocarcinoma predict clinical outcome. *World Journal of Surgical Oncology*, 18 (1).
- Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley M-B, Borczuk AC, Botling J, Bubendorf L, Chirieac L, Chen G, Chou T-Y, Chung J-H, Dacic S, Lantuejoul S, Mino-Kenudson M, Moreira AL, Nicholson AG, Noguchi M, Pelosi G, Poleri C, Russell PA, Sauter J, Thunnissen E, Wistuba I, Yu H, Wynes MW, Pintilie M, Yatabe Y, Hirsch FR. 2018. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *Journal of Thoracic Oncology*, 13 (9):1302-1311.
- Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. 2010. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist*, 15 Suppl 4:5-13.
- Vogel A, Saborowski A. 2017. Cholangiocellular Carcinoma. *Digestion*, 95 (3):181-185.
- Walenta S, Mueller-Klieser WF. 2004. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Seminars in Radiation Oncology*, 14 (3):267-274.
- Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfjør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. 2000. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer research*, 60 (4):916-921.
- Weltgesundheitsorganisation IAfRoC, GLOBOCAN. 2018. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populationns=900&key=asr&sex=0&cancer=11&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B-54.5%252C-2%252C0%255D.
- Wengert GJ, Bickel H, Breitenseher J, Ba-Ssalamah A. 2015. [Primary liver tumors : hepatocellular versus intrahepatic cholangiocellular carcinoma]. *Radiologe*, 55 (1):27-35.
- Wiessner C, Keil T, Krist L, Zeeb H, Dragano N, Schmidt B, Ahrens W, Berger K, Castell S, Fricke J, Führer A, Gastell S, Greiser H, Guo F, Jaeschke L, Jochem C, Jöckel K-H, Kaaks R, Koch-Gallenkamp L, Krause G, Kuss O, Legath N, Leitzmann M, Lieb W, Meinke-Franze C, Meisinger C, Mikolajczyk R, Obi N, Pischon T, Schipf S, Schmoor C, Schramm S, Schulze MB, Sowarka N, Waniek S, Wigmann C, Willich SN, Becher H. 2020. Personen mit Migrationshintergrund in der NAKO Gesundheitsstudie – soziodemografische Merkmale und Vergleiche mit der autochthonen deutschen Bevölkerung. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 63 (3):279-289.

- Wu X, Gu Z, Chen Y, Chen B, Chen W, Weng L, Liu X. 2019. Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J*, 17:661-674.
- Xie Q, Wang L, Zheng S. 2020. Prognostic and Clinicopathological Significance of PD-L1 in Patients with Cholangiocarcinoma: A Meta-Analysis. *Disease Markers*, 2020:1817931.
- Yang W, Li H, Chen PW, Alizadeh H, He Y, Hogan RN, Niederkorn JY. 2009. PD-L1 Expression on Human Ocular Cells and Its Possible Role in Regulating Immune-Mediated Ocular Inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50 (1):273.
- Zender L, Malek NP. 2016. [Diagnostics and treatment of cholangiocellular carcinoma]. *Internist (Berl)*, 57 (12):1191-1205.
- Zhu RX, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. 2016. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the Asia-Pacific Region. *Gut Liver*, 10 (3):332-339.

9.1. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. Amelie Lupp,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den

Clara-Sophie Blättermann

9.2. Danksagung

Mein mit Abstand größter Dank und meine große Bewunderung gilt Frau apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp, die mich aufgrund ihres unvergleichbaren Studentenunterrichts überhaupt erst auf die Idee brachte, eine Doktorarbeit im Bereich der Pharmakologie und Toxikologie zu schreiben. Vielen Dank für die Vergabe und Betreuung des Themas. Sie hat diese Doktorarbeit mit ihrem großen Fachwissen, ihrem persönlichen Engagement und mit unerschöpflicher Geduld betreut und so zur Optimierung dieser beigetragen.

Für das produktive und angenehme Arbeitsklima möchte ich mich darüber hinaus insbesondere bei Blanca Ehms, Kristina Bursian und Isabel Kreuzer bedanken. Zudem gilt mein Dank auch meinem Lebensgefährten, meiner Mama und meinem Opa.