

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*LEBERADENOME – IMMUNHISTOCHEMISCHE EVALUATION
UND KLINISCHE IMPLEMENTIERUNG*

*Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin*

*der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg*

*vorgelegt von
Stefan Wehrmann*

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Farkas

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Teufel

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2017

Meinen Eltern

Heike und Wolfgang Wehrmann

Inhalt

1	Einleitung	3
1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren des Hepatozellulären Adenoms	3
1.2	Symptomatik und Komplikationen	4
1.2.1	Hämorrhagie.....	4
1.2.2	Maligne Entartung.....	5
1.3	Charakterisierung und Pathogenese der Hepatozellulären Adenome	5
1.3.1	Der inflammatorische Subtyp (IHCA)	6
1.3.2	Der HNF1- Alpha mutierte Subtyp (H-HCA)	8
1.3.3	Der Betacatenin-mutierte Subtyp (B-HCA)	11
1.3.4	Der unklassifizierbare Subtyp (u-HCA)	14
1.4	Fokal Noduläre Hyperplasie (FNH) als wichtigste Differentialdiagnose.....	14
1.4.1	Epidemiologische und klinische Fakten	14
1.4.2	Morphologische und immunhistochemische Charakteristika der FNH	15
1.5	Diagnostik von Hepatozellulären Adenomen und Ihre Differentialdiagnostik	16
1.5.1	Bildgebende Diagnostik.....	16
1.5.2	Mikroskopie und Immunhistochemische Diagnostik.....	23
1.6	Strategien bei der Behandlung von Leberadenomen	24
1.7	Ziel der Dissertation.....	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Patientenselektion.....	28
2.2	Allgemeine Histologie	28
2.3	Immunhistochemie.....	30
2.3.1	Das Prinzip der Immunhistochemie	30
2.3.2	Anwendung der Immunhistochemie auf die Leberadenome der Studie	32

2.4	Anfertigung von Tissue Micro Arrays (TMA)	33
2.5	Mikrodissektion und Isolation von DNA aus paraffingebetteten Leberadenomen ..	34
2.6	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Mutationsanalyse im Betacatenin-Gen auf Grundlage der Gen-Sequenzierung.....	34
2.6.1	Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion	34
2.6.2	Anwendung der PCR in der Studie	35
2.7	Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Agarosegelen.....	36
2.8	DNA-Sequenzierung.....	37
2.9	Radiologische Daten	37
3	Resultate	38
3.1	Patienten	38
3.2	Tumorgröße, Anzahl und Lokalisation.....	38
3.3	Operative Therapie	40
3.4	Prä- und Postoperative Komplikationen	43
3.5	Präoperative radiologische Befunde	47
3.6	Subtypisierung der Leberadenome	48
3.6.1	Der Inflammatorische Subtyp	50
3.6.2	Der HNF1-Alpha mutierte Subtyp	54
3.6.3	Der Betacateninmutierte Subtyp	57
3.6.4	Besonderheiten bei der Studienpopulation.....	60
3.7	Korrelationen zwischen Subtyp und klinischen Bild.....	62
3.7.1	Die Adenomgröße und Anzahl in Abhängigkeit des Subtyps.....	62
3.7.2	Subtypen in Bezug auf Geschlecht, Patientenalter, BMI und Einnahme von Kontrazeptiva	64
3.8	Vergleich der Morphologie von Leberadenompräparaten mit Präparaten auf Tissue Micro Arrays (TMA)	66

4	Diskussion	69
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	75
7	Anhang	88
7.1	Abkürzungsverzeichnis	88
7.2	Danksagung	91

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Hepatozellulären Adenoms

Das Hepatozelluläre Adenom ist eine benigne Läsion der Leber, welche vor allem bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter auftritt. Mit einer Prävalenz von 1-1,3 pro 1 000 000 ohne bzw. 30-40 pro 1 000 000 mit jahrelanger Einnahme Oraler Kontrazeptiva (OK), ist das HCA ein eher selten vorkommender Lebertumor [1,2]. Meistens werden Leberadenome als solitäre Läsion der Leber gefunden. In Ausnahmefällen können jedoch auch Läsionen mit mehr als 10 Tumoren in der Leber entdeckt werden. In diesem Fall spricht man von einer Leberadenomatose [3].

Die Verteilung zwischen Frauen und Männern beträgt 8 zu 1 [4]. Bereits 1973 berichteten Baum et al. über sieben Patientinnen mit Leberadenomen, welche seit Jahren Orale Kontrazeptiva einnahmen. Sie wiesen somit auf die enge Korrelation zwischen Gebrauch von Oralen Kontrazeptiva und Entstehung von Leberadenomen hin [5].

Obwohl die Inzidenz von Leberadenomen und Fokal Nodulären Hyperplasien aufgrund der Einführung neuer Generationen Oraler Kontrazeptiva mit geringeren hormonalen Wirkspiegeln (Östrogene) sinken sollte [6], werden benigne Lebertumoren immer häufiger entdeckt.

Dies liegt auch an dem immer häufiger gewordenen Einsatz hochauflösender Bildgebungsmethoden zur abdominalen Untersuchung (Tumorscreening, Routine-Check-up, etc.) [7].

Bei Männern wird die Entwicklung von Leberadenomen u.a. durch die Einnahme von androgenen Steroiden – wie beispielsweise bei der Behandlung von der Fanconi-Anämie [8,9] - bzw. Anabolika positiv beeinflusst [10–12].

Allgemein kann man sagen, dass die Inzidenz von Leberadenomen in westlichen Ländern größer ist als in östlichen [13,14]. Ursächlich hierfür könnte unter anderem die im Vergleich mit westlichen Ländern geringere Einnahme Oraler Kontrazeptiva sein [15].

Trotz des wohl sinkenden Einflusses Oraler Kontrazeptiva gibt es nun neue Risikofaktoren, die zivilisationsbedingt an Priorität immer weiter zunehmen: Adipositas und Alkoholkonsum [16–18].

Weitere Assoziationen mit verschiedenen genetischen Grunderkrankungen sind ebenfalls bekannt. Ein Auftreten der Leberadenome bei Glykogenspeicherkrankheiten Typ I und III [19–22], Klinefelter Syndrom [22], Familiäre Adenomatöse Polyposis [23,24] sowie Primär Sklerosierender Cholangitis [25] wurde in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben.

Es existiert ein Case Report von 2012 von Seo et al., in dem von einem HCC berichtet wird, welches aus einem Leberadenom, auf Grundlage einer HBV induzierten Leberzirrhose, entsteht [26].

Einen überaus interessanten Zusammenhang zwischen HCA und genetischen Erkrankungen liefert vor allem die Assoziation mit Patienten, bei denen ein Maturity Onset Diabetis of the Young (MODY) Typ 3 [27,28] bekannt ist.

1.2 Symptomatik und Komplikationen

Das HCA ist eine Leberläsion, welche sich klinisch meist inapparent zeigt. Daher werden viele Leberadenome meist nebenbefundlich bei bildgebenden Untersuchungen des Abdomens entdeckt [7]. Dennoch gibt es Komplikationen, auf die im Folgenden eingegangen werden sollte

1.2.1 Hämorrhagie

Die Hämorrhagie bzw. Ruptur ist mit 25% Wahrscheinlichkeit die Hauptkomplikation bei Leberadenomen und ist, neben den Verdacht auf maligne Entartung, einer der beiden Hauptgründe für chirurgische Intervention [29].

Gerade gefäßreiche Tumoren mit ausgeprägten dünnwandigen Sinusoiden tendieren zu Ruptur und Blutung in Leber oder Bauchraum. [30,31].

Interessanterweise korreliert das Risiko einer Hämorrhagie/ Ruptur des HCA weder mit Geschlecht und Alter des Patienten noch mit der Anzahl der Leberadenome. Dafür zeigten Deneve et al., dass das Risiko einer Ruptur mit einer Tumorgröße von mehr als 7 cm sowie mit der Einnahme Orale Kontrazeptiva (58 % der Patienten mit OK-Einnahme vs. 25% ohne) signifikant steigt [32].

Gerade bei Schwangeren scheint das Risiko von Ruptur und Blutung aufgrund der veränderten Hormonlage besonders hoch zu sein [33], obwohl bisher keine Östrogenrezeptoren in Leberadenomen nachgewiesen werden konnten [34,35].

1.2.2 *Maligne Entartung*

HCA tendieren sich in 4,2 – 4,5% der Fälle zu einem Hepatozellulären Karzinom umzuwandeln [29]. Betroffen sind vor allem männliche Patienten [4,36], sowie Patienten mit einer Androgen-/ Anabolikaanamnese [37] oder einer gesicherten Dysplasie im HCA [29]. Patienten mit Glycogenspeicherkrankheiten haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung bei bekannten HCA [38].

Offensichtlich spielt, wie bei den Adenomen mit Rupturationsgefahr, auch hier die Größe der Tumoren eine Rolle. Deneve et al. beschreiben eine durchschnittliche Größe von Tumoren mit Malignitätspotential von 11.6 cm, wobei kein Tumor kleiner als 8 cm maligne Anteile zeigte [32]. Ein Fall ist bekannt, in dem ein HCA mit malignem Anteil reseziert wurde, welches einen Durchmesser von nur 4 cm aufwies [39]. Insgesamt zeigen sich in der Literatur nur drei Fälle, in denen ein malignes HCA kleiner als 5 cm entdeckt wurde [29].

1.3 Charakterisierung und Pathogenese der Hepatozellulären Adenome

Aufgrund der herausragenden Arbeit der Forschungsgruppe um Zucman-Rossi ist es seit wenigen Jahren möglich, die Leberadenome in vier Subtypen zu unterteilen, welche sich aufgrund ihrer geno- und phänotypischen Eigenschaften und dem damit verbundenen Risiko von Ruptur/ Blutung sowie maligner Transformation unterscheiden.

Allgemein gilt für die Morphologie von Leberadenomen folgendes:

Das HCA ist eine Läsion, welche aus Bändern bzw. Strängen von morphologisch normalen, jedoch größeren und teilweise mit Glykogen und Lipiden stark angereicherten Hepatozyten besteht, die durch verschieden breite Sinusoide getrennt werden. Jene Sinusoide sind ähnlich wie dünnwandige Kapillaren aufgebaut, welche arteriell gespeist werden. Dementsprechend ist die Blutversorgung der HCA arterieller Natur und damit vom portalvenösen Kreislauf entkoppelt. Aufgrund der dünnwandigen und meist relativ breiten Sinusoide (v.a. beim inflammatorischen Subtyp) erklärt sich auch die oben schon erwähnte Tendenz zur Hämorrhagie bei größeren Adenomen.

Die Leberadenome sind nur fakultativ von einer Kapsel umgeben, was wiederum die Möglichkeit einer in den Bauchraum austretenden Blutung bei Ruptur von oberflächlichen HCA begünstigt.

Typisch für HCA ist das Fehlen von Gallegängen innerhalb der Läsion, was ein wichtiges Kriterium in Hinblick auf die Differentialdiagnostik zu der FNH darstellt. Außerdem zeigt sich ein Verlust in Anzahl und Funktion von Kupffer-Zellen innerhalb der Läsion [30,40,41].

Auf der Grundlage von den Kriterien: HNF1-Alpha- Mutation, Betacatenin- Mutation sowie der Existenz von inflammatorischen Infiltrat kann man insgesamt 4 Subtypen des HCA unterscheiden:

- 1.) Inflammatorischer Typ
- 2.) HNF1 Alpha mutierter Typ
- 3.) Betacateninmutierter Typ
- 4.) Unklassifizierbarer Typ [4]

Diese vier Subtypen können mit Hilfe von Immunhistochemie (IHC) differenziert werden.

1.3.1 Der inflammatorische Subtyp (IHCA)

Mit einem Anteil von 40-55% [18] ist das IHCA der häufigste Subtyp. Assoziiert ist er mit einem BMI von über 25 kg/m² sowie häufiger Alkoholexposition, erhöhten GGT-Werten [42] und dem Auftreten des inflammatorischen Syndroms, was jedoch keinen obligaten Faktor darstellt [43].

Histomorphologisch sind bei den IHCA vor allem inflammatorische Infiltrate (meistens eine Kombination aus CD3 und CD45 positiven T-Zellen und CD20, CD79A positiven B-Zellen sowie Lymphozyten und CD 68 positiven Histozyten) auffällig, welche sich meistens um die vielzählig verdickten Arterien bzw. Arteriolen ansammeln. Die stark dilatierten Sinusoide, Pseudoportalfelder sowie duktilären Reaktionen, leichte bindegewebige Stränge, die sich um die Arterien ziehen, ein unterschiedlich stark geprägtes Ausmaß an Peliose und Hämorrhagie sowie eine im Vergleich zu anderen Subtypen weniger ausgeprägte Steatosis, die, wenn existent, eher makrovesikulär und heterogen verteilt auftritt, komplettieren das Bild der inflammatorischen HCA [18,42,43].

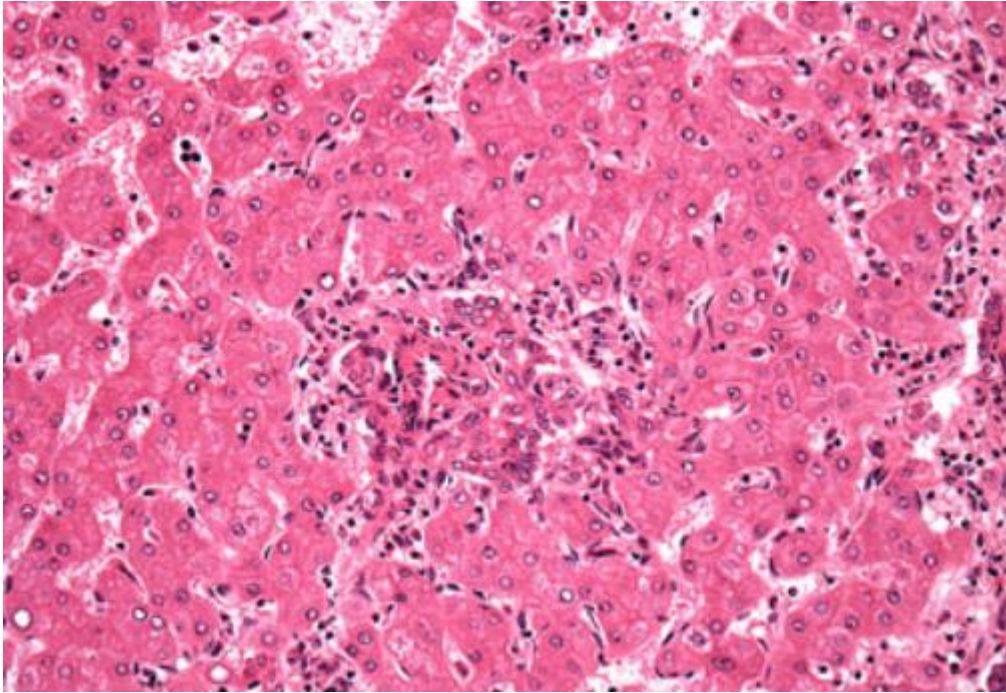


Bild 1: Typische Darstellung eines inflammatorischen HCA in H&E Färbung. [44]

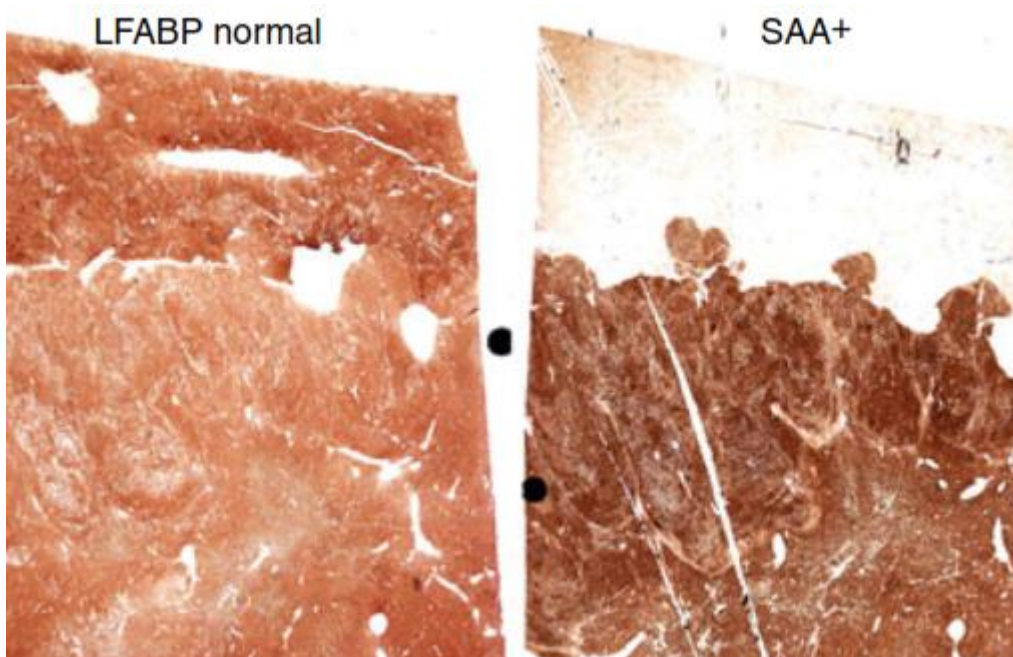


Bild 2: IHC-Färbung eines I-HCA mittels Anti-LFABP und Anti-SAA. Hier sieht man eine deutliche Grenze zwischen Tumor und Normalgewebe. [44]

Interessanterweise hat eine Studie von Bioulac-Sage et al. gezeigt, dass ein Auftreten von sogenannten „Micronodules“ direkt mit der Anzahl von größeren, in der Bildgebung sichtbaren Adenomen korreliert. Das bedeutet, dass undetektierte kleine tumoröse Veränderungen vor allem im Falle von multiplen Adenomen bzw. Leberadenomatosen auftreten können [45].

Die immunhistochemische Aufarbeitung und Diagnostik ist für IHCA sehr charakteristisch. Aufgrund der Überexpression inflammatorischer Proteine, kann mit Hilfe von Serum Amyloid A Antikörpern (Anti-SAA) und Antikörpern gegen C-Reaktives-Protein (Anti-CRP) ein IHCA dargestellt und diagnostiziert werden. SAA und CRP sind überaus stark und diffus in der Läsion exprimiert und zeigen meist eine markante Grenze zum tumorfreien Gewebe. Diese Eigenschaften ermöglichen es, auch die oben erwähnten „Micronodules“ vom inflammatorischen Typ zu identifizieren.

Die Färbung mit Anti-CRP zeigt sich meist intensiver ausgeprägt als die mit Anti-SAA, jedoch ist Nutzung beider Marker vor allem bei schwer einzuordnenden HCA sinnvoll und hat ihre Berechtigung. Fokale bzw. minimal positiv gefärbte Gewebeanteile mit Nähe zu inflammatorischen Infiltrat sollten als negativ bewertet werden [18,46,47].

Die Expression von CD34 ist eher irregulär und meist um Pseudoportalfelder verstärkt angesiedelt. Keratin 7 zeigt die duktiläre Reaktion bei meist negativen Keratin 19. Alpha-Smooth Muscle Actin färbt vor allem die verdickten Arterien und Arteriolen an und markiert häufig die Sternzellen der Sinusoide. LFABP wird normal im umliegenden Lebergewebe exprimiert [47].

Alle eben genannten Marker haben jedoch nur geringen Einfluss auf die Diagnostik der IHCA und sind hier nur aus Gründen der Vollständigkeit mit aufgeführt.

Die Expression von Glutamin-Synthetase und Betacatenin ist in den meisten Fällen unverändert. Jedoch gibt es zwischen inflammatorischen und betacateninmutierten Leberadenomen eine Schnittmenge. Aus diesem Grund gelten für ca. 10 % der IHCA die typischen Charakteristika beider Subtypen. Es sind betacateninmutierte inflammatorische HCA [48].

1.3.2 Der HNF1-Alpha mutierte Subtyp (H-HCA)

2002 wurde von Bluteau et al. eine Loss Of Heterozygosity (LOH) am Chromosom 12q, welches in eine biallelische somatische Mutation im HNF1A Gen führt, in Leberadenomen erkannt. Diese Mutation charakterisiert den mit 30-40% zweithäufigsten Subtyp der HCA [49]. Eine Studie von Poussin et al. zeigt ein erhöhtes Risiko der Entwicklung eines H-HCA bei gleichzeitiger Keimbahnmutation von CYP1B1, einem Schlüsselenzym im Abbau von genotoxischen und hydroxylierten Metaboliten des Östrogenstoffwechsels [50].

HNF1-A ist ein Transkriptionsfaktor der vor allem in der Leber, aber auch in Niere, Darm, Magen und Pankreas vorkommt [51]. Laut den Forschungsergebnissen von Odom et al., existieren mindestens 222 Zielgene allein in Hepatozyten, welche durch den Transkriptionsfaktor reguliert werden. Diese Gene codieren Proteine, welche größtenteils eine Schlüsselrolle im hepatischen Metabolismus spielen.

Eine wichtige Rolle spielt die monoallelische Mutation des HNF1-A als Ursache für den sog. Maturity Onset Diabetes of the Young Typ 3 (MODY3), eine autosomal dominant vererbte Form des Nicht-Insulinabhängigen Diabetes, der meist zu Hyperglykämien schon vor dem 25. Lebensjahr führt [52]. Assoziationen zwischen MODY-Patienten und Leberadenomen bzw. Leberadenomatosen wurden in verschiedenen Case Reports beschrieben [53–56].

Das H-HCA ist meist schon mit Hilfe von H&E-Färbung gut zu diagnostizieren. Aufgrund der klassischen Erscheinung eines diffus verfetteten Tumors, wobei die Steatosis von mild bis hin zu massiv schwanken kann, jedoch meist um die Arterien fehlt, fällt es oft leicht, diesen Subtyp zu kategorisieren. Es gibt jedoch auch Fälle, in denen keine Steatosis anzutreffen ist. Des Weiteren zeigen sich morphologisch klare, vergrößerte und mit Lipiden gefüllte Hepatozyten, die durch eine Vielzahl von dünnen arteriellen und venösen Gefäßen miteinander verbunden sind. Das Fasergerüst aus Retikulin ist normal, Inflammation sowie Zell- und Kernatypien sind nicht auffindbar. Die Grenze des Tumors ist häufig lobuliert und nicht gekapselt. Teilweise zeigt sich auch ein erhöhter Verfettungsgrad im normalen umliegenden tumorfreien Gewebe, welcher jedoch wesentlich geringer ist als das Tumorgewebe selbst.

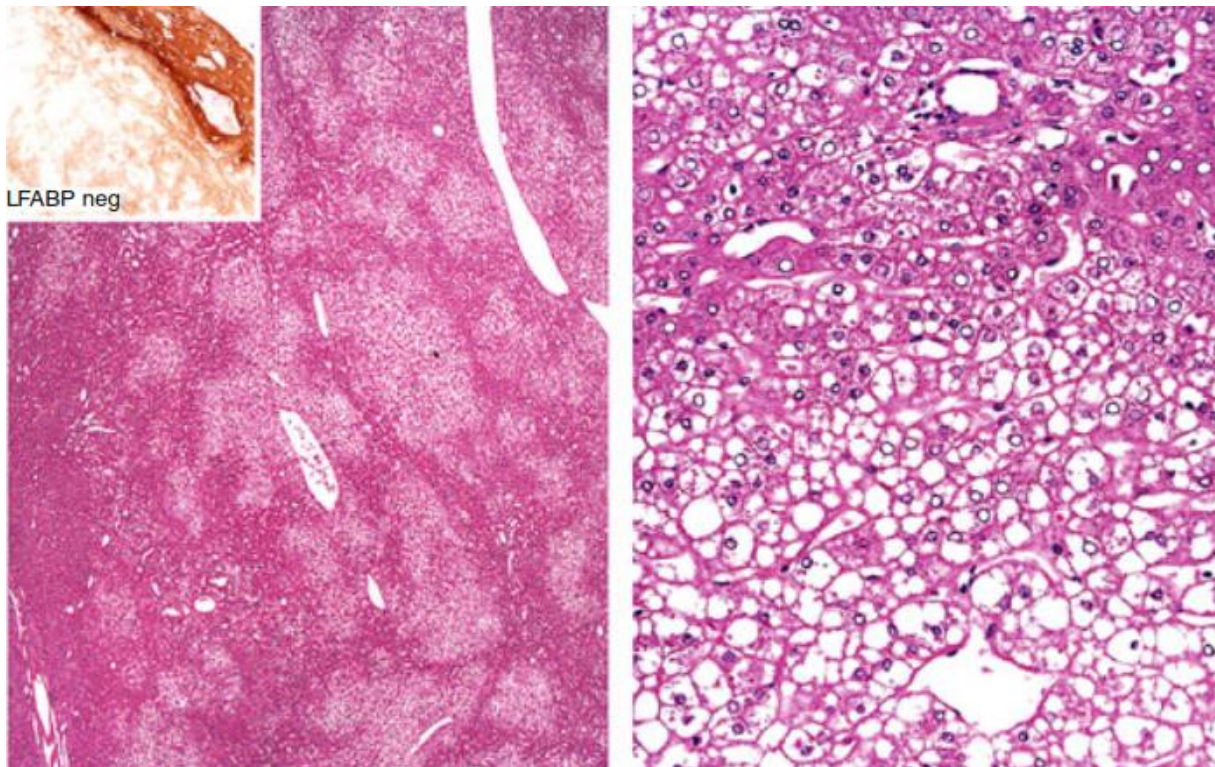


Bild 3: Typische Morphologie eines HNF1-A mutierten Leberadenoms mit H&E-Färbung und Anti-LFABP Färbung. [44]

Immunhistochemisch lässt sich mit Hilfe von CD34-Färbung die irreguläre sinusoidale Kapillarisation der von Arterien geprägten Gebiete darstellen. Mit Kreatin 7- Färbung zeigen sich die teilweise verstreuten, stammzellartig wirkenden kleinen Hepatozyten und hepatobiliäre Zellen [18,47].

Auf der molekularbiologischen Grundlage ist es nun möglich mit Hilfe von Antikörpern gegen Liver Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) die Leberadenome vom HNF1A-Typ immunhistochemisch zu färben und darzustellen. Als normal bzw. L-FABP positiv wird der Tumor angesehen, wenn sich die Färbung des Tumors und des umgebenden gesunden Gewebes gleicht. Andererseits spricht man von L-FABP negativ, und somit HNF1A mutiert, wenn das Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe an Färbung abnimmt bzw. sich gar nicht anfärben lässt. Es wird auch dann noch von HNF1A Mutation ausgegangen, obwohl am Tumorrand bzw. im Tumor selbst noch wenige Hepatozyten (< 5%) L-FABP produzieren. Es kann zu Problemen der immunhistochemischen Diagnostik bei H-HCA kommen, wenn beispielsweise die L-FABP Färbung des tumorumgebenden gesunden Gewebes selbst recht schwach ist und dementsprechend nur eine kleine Differenz zwischen gesunden und Tumorgewebe zulässt. Hier wird das Problem der IHC-Diagnostik deutlich, da es nicht möglich ist allein mit IHC zu differenzieren, ob die Mutation im HNF1A Gen somatisch oder

konstitutionell ist. Außerdem können monoallelische Mutationen mit IHC nicht detektiert werden [18,42,47,47].

In Abgrenzung zu den anderen Subtypen, ist bei H-HCA die Färbung mit Anti-CRP und Anti-SAA negativ. Auch die Diagnostik mittels Anti-GS ist nicht zielführend, obwohl manche Hepatozyten, vor allem an der Grenze zum gesunden Gewebe und um Venen im Tumor selbst, auch Glutaminsynthetase überexprimieren. Es wurden seltene Fälle beschrieben, in denen H-HCA zu HCC transformieren können, jedoch gibt es bisher keine bekannten Fälle von H-HCA mit Betacateninmutation [4,18,42].

Die molekulare Basis dieses Phänotyps lässt sich durch die aufgrund der Mutation im TCF1 Gen entstehenden Veränderungen im Stoffwechsel der Leber erklären. Gluconeogenese wird heruntergefahren und Glykolyse gleichzeitig aktiviert. Des Weiteren kommt es zu einer verstärkten Funktion des Citrat-shuttles und zu einer erhöhten Produktion von Fettsäuren bei verminderter Expression von L-FABP. Dies, sowie die erhöhte Rate der Lipogenese und die Tatsache, dass Linolsäure und Alpha-Linolsäure in der Leber akkumulieren, führen zu dem oben beschriebenen Phänotyp.

1.3.3 Der Betacatenin-mutierte Subtyp (B-HCA)

Der Anteil von betacateninmutierten Adenomen unter den HCA liegt lediglich bei 10-15% [18,42], wobei vergleichsweise mehr Männer an diesem Typ erkranken. Beruhend auf der Tatsache, dass die Leberadenome in nur 4,2 bis 4,5 % der Fälle maligne entarten [18,29], machen die B-HCA den Großteil aus. HCC und sog. Borderlinetumoren zwischen Adenomen und HCC sind mit einer Steigerung der Aktivität von Betacatenin signifikant assoziiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in 20 bis 24% der Fälle eine betacateninaktivierende Mutation bei HCC auftritt [4].

Aufgrund der dem Wnt/ Betacatenin- Pathway zukommenden Schlüsselrolle im hepatozellulären Metabolismus sowie der Entstehung von HCC erscheint es an dieser Stelle sinnvoll, die Rolle von Betacatenin etwas genauer zu betrachten:

1.3.3.1 Aktivierung von Betacatenin durch den Wnt- Pathway

Betacatenin ist eine Komponente der Wnt- Signalkaskade. Im inaktivierten Zustand von Wnt ist Betacatenin als Teil eines Multiproteinkomplexes phosphoryliert an der Zellmembran gebunden. Einmal phosphoryliert kommt es zu einem Abbauprozess von Betacatenin über Ubiquitinierung sowie proteosomaler Degradation [57].

Kommt es zu einer Aktivierung von Wnt und Bindung an dessen Rezeptor/ Co-Rezeptor an der Zelloberfläche, so wird der Degradationsprozess von Betacatenin aufgehoben und das Protein geht in seine aktive Form über, löst sich vom Membrankomplex und transloziert in den Zellkern, wo es als Co-Faktor des T-Zell-Faktors (TCF) bzw. des Lymphoid Enhancer Faktors (LEF) agiert und somit die Expression von Zielgenen mitentscheidet [58].

1.3.3.2 Die Assoziation zwischen Betacatenin und HCC

De La Coste et al. zeigten sowohl in Mausmodellen als auch in menschlichen Hepatozellulären Karzinomen eine starke Assoziation mit Mutationen im Betacatenin-Pathway. Bei Mäusen traten in der Studie insgesamt 50% und bei Menschen von 25% Betacateninmutation in allen untersuchten HCC auf [59]. Verschiedene andere Studien belegen diese starke Assoziation, welche ähnlich wie bei den HCA ohne HCC eine Mutation im Exon 3 des CTNNB1 –Gens hat (Vgl. siehe Review von Singh Monga et al. [60]). Neben der CTNNB1 Mutation ist die Mutation von AXIN1 mit 3-16% am häufigsten [61–63].

Wie zu erwarten, ist die Genexpression von Zielgenen wie GS, G-Protein gekoppelter Rezeptor 49 und Glutamattransporter 1 bei der CTNNB1 Mutation stark erhöht. Dies macht es dem Pathologen möglich betacateninmutierte HCC immunhistochemisch ähnlich darzustellen, wie B-HCA, nämlich mit dem Marker Anti-GS [63]. Natürlich erschwert dies die Differentialdiagnostik.

Interessant ist die Tatsache, dass 59% der HCC eine somatische Mutation in der Promotorregion der Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) aufweisen, die die Expression der Transkriptase erhöht. Diese Mutation wurde auch in 25% von präneoplastischen zirrhotischen Knoten sowie in 44% von HCA entdeckt, die sich zu HCC entwickeln [64].

Die unterschiedliche Genese von HCC auch mit verschiedenen Mutationen einhergehend. Jedoch finden sich gerade in Bezug auf CTNNB1 mutierte HCC Gemeinsamkeiten in der Expression von Betacatenin. So weisen beispielsweise HCC, die auf dem Boden einer Hepatitis C entstanden sind, in 41% der Fälle ein höheres Level an Betacatenin auf [65]. Im Gegensatz dazu zeigen HCC, welche auf der Basis einer Hepatitis B entstehen, wesentlich weniger Betacateninaktivität [66]. Ähnlich verhält es sich mit HCC, die auf der Basis einer Leberzirrhose entstehen. Auch diese weisen im Gegenzug zu denen, die aus nicht-zirrhotischen Lebern wachsen eine deutlich geringere Betacateninexpression auf, da hier primär der p53-Weg mutiert ist [67].

1.3.3.3 Histomorphologische Eigenschaften von B-HCA

Histomorphologisch muss man die B-HCA nochmals unterteilen: einmal in Leberadenome, welche sowohl betacateninmutiert sind als auch die typischen Zeichen eines IHCA aufweisen und die andere Gruppe, in welcher keine Inflammation erkennbar ist [4,18].

Typischerweise besitzen B-HCA Zelltypen, wie Veränderung der Kern-Plasma-Relation und eine erhöhte Anzahl an Mitosefiguren. Des Weiteren findet man häufig pseudoglanduläre Formationen. Eine Steatosis existiert meist nicht [4].

Immunhistochemisch stehen uns derzeit zwei Marker zur Verfügung, die eine Aussage über die Aktivität von Betacatenin in Hepatozyten machen können. Zum einen Antikörper gegen Betacatenin (Anti-Betacatenin) selbst und zum anderen Antikörper gegen Glutamin-Synthetase (Anti-GS). Wie sich herausstellte, ist die Anti-Betacatenin Färbung recht schwer zu interpretieren und teilweise unpräzise. Dies liegt daran, dass die Färbung nur in manchen Zellkernen der Hepatozyten akkumuliert, die dann entweder in Gruppen mutierter Zellen oder isoliert in Erscheinung treten.

Im Vergleich dazu ist die Färbung unter Nutzung von Anti-GS wesentlich einfacher zu interpretieren, da GS in betacateninmutierten Zelle im Zytoplasma stark überexprimiert wird. Dementsprechend sind die Zellen mehr oder weniger homogen im gesamten Tumor gut zu erkennen. Allerdings färbt dieser Marker auch das gesunde Lebergewebe an, da selbstverständlich auch hier GS synthetisiert wird. Typisch hierfür ist eine Expression in ein- bis zwei Zellreihen perivaskulär [18]. Allerdings akkumuliert Anti-GS auch bei der Fokal nodulären Hyperplasie, jedoch nicht homogen sondern eher landkartenartig (map-like pattern) in ca. 2 bis 5 Zellreihen um die Gefäße bzw. im Tumorgewebe selbst [68,69].

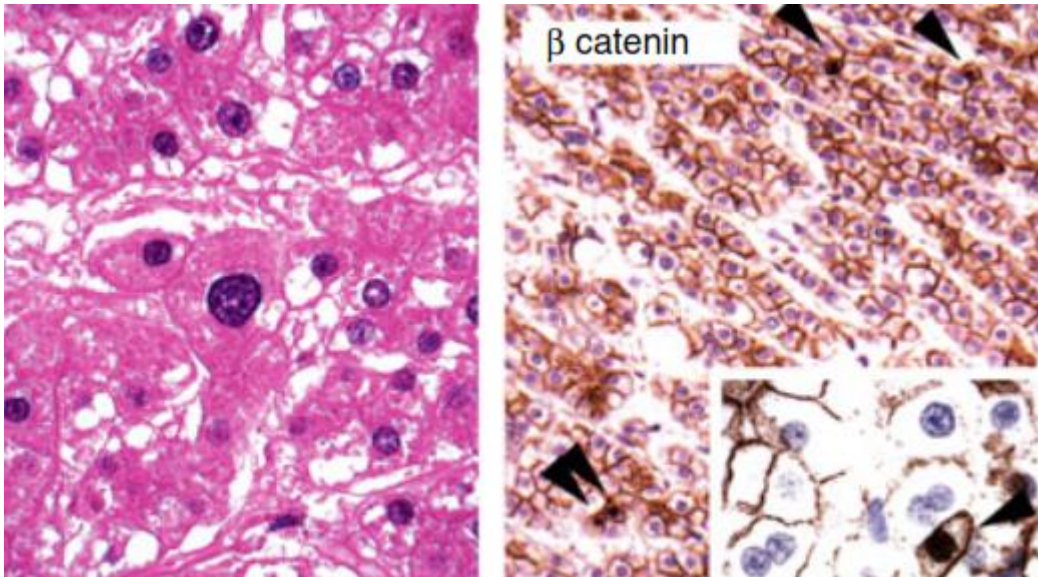


Bild 4: Morphologie eines B-HCA in H&E Färbung sowie mit Anti-Betacatenin Färbung. Die Pfeile zeigen betacateninmutierte Zellen mit Anreicherung des Markers im Zellkern und Cytoplasma [44].

1.3.4 Der unklassifizierbare Subtyp (*u-HCA*)

Der vierte Subtyp der HCA ist weder HNF1-A mutiert, noch zeigt er eine Überexpression von Betacatenin. Ebenso wenig besitzt er die typischen Charakteristika einer inflammatorischen Läsion. Daher schlägt auch jeglicher Versuch der Identifikation mit den zur Verfügung stehenden immunhistochemischen Markern fehl. Zwar werden die morphologischen Kriterien eines HCA erfüllt, jedoch lassen sich diese Tumoren in keine der bereits bekannten Kategorien einordnen. Diese unklassifizierbaren Tumoren treten unter den HCA mit einer Häufigkeit von weniger als 10% auf [4,18,42,48].

1.4 Fokal Noduläre Hyperplasie (FNH) als wichtigste Differentialdiagnose

1.4.1 Epidemiologische und klinische Fakten

Mit einer Prävalenz von ca. 0,6 bis 3% der Allgemeinbevölkerung (entsprechend 0,8% Prävalenz in autopsierten Patienten) ist die FNH die weltweit zweithäufigste benigne Leberläsion neben den Hämangiomen.

Ein direkter Zusammenhang mit der Einnahme Oraler Kontrazeptiva ist unumstritten. Diese Tatsache erklärt auch den Unterschied in der geographischen Verteilung der FNH weltweit: In Ländern, in denen der Gebrauch Oraler Kontrazeptiva häufig ist, tritt die Läsion primär bei Frauen zwischen 30. und 40. Lebensjahr auf; wobei in den Ländern mit geringer Einnahme

Oraler Kontrazeptiva, wie beispielsweise China, eher adulte Männer und Kinder beider Geschlechter betroffen sind.

In ca. 66% der Fälle ist die FNH eine solitäre Leberläsion, die eher als Zufallsbefund bei Autopsien entdeckt wird. Klinisch bleibt die FNH meist inapparent. Große Läsionen können jedoch mit Oberbauchschmerz und Kompression angrenzender Organe symptomatisch werden. Für die FNH besteht eine Assoziation zu anderen, die Leber primär nicht betreffenden Erkrankungen, wie Cervixhämangiom, vaskuläre Malformationen des Gehirns und Meningeom [70].

1.4.2 Morphologische und immunhistochemische Charakteristika der FNH

Makroskopisch stellt sich die FNH als eine weißlich anmutende Läsion dar, welche im Durchmesser von nur einigen Millimetern bis hin zu einer Größe von mehreren Zentimetern (teilweise > 10cm) schwankt. Die Läsion selbst ist lobuliert und gut von der gesunden Umgebung abzugrenzen. Eine Kapsel besteht im Regelfalle nicht. Aufgrund von kleinen ca. 2-3mm großen Knoten, welche durch Stränge von atrophen Zellen voneinander getrennt werden, entsteht der Eindruck einer multinodulären Läsion, welche zentral oder exzentrisch eine sternförmige Narbe/ Einziehung besitzt [70].

Mikroskopisch präsentiert sich die FNH als eine benigne Läsion bestehend aus Hepatozyten, die aus Schichten von maximal zwei Zellen bestehen. Die o.g. Narbe wirkt häufig ödematös verändert und enthält meist eine oder mehrere große dystrophe Gefäße, welche von vielen kleinen Arteriolen begleitet werden. Jene größeren Gefäße besitzen eine fibrös verdickte Intima sowie eine fokal ausgedünnte Media. Die Lamina elastica interna ist nur schwach ausgebildet und teilweise gespalten. Auffällig ist die Abwesenheit der Portalvene. Am Rand der Narbe finden sich portalfeldartige Strukturen, die zwar eine Arterie besitzen, jedoch keine Portalvene oder Gallengänge.

Des Weiteren ist das Auftreten von lymphozytären bzw. gemischten inflammatorischen Infiltrats um die fibrösen Teile der Läsion typisch.

Zwischen den Noduli und den fibrösen Bändern können u.a. Cholestase mit degenerierten Hepatozyten, Mallory-Denk-Körperchen sowie duktiläre Reaktionen auftreten [70].

Immunhistochemisch kann man die FNH durch Färbung mittels CK7 und CK 19 (Markierung der duktiläre Reaktion) sowie mittels CK34 positiven Endothel kennzeichnen. Das landkartenartige Muster, welches bei einer Anti- Glutaminsynthetase Färbung um die Venen der Leber entsteht gibt den entscheidenden Hinweis auf eine FNH in der Differentialdiagnose zum HCA [70].

1.5 Diagnostik von Hepatozellulären Adenomen und Ihre Differentialdiagnostik

1.5.1 Bildgebende Diagnostik

Obwohl die Schnittbilddiagnostik und die Immunhistochemie den derzeitigen Goldstandard für die Diagnose von FNH und HCA darstellen, hat die Bildgebung nicht nur in der Frühdiagnostik benigner Leberläsionen, sondern auch im Hinblick die Subtypisierung von HCA in den letzten Jahren an Priorität zugenommen. Kontrastmittelgestützter Ultraschall, Dopplersonographie, Computertomographie und natürlich die Magnetresonanztomographie sind die Grundpfeiler radiologischer Diagnostik von Leberherden und somit auch den HCA.

1.5.1.1 Kontrastmittelunterstützter Ultraschall (CEUS)

HCA ohne Nekrose, Hämorrhagie oder malignen Anteilen lassen sich als homogene Läsionen darstellen, deren Echogenität von dem umgebenden gesunden Lebergewebe abhängt.

Das bedeutet, dass sich HCA, die Fett bzw. hämorrhagische oder fibrotische Anteile besitzen, eher echoreich im Vergleich zum gesunden Lebergewebe und dass HCA, die in einer steatotischen Leber wachsen, eher echoarm darstellen [31,71].

Da die Blutzufuhr der Leberadenome primär arteriell und nicht portalvenös bedingt ist, sieht man mit Hilfe von kontrastmittelgestützten Ultraschall einen zentripetal zum Adenom hinfließenden Blutfluss. Die meisten HCA sind im 2D-Ultraschall echoreich mit einem hypervaskulärem Enhancement und einem typischen schnellen Einfluss sowie langsamen Abfluss aus dem Adenom (fast in-slow out). Nach der arteriellen Phase bleibt die Läsion leicht echoreich und geht dann im Übergang zur venösen Phase in einen isogenen mit dem restlichen Lebergewebe fast gleichen Zustand über [72]. Mit Hilfe von Kontrastmittel ist es sogar möglich einzelne Subtypen von HCA zu unterscheiden.

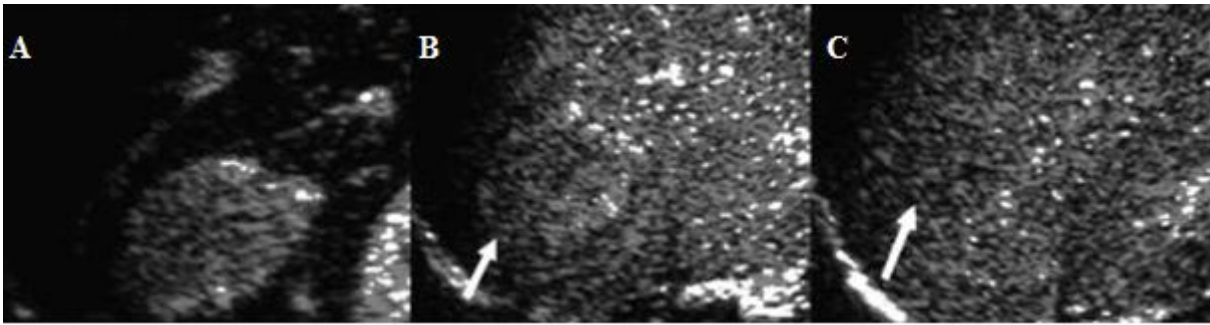


Bild 5: CEUS bei einem HCA: A zeigt die arterielle Phase mit einem schnellen Signalanstieg. B zeigt die portalvenöse Phase mit einem iso- bis leicht hyperechogenen Verhalten bezüglich dem Normalgewebe. C zeigt das langsame Auswaschen des KM aus der Läsion (slow out). Modifiziert nach Zhu et al. [72].

Interessant wird die Frage nach der Relevanz des (kontrastmittelgestützten) Ultraschalls im Hinblick auf die Differentialdiagnose FNH, Hämangiom und HCC:

Im Vergleich zum HCA imponieren die FNH im CEUS mit einer zentrifugalen Füllung, einer peripher signalarmen Zone sowie Zentralarterien. Signifikant ist auch der Unterschied von FNH zu HCA bezüglich der Signalstärke in der portalvenösen Phase: Bei FNH bleibt das Signal erhalten, bei HCA nicht. Interessanterweise sind diese spezifischen Charakteristika für FNH vor allem in Läsionen kleiner als 35 mm zu beobachten [73].

Ähnliche Unterschiede sieht man auch, wenn man die typischen Charakteristika von Hämangiomen und HCA im CEUS vergleicht. Hämangiome sind homogen echoreiche Läsionen, die in 74% der Fälle eine peripher noduläre Signalanhebung aufweisen. Dies unterscheidet vor allem H-HCA von Hämangiomen [71,74].

Von extremer Wichtigkeit ist die Differentialdiagnose HCA zum HCC. Meist haben Patienten mit einem HCC, auch wenn es gut differenziert ist, eine Leberzirrhose. Charakteristisch für Patienten mit schlecht differenzierbaren HCC ist ein sog. „fast-in and fast-out“ Phänomen bei An/ Abflutung des Kontrastmittels, was wahrscheinlich an einer doppelten Blutzufuhr der HCC bzw. einem arterio-venösen shunt, liegt (Bild 6). Der Kontrast im schwach differenzierten HCC manifestiert sich in einer im Vergleich zum HCA langsameren Anflutungszeit (arriving time, AT) sowie dem Zeitpunkt der maximalen Anflutung (peak time, PT) und einer dafür schnelleren Abflutung (retrogression time, RT). Anders die gut differenzierte HCC, welche sich nur in einer langsameren AT zu den HCA signifikant unterscheiden. Jedoch entstehen ca. 80% der HCC auf dem Boden einer Zirrhose, welche KM-sonographisch eine eher atypische, durch hämodynamische Veränderungen, Fibrose, intrahepatische Shunts, etc. bedingte An- und Abflutung aufweist. Daher stellen sich manche Leberzirrhosen ebenso mit einem „fast-in and slow-out“ Phänomen dar, wie die HCA, was die Differentialdiagnostik erschwert [72,75,76].

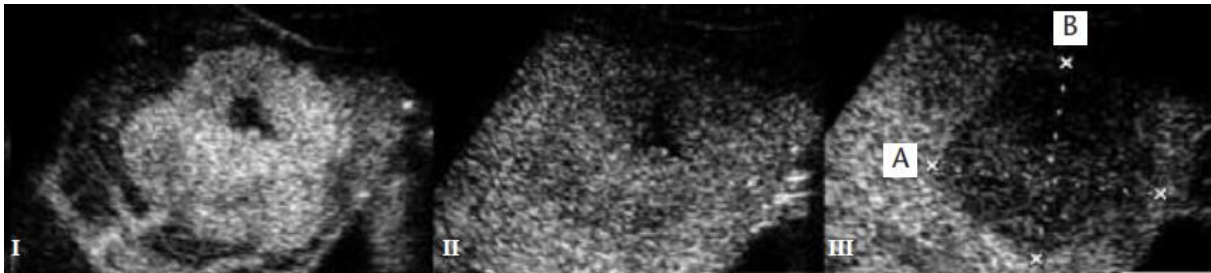


Bild 6: Darstellung eines schlecht differenzierten HCC im CEUS. I zeigt das schnelle Anfluten des KM. II und III zeigen das schnelle Auswaschen des KM in portalvenöser und venöser Phase. Modifiziert nach Zhu et al. [72].

1.5.1.2 Darstellung von Hepatozellulären Adenomen im CT

Ichikawa et al. zeigten in einer im Jahr 2000 veröffentlichten Studie über 44 HCA in 25 Patienten die Vor- und Nachteile der Computertomographie bezüglich dieser Patientengruppe. Auch hier ließ sich, ähnlich wie bei CEUS, ein gut differenzierbarer Rand, glatte nicht-lobulierte Oberflächenstrukturen der Leber sowie eine in 25% der Fälle aufgetretene Umkapselung der Läsion sowie eine Kalzifizierungsrate von 5% darstellen. Eine zentrale Narbe oder fibrotische Bänder, wie bei FNH typisch, wurden nicht entdeckt. Ähnlich wie bei der Sonographie, ist auch bei der CT die Signalstärke der Läsion abhängig von dem Gewebe des HCA sowie dem des umliegenden gesunden Leberparenchyms. So ist es nicht verwunderlich, dass in einer steatotischen Leber das HCA hyperdens gewertet wird. Ansonsten zeigen die Tumoren eine nahezu homogene KM-anreicherung mit einer Tendenz zur Inhomogenität bei größeren Läsionen. In den sog. unkomplizierten Adenomen (keine Nekrose, Hämorrhagie, übermäßigem Fettanteil) fanden sich eine Signalverstärkung in der arteriellen und eine Abschwächung bis hin zur Angleichung des Signals in portalvenöser und venöser Phase. Jedoch traf diese Reihenfolge nicht auf alle unkomplizierten Adenome zu, sodass es teilweise starke Differenzen über der Signalstärke während der portalvenösen sowie venösen Phase gab. Die Detektionsrate aller Adenome war in der arteriellen Phase mit 100% am höchsten (Man muss dabei jedoch erwähnen, dass aufgrund des retrospektiv angelegten Studiendesigns die Radiologen die Diagnose schon im vornherein wussten.).

Interessanterweise scheint die Differentialdiagnose zum fibrolamellären HCC auch CT-diagnostisch gut abgrenzbar zu sein. Diese Tumoren präsentieren sich als heterogene große, lobulierte Läsionen mit zentraler oder exzentrischer Narbenbildung, fibrotischen Septen und Kalzifikation [77].

Die Differentialdiagnose zum FNH ist aufgrund der häufig auftretenden zentralen Narbe, dem hyperdensen Erscheinungsbild in der arteriellen Phase sowie der isodensen Erscheinung in der portalvenösen bzw. venösen Phase in vielen Fällen eindeutig zu stellen [77–79].

Laut Ichikawa et. al scheint die Diagnose bzw. Differentialdiagnose von Lebermetastasen mittels CT-Diagnostik überaus kompliziert, wenn nicht sogar unmöglich. Methode der Wahl wäre hier einer Bildgebung mittels MRT [77].

1.5.1.3 Darstellung von HCA und Ihren Differentialdiagnosen mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT)

Hepatozelluläre Adenome lassen sich aufgrund des spezifischen Weichteilkontrasts mit dem MRT am besten darstellen. Beispielsweise ist es sogar möglich, individuelle Unterschiede der einzelnen Subtypen zu detektieren und somit die HCA schon mittels der Bildgebung teilweise zu charakterisieren [31,80,81].

Allgemein kann man die HCA wie folgt charakterisieren:

In der T1-Wichtung sind HCA gegenüber der gesunden Leber meist isointens bis leicht hyperintens. Wenn man die in-phase Bilder hinzuzieht und vergleicht, so kann das Signal von hypo-bis hyperintens wechseln und somit, in Abhängigkeit der Gewebestruktur von gesunder Leber und Läsion, ein heterogenes Bild entstehen.

In der T2-Wichtung präsentiert sich das HCA je nach Subtyp hyper-oder hypointens.

Während KM-gestützter MRT-Bildgebung kann man eine homogene Anflutung der Läsion in der arteriellen Phase beobachten, wobei in der venösen Phase das HCA wieder isointens wird. Weder „washout-Phänomen“ noch eine Anhebung des Randsignals/ der Kapsel sind detektierbar. Daher kann man sagen, dass HCA im MRT ohne weiteres nicht eindeutig zu diagnostizieren sind, sondern aufgrund ihres spezifischen Verhaltens zur Umgebung sehr heterogene Strukturen aufweisen können [31,82,83].

Van Aalten et al. wiesen in einer retrospektiven Studie zur Untersuchung von adenomspezifischen MRT darauf hin, wie die drei häufigsten Adenomtypen H-HCA, IHCA und B-HCA herauszufiltern sind.

H-HCA. In 78% der Fälle war eine Hypointensität des Tumors in T1-gewichteten sowie einer Hyperintensität in T2-gewichteten Aufnahmen sichtbar, was auf die markante Steatose im

Tumor hindeutet. Keine der anderen untersuchten Läsionen zeigte eine solch markante Steatosis inmitten des Tumors. Dieser in T1 entstandene signal-drop ist mit einer Sensitivität von 85% sowie einer Spezifität von 100% dem HCA zuzuordnen. PPV ist 100% und NPV ist 94% [84].

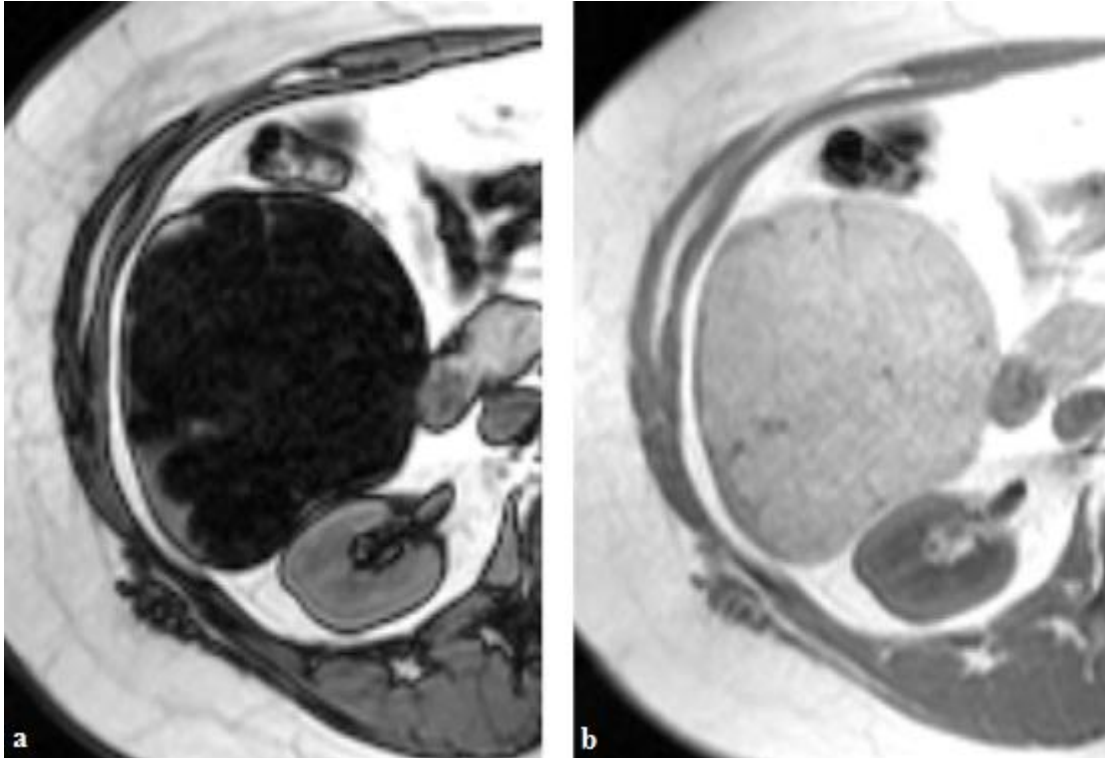


Bild 7: T1-gewichtetes MRT Bild eines H-HCA in Segment V/VI mit typischer Hypointensität. Deutlich wird vor allem die Signalminderung in der Transverse-Phase (a) im Vgl. zur opposed-phase (b) [81].

IHCA. Meist imponieren IHCA als hyperintense in T2 sowie isointens bis leicht hyperintense Läsionen in T1-Wichtung, jedoch immer wieder mit wechselnder Intensität [81,85].

Typisch für IHCA ist das sog. Atoll-Zeichen, ein hyperintenses Signalband in der Tumorperipherie und einer isointensen Präsentation des Tumorzentrums in der T2-Wichtung. In 77% der Adenome mit Atoll-Zeichen konnten noch kleine in der T2-Wichtung hyperintense Inseln inmitten des Tumors entdeckt werden [81,84].

Die T2-Hyperintensität, welche mit einem verspäteten aber persistierenden Enhancement einhergeht, ist mit einer Sensitivität von 85,2% sowie einer Spezifität von 87,5% als IHCA zu werten [84].

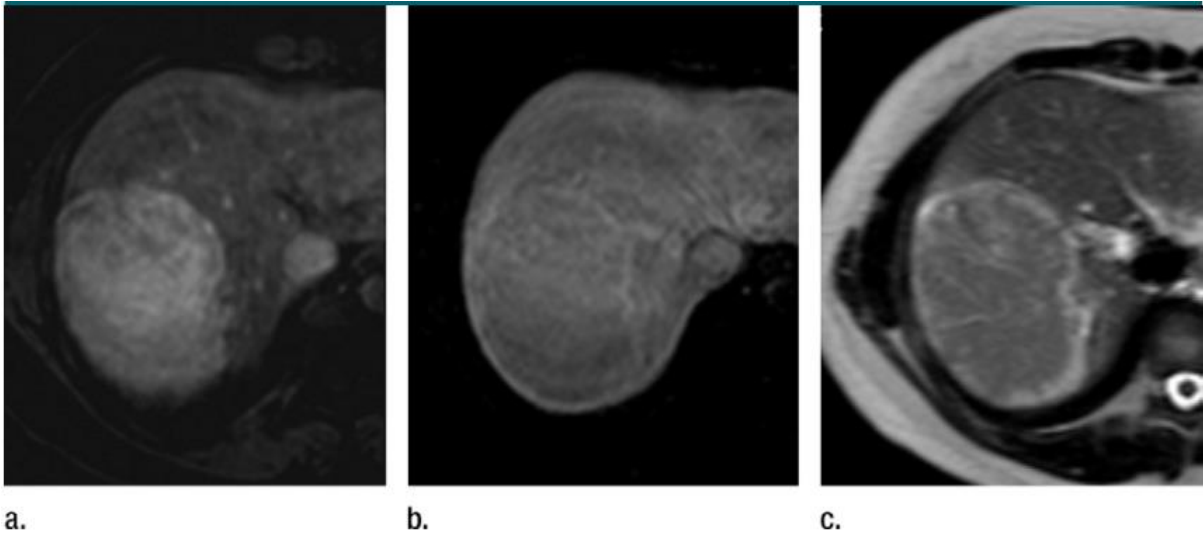


Bild 8: MRT bei IHCA in T1- Wichtung. Die arterielle (a) und venöse Phase (b) zeigen einen hyperintensens Tumor. In c. zeigt sich das typische Atoll-Zeichen [81].

B-HCA. Das B-HCA stellt sich sowohl in T1 als auch in T2 gewichteten Aufnahmen als variabel und heterogen dar [84]. In den vier von van Aalten untersuchten B-HCA waren drei mit einer zentralen Narbe und verschieden schwach begrenzten Arealen von hoher Signalintensität ausgestattet. Wenn man das Atoll-Zeichen nun mit dem Vorhandensein einer zentralen Narbe kombiniert, so kann man unterscheiden, ob eine Läsion sowohl inflammatorisch als auch betacateninmutiert ist, oder unter der Voraussetzung des Fehlens einer Narbe nur inflammatorisch ist. Jedoch findet sich auch bei den FNH eine zentrale Narbe. Das bedeutet, dass eine Narbe zwar einen Hinweis auf ein B-HCA geben kann, jedoch eher für die Mutation im Betacateninweg steht.

Ebenfalls konnte in 75% eine Pseudokapsel entdeckt werden. Interessanterweise ist bei einem B-HCA während der T2-Wichtung ein schwach unbegrenztes Areal von hoher Signalintensität typisch, was zusätzlich einen wichtigen Hinweis auf das Vorhandensein einer Betacateninüberaktivität liefert [81,84].

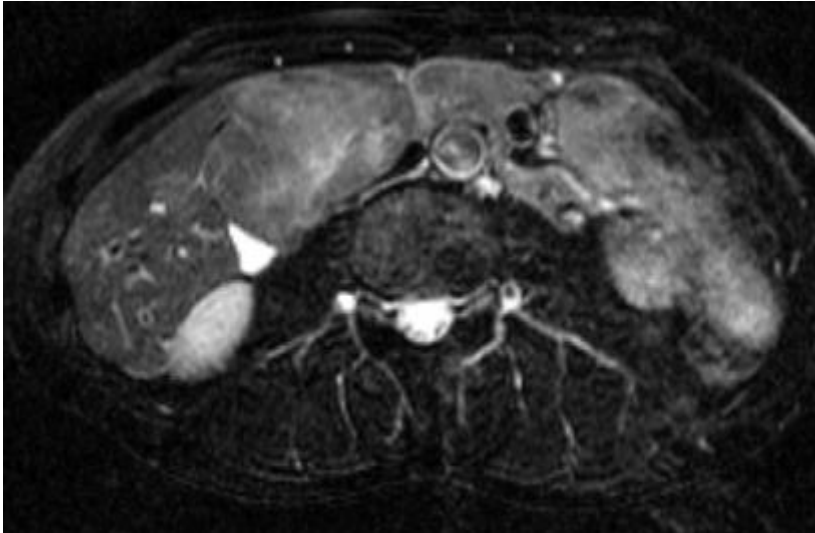


Bild 9: T2-Wichtung bei einem B-HCA in Segment IV. Hier sieht man die zentrale Narbe sowie eine heterogene Kontrastmittelaufnahme des Tumors [81].

U-HCA. Was den unklassifizierbaren Typ angeht, so sind bisher keine nennenswerten Phänomene in der MR-Bildgebung bekannt [81,84].

An dieser Stelle sollen nur die Hauptdifferentialdiagnosen zum HCA, nämlich die FNH und HCC in nicht- zirrhotischen Lebern etwas genauer vorgestellt werden.

FNHs präsentieren sich in T2 gewichteten Aufnahmen als homogen isointens bzw. leicht hyperintens sowie iso-oder hypointens in T1 gewichteten Aufnahmen. Typisch sind die markante und homogene Füllung sowie Signalintensität in der arteriellen Phase das schnelle „wash-out“ in der portalen Phase sowie die Isointensität zum gesunden Lebergewebe in der venösen Phase. In der hepatobiliären Phase zeigt sich die FNH als iso- bis hyperintens in T1-Wichtung. Das Hauptunterscheidungsmerkmal von HCA und FNH ist die zentrale Narbe der FNH, welche sich als hyper- oder hypointens in T1 bzw. T2- Wichtung und als hypointens während arterieller und portalvenöser mit einer leichten Hyperintensität in der venösen Phase zeigt [31,86].

Aufgrund des langen symptomfreien Intervalls werden HCC in nicht- zirrhotischen Lebern erst sehr spät entdeckt. Dabei sind die Tumoren schon auf eine beachtliche Größe herangewachsen. Aufgrund Ihrer starken hypervaskulären Natur stellen sich diese HCC in der arteriellen Phase als stark hyperintens sowie hypointens in portalvenöser und venöser Phase dar. In Abhängigkeit von Größe und innerem Aufbau der Läsion kann es zu einem mosaikartigen peripheren

Signalanstieg in der Läsion kommen. Unter Nutzung von leberspezifischen KM ist es möglich, moderat differenzierte von schwach differenzierten HCC zu unterscheiden [87].

Die Differentialdiagnose zwischen HCC und B-HCA sowie I-HCA ist kompliziert. Beide Adenomtypen können in T2 hyperintens sowie hypointens in T1 gewichteten Aufnahmen erscheinen. Ebenfalls ist ein heterogenes Enhancement in der arteriellen Phase, wash-out Phänomen sowie Hypointensität während der hepatobiliären Phase möglich [87].

1.5.2 Mikroskopie und Immunhistochemische Diagnostik

Wie bereits erwähnt stehen fünf immunhistochemische Marker zur Verfügung, welche eine repräsentative Aussage über den Subtyp von Leberadenomen machen können: Antikörper gegen LFABP, SAA, Betacatenin und Glutaminsynthetase (Tabelle 1).

Bezüglich der Antikörper gegen CRP existieren in der Literatur unterschiedliche Aussagen über Sensitivität/ Spezifität, sodass dieser Antikörper hier nicht aufgeführt wird.

Marker	Spezifität	Sensitivität
Anti-LFABP	100%	100%
Anti-SAA	94%	94%
Anti-Betacatenin	100%	85%
Anti-GS	89%	100%

Tabelle 1: Sensitivität und Spezifität von IHC- Markern bei der Subtypisierung von Leberadenomen [4,18]

Nicht allein die Subtypisierung wird durch diese Marker erleichtert, sondern sind sie auch von höchster Relevanz in Bezug auf die Differentialdiagnose zu den FNH. Diese typischen Charakteristika wurden in mehreren Publikationen beschrieben und validiert (Vgl. Tabelle 2) [4,18,42,44,89].

Diagnose	Anti-LFABP	Anti-SAA/ Anti-CRP	Anti-GS	Anti- Betacatenin
H-HCA	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
I-HCA	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ
B-HCA	Positiv	Negativ	Positiv	Vereinzelt positiv
Betacateninmutiertes I-HCA	Positiv	Positiv	Positiv	Vereinzelt positiv
U-HCA	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ
FNH	Positiv	Negativ	Positiv (map- like-pattern)	Negativ
tumorfrees Lebergewebe	positiv	negativ	Negativ	Negativ

Tabelle 2: Immunhistochemische Charakteristika der HCA-Subtypen [4,18]

Interessanterweise haben Bioulac-Sage et al. herausgefunden, dass im Vergleich zu einer direkten Biopsie von Lebergewebe auch die Feinnadelbiopsie sehr gute und spezifische Aussagen über die Tumoridentität einer Leberläsion treffen kann. In Kombination von Routine Histologie (H&E Färbung) und IHC können FNH mit einer Treffsicherheit von 96,8 % und HCA mit einer Treffsicherheit von 74,3% identifiziert werden [89].

Obwohl die bildgebenden Verfahren sehr solide Aussagen über die Identität eines Lebertumors geben, so ist nach wie vor die Histologie im Allgemeinen und die Immunhistochemie im Speziellen für HCA der Goldstandart der Diagnostik.

1.6 Strategien bei der Behandlung von Leberadenomen

In Abhängigkeit von Anzahl, Größe, Rupturrisiko sowie dem Risiko der Transformation in ein HCC und den möglichen Begleitumständen wie Schwangerschaft oder verschiedene Grunderkrankungen (GSD I oder II, MODY, etc.) gibt es verschiedene Strategien, die zur Behandlung von Leberadenomen verfolgt werden können. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, eine Leitlinie zu erstellen, an der man sich orientieren könnte.

Bekannt ist, dass Leberadenome nach der Einstellung der Einnahme von Oralen Kontrazeptiva und Steroide sich verkleinern und sogar vollständig zurückbilden können [7,90].

In Abhängigkeit der Größe der Adenome kann man verschiedene Therapiemöglichkeiten ausmachen. Viele Autoren sind der Meinung, dass eine Resektion von Adenomen größer als 5 cm im Hinblick auf maligne Transformation und Rupturrisiko indiziert wäre [36,91–93]. Die Indikation zur Resektion stellen auch Tumoren, bei denen, unabhängig von ihrer Größe, eine Malignität nicht sicher auszuschließen ist [94].

Die Möglichkeit des klinischen follow-ups mit nach sechs-monatig erfolgreicher MRT-Kontrolle obliegt eher den Tumoren die kleiner als 5cm sind [7].

Eine Resektion sollte, laut einem Review von van Aalten et al., auch dann erfolgen, wenn eine junge Patientin mit Adenomen größer als 5 cm und einem bereits stattgefundenen klinischen follow-up ohne Größenregredienz, einen Kinderwunsch hegt. Ebenso postmenopausale Patientinnen nach 6-monatigen follow up sowie Männern mit HCA, welche aufgrund des Geschlechts ein höheres Risiko eines B-HCA tragen, sollten sich einer operativen Therapie unterziehen [7,95].

Barthelmes & Tait beschrieben vier Gründe, warum eine Resektion eines solitären Leberadenoms erfolgen sollte:

1. Risiko der Malignität
2. Blutungs- bzw. Rupturrisiko
3. Bildgebung allein ist unzureichend, um ein HCA von einem gut differenzierten HCC zu unterscheiden
4. Garantierte Heilung vom Tumor mit unwahrscheinlichem Rezidiv [96]

Verschiedene Studien postulieren die laparoskopische Resektion von Leberadenomen als beste Möglichkeit der operativen Therapie, da diese eine überaus gute Indikation für minimalinvasive Chirurgie mit optimalen Outcome versprechen [97,98].

Für kleinere (<4cm) Tumoren ist auch die Möglichkeit der Radiofrequenzablation erfolgreich und sicher [99–101].

Das Problem von Hämorrhagie und Ruptur ist gerade bei größeren Tumoren gegeben. Die Transarterielle Embolisation ist hierbei eine der erfolgversprechenden Methoden, wenn es um Spontanblutung sowie intraabdominelle Ruptur geht und kann, wenn korrekt durchgeführt, die akute Notwendigkeit chirurgischer Intervention zur Blutungskontrolle minimieren [102–104].

Wenige Studien behaupten auch, dass die Transarterielle Embolisation eine erfolgversprechende Methode zur Tumorreduktion bei größeren HCA sei [102,105].

Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Therapie von Leberadenomen bei Schwangeren bzw. bei jungen Frauen mit HCA und Kinderwunsch liegen. Vor allem das Rupturrisiko ist bei Schwangeren im dritten Trimenon aufgrund des erhöhten Levels an Sexualhormonen sowie der erhöhten Vaskularisierung der Leber stark erhöht [33]. Verschiedene Studien und Case Reports aus den 1970er und 1980er Jahren berichten über ein extrem erhöhtes Blutungsrisiko der HCA einhergehend mit einer stark erhöhten Mortalität von Fetus und Mutter [106–109]. Bis et al. beschreiben in einem Review von 1976 eine maternale Mortalität von 59% und eine fetale von 62% [110]. Jedoch wurden bei diesen hohen Zahlen weit risikoreichere Mortalitätsursachen wie Präeklampsie und Lungenembolie nicht herausselektiert [106,107].

Dementsprechend gibt es verschiedene therapeutische Ansätze, die nicht zuletzt auch in Abhängigkeit von der Adenomgröße individuell zu bewerten sind. So scheint es sinnvoll zu sein, Patientinnen mit großen Adenomen oder stark proliferierenden HCA (>5cm) primär von einer Schwangerschaft abzuraten und zunächst die Läsion zu beseitigen. Bei kleineren Läsionen unter 5cm besteht die Möglichkeit unter 6 wöchiger Ultraschallkontrolle die kleinen Adenome zu belassen und dennoch schwanger zu werden. [111–113].

Ein letzter Punkt sollte ebenfalls noch beachtet werden, wenn man sich mit der Therapie der Leberadenome auseinandersetzt: Die Therapie multipler Adenome bzw. der Leberadenomatose. Laut Barthelmes & Tait ist die einzige Heilung die Lebertransplantation. Wichtig ist, nach Erstdiagnose der Adenomatose und Differenzierung des Subtyps, dass die Patienten in ein Überwachungsprogramm integriert werden, in dem eine im Intervall stattfindende CT- oder MRT- gestützte Bildgebung sowie eine Messung von AFP- Werten enthalten sind. Patientinnen sollten die Orale Kontrazeption aufgeben sowie Schwangerschaften vermeiden. Falls es zu Komplikationen wie einer Blutung kommt sollte der Tumor entfernt werden bzw. bei massiver Form der Adenomatose eine Hemihepatektomie erfolgen. Ein Progress der Erkrankung sowie multiple subkapsuläre Adenome größer 4 cm mit dem Risiko der malignen Entartung sind eine feste Indikation zur multifokalen Leberresektion. Indikation zu einer Lebertransplantation sind bei Adenomatose eine Erhöhung des AFP, malignitätsverdächtige Läsionen in der Bildgebung, symptomatische Patienten mit markanter Hepatomegalie und sich wiederholenden Komplikationen in der Anamnese [96].

1.7 Ziel der Dissertation

Wissenschaftliche Arbeiten mit dem Thema „Hepatozelluläre Adenome“ nehmen seit der Möglichkeit der Subtypisierung in die o.g. Unterklassen immer weiter zu. Jedoch gibt es in Deutschland weder klare Leitlinien noch ein Register, welches diese seltenen Leberläsionen erfasst. Ziel dieser Arbeit soll sein, den Pool von Patienten mit HCA der Universitätsklinik Regensburg zu subtypisieren, katalogisieren und somit eine Basis für weitere Studien im Hinblick auf eine institutsübergreifende Zusammenarbeit deutschlandweit zu etablieren

2 Material und Methoden

2.1 Patientenselektion

Alle 29 Patienten, die im Zeitraum von 1997 bis 2014 an dem Universitätsklinikum Regensburg mit Leberadenom operiert wurden, wurden in die Studie mit eingeschlossen. Hierbei handelt es sich sowohl um solitäre als auch multiple Leberadenome sowie Leberadenomatosen. Von diesen Patienten wurden klinische Daten wie Geschlecht, Alter, BMI, Einnahme Oraler Kontrazeptiva sowie Anabolika/ Steroide, Stoffwechselerkrankungen und weitere Nebendiagnosen, die im Bezug zu Leberadenomen stehen systematisch gesammelt und ausgewertet.

2.2 Allgemeine Histologie

Alle entfernten Leberresektate wurden makroskopisch analysiert und vermessen. Zur weiteren morphologischen Diagnostik wurden die Adenome in einer 8%igen Formaldehydlösung fixiert, in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe entwässert, mit 100% Xylol gereinigt und in Gewebeblöcken mit Paraffin gebettet (Grundprinzip siehe Tabelle 3). Anschließend wurden die Blöcke unter Nutzung eines Schlittenmikrotoms in 2-3µm dünne Präparate geschnitten. Hierzu wurde der Paraffinblock zunächst auf einer Kühlplatte von -15°C gekühlt, dann geschnitten, in einem Wasserbad kurz gestreckt und danach auf den Objektträger (Superfrost plus der Firma R. Langenbrinck) aufgezogen. Dieser wurde daraufhin kurz bei Raumtemperatur angetrocknet und in einer Wärmekammer bei 72°C eine halbe Stunde angebrannt. Folglich wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) angefärbt.

Unter dem Lichtmikroskop wurde dann eine zunächst groborientierende Differentialdiagnostik in Hinblick auf HCA, FNH und HCC durchgeführt. Folgenden morphologischen Kriterien wurde besondere Beachtung geschenkt:

- Präsenz von Gallengängen/ Portalfeldern
- Pseudoportalfelder
- Grad der Steatosis im Lebertumor im Vergleich zum gesunden umliegenden Lebergewebe (Tabelle 4)
- Sinusoidale Dilatation in Entfernung von Leberarteriolen
- duktiläre Reaktion/ Inflammation im Zusammenhang mit früheren Portalfeldern
- isolierte Arteriolen
- Peliose
- Hämorrhagie
- Tumorkapsel
- Fibrotische Knoten und Septen/ zentrale Narbe
- Nukleäre Atypien/ Mitosefiguren
- Kern-Plasma-Relation

Schritt	Reagens	Dauer	Temperatur	Druck/ Vakuum
Fixierung	8% Formalin	1 h	37°C	Ja
	8% Formalin	1 h	37°C	Ja
Entwässerung	50% Ethanol	1 h	37°C	Ja
	70% Ethanol	1 h	37°C	Ja
	96% Ethanol	1 h	37°C	Ja
	96% Ethanol	1 h	37°C	Ja
	100% Ethanol	1 h	37°C	Ja
	100% Ethanol	1 h	37°C	Ja
Clearing	100% Xylol	1 h	37°C	Ja
	100% Xylol	1 h	37°C	Ja
Infiltration	Paraffin	45 min	60°C	Ja
	Paraffin	45 min	60°C	Ja
	Paraffin	45 min	60°C	Ja
	Paraffin	45 min	60°C	Ja

Tabelle 3: Grundprinzip der Fixation und Einbettung zur histologischen Diagnostik [114]

Anteil der Verfettung im Vergleich zum restlichen Gewebe (%)	Steatosis-Grad
< 5%	0
5-33%	1
34-66%	2
>66%	3

Tabelle 4: Gradierung der Steatosis in tumorösen sowie tumorfreien Gewebe

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Das Prinzip der Immunhistochemie

Seit Mitte der 1980er Jahre hat die Histodiagnostik eine suffiziente Methode, spezifische Gewebeeigenschaften auf der Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen: die Immunhistochemie. Obwohl schon Anfang der 40er Jahre durch Coons et al. der Nachweis von Mikroorganismen in Gewebeschnitten mittels fluoreszierenden Antikörpern [115] gelang, bedurfte es noch eine gewisse Zeit, ehe diese Methode Einzug in die histologischen Laboratorien hielt [114].

Immunhistochemische Färbemethoden basieren auf den Wechselwirkungen zwischen Antigenen der Zellen und deren, mit Markern gekoppelten, Antikörpern. Reaktionspartner sind dabei antigene Determinanten, sogenannte Epitope (meist spezifische Aminosäuresequenzen), und der spezifische primäre Antikörper. Diese chemischen Bindungen sind nicht kovalent, sondern beruhen auf Wasserstoffbrückenbindung, elektrostatischer Anziehung und van-der-Waals Kräften.

Das größte Anwendungsgebiet der IHC ist die Tumordiagnostik, wobei Identifikation, Klassifizierung und Subtypisierung sowie auch die Aussagen über die Aggressivität und Therapieresistenz und damit der Prognose der Erkrankung auswirken, möglich sind. Ein anderes Einsatzgebiet der IHC ist der direkte Erregernachweis in Geweben, wie beispielsweise bei der Helicobacterdiagnostik [114].

Für die immunhistochemische Aufarbeitung wird ebenfalls formalinfixiertes-paraffingebettetes Material verwendet. Wichtig ist, dass vor der Durchführung der Immunhistochemie das Paraffin aus dem Schnitt wieder entfernt wird. Hierfür eignet sich wiederum das oben schon erwähnte Xylol. Nach Entparaffinierung erfolgt die Rehydrierung mittels einer absteigenden alkoholischen Reihe, wobei darauf zu achten ist, dass die Schnitte nach Entparaffinierung nicht mehr austrocknen. Als nächster Schritt erfolgt die Demaskierung der Antigene, um eine optimale Antigen-Antikörper-Bindung zu gewährleisten. Unterschiedliche Möglichkeiten der Demaskierung können in Abhängigkeit der Antigene genutzt werden, wie beispielsweise die Andauung proteolytischer Enzyme, feuchte Hitze, Druckkochtopf, Wasserbad, Mikrowelle, Dampfgarer, Autoklav oder die Kombination aus Enzymandauung und Hitze.

Bevor man sich dem eigentlichen Färben zuwenden kann, muss zunächst der Antikörpertiter bestimmt werden. Dieser Titer entspricht der höchstmöglichen Verdünnung des Antiserums, bei der eine optimale, spezifische Anfärbung bei geringstem Hintergrund möglich ist.

Es existieren verschiedene immunhistochemische Färbemethoden, unter denen sich die, wie auch in dieser Studie genutzte, Polymer-Methode derzeit am stärksten durchzusetzen scheint [114].

Als Beispiel solcher Färbemethoden dient die sog. Zwei-Schritt-Polymermethode, welche u.a. Grundlage der automatisierten Prozesse in Färbemaschinen darstellt.

Ziel dieser Methode ist es durch ein Polymer, welches an den sekundären Antikörper gebunden ist, möglichst viele Marker an einen Primärantikörper zu binden. Außerdem ist eine größere Anzahl von Peroxidasemolekülen vorhanden bzw. gleich über mehrere Linker an den Primärantikörper gebunden. Hierbei kann die Sensitivität um ein Vielfaches gesteigert werden, ohne einen erhöhten Arbeitsaufwand wie bei den mehrstufigen Methoden, zu haben. Trotz der insgesamt verkürzten Gesamtdauer und der Unbeeinflussbarkeit durch endogenes Biotin, besitzt diese Methode einen Nachteil: in dichten Gewebestrukturen kann es aufgrund der schwer herauspühlbaren Makromoleküle zu einer verstärkten Hintergrundfärbung kommen. [114].

2.3.2 Anwendung der Immunhistochemie auf die Leberadenome der Studie

Zunächst wurden alle Gewebeblöcke auf einer Kühlplatte kurz gekühlt und mit einem Schlittenmikrotom in 2-3 µm große Schnitte geschnitten und wie oben erwähnt kurz angetrocknet.

Wichtig bei der IHC-Färbung ist die Aufreinigung von Paraffin in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 5) bis hin zum 70% Ethanol und darauf folgender Spülung mit Aqua dest.

Alle immunhistochemischen Färbungen der Leberadenome sowie auch Positiv- und Negativkontrolle wurden mit dem Färbeautomaten BenchMark ultra der Firma Ventana nach Protokoll des Herstellers gefärbt. Die Zuführung der erforderlichen Antikörper (Tabelle 7) erfolgte manuell während der einzelnen automatisierten Schritte.

Nach der Färbung wurden die Schnitte noch mittels Leitungswasser und Spülmittel gebläut und in einer aufsteigenden Alkoholreihe erneut eingebettet und fixiert.

Lösemittel	Zeit (Minuten)
Xylol	5
Xylol	5
Propanol 100%	3
Propanol 100%	3
Ethanol 96%	3
Ethanol 96%	3
Ethanol 70%	3

Tabelle 5: absteigende Alkoholreihe

Antikörper	Firma	Antikörpertiter
Anti-Liver Fatty Acid Binding Protein	abcam	1:25
Anti- Serum Amyloid A	Dako	1:50 und 1:100
Anti- C-Reaktives Protein	abcam	1:100
Anti- Betacatenin	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:200
Anti- Glutamin-Synthetase	BD Biosciences	1:700

Tabelle 6: Antikörper und Antikörpertiter

2.4 Anfertigung von Tissue Micro Arrays (TMA)

1986 entdeckten Battifora et al. die Möglichkeit Gewebeproben mehrerer verschiedener Präparate in einem Paraffinblock darzustellen. Mit dieser Innovation ist es seitdem möglich, gerade bei großen Patientenkollektiven einen wesentlich effektiveren Arbeitsablauf bezüglich der histologischen Diagnostik zu erreichen [116]. Es ist heute sogar möglich bis zu 1000 solcher Proben auf einen Paraffinblock zu bringen, um sie mit einem Arbeitsschritt zu färben [117]. Ziel unserer TMAs war es, die Tumoren der großen Paraffinblöcke immunhistochemisch mit den Stenzen der TMAs zu vergleichen und einen Eindruck über die diagnostische Sicherheit der Arrays bei Leberadenomen zu erhalten.

Auf den angefertigten H&E-Färbungen der Leberadenome wurden die repräsentativen Ausschnitte mittels Folienstift markiert und mit den Paraffinblöcken abgeglichen. Nun wurde mittels einer Stanze aus dem repräsentativen Material des Donorblocks ein Stück herausgestanzt und in den Rezipientenblock –ein aus Paraffin vorgefertigter Block mit ausgestanzten Zylindern des gleichen Durchmessers, wie die des zu untersuchenden Materials– eingelassen. Um eine optimale Bindung zwischen Paraffin des Rezipientenblocks und dem des Präparats zu erreichen, wurden die fertigen TMA- Blöcke bei 45°C für 20 Minuten inkubiert. Ebenfalls wurden Positiv- und Negativkontrollen sowie Kontrollen zum Normalgewebe in die Blöcke mit eingebracht.

Die Mikrotomie und Färbung der TMAs erfolgte nach gleicher Abfolge und mit gleichen IHC-Markern wie oben beschrieben. Die Auswertung der TMA erfolgte ebenfalls lichtmikroskopisch nach den oben genannten Kriterien.

2.5 Mikrodissektion und Isolation von DNA aus paraffingebetteten Leberadenomen

Zunächst wurden aus den Probeblöcken 4-5µm dicke Schnitte angefertigt, welche in einer absteigenden Alkoholreihe aufgereinigt und von Paraffin sowie Formalin befreit wurden. Nach der Aufreinigung erfolgte eine einmalige Färbung der Schnitte mit Methylenblau (SigmaChemicals) sowie eine daraufhin folgende zweimalige Spülung mit Aqua dest.

Um beim folgenden Isolationsschritt sicher zu sein, dass nur die DNA des Tumorgewebes isoliert wird, wurde der gebläute Schnitt mit den HE-Schnitten des Blocks, auf denen das Tumorgewebe mittels Filzstift markiert wurde, verglichen. Zuletzt erfolgte die Übertragung des durch Methylenblau sichtbar gewordenen Tumorgewebes zu dem Isolationsgemisch. Nach guter Durchmischung und kurzer Zentrifugation bei 8000 rpm erfolgte der Verdau im Thermomixer bei 37°C und 450 rpm über Nacht.

Das DNA- Isolationsgemisch MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) der Firma ROCHE besteht aus 90µl Puffer (03186229001) und 25µl Proteinase K, die in 1.5ml Eppendorf Cups laut Anweisung des Herstellers zusammengemischt wurden.

Die Isolation der DNA erfolgte dann unter Nutzung des MagNA Pure LC 2.0 Systems automatisch.

Das dadurch gewonnene Gemisch wurde dann mit Hilfe der Photospektrometrie auf den Gehalt der DNA untersucht. Dafür wurde 1µl des Substrats auf die Nadel des Photospektrometers (NanoDrop Spectrophotometer) gegeben und automatisch gemessen.

2.6 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Mutationsanalyse im Betacatenin-Gen auf Grundlage der Gen-Sequenzierung

2.6.1 *Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion*

Die PCR ist die Methode der Wahl, welche es ermöglicht auf einfache und schnelle Weise DNA zu vervielfältigen. Der typische Ablauf einer PCR besteht immer aus einer definierten Sequenz folgender drei Schritte: einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt.

Bei der Denaturierung trennen sich bei 94°C die beiden Stränge der Template-DNA, damit die Taq-Polymerase an einen Strang andocken und beginnen kann, einen neuen zum Strang passenden DNA-Strang mit Hilfe von Oligonukleotidprimern und dNTPs zu synthetisieren. Zuvor muss jedoch die Temperatur des Reagenz auf 55°C gesenkt werden, sodass es zur Hybridisierung der überschüssig vorhandenen Oligonukleotidprimern an die Einzelstränge der Template- DNA kommen kann (Annealing). Anschließend wird die Temperatur auf den für die Taq-Polymerase optimalen Wert von 72°C angehoben und die DNA Synthese kann starten, der Primer kann verlängert werden (Elongation). Da die DNA- Synthese an beiden Strängen der Template- DNA stattfindet, bekommt man am Ende des ersten Durchganges die doppelte Zahl an Template- DNA. In den darauf folgenden Zyklen kommt es zu einer Potenzierung der Template- DNA.

2.6.2 Anwendung der PCR in der Studie

Der photospektrometrisch bzw. elektrophoretisch bestimmte DNA- Gehalt der o.g. Lösung kann nun im Verhältnis zu der Master-Mix Lösung (Tabelle 8) zugesetzt werden und die PCR kann beginnen.

Für die Reaktion nutzten wir den Peltier Thermal Cycler PTC200 von MJ Research.

Für die PCR des Betacatenin-Gens und Mutationsanalytik wurde folgende Basenfolge als Primer verwendet: metabion Bcat-PCR down 5'-GCT ACT TGT TCT TGA GTG AA-3' sowie metabion Bcat-PCR up 5'-GGA GTT GGA CAT GGC CAT GG-3'.

	µl	Endkonzentration	Stammlösung
Millipor-Wasser	146,9		
DMSO	19,5	5%	100%
Magnesiumdichlorid	39,0	2,5µM	25µM
10x Rx Puffer mit Ammoniumtetrasulfat	39,0	1x	10x
dNTPs	7,8	0,2mM	10mM
Primer	3,9	0,2µM	25µM
Taq. Pol. Fermentas	3,9	0,05U/µl	5U/µl
gesamt	260		

Tabelle 7 Master-Mix für insgesamt 13 Reaktionen

Ziel ist eine Gesamtmenge des PCR-Ansatzes von 30 µl zu erhalten. Dafür werden 20 µl des Master-Mixes und 10 µl Template DNA zusammen gemischt. Was die Template DNA angeht, so ist die Menge an DNA von Probe zu Probe unterschiedlich. Wichtig ist, dass die Template Menge genau 100 ng entspricht. Somit werden diese unterschiedlichen Konzentrationen mit Aqua dest. auf 10 µl verdünnt.

Dann wurde der Ansatz in den Cycler eingebracht und die PCR gestartet.

Denaturierung	94°C	3 Minuten	
<hr/>			
Denaturierung	94°C	1 Minute	
Annealing	55°C	1 Minute	35 malige Wiederholung
Elongation	72°C	1 Minute	
<hr/>			
Elongation	72°C	8 Minuten	

Schema 1: PCR des Betacatenin-Gens

2.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Agarosegelen

Nach der PCR wird mit Hilfe der Gelelektrophorese der Gehalt der DNA aus der PCR quantifiziert.

Um ein 2,5% Agarosegel zu erhalten wurden 2.5 g Biozym LE Agarose (Scientific GmbH) in 100ml TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle (BOSCH) aufgeköcht bis die Lösung klar war. Danach wurden 3 µl des Loading-Puffers mit 5 µl der Probe versetzt und in die Taschen der Gel-Kammern eingebracht. Als Standard dienten 3 µl Standardlösung für Agarosegele von Fermentas Gene Ruler 100bp. Daraufhin wurde eine Spannung von 110 V an die Kammern angeschlossen und das Experiment nach 30 minütiger Laufdauer beendet.

Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Färbung des Gels mit 0,05%iger Ethidiumbromidlösung für 5-10 Minuten. Nach dieser Zeit erfolgte zur Reduzierung der

Hintergrundfluoreszenz durch freies Ethidiumbromid eine Entfärbung des Gels in Aqua dest. Daraufhin wurde das Gel unter UV-Licht (Wellenlänge und Gerät) fotografiert. Anhand der so entstandenen Banden konnte nun der DNA-Gehalt der Probe ermittelt werden.

2.8 DNA-Sequenzierung

Für die Mutationsanalyse des Betacatenin-Gens wurde der Genetic Analyzer 3130 von Hitachi benutzt. (siehe Schema 2).

Der Ablauf der Sequenzierungsreaktion ist analog zu dem der oben beschriebenen PCR, jedoch mit anderen Reaktionstemperaturen und Reaktionszeiten.

Die Reaktionspartner sowie Primer sind gleich denen der o.g. PCR. Der Unterschied besteht jedoch im Verhältnis von DNA und Master Mix. Dabei wurde der aus der Gelelektrophorese ermittelte DNA-Gehalt zum Mastermix ins Verhältnis gesetzt um somit das neue Reaktionsgemisch zu erhalten, welches nach dem unten gezeigten Schema sequenziert wurde.

Denaturierung	96°C	15 Sekunden	
Annealing	60°C	15 Sekunden	25 malige Wiederholung
Elongation	62°C	4 Minuten	

Schema 2: Sequenzierungsreaktion

Die Auswertung der Sequenzierungsreaktion erfolgte durch einen Pathologen unseres Hauses.

2.9 Radiologische Daten

Die radiologischen Daten lagen retrospektiv für 26 Patienten vor und wurden mit den Befunden aus der IHC verglichen.

3 Resultate

3.1 Patienten

Für die Studie wurden insgesamt 29 Patientinnen und Patienten ausgewählt, die im Zeitraum von 1997 bis 2014 am Universitätsklinikum Regensburg an Leberadenomen operiert wurden. Insgesamt wurden 56 solitäre und multiple Leberadenome sowie vier Leberadenomatosen diagnostiziert.

Eine systematische Reevaluation bezüglich Einnahme oraler Kontrazeptiva bzw. Anabolika, Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, GSD oder FAP wurde retrospektiv durchgeführt (Tabelle 14).

Der Durchschnitts-BMI lag bei 29,75 kg/m², wobei der niedrigste Wert bei 18,25 kg/m² und der höchste Wert bei 60,72 kg/m² lag.

Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation lag bei 40,97 Jahren, wobei spezifisch für die Männer ein Altersdurchschnitt von 47,97 Jahren und für die Frauen von 39,17 Jahren vorlag. Trotz intensiver Recherche der Patientenakten konnte nur bei 13 der 23 Patientinnen ein Gebrauch Oraler Kontrazeptiva nachgewiesen werden, der im Mittel bei 14,25 Jahren lag. Ein männlicher Patient bestätigte die regelmäßige Einnahme von Anabolika über Jahre.

Vier Patienten hatten einen Diabetes mellitus (zwei einen Typ 1 zwei einen Typ 2), ein Patient litt an Eisenmangelanämie. Ein Patient hatte zusätzlich eine Glykogenose sowie chronische Pankreatitis und Hyperthyreose. Ein anderer Patient hatte bereits eine Operation bei Mittelohr-Karzinoid (Tabelle 14).

3.2 Tumorgröße, Anzahl und Lokalisation

Der durchschnittliche Durchmesser der Leberadenome lag bei 7,24 cm, wobei der kleinste entfernte Tumor eine Größe von 1,7 cm (Fall 25) aufwies und die Größten 19 cm (Fälle 13 und 14) maßen.

Von den 29 Studienpatienten hatten 17 solitäre Adenome, 8 multiple (zwischen 2 und 9) HCA und 4 eine Adenomatose. Tabelle 8 zeigt die Größe der Adenome in Abhängigkeit ihrer Anzahl. Hier sieht man, dass vor allem die kleinen Adenome (kleiner 5cm) noch solitär vorkommen, multiple Adenome jedoch vor allem im Bereich von 5 cm bis 10 cm liegen.

Alle männlichen Patienten hatten Tumoren mit einem Durchmesser unter 10 cm. Bei 5 von 6 männlichen Patienten wurden solitäre Adenome gefunden. Bei Fall 15 wurden 6 HCA diagnostiziert. Bei 18 von 23 weiblichen Patienten fanden sich ebenfalls Tumoren kleiner 10cm. 12 Patientinnen hatten solitäre Tumoren. (Tabelle 9).

Anzahl

		Durchmesser				Gesamtsumme
		kleiner 5cm	kleiner 10cm	kleiner 15cm	kleiner 20cm	
Adenome	1	7	7	1	2	17
	2	2	0	0	0	2
	3	0	1	0	0	1
	4	0	1	0	0	1
	6	2	0	0	0	2
	7	0	0	0	1	1
	9	0	1	0	0	1
	>/=10	0	3	0	1	4
Gesamtsumme		11	13	1	4	29

Tabelle 8: Anzahl der Leberadenome in Abhängigkeit ihres Durchmessers.

		Geschlecht		Gesamtsumme
		weiblich	männlich	
Durchmesser	kleiner 5cm	8	3	11
	kleiner 10cm	10	3	13
	kleiner 15cm	1	0	1
	kleiner 20cm	4	0	4
Gesamtsumme		23	6	29

Tabelle 9: Durchmesser der Adenome in Abhängigkeit des Geschlechts

3.3 Operative Therapie

Die Verdachtsdiagnose Leberadenom DD FNH/ HCC erfolgte in den meisten Fällen als Zufallsbefund bei einer Oberbauchsonographie und wurde mittels anderer bildgebender Verfahren wie CT und MRT spezifiziert (s.u.).

Die Indikationsstellung richtete sich primär nach Tumordurchmesser- und Anzahl sowie differentialdiagnostisch nicht auszuschließender Malignität.

Bei einer Patientin (Fall 13) erfolgte eine Notoperation bei Akutem Abdomen aufgrund einer Ruptur eines knapp 20cm großen Leberadenoms. .

In 69% der Fälle (20/29) war eine typische oder atypische Segmentresektion eines oder mehrerer Lebersegmente ausreichend. In jeweils 2 Fällen musste eine linkslaterale bzw. erweiterte linkslaterale Leberresektion durchgeführt werden. Von den Patienten mit Leberadenomatose wurden zwei erweitert hemihepatektomiert sowie ein Patient hemihepatektomiert und adenomenukleiert. Bei einer Patientin (Fall 18) lagen die Adenome primär im Segment VI, sodass eine typische Segmentresektion durchgeführt wurde, jedoch unter Belassen kleinerer Leberadenome.

Aufgrund der randständigen Lage eines 5,5cm großen HCAs im Segment VI konnte bei einer Patientin (Fall 29) eine laparoskopische Subsegmentresektion durchgeführt werden.

Im Fall 6 wurde aufgrund der disseminierten Lage der Leberadenome eine typische Segmentresektion von drei Segmenten sowie eine atypische Resektion von zwei Lebersegmenten vorgenommen.

Tabellen 10 und 11 zeigen die angewendeten operativen Verfahren in Abhängigkeit von Tumoranzahl und jeweiligem Durchmesser; bei multiplen Adenomen bemessen am Maximaldurchmesser eines Tumors.

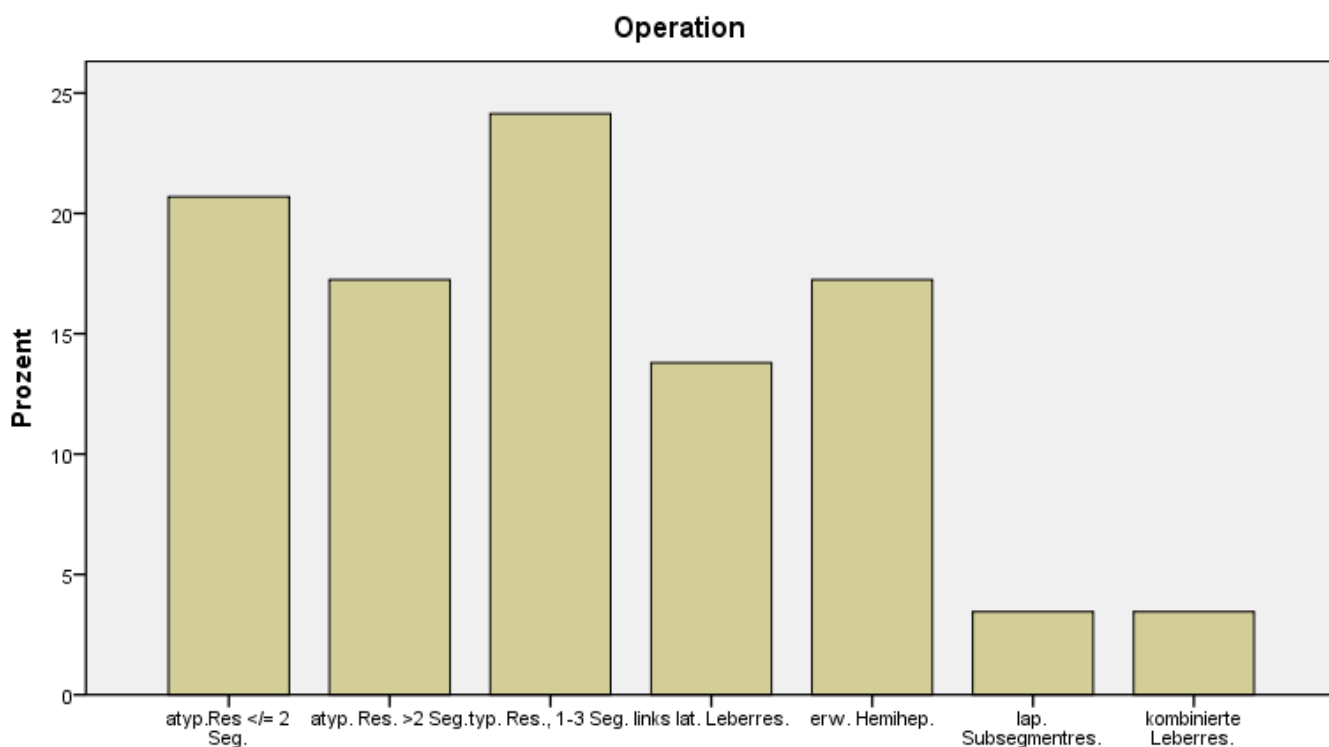


Diagramm 1: operative Verfahren bei HCA

Anzahl

Operation	Durchmesser				Gesamtsumme
	< 5cm	< 10cm	< 15cm	< 20cm	
atyp. Res <= 2 Seg.	4	2	0	0	6
atyp. Res. >2 Seg.	2	2	1	0	5
typ. Res., 1-3 Seg.	1	4	0	2	7
links lat. Leberres.	2	2	0	0	4
erw. Hemihep.	1	2	0	2	5
lap. Subsegmentres.	0	1	0	0	1
kombinierte Leberres.	1	0	0	0	1
Gesamtsumme	11	13	1	4	29

Tabelle 10: Operationen in Abhängigkeit des Tumordurchmessers.

Anzahl

		Anzahl				Gesamtsumme
		1-2 HCA	3-4 HCA	6-9 HCA	Adenomatose	
Operation	atyp.Res <= 2 Seg.	4	2	0	0	6
	atyp. Res. >2 Seg.	3	1	1	0	5
	typ. Res., 1-3 Seg.	6	0	0	1	7
	links lat. Leberres.	4	0	0	0	4
	erw. Hemihep.	0	0	2	3	5
	lap. Subsegmentres.	1	0	0	0	1
	kombinierte Leberres.	0	0	1	0	1
Gesamtsumme		18	3	4	4	29

Tabelle 11: Operationen in Abhängigkeit der Adenomanzahl.

Interessanterweise ist die Lokalisation der Tumoren vor allem in den Segmenten V bis VIII verteilt (57%), der linke Leberlappen ist mit 27% der Tumoren infiltriert. (Tabelle 12)

Segment	Anteil in %
Segment I	1
Segment II	15
Segment III	12
Segment IVa	7
Segment IVb	8
Segment V	11
Segment VI	20
Segment VII	14
Segment VIII	12

Tabelle 12: Lokalisation der Tumoren

3.4 Prä- und Postoperative Komplikationen

Wie eingangs erwähnt sind die Hauptkomplikationen eines HCA die Ruptur, einhergehend mit teilweise massiven Blutungen, sowie die maligne Entartung.

In der Studiengruppe hatten 21 von 29 Patienten (72,4%) keine relevanten Komplikationen. Hb-wirksame Blutung traten sowohl prä- als auch postoperativ in zwei Fällen auf. Bei einer Patientin mit Adenomatose (Fall 18) musste aufgrund der Vielzahl an Adenomen ein kleiner Teil intrahepatisch belassen werden. Bei einer anderen Patientin verblieben aufgrund signifikanter Steatosis hepatis ebenfalls zwei zentrale Läsionen (Fall 28).

(Tabelle 13)

Komplikation		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozent	Kumulative Prozente
Gültig	präoperative Ruptur/ Blutung	2	6,9	6,9	6,9
	postoperative Blutung	2	6,9	6,9	13,8
	Belassen von LCA aufgrund Inoperabilität	2	6,9	6,9	20,7
	keine Komplikationen	21	72,4	72,4	93,1
	p.o. intrahepatischer Verhalt/ blutig tingiertes Serom	2	6,9	6,9	100,0
	Gesamtsumme	29	100,0	100,0	

Tabelle 13: Prä- und Postoperative Komplikationen.

ID-Nummer	Geschlecht	Operationsalter (J)	BMI	Gebrauch oraler Kontrazeptiva/ Anabolika	relevante Begleiterkrankungen	durchgeführte Operation	Komplikationen	Anzahl der Adenome	maximaler Durchmesser (cm)
1	weiblich	39,7	25,15	20	Struma nodosa Typ II	atyp. Segmentresektion S II	Hb sig. Nachblutung	1	6,5
2	männlich	43,1	26,42	n	Diabetes mellitus Typ 2	typ. Segmentresektion SVII und VIII	nein	1	6,5
3	weiblich	32,6	39,06	7	chronische Cholezystitis, Steatosis hepatis	atyp. Segmentresektion SII und S VI,VII	nein	3	6
4	weiblich	50,7	24,24	20	keine	Adenomexstirpation und Leberresektion S II/III	nein	1	18,2
5	weiblich	47,9	25,61	20	keine	atyp. Segmentresektion S VII und VIII sowie Anteilen von IV a	nein	1	4,8
6	weiblich	40,3	33,3	unklarer Zeitraum	keine	Trisegmentektomie (5/6/7); atyp. Resektion S 4 und S2/3	präop. Einblutung	6	3,5
7	weiblich	50,3	31,25	12	pleomorphes Adenom der Gl. Parotidea	erweiterte Lobektomie links	nein	1	9
8	weiblich	24,4	20,9	unklarer Zeitraum	keine	atyp. Segmentresektion S VII und Anteilen von S VI und VIII	nein	1	4
9	weiblich	36	22,38	unklarer Zeitraum	keine	atypische Segmentresektion VI	nein	1	1,4
10	männlich	54,7	34,29	n	insulinpflichtiger Diabetes mellitus Typ 3	atyp. Segmentresektion S VI und V	nein	1	6
11	weiblich	32,1	18,25	15	Hypercholesterinämie	Links laterale Leberresektion	nein	2	2
12	weiblich	41,5	25,39	n	Cholezystolithiasis	Links laterale Leberresektion	nein	1	5

13	weiblich	41,2	k.A.	k.A.	keine	zentrale Leberresektion (Segm. IVB, V, VI)	Ruptur	1	19
14	weiblich	37,2	36,12	10	Diabetes mellitus Typ 1, Steatosis hepatis, Hyperlipidämie	Hemihepatektomie rechts, atypische Resektion Segment III,	nein	7	19
15	männlich	28,5	32,41	Anabolika, unklarer Zeitraum	keine	Hemihepatektomie links, Subsegmentresektion S VI (2x) und S VII (1x)	inf. Galleleck und Hb sig. Nachblutung	6	4
16	weiblich	28,2	37,18	k.A.	Diabetes mellitus Typ 1, Glycogenose Typ IV	atyp. Segmentresektion S II mit RITA S V (2 x), C2-Instillation, S VI/VII	nein	4	7,5
17	weiblich	26,6	20,03	10	keine	Enukleation Adenom S III (ventral) und S VI	nein	2	3,8
18	weiblich	47,3	23,26	unklarer Zeitraum	Hyperthyreose	typ. Segmentresektion S VI	aufgrund Vielzahl Belassen kleinerer HCA	Adenomatose	6,5
19	weiblich	27	36,21	k.A.	keine	Hemihepatektomie re., Adenomenukleation li. lateral an S II/III	zweizeitiges Vorgehen, kleine Leber	Adenomatose	6,3
20	männlich	66	29,26	n	keine	typische Segmentresektion S IVb und VIII	nein	1	5
21	weiblich	46,5	31,71	k.A.	latente Hyperthyreose, Cholecystolithiasis	atyp. Segmentresektion S VI/VII	nein	1	2,5
22	weiblich	42,9	60,72	k.A.	keine	erweiterte Hemihepatektomie rechts (S II-IV, VIII, Teile I, V,)	nein	Adenomatose	19
23	weiblich	31	30,44	k.A.	keine	Hemihepatektomie rechts (S V-VIII),	nein	Adenomatose	6

						erweitert um Teile von S IV. b			
24	weiblich	57,4	21,97	k.A.	keine	atyp. Segmentresektion IVb, V, VI	nein	1	13
25	männlich	24,9	25,51	n	Z.n. Mittelohrkarzinoid	atyp. Segmentresektion VI	S p.o. blutig tingiertes Serom am Resektionsrand	1	1,7
26	weiblich	49	24,98	k.A.	Schilddrüsenkarzinom	atyp. Segmentresektion S V/ VIII, S VIII, SV, SIV, links laterale Leberresektion	nein	1	6,7
27	männlich	70,2	26,12	n	keine	typ. Segmentresektion VII und VIII	intrahep. Verhalt	1	5,8
28	weiblich	34,4	40,09	k.A.	Hyperlipidämie	atypische Segmentresektion II,II,VI,VII,VIII,IVa,	S 2 zentrale HCA aufgr. Steatosis belassen	9	5,7
29	weiblich	36,7	k.A.	k.A.	keine	lap. Subsegmentresektion S VI	nein	1	5,5

Tabelle 14: Patientendaten

3.5 Präoperative radiologische Befunde

Alle Patienten unterzogen sich präoperativ einer Bildgebung in Form von MRT oder CT. Trotz intensiver Suche in unserer Datenbank, waren die Befunde von lediglich 22 Patienten noch auffindbar.

Wie Tabelle 15 zeigt, sind viele, später histologisch eindeutig als HCA identifizierte, Lebertumoren als unklare Raumforderung (31,8%) bzw. als malignitätsverdächtig (22,7%) eingestuft wurden, was wiederum die Basis für eine schnelle operative Therapie der Patienten darstellt.

Interessanterweise zeigte sich eine Korrelation zwischen zystischen Läsionen und den HCA. 5 der 22 Patienten (22,7%) wiesen zystische Strukturen im gesunden Lebergewebe auf (Fall 5,9,11,21,27)

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozent	Kumulative Prozente
Gültig HCA	4	18,2	18,2	18,2
Malignität möglich	5	22,7	22,7	40,9
HCC	4	18,2	18,2	59,1
Metastase	2	9,1	9,1	68,2
Unklar	7	31,8	31,8	100,0
Gesamtsumme	22	100,0	100,0	

Tabelle 15 : Darstellung der präoperativen radiologischen Befunde der HCA

3.6 Subtypisierung der Leberadenome

Wir lehnten unsere Studie den aktuellen Ergebnissen der Bordeaux-Gruppe um Bioulac-Sage und Zucman-Rossi an. Somit subtypisierten wir die Leberadenome nach dem eingangs erwähnten Schema.

Die histologische Einteilung erfolgte in

- Inflammatorische HCA
- HNF1- Alpha mutierte HCA
- Betacateninmutierte HCA
- Unklassifizierbare HCA

Die Untergruppe der inflammatorischen betacateninmutierten HCA wurde in unserer Studienpopulation nicht detektiert.

Wichtig dabei ist, dass auch bei multiplen Adenomen bzw. Adenomatosen pro Patient immer nur ein Subtyp auftrat.

Zunächst erfolgte eine systematische Befundung der Morphologie der Präparate mittels H&E Färbung. Hier kristallisierten sich bereits erste Hinweise auf den Subtyp heraus, welche wir dann versuchten mittels IHC zu bestätigen.

Tabelle 16 und Diagramm 2 zeigen die endgültige Subtypisierung.

Subtyp		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozent	Kumulative Prozente
Gültig	inflammatorisch	19	65,5	65,5	65,5
	HNF1A	7	24,1	24,1	89,7
	unklassifiziert	1	3,4	3,4	93,1
	Betacatenin	2	6,9	6,9	100,0
	Gesamtsumme	29	100,0	100,0	

Tabelle 16: Subtypen der HCA

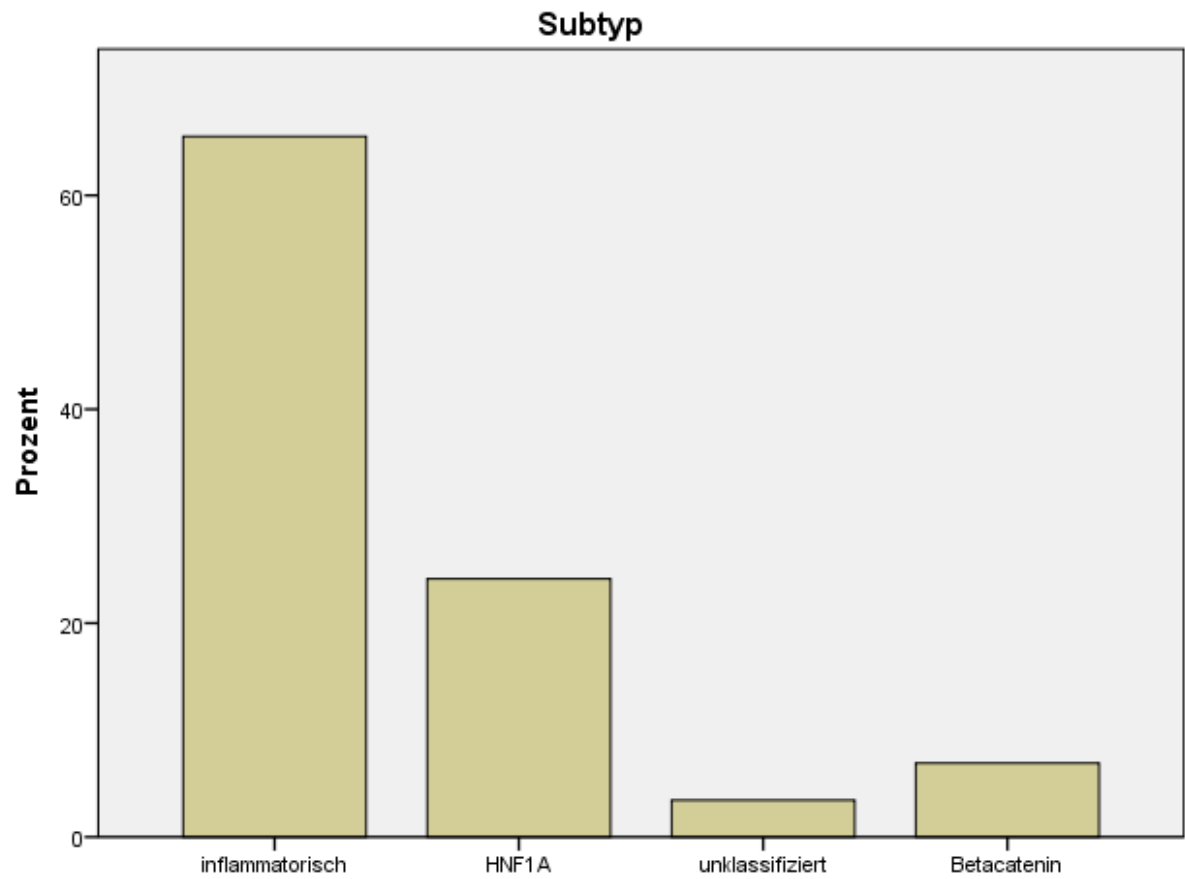


Diagramm 2: Darstellung der einzelnen Subtypen

3.6.1 *Der Inflammatorische Subtyp*

Mit 65,5% (19Fälle) stellt der inflammatorische Subtyp den Hauptteil der Studienpopulation dar. Wie allein schon der H&E Schnitt zeigt, finden sich hier stark erweiterte Sinusoide, inflammatorisches Infiltrat sowie, jedoch nicht in allen IHCA aufzufinden, teilweise starke hämorrhagische Infarzierungen bzw. Peliosis.

Bei diesem Subtyp zeigte sich auch in unserer Studiengruppe eine starke Anreicherung in der immunhistochemischen Untersuchung mittels Anti-CRP und Anti-SAA. Anti- Betacatenin und Anti- GS waren beide negativ, Anti- LFABP wie erwartet positiv.

Fall 7 zeigt recht eindrücklich die starke sinusoidale Dilatation und Hämorrhagie bei inflammatorischen HCA. (Bild 10 und 11).

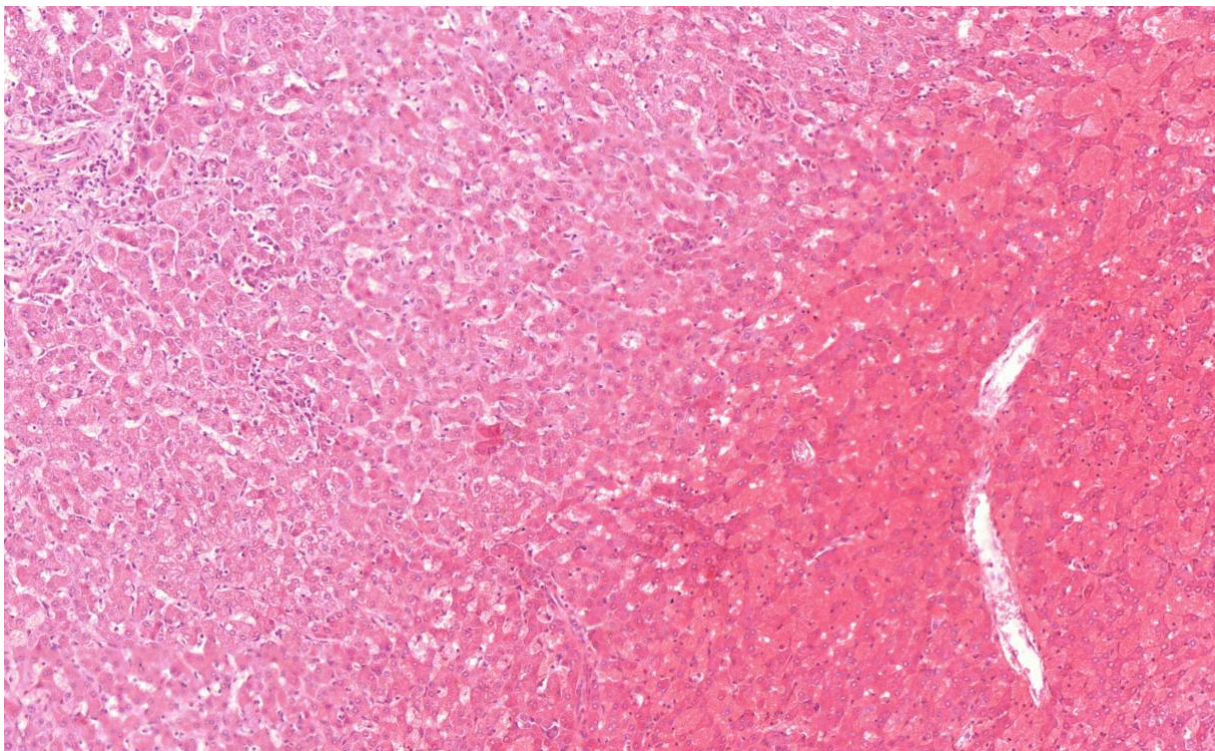


Bild 10: Morphologie eines IHCA (H&E- Färbung, Fall 7)

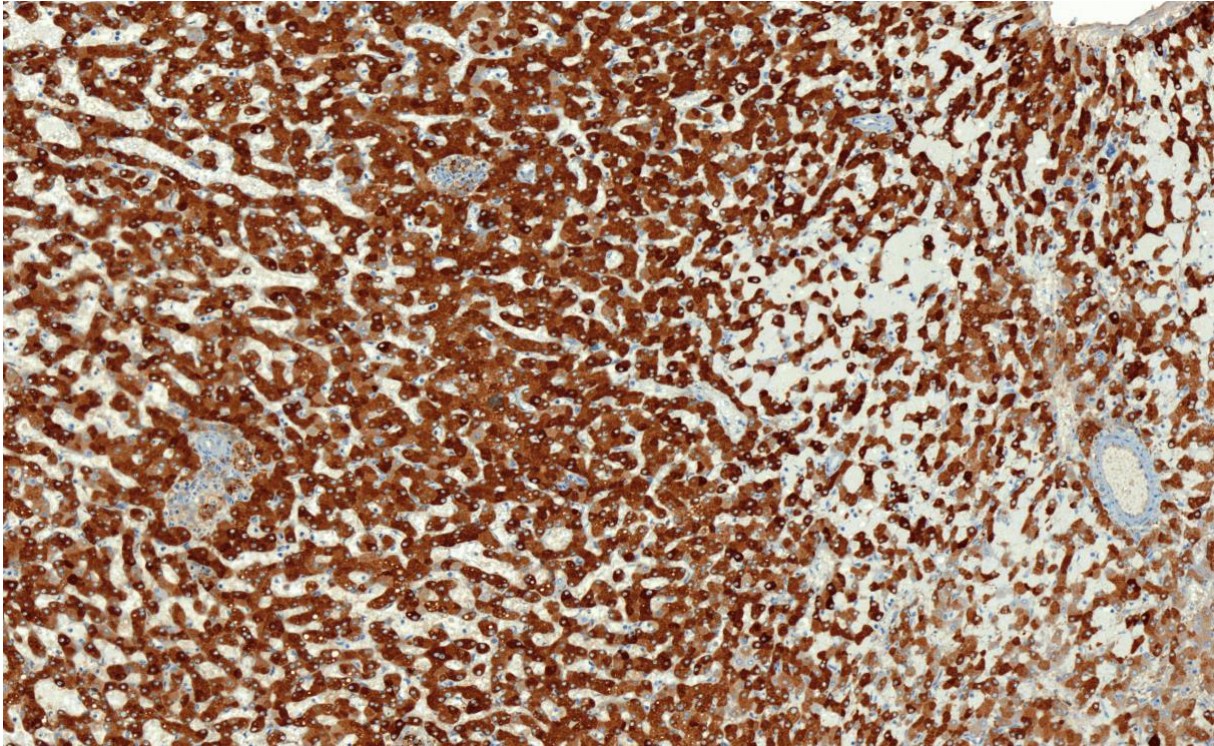


Bild 11: Anti-CRP Färbung eines IHCA (Fall 7)

Einen Sonderfall unter inflammatorischen HCA stellt Fall Nummer 22 dar.

Interessant ist, dass trotz BMI von 60,72 kg/m² das Adenom im Vergleich zum normalen Lebergewebe mit ca. 70% Verfettung (Bild 12) keinen Anhalt auf Steatosis bot und daher nicht, wie aus den klinischen Daten erwartet HNF1A mutiert war.

Bild 13 zeigt einen Ausschnitt aus einem mit H&E gefärbten IHCA (Fall 22).

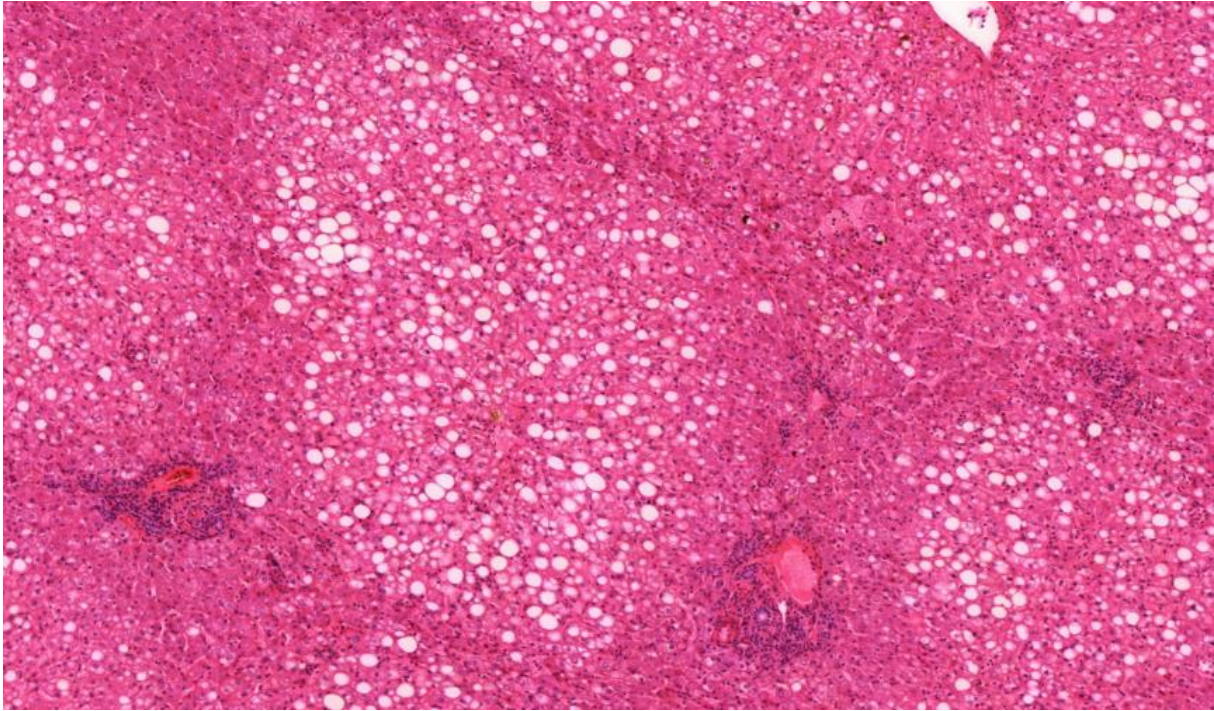


Bild 12: Normalgewebe einer mäßig verfetteten Leber bei IHCA (Fall 22)

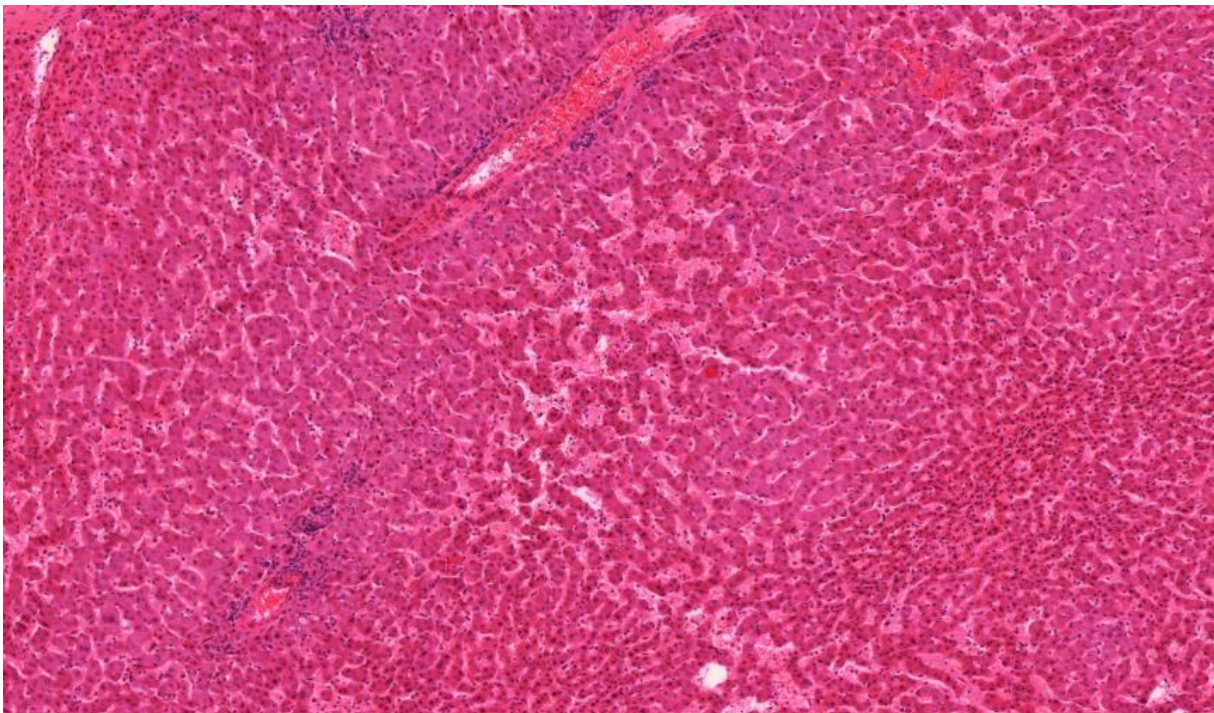


Bild 13: Morphologie eines IHCA (H&E Färbung des Falls 22)

Um die These eines IHCA zu beweisen, färbten wir das Gewebe zum einen mit Anti- CRP und zum anderen mit Anti-SAA (siehe Bild 14 und 15). Interessanterweise reicherten sich diese Marker auch im Normalgewebe an, jedoch nicht so stark, wie in der Läsion selbst. Als

Gegenbeweis wurde das Gewebe noch mit Anti-LFABP gefärbt, wobei sich hier eine flächendeckende Anreicherung im Tumor, wie auch Normalgewebe präsentierte (Bild 16).

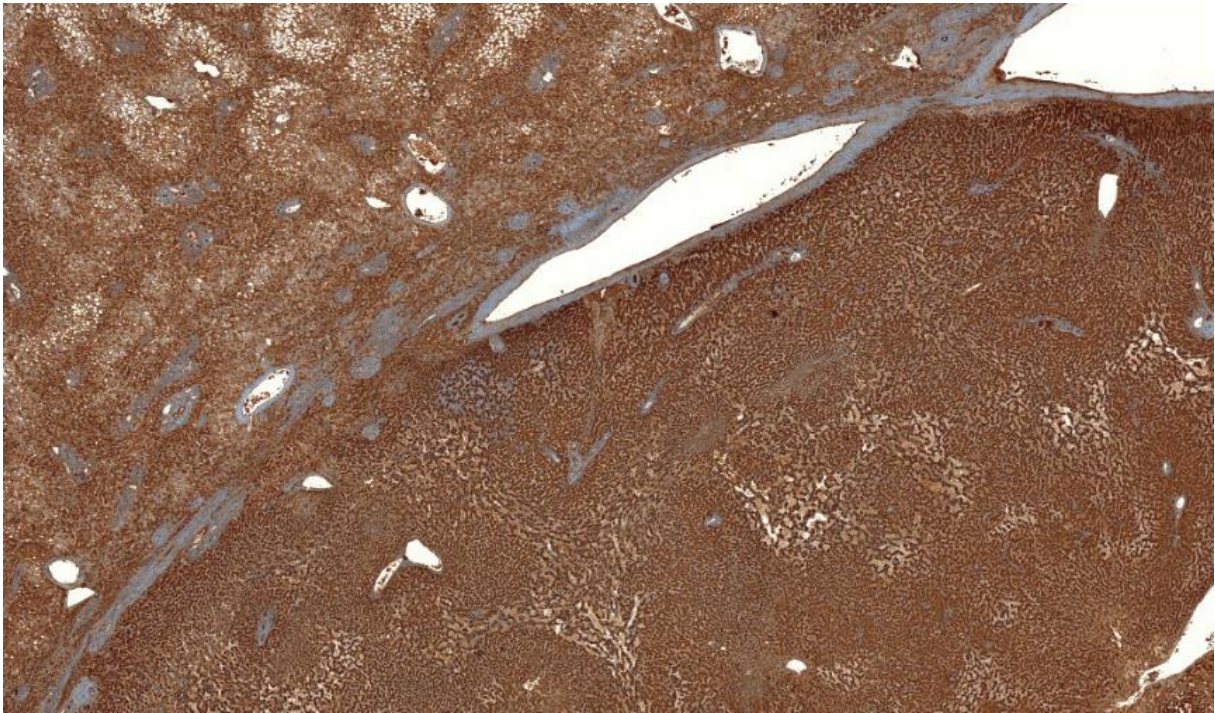


Bild 14: Färbung mit Anti-CRP (Fall 22)

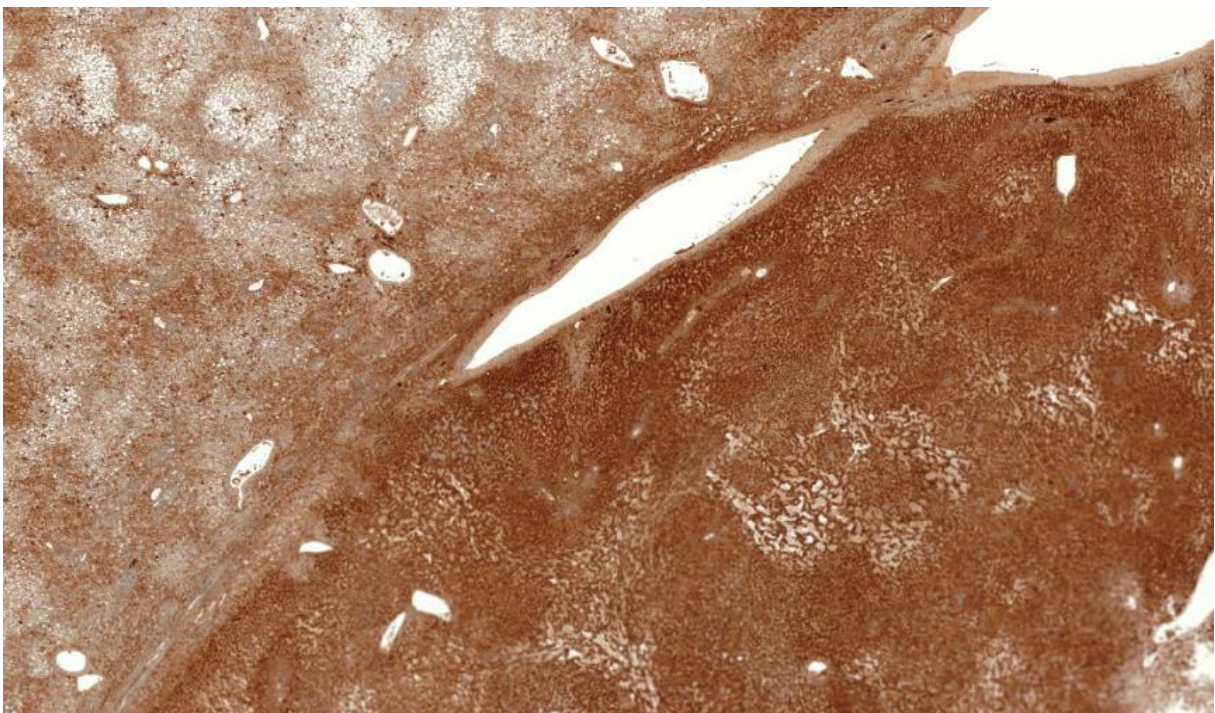


Bild 15: Färbung mit Anti-SAA (Fall 22)

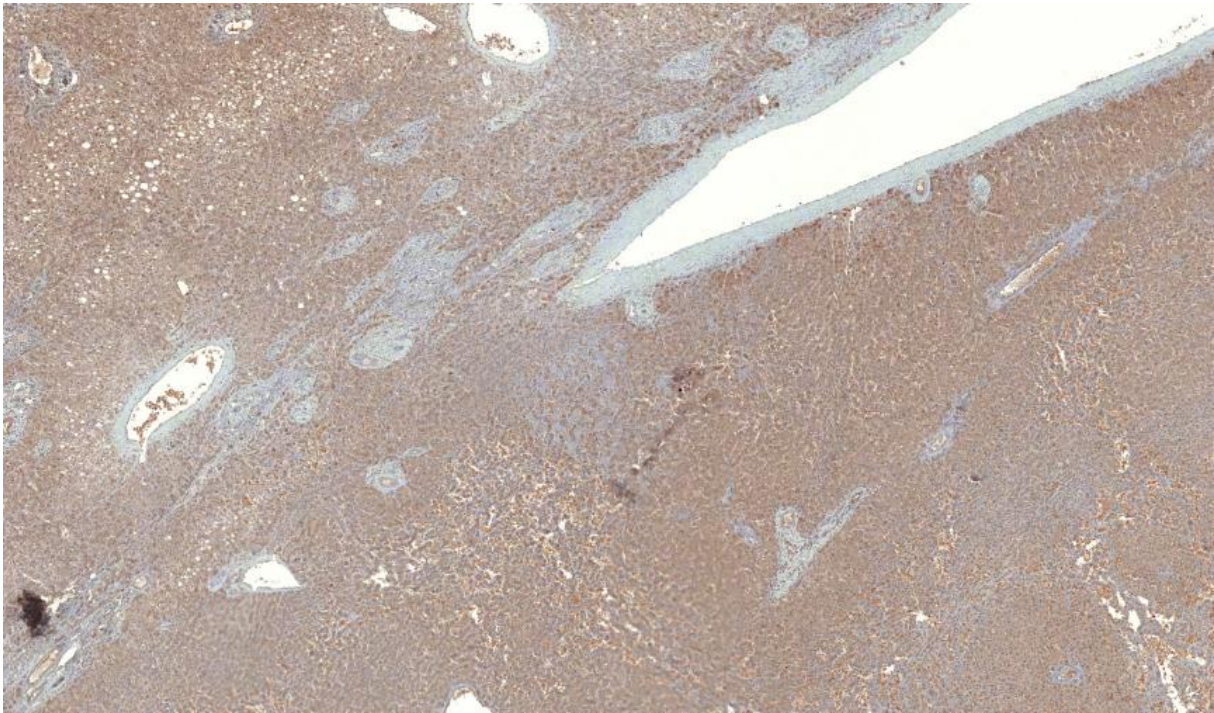


Bild 16: Färbung mit Anti-LFABP (Fall 22)

3.6.2 *Der HNF1-Alpha mutierte Subtyp*

In unserer Studienpopulation macht der HNF1-Alpha mutierte Subtyp mit 24,1% (7 Fälle) die zweithäufigste Subgruppe von Leberadenomen aus. Typisch für das H-HCA ist, wie eingangs schon erwähnt, die markante Steatosis im Vergleich zum restlichen tumorfreien Lebergewebe sowie das Fehlen von Inflammation und Kernatypien. Beweisend ist eine negative Färbung mit Anti-LFABP.

Fall 9 zeigt als sehr anschauliches Beispiel sowohl die Morphologie dieses Subtyps im H&E Schnitt, wie auch das beeindruckende immunhistochemische Färbeverhalten (Bild 17-21).



Bild 17: H&E Schnitt eines H-HCA (Fall 9)

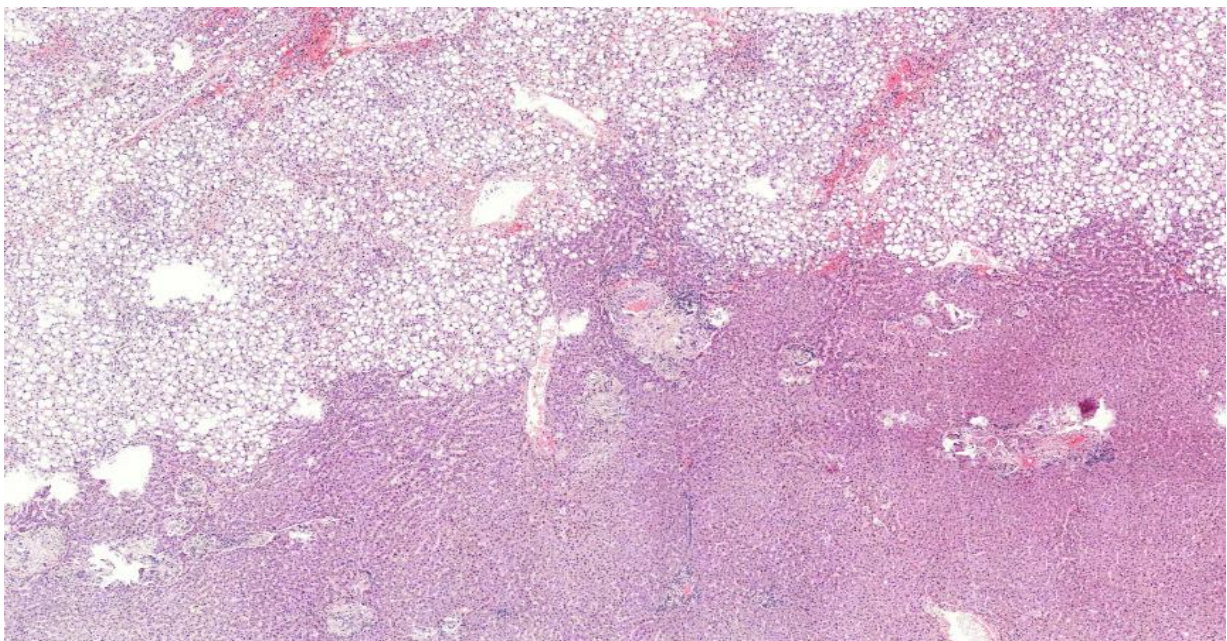


Bild 18: Vergrößerung des Übergangs von Normalgewebe zu Tumorgewebe. Es zeigt sich eine markante Steatosis im Tumorgewebe, welches eine relative scharfe Randbegrenzung zum Normalgewebe aufzeigt (Fall 9).

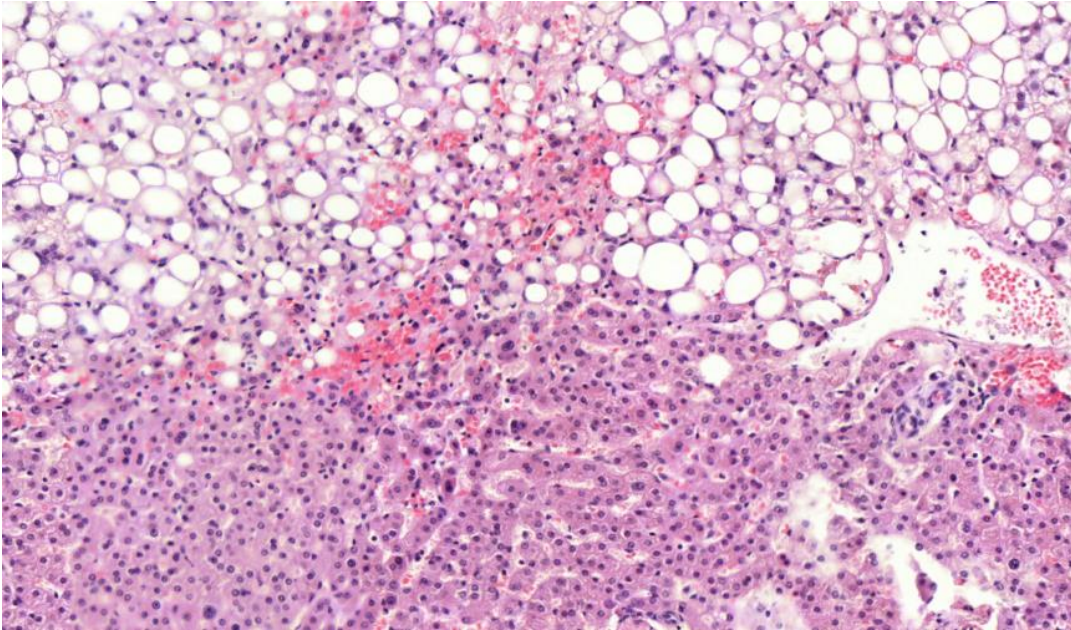


Bild 19: Vergrößerung in das Randgebiet des Tumors zum Normalgewebe (Fall 9)

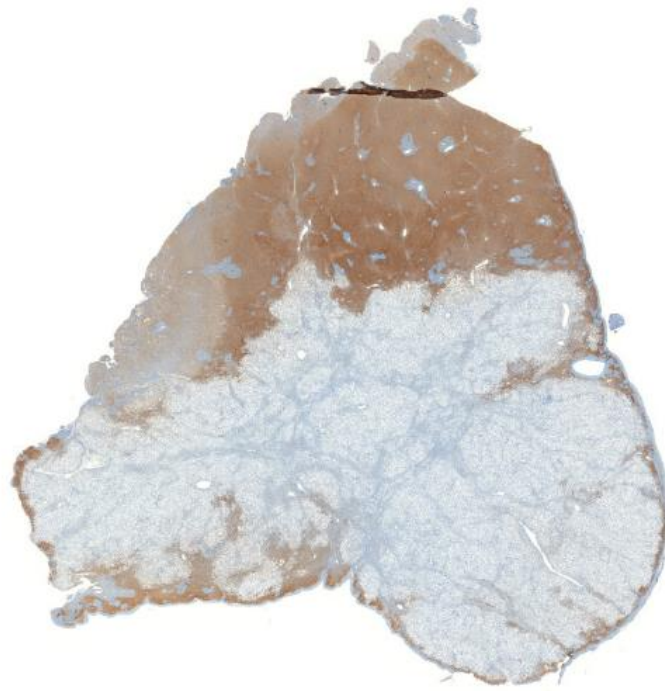


Bild 20: Anti-LFABP Färbung eines H-HCA (Fall 9)

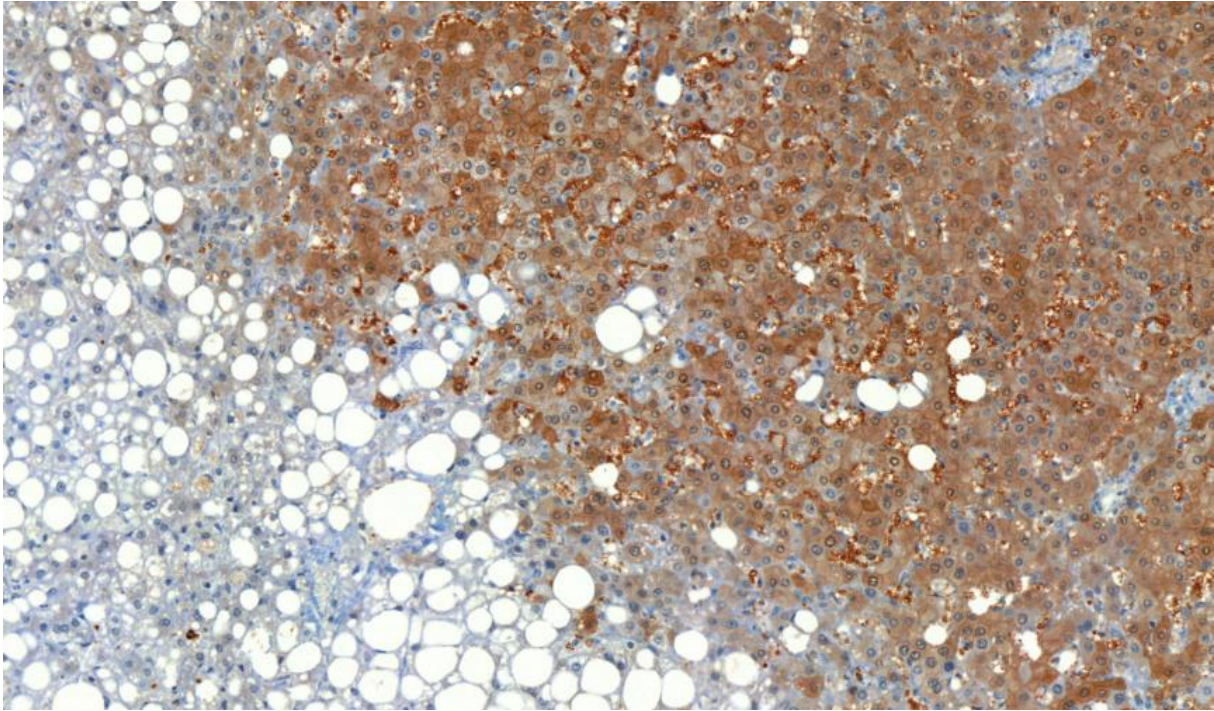


Bild 21: Vergrößerung in das Randgebiet des Tumors (Fall 9)

3.6.3 *Der Betacateninmutierte Subtyp*

Der betacateninmutierte Subtyp ist in unserer Studie mit 2 Fällen (Fallnummer 10 und 15), also 6,9% vertreten.

Dieser morphologisch meist durch eine gewisse Kernruhe (Bild 22) auffallende Tumor ist der einzige Subtyp bei den HCA, aus dem sich ein HCC entwickeln kann. Aus diesem Grund sollte die Färbung mit Anti-GS, welche flächendeckend den gesamten Tumor einfärbt, zu Beginn einer jeden immunhistochemischen Diagnostik stehen. Hier können, aufgrund der unterschiedlichen Färbeeigenschaften zur FNH und anderen Lebertumoren bereits zu Beginn verschiedene Differentialdiagnosen herausgefiltert werden.

Die Färbung mit Anti- Betacatenin gestaltete sich in unserer Studienpopulation schwierig. Dies liegt daran, dass beim B-HCA nicht alle, sondern nur sehr wenige Zellen betacateninmutiert sind und demnach die Färbung in nur wenigen Zellkernen bzw. später im Zellplasma akkumuliert. Fall 15 stellt ein anschauliches Beispiel für ein B-HCA dar. Der Patient nahm seit Jahren Anabolika ein und entwickelte hierauf multiple Leberläsionen, die sich später als betacateninmutiert darstellten. Die H&E-Färbung im Bild 22 zeigt eine gewisse Kernruhe mit Kernatypien. Auffällige Mitosefiguren waren dagegen nicht erkennbar. Bei der Färbung

mit Anti-GS zeigt sich der typisch flächendeckende Charakter der Färbung bei dieser Läsion. Auch die Anfärbung mittels Anti-Betacatenin war im Fall 15 vereinzelt positiv.

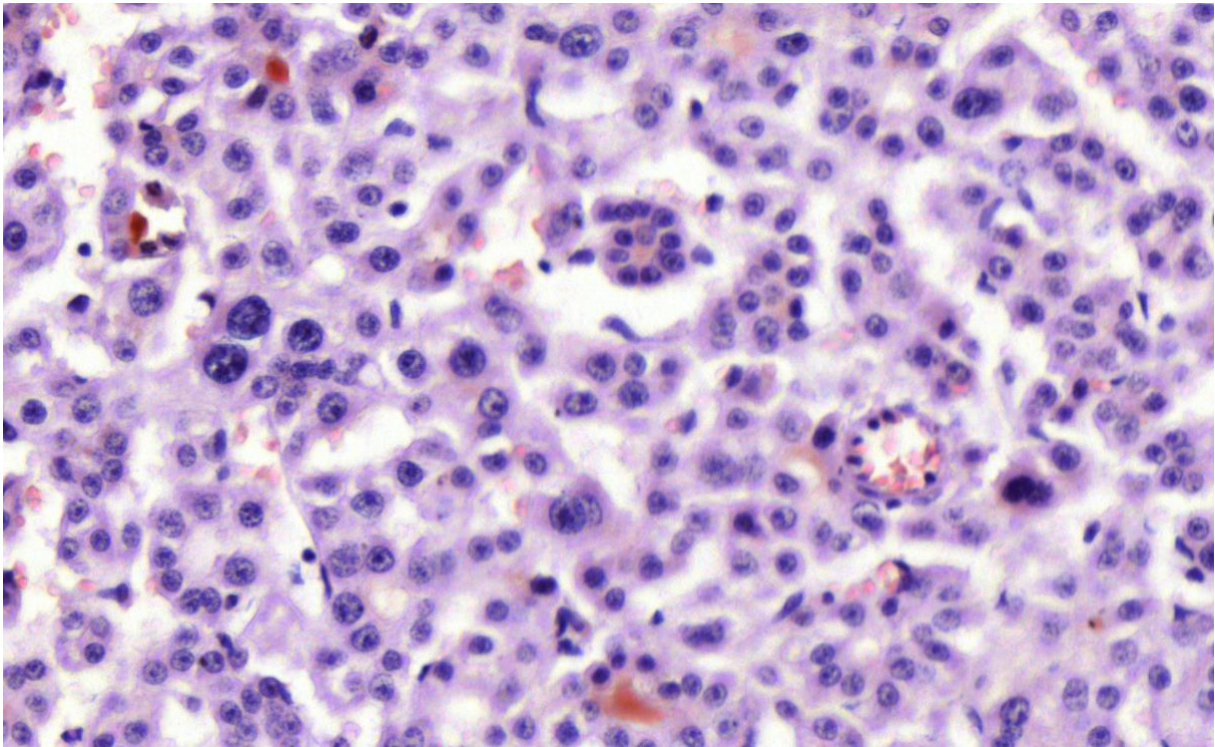


Bild 22: H&E Färbung eines B- HCA. Es fallen verschiedene Kernatypien sowie eine veränderte Kern-Plasma-Relation und pseudoglanduläre Strukturen auf (Fall15).



Bild 23: Färbung mit Anti-GS eines B-HCA. Es fällt die typische flächendeckende Akkumulation auf (Fall 15).

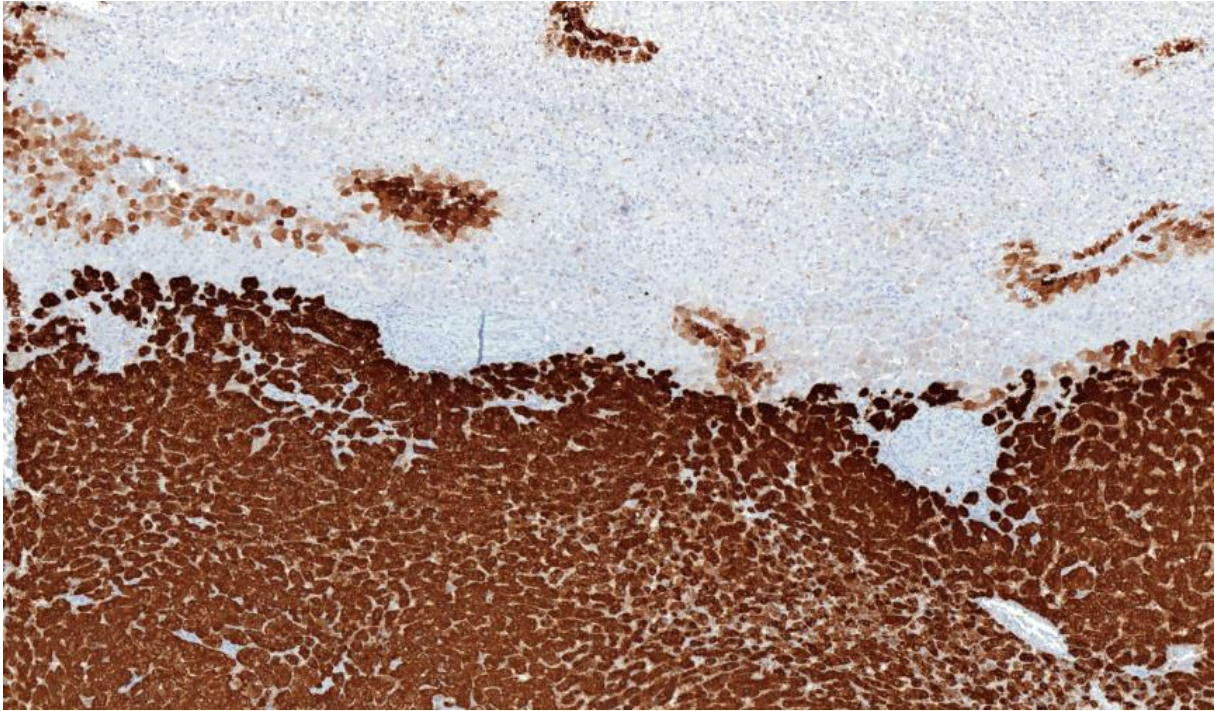


Bild 24: Färbung mit Anti-GS eines B-HCA. An der Randzone des Tumors sieht man den scharfen Übergang zum normalen Lebergewebe (Fall 15).

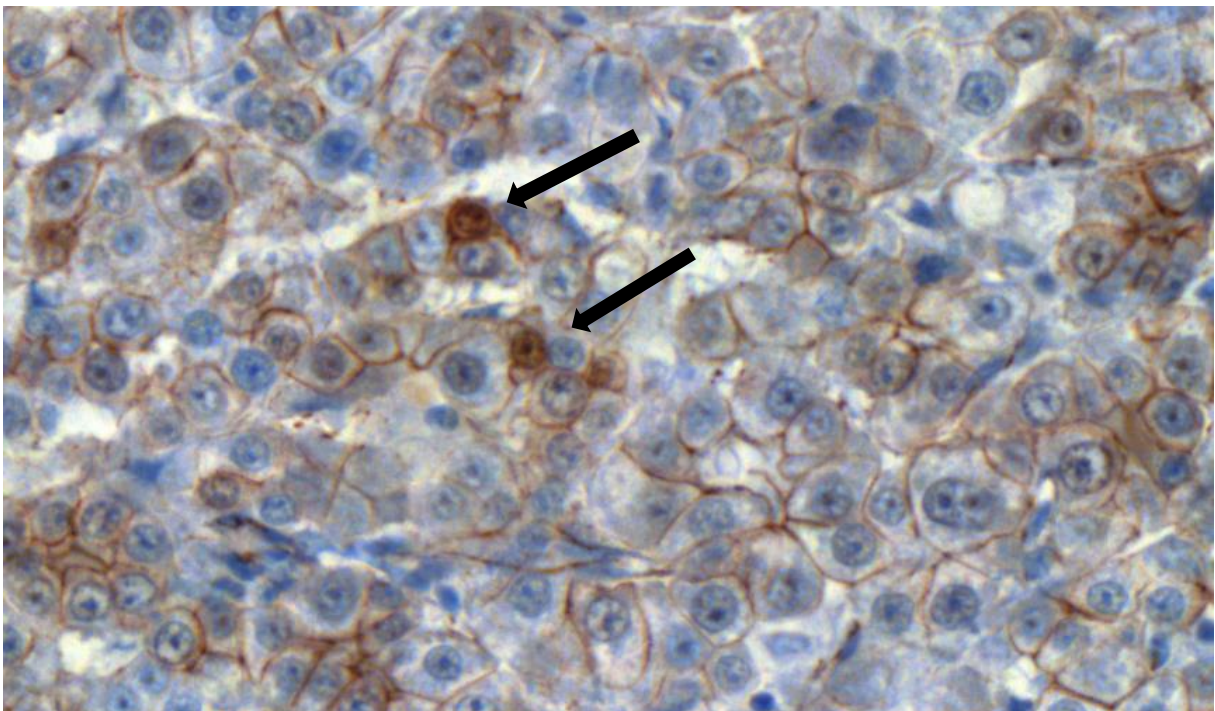


Bild 25: Anti-Betacateninfärbung eines B-HCA (Fall 15). Hier sieht man die Akkumulation des Antikörpers sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (Pfeile).

Im Fall 15 war durchgeführte Gensequenzierung bezüglich der Betacatenin, welche primär zur Validisierung des immunhistochemischen Befundes dienen sollte, positiv; in dem anderen, immunhistochemisch eindeutig als betacateninmutiert befundenen, Fall (Nr. 10) jedoch nicht. Dies liegt höchstwahrscheinlich an der noch zu geringen Mutationsdichte der Hepatozyten bzw. ist dem Verdünnungseffekt zuzuschreiben.

3.6.4 Besonderheiten bei der Studienpopulation

Gerade in Bezug auf die Anti-GS Färbung sind bei insgesamt 3 Fällen, welche rein morphologisch definitiv Adenome sind, Färbemuster aufgetreten, welche sonst nur bei FNH auftreten. Das typische „map-like-pattern“, was normalerweise differentialdiagnostisch den FNH zugehörig ist, zeigt sich nun in ähnlicher Weise in Adeomen. Im gesunden Gewebe akkumuliert Anti-GS in zwei bis drei Zellreihen um die Gefäße. In FNH ist die perivasale Akkumulation wesentlich stärker, was das landkartenartige Muster ausmacht. In B-HCA akkumuliert Anti-GS, wie oben gezeigt, flächenhaft. In den Fällen 5, 12 und 25 erscheint eben dieses landkartenartige Muster. (Bild 26-28)

Eine Nachfärbung mittels Cytokeratin 7 war ebenfalls erfolglos.

Da Fall 5 und 12 eindeutig CRP positiv waren und die molekulardiagnostische Analyse bezüglich Betacateninmutation dem Wildtyp entsprach, wurde entschlossen, diese Adenome als IHCA einzustufen. Fall 25 war in allen anderen IHC-Färbungen unauffällig, sodass nach mutationsanalytischen Ausschluss einer Betacateninmutation, entschieden wurde, diesen Fall als unklassifizierbar einzustufen.

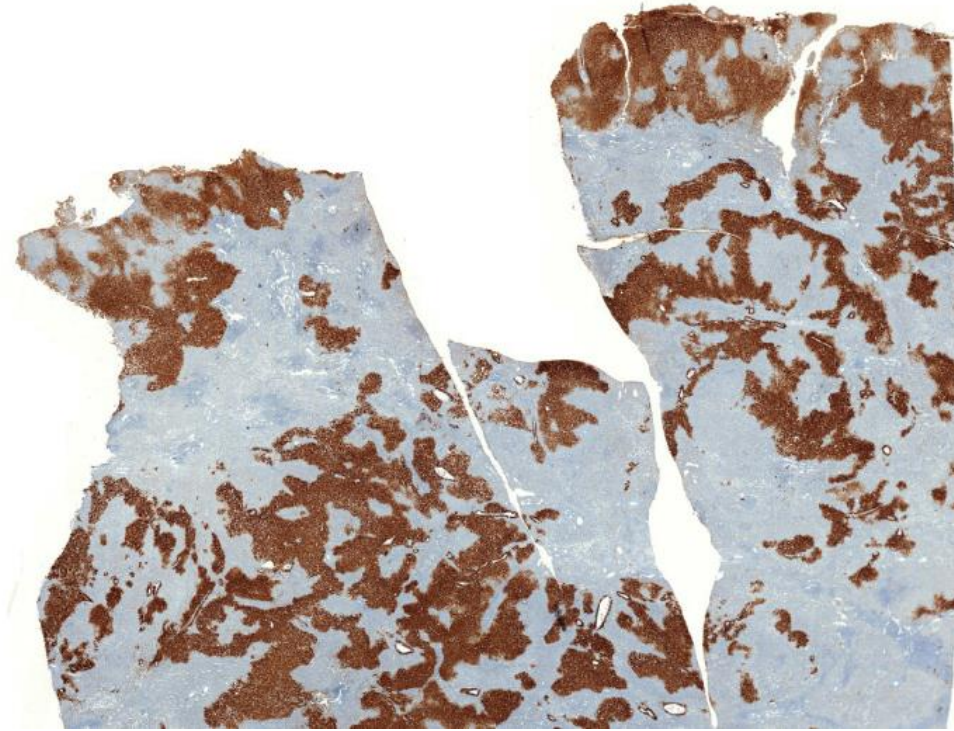


Bild 26: Anti-GS Färbung von Fall 5 (IHCA). Man sieht eine landkartenähnliche Anfärbung von Tumorgewebe .

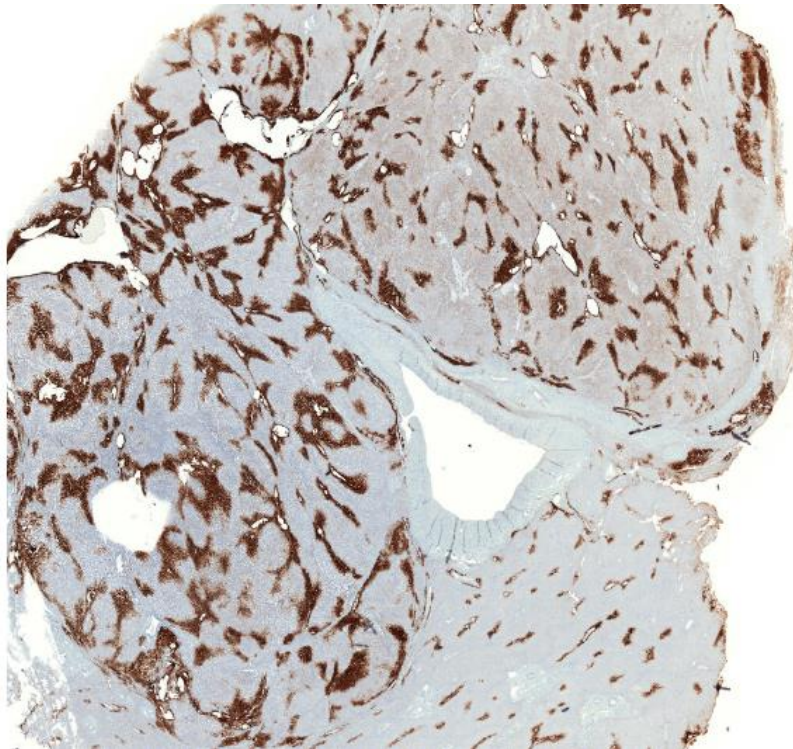


Bild 27: Anti-GS Färbung von Fall 12 (IHCA). Auch hier sieht man eine scharfe Begrenzung zum Tumor. Die Akkumulation von Anti-GS erfolgt zwar perivaskulär, jedoch in einem wesentlich größeren Ausmaß als im Normalgewebe.



Bild 28: Anti-GS Färbung von Fall 25 (UHCA). Man sieht eine deutliche Abgrenzung des Tumors zum Normalgewebe.

3.7 Korrelationen zwischen Subtyp und klinischen Bild

3.7.1 Die Adenomgröße und Anzahl in Abhängigkeit des Subtyps

Tabelle 17 zeigt die Größen der Adenome in Abhängigkeit des Subtyps. Auffällig ist, dass vor allem die inflammatorischen HCA in einer Größenordnung von 1 bis 10 cm anzusiedeln sind. In nur 2 Fällen (Fall 4 und 22) erreichen die IHCA der Population eine Größe zwischen 15 und 20 cm. Erstaunlicherweise sind die HNF1- Alpha mutierten HCA von ihrer Größenverteilung her eher gleichmäßig verteilt. Betacateninmutierte HCA waren alle unter 10 cm.

		Subtyp				Gesamtsumme
		Inflammatorisch	HNF1A	unklassifiziert	Betacatenin	
Durchmesser	kleiner 5cm	7	2	1	1	11
	kleiner 10cm	10	2	0	1	13
	kleiner 15cm	0	1	0	0	1
	kleiner 20cm	2	2	0	0	4
Gesamtsumme		19	7	1	2	29

Tabelle 17: Durchmesser in Abhängigkeit des Subtyps

Auch bezüglich der Anzahl zeigen sich aufgrund der Verteilung die meisten solitären HCA als inflammatorisch. Interessanterweise treten multiple inflammatorische Leberadenome in nur 5 Fällen auf, wohingegen alle vier detektierten Adenomatosen als inflammatorisch charakterisiert wurden. Diagramm 3 spezifiziert diese Aussagen.

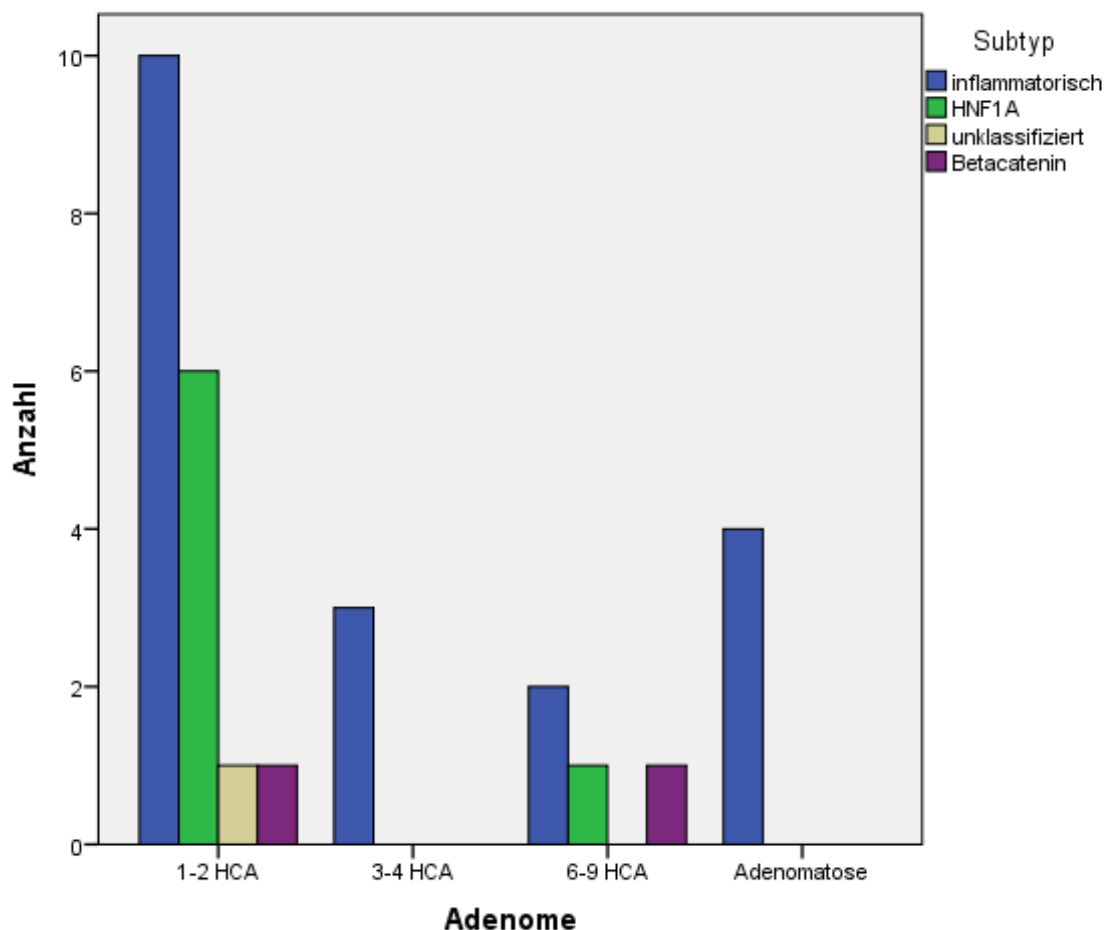


Diagramm 3: Adenomanzahl in Abhängigkeit des Subtyps

3.7.2 Subtypen in Bezug auf Geschlecht, Patientenalter, BMI und Einnahme von Kontrazeptiva

Geschlechterbezogen zeigt sich aufgrund des Mehranteils von Frauen in der Population auch ein erhöhtes Vorkommen von inflammatorischen Adenomen bei Frauen. Ebenso waren alle Patienten mit Adenomatose weiblich.

Interessanterweise waren aber beide Patienten mit B- HCA männlich.

Anzahl

		Geschlecht		Gesamtsumme
		weiblich	männlich	
Subtyp	Inflammatorisch	17	2	19
	HNF1A	6	1	7
	unklassifiziert	0	1	1
	Betacatenin	0	2	2
Gesamtsumme		23	6	29

Tabelle 18: geschlechterspezifische Aufteilung des Subtyps

Tabelle 19 zeigt den Subtyp in Abhängigkeit des Alters. Hier sieht man, dass vor allem Menschen unter 50 Jahren von Leberadenomen betroffen sind. Es ist also auch in der Studienpopulation des UKR von einem Tumor des mittleren Alters auszugehen.

Anzahl

		Subtyp				Gesamtsumme
		inflammatorisch	HNF1A	unklassifiziert	Betacatenin	
Alter	20-30 Jahre	4	0	1	1	6
	30-40 Jahre	5	3	0	0	8
	40-50 Jahre	7	2	0	0	9
	50-60 Jahre	2	1	0	1	4
	60-70 Jahre	1	0	0	0	1
	über 70 Jahre	0	1	0	0	1
Gesamtsumme		19	7	1	2	29

Tabelle 19: Subtyp in Abhängigkeit des Alters

In Bezug auf den BMI sieht man, dass die meisten Tumoren ab einem BMI von 25 kg/m² auftreten. Was jeden Subtyp für sich angeht, so kann man auch aufgrund der Populationsgröße schlecht auf eine Tendenz schließen, da die Verteilung ausgeglichen ist.

Anzahl

		Subtyp				Gesamtsumme
		inflammatorisch	HNF1A	unklassifiziert	Betacatenin	
BMI [kg/m ²]	kleiner 20	1	1	0	0	2
	zwischen 20,1 und 25	3	3	0	0	6
	zwischen 25,1 und 30	5	1	1	0	7
	größer 30,1	7	1	0	2	10
	größer 40	2	0	0	0	2
Gesamtsumme		18	6	1	2	27

Tabelle 20: Subtyp in Abhängigkeit des BMI

Diagramm 4 zeigt die Abhängigkeit des Subtyps von der Einnahme Oraler Kontrazeptiva bzw. Anabolika. Da von 7 Patienten keine Angaben gemacht wurden bzw. die Analyse der Daten nicht aufschlussreich war, sind diese Daten unter Vorbehalt zu betrachten. Was auffällt ist, wie auch eingängig in der Literatur beschrieben, die Korrelation der Leberadenome mit der Einnahme Oraler Kontrazeptiva. Fünf Patienten (Männer) nahmen keine Oral Kontrazeptiva bzw. Anabolika ein. Ein Patient nahm über mehrere Jahre Anabolika ein (Fall 15) und entwickelte daraufhin ein B-HCA.

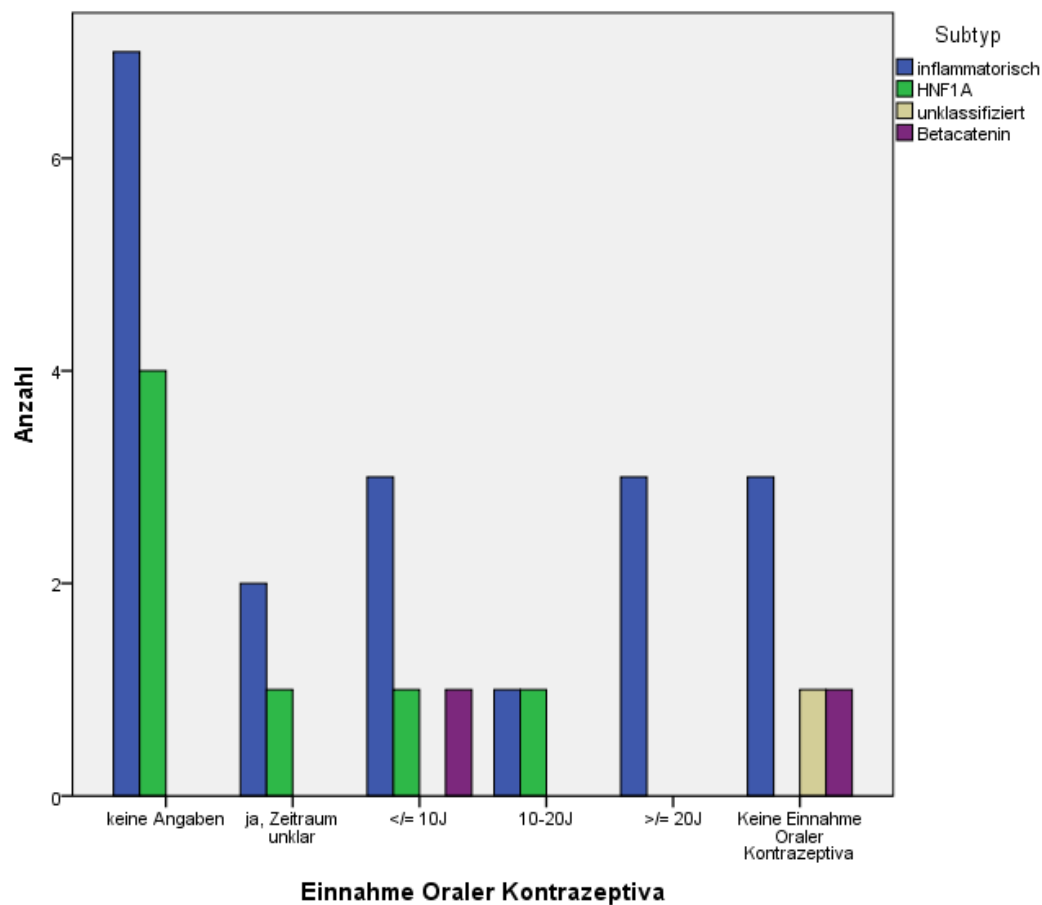


Diagramm 4: Subtyp in Abhängigkeit der Einnahme Orale Kontrazeptiva/ Anabolika

3.8 Vergleich der Morphologie von Leberadenompräparaten mit Präparaten auf Tissue Micro Arrays (TMA)

Von einer Subpopulation der Studienpatienten wurden Tissue Micro Arrays der Adenome angefertigt (Beispiele siehe Bild 29 und 30) und in gleicher, oben erläuteter, Weise gefärbt. Ziel war es herauszufinden, ob die Möglichkeit besteht, eine größere Studienpopulation schnell und effektiv auswerten zu können, ohne eine Großzahl an Schnitten zu untersuchen.

Daher wurden die Befunde der TMAs mit den der konventionellen Auswertung verglichen.

Tabelle 21 zeigt die Korrelation der Befunde aus TMA mit dem Subtyp aus der konventionellen Diagnostik.

		Subtyp			
		inflammatorisch	HNF1A	unklassifiziert	Betacatenin
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
TMA	Inflammatorisches HCA	10	2	0	0
	HNF1 Alpha mutiertes HCA	0	2	0	0
	unklassifizierbares HCA	3	0	0	0
	betacateninmutiertes HCA	0	0	0	2

Tabelle 21: Vergleich von Subtyp und Befund der TMA

Hier sieht man, dass bis auf 5 von 19 Fällen die Diagnose von TMA und direkter Schnittbildanalytik übereinstimmt. Drei davon waren im TMA unklassifizierbar, zwei fälschlicherweise als inflammatorisch befundet wurden. Jene Fälle stellten sich auch in der konventionellen Analyse als überaus schwierig zu diagnostizieren dar. Hierbei handelt es sich um Patienten Nummer 4, 5, 11, 12 und 14.

Die Patienten 4, 5 und 12 hatten inflammatorische HCA (im TMA als unklassifizierbar eingestuft), welche schon morphologisch mittels H&E Färbung nur schwer zu kategorisieren waren. Auch die immunhistochemische Aufarbeitung war nicht in allen Adenomanteilen gleichmäßig und eindeutig, sodass nur in Zusammenschau von H&E sowie Immunhistochemie eine definitive Aussage zum Subtyp zu treffen war.

Bei den Patienten mit der Nummer 11 und 14 waren die Adenome HNF1 Alpha mutiert, nicht, wie im TMA vermutet, inflammatorisch.



Bild 29: TMA, Färbung in H&E von 16 Leberadenomen und umgebenden Normalgewebe

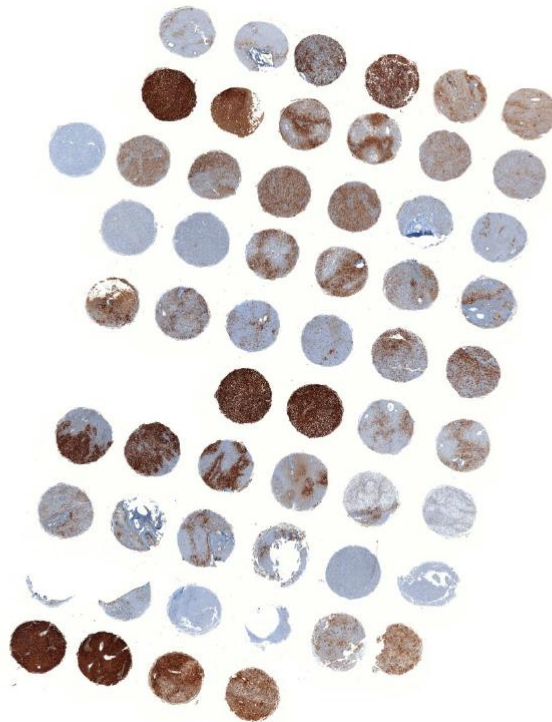


Bild 30: TMA, Färbung mit Anti-CRP von 16 Leberadenomen und umgebenden Normalgewebe

4 Diskussion

Trotz der kleinen Fallzahl von Leberadenompatienten konnte gezeigt werden, dass auf Grundlage der immunhistochemischen Diagnostik sich die von Bioulac-Sage und Zucman-Rossi beschriebene Verteilung der Subtypen [18,42] auch auf die Studienpopulation des Universitätsklinikums Regensburg anwenden lässt.

Bei den Studienpatienten war, wie auch in der Literatur eindeutig beschrieben, der inflammatorische Subtyp mit 65,5% am meisten vertreten, gefolgt vom HNF1A mutierten Subtyp mit 24,1%. Zwei Patienten mit betacateninmutierten HCA waren ebenfalls vertreten (6,9%).

Ähnlich, wie auch in bereits publizierten Studien [5,10], findet sich die enge Korrelation zwischen Einnahme Oraler Kontrazeptiva bzw. Anabolika und Leberadenomen wieder.

Leberadenome verhalten sich klinisch eher inapparent und werden dementsprechend meist als Zufallsbefund bei bildgebenden Untersuchungen des Abdomens entdeckt. Nun stellt sich die Frage, wie man den Patienten optimal weiter führt: Welche weitere Diagnostik ist am sinnvollsten? Welche Therapie ist am besten? Aufgrund der Tatsache, dass in Deutschland bisher keine Leitlinie für die Diagnostik und Therapie von Leberadenomen existiert sind diese Fragen primär nur schwer zu beantworten.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, wie wichtig und therapieentscheidend eine fundierte Diagnostik ist. Zu Beginn sollte die Bildgebung als initiales Werkzeug stehen. Hierbei haben vor allem das kontrastmittelgestützte MRT der Leber als auch die Kontrastmittelsonographie den wichtigsten Stellenwert. Dabei kann schon eine erste Einschätzung der Leberherde getroffen werden. Bei allem Patienten wurde präoperativ ein CT des Abdomens angefertigt. In manchen Fällen zusätzlich noch eine KM- MRT der Leber. In der ausgewerteten Population konnten jedoch nur 4 von 22 Fällen (18,2%) definitiv einem Leberadenom zugeordnet werden. 11 von 22 waren fälschlicherweise als malignitätssuspekt bzw. HCC oder Metastase eingestuft worden. Hierbei sieht man die Komplexität und Schwierigkeit der eindeutigen Darstellung von Leberadenomen im CT/ MRT, wobei hier auch die Qualität sowie die fehlende Standardisierung der Bildgebung eine Rolle zu spielen scheint.

Daher ist die histologische Untersuchung nach wie vor Goldstandard und Entscheidungsbasis für die weitere Therapieplanung. Dennoch ist es fraglich, wann die erste Histologie entnommen werden soll. Prä- oder postoperativ?

Die Adenompatienten des UKR wurden präoperativ nicht punktiert. Dies hat folgende grundlegende Ursachen: Zum einen ist es nicht gesichert, dass bei einer Punktion der Läsion eine repräsentative Probe entnommen werden kann, beispielsweise aufgrund der Größe des Tumors oder einer zentralen Lage. Außerdem ist bis dahin noch nicht gesichert, ob die Läsion wirklich benigne ist. Bei einem primären HCC oder einem HCC im Adenom hat man zusätzlich das Problem der Schaffung eines Stichkanals und der damit einhergehenden Möglichkeit der Metastasierung entlang des Kanals. Des Weiteren kann es gerade bei kleinen HCC im Adenom zu Problemen der Aussagekraft des Biopsats kommen, wenn nur das Adenom, nicht aber das Karzinom biopsiert wurde.

In allen Fällen wurde sich in Zusammenschau der Befunde für eine primäre Resektion der Läsionen entschieden und die Resektate zur feingeweblichen Untersuchung weitergeleitet. Retrospektiv erfolgte im Rahmen dieser Dissertation die Subtypisierung der Leberadenome auf immunhistochemischer Basis nach dem Vorbild von Bioulac-Sage und Zucman-Rossi [4,18]. Jedoch zeigten sich im Rahmen der Auswertung in Einzelfällen differentialdiagnostische Probleme:

Die typische Darstellung eines Leberadenoms bei Anti-GS Färbung war in drei Fällen nicht eindeutig. Hier zeigte sich ein eher für FNH typisches Bild. Das sog. „map-like pattern“ bei Anti-GS Färbung in FNH dient als definitives differentialdiagnostisches Kriterium zum HCA. Bei der Studienpopulation zeigte sich in drei Fällen ein H&E- morphologisch klares Leberzelladenom; in der Anti-GS Färbung aber das landkartenartige Muster. Bioulac-Sage et al. sowie Kakar et al. beschreiben ebenfalls solche untypischen Muster bei Leberadenomen [118,119], ohne eine definitive Erklärung dieses Phänomens zu geben. Daher bedarf es ggf. weiteren Untersuchungen bezüglich der Färbemethode in Hinblick auf ihre biochemische Wirkweise in solchen Lebertumoren.

Ein ähnliches Phänomen bei der immunhistochemischen Analyse ist, dass bei einer kleinen Unterzahl von definitiv als IHCA zu subtypisierenden Adenomen, die Färbung mittels Anti-SAA nur unzureichend bzw. fokal auftritt. Die endgültige Befundung war hier nur aufgrund von der Morphologie bei H&E-Färbung sowie durch Anti-CRP Färbung zu erreichen. Bioulac-Sage et al. sowie Kakar et al. beschreiben dies ebenfalls in Ihren Studien [118,119].

Problematisch ist hierbei, dass die Spezifität von Anti-SAA bezüglich der Subtypisierung von HCA höher anzusiedeln ist, als die von Anti-CRP, da dies oft auch bei verschiedenen anderen Tumoren wie beispielsweise FNH stark exprimiert werden kann.

Aus diesem Grund ist eine Färbung mittels H&E immens wichtig und sollte am Anfang der feingeweblichen Untersuchung stehen.

Tissue Micro Arrays sind eine zeitsparende und effektive Methode, Leberadenome in größeren Studienpopulationen zu befunden. Jedoch ist in Einzelfällen eine sekundäre Färbung des gesamten Tumors sinnvoll. Vor allem bezüglich des seltenen betacateninmutierten Typs erscheint dies nötig. Des Weiteren ist gerade bei kleinen HCA das Risiko größer, eine nicht repräsentative Stanze des Tumors zu erhalten. Diesbezüglich ist eine Färbung des gesamten Präparats nötig.

Interessant ist die Frage nach Diagnostik und Therapie von Leberadenomen. Wann muss operiert werden? Wann sollte man nach der Devise „watch and wait“ gehandelt werden?

Es gibt Studien, die belegen, dass das Absetzen Oraler Kontrazeptiva zu einer Verkleinerung bzw. vollständigen Remission von Leberadenomen führen kann [7,90]. Doch in welchen Fall ist das sinnvoll?

Erste Anhaltspunkte bzw. Thesen geben die Veröffentlichungen von Balabaud et al. sowie von van Aalten et al. [7,70].

Führend sind zum einen die Klinik des Patienten sowie die Einschätzung der etwaigen Risikofaktoren wie Blutung und maligne Transformation.

Daher sollte die Bildgebung an erster Stelle stehen. Sowohl die kontrastmittelgestützte Sonographie als auch das MRT bieten hier die höchste Sicherheit zur Diagnosefindung (s.o.).

Sollte eine sichere Diagnose im Sinne eines HCA gefunden sein, ist die Therapieentscheidung von folgenden Punkten abhängig:

1. Größe des Tumors
2. Persönliches Risiko des Patienten (Begleiterkrankungen, Schwangerschaft oder Kinderwunsch, Geschlecht und Alter des Patienten, Einnahme von Oralen Kontrazeptiva/ Anabolika/ oraler Steroide, etc.)
3. Rupturrisiko und Subtyp

Ist eine endgültige Diagnose noch nicht gefunden, so schlagen die Autoren eine Biopsie vor. (Vgl. [7,70]). Jedoch sollte hier das Risiko einer Blutung sowie die Möglichkeit einer doch malignen Läsion und damit der Schaffung eines Stichkanals und somit Tumorabsiedlung genau abgewogen werden. Außerdem besteht bei HCC im HCA die Möglichkeit nur das Adenom zu punktieren, was letztendlich zu einer Fehldiagnose und somit zu einer insuffizienten weiteren Therapieplanung führen kann.

Nach definitiver Diagnose eines HCAs gibt es die Empfehlung, die Orale Kontrazeption zu beenden.

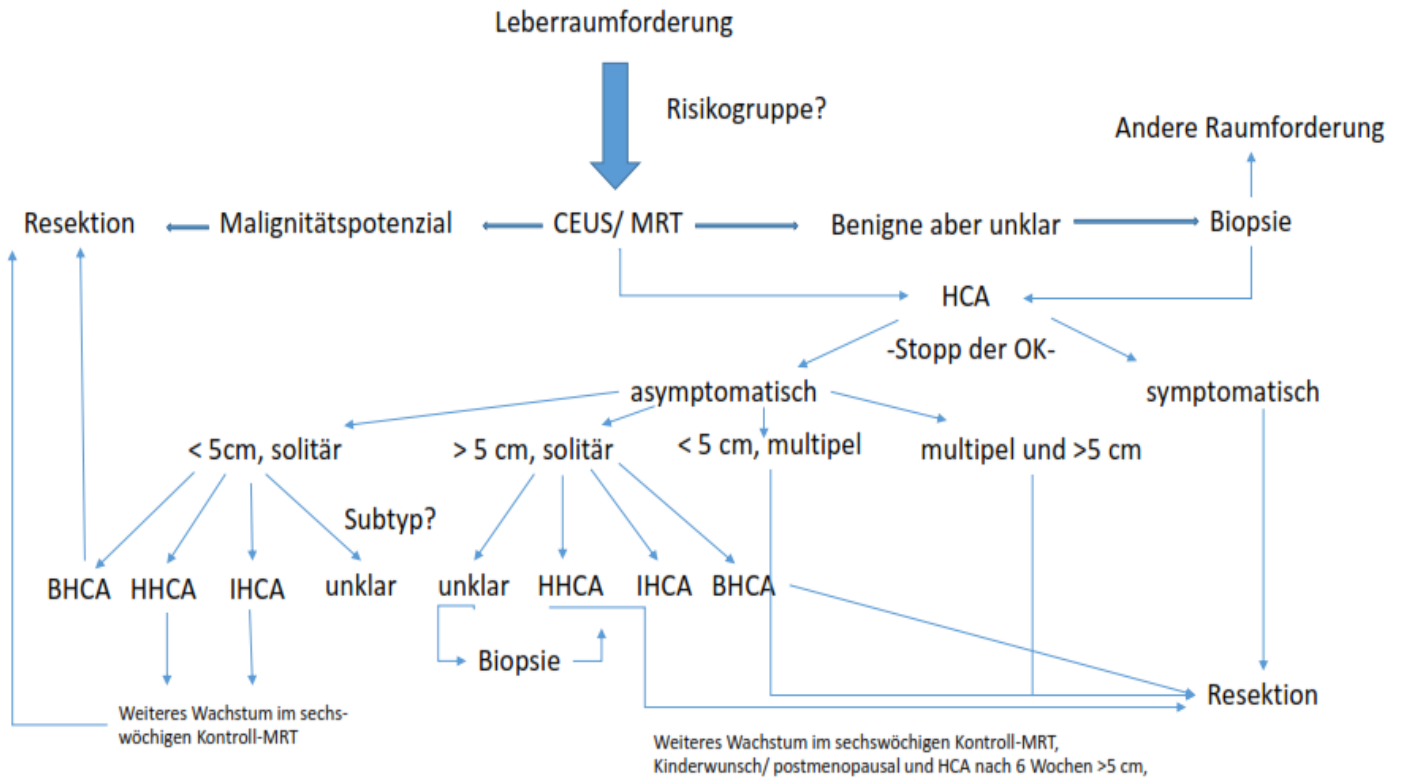
Bezüglich der Tumorgröße existiert eine generelle Übereinkunft, dass Leberläsionen größer als 5 cm operativ entfernt werden. Van Aalten et al. empfehlen bei solitären Leberadenomen eine Wartezeit von ca. 6 Monaten sowie eine daraufhin folgende erneute Bildgebung. Dies erscheint sinnvoll, da es Studien gibt, die belegen, dass HCA nach Absetzen der Oralen Kontrazeption größenregredient werden können.

Hier sollte eine Reevaluation und ggf. konservativer Therapieversuch im mittelfristigen Intervall mit Sonographie/ MRT-Kontrollen erfolgen.

Im Falle, dass das Wachstum des Tumors progredient ist bzw. schon von Beginn an multiple Läsionen der Leber existieren oder ein Malignitätsverdacht besteht, so sollte eine operative Entfernung angestrebt werden.

Es ist noch fraglich, ob alle Subtypen operativ entfernt werden müssen, zumal nur der betacateninmutierte Typ zur malignen Transformation neigt und vor allem das inflammatorische HCA ab einer gewissen Größe das Risiko der Ruptur mit sich bringt. Andere Therapieschemata wie Radiofrequenzablation oder Embolisation werden bei bestimmten Konstellationen bereits durchgeführt, sind aber eher selten [100,102,105].

Eine eindeutige Empfehlung zur Therapie von Leberadenomen kann aus diesen o.g. Gründen nicht erfolgen. Es ist eine individualisierte Therapie in Abhängigkeit des Subtyps erforderlich. Das folgende Schema ist als Vorschlag bezüglich Diagnostik und Therapie zu sehen und stützt sich zusätzlich zu den aus der eigenen Untersuchung erlangten Ergebnissen auf einschlägige Literatur bezüglich dieses Themengebiets [7,94,111,112,120].



Schema 3: Vorschlag zum diagnostischen und therapeutischen Vorgehen bei HCA (modifiziert und erweitert nach Bröker, Noels, van Aalten und Bioulac-Sage [7,48,81,94,111–113]).

Es benötigt eine wesentlich höhere Fallzahl, um eine definitive Aussage über die Verteilung der Leberadenome in Deutschland aussagekräftig zu machen. Hierbei ist es nötig, dass ein deutschlandweites Register für Leberadenome aufgebaut wird, um die Subtypen sowie deren mögliche Komplikationen zu sammeln. Hierauf könnte somit eine Leitlinie für Diagnostik und Therapie aufgebaut werden.

5 Zusammenfassung

Hepatozelluläre Adenome sind seltene benigne Lebertumoren, welche klinisch meist inapparent sind und häufig als Nebendiagnose bei abdomineller Bildgebung entdeckt werden. Trotz Ihrer Seltenheit bergen sie, in Abhängigkeit ihres Subtyps, zwei nicht zu unterschätzende Risiken: Ruptur mit Blutung und maligne Transformation.

Bisher sind bereits vier Subtypen der Leberadenome bekannt, welche auf immunhistochemischer Basis diagnostiziert werden können.

Ziel dieser Arbeit war es, den Pool von Patienten des Universitätsklinikums Regensburg mit Leberadenomen mittels immunhistochemischen Färbemethoden zu subtypisieren und retrospektiv die klinischen und radiologischen Daten unter diesem Hintergrund neu zu evaluieren und zu kategorisieren. Hierbei wurden die einzelnen Therapieansätze erneut begutachtet und hinterfragt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Regensburger Patientenkollektiv in Bezug auf den Subtyp des HCA eine ähnliche Verteilung aufweist, wie in der Literatur eindeutig beschrieben. Alle Patienten unterzogen sich einer operativen Therapie der Adenome.

Es ist weiterhin gelungen zu zeigen, dass mit Hilfe von Tissue Micro Arrays eine schnelle und effektive Auswertung einer größeren Anzahl von Leberadenomen mit einer hohen Treffsicherheit möglich ist.

Nach wie vor sind Diagnostik und Therapie von Hepatozellulären Adenomen in Deutschland nicht an eine Leitlinie gekoppelt. Als Grundlage hierfür fehlt ein deutschlandweites Register von Leberadenomen, in dem nicht nur der Subtyp sondern auch die Therapie und der diagnostische Weg abgebildet sind. So wäre es im Verlauf möglich, risikobehaftete HCA schneller zu erkennen und eine für den Patienten optimale Therapie einzuleiten.

In dieser Arbeit haben wir eine modifizierte Diagnostik- und Therapiestrategie vorgeschlagen, die jedoch weiter evaluiert werden muss.

6 Literaturverzeichnis

1. Shaked O, Reddy, K. Rajender. Approach to a Liver Mass. Key Consultations in Hepatology [Internet]. 2009;13(2):193–210.
2. Rooks JB. Epidemiology of Hepatocellular Adenoma. JAMA. 1979;242(7):644. doi: 10.1001/jama.1979.03300070040020.
3. Flejou JF, Barge J, Menu Y, Degott C, Bismuth H, Potet F, et al. Liver adenomatosis. An entity distinct from liver adenoma? Gastroenterology. 1985;89(5):1132–8. PubMed PMID: 2412930.
4. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu, Jeanne Tran Van, Scoazec J-Y, Guettier C, Rebouissou S, et al. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. Hepatology. 2006;43(3):515–24. doi: 10.1002/hep.21068.
5. Baum J, Bookstein J, Holtz F, Klein E. Possible association between benign hepatomas and oral contraceptives. Originally published as Volume 2, Issue 7835 [Internet]. 1973;302(7835):926–9.
6. Giannitrapani L, Soresi M, La Spada E, Cervello M, D'Alessandro N, Montalto G. Sex Hormones and Risk of Liver Tumor. Annals of the New York Academy of Sciences [Internet]. 2006;1089(1):228–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1386.044>.
7. van Aalten, Susanna M, Witjes, Caroline D M, de Man, Robert A, Ijzermans, Jan N M, Terkivatan T. Can a decision-making model be justified in the management of hepatocellular adenoma? Liver Int. 2012;32(1):28–37. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02667.x.
8. Ozenne V, Paradis V, Vullierme M-P, Vilgrain V, Leblanc T, Belghiti J, et al. Liver tumours in patients with Fanconi anaemia: a report of three cases. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2008;20(10):1036–9. doi: 10.1097/MEG.0b013e3282f824e9. PubMed PMID: 18787475.
9. Velazquez I, Alter BP. Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. Am J Hematol. 2004;77(3):257–67. doi: 10.1002/ajh.20183. PubMed PMID: 15495253.

10. Martin NM, Dayyeh, Barham K Abu, Chung RT. Anabolic steroid abuse causing recurrent hepatic adenomas and hemorrhage. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [Internet]. 2008;14(28):4573–5.
11. Pais-Costa SR, Lima, Olímpia Alves Teixeira, Soares AF. Adenoma hepático gigante associado com uso abusivo de esteróide androgênico anabolizante: relato de caso. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)* [Internet]. 2012;25:180–2.
12. Soe KL, Soe M, Gluud C. Liver pathology associated with the use of anabolic-androgenic steroids. *Liver*. 1992;12(2):73–9. PubMed PMID: 1535676.
13. Heinemann LA, Weimann A, Gerken G, Thiel C, Schlaud M, DoMinh T. Modern oral contraceptive use and benign liver tumors: the German Benign Liver Tumor Case-Control Study. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 1998;3(4):194–200. PubMed PMID: 10036602.
14. Sasaki M, Nakanuma Y. Overview of Hepatocellular Adenoma in Japan. *Int J Hepatol* [Internet]. 2012;2012:648131.
15. Matsumoto Y, Yamabe S, Sugishima T, Geronazzo D. Perception of oral contraceptives among women of reproductive age in Japan: a comparison with the USA and France. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011;37(7):887–92. doi: 10.1111/j.1447-0756.2010.01461.x. PubMed PMID: 21450030.
16. Bunchorntavakul C, Bahirwani R, Drazek D, Soulen, M. C., Siegelman, E. S., Furth, E. E., et al. Clinical features and natural history of hepatocellular adenomas: the impact of obesity. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [Internet]. 2011;34(6):664–74.
17. Paradis V, Champault A, Ronot M, Deschamps L, Valla D-C, Vidaud D, et al. Telangiectatic adenoma: an entity associated with increased body mass index and inflammation. *Hepatology*. 2007;46(1):140–6. doi: 10.1002/hep.21684. PubMed PMID: 17596890.
18. Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Thomas C, Blanc J-F, Saric J, Sa Cunha A, et al. Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry. *Hepatology*. 2007;46(3):740–8. doi: 10.1002/hep.21743.
19. Calderaro J, Labrune P, Morcrette G, Rebouissou S, Franco D, Prévot S, et al. Molecular characterization of hepatocellular adenomas developed in patients with glycogen storage disease type I. *J. Hepatol.* [Internet]. 2013;58(2):350–7.

20. Di Rocco M, Calevo MG, Taro' M, Melis D, Allegri, Anna Elsa Maria, Parenti G. Hepatocellular adenoma and metabolic balance in patients with type Ia glycogen storage disease. *Molecular Genetics and Metabolism* [Internet]. 2008;93(4):398–402.
21. Wang DQ, Fiske LM, Carreras CT, Weinstein DA. Natural History of Hepatocellular Adenoma Formation in Glycogen Storage Disease Type I. *The Journal of Pediatrics* [Internet]. 2011;159(3):442–6.
22. Beuers U, Richter WO, Ritter MM, Wiebecke B, Schwandt P. Klinefelter's syndrome and liver adenoma. *J Clin Gastroenterol*. 1991;13(2):214–6. PubMed PMID: 1851773.
23. Bala S, Wunsch PH, Ballhausen WG. Childhood hepatocellular adenoma in familial adenomatous polyposis: Mutations in adenomatous polyposis coli gene and p53. *Gastroenterology* [Internet]. 1997;112(3):919–22.
24. Jeannot E, Wendum D, Paye F, Mourra N, Toma C de, Fléjou J-F, et al. Hepatocellular adenoma displaying a HNF1 α inactivation in a patient with familial adenomatous polyposis coli. *J. Hepatol.* [Internet]. 2006;45(6):883–6.
25. Maylee H, Harada K, Igarashi S, Tohda G, Yamamoto M, Ren XS, et al. Case of telangiectatic/inflammatory hepatocellular adenoma arising in a patient with primary sclerosing cholangitis. *Hepatol Res*. 2012;42(6):611–8. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00962.x. PubMed PMID: 22568458.
26. Seo JM, Lee SJ, Kim SH, Park CK, Ha SY. Hepatocellular carcinoma arising from hepatocellular adenoma in a hepatitis B virus-associated cirrhotic liver. *Clin Radiol*. 2012;67(4):329–33. doi: 10.1016/j.crad.2011.09.003. PubMed PMID: 22079485.
27. Jeannot E, Mellottee L, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Scoazec J-Y, Tran Van Nhieu, Jeanne, et al. Spectrum of HNF1A somatic mutations in hepatocellular adenoma differs from that in patients with MODY3 and suggests genotoxic damage. *Diabetes*. 2010;59(7):1836–44. doi: 10.2337/db09-1819. PubMed PMID: 20393147.
28. Willson, J S B, Godwin TD, Wiggins, G A R, Guilford PJ, McCall JL. Primary hepatocellular neoplasms in a MODY3 family with a novel HNF1A germline mutation. *J Hepatol*. 2013;59(4):904–7. doi: 10.1016/j.jhep.2013.05.024. PubMed PMID: 23707370.
29. Stoot, Jan H M B, Coelen, Robert J S, De Jong, Mechteld C, Dejong, Cornelis H C. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinomas: a

- systematic review including more than 1600 adenoma cases. *HPB (Oxford)*. 2010;12(8):509–22. doi: 10.1111/j.1477-2574.2010.00222.x.
30. Grazioli L, Federle MP, Brancatelli G, Ichikawa T, Olivetti L, Blachar A. Hepatic Adenomas: Imaging and Pathologic Findings. *RadioGraphics [Internet]*. 2001;21(4):877–92.
 31. Hussain SM, van den Bos, Indra C, Dwarkasing RS, Kuiper J-W, den Hollander J. Hepatocellular adenoma: findings at state-of-the-art magnetic resonance imaging, ultrasound, computed tomography and pathologic analysis. *Eur Radiol*. 2006;16(9):1873–86. doi: 10.1007/s00330-006-0292-4. PubMed PMID: 16708218.
 32. Deneve JL, Pawlik TM, Cunningham S, Clary B, Reddy S, Scoggins CR, et al. Liver cell adenoma: a multicenter analysis of risk factors for rupture and malignancy. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(3):640–8. doi: 10.1245/s10434-008-0275-6. PubMed PMID: 19130136.
 33. Cobey FC, Salem RR. A review of liver masses in pregnancy and a proposed algorithm for their diagnosis and management. *The American Journal of Surgery [Internet]*. 2004;187(2):181–91.
 34. Masood S, West AB, Barwick KW. Expression of steroid hormone receptors in benign hepatic tumors. An immunocytochemical study. *Arch Pathol Lab Med*. 1992;116(12):1355–9. PubMed PMID: 1333749.
 35. Stock RJ, Labudovich M, Ducatman B. Asymptomatic first-trimester liver cell adenoma: diagnosis by fine-needle aspiration cytology with cytochemical and ultrastructural study. *Obstet Gynecol*. 1985;66(2):287–90. PubMed PMID: 2991833.
 36. Dokmak S, Paradis V, Vilgrain V, Sauvanet A, Farges O, Valla D, et al. A single-center surgical experience of 122 patients with single and multiple hepatocellular adenomas. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1698–705. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.061. PubMed PMID: 19664629.
 37. Gorayski P, Thompson CH, Subhash HS, Thomas AC. Hepatocellular carcinoma associated with recreational anabolic steroid use. *Br J Sports Med*. 2008;42(1):74–5; discussion 75. doi: 10.1136/bjism.2007.03932. PubMed PMID: 18178686.
 38. Labrune P, Trioche P, Duvaltier I, Chevalier P, Odievre M. Hepatocellular adenomas in glycogen storage disease type I and III: a series of 43 patients and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997;24(3):276–9. PubMed PMID: 9138172.

39. Micchelli, Shien T L, Vivekanandan P, Boitnott JK, Pawlik TM, Choti MA, Torbenson M. Malignant transformation of hepatic adenomas. *Mod Pathol*. 2008;21(4):491–7. doi: 10.1038/modpathol.2008.8. PubMed PMID: 18246041.
40. Kondo F, Fukusato T, Kudo M. Pathological Diagnosis of Benign Hepatocellular Nodular Lesions Based on the New World Health Organization Classification. *Oncology [Internet]*. 2014;87(suppl 1)(Suppl. 1):37–49.
41. Rubin RA, Lichtenstein GR. Hepatic scintigraphy in the evaluation of solitary solid liver masses. *J Nucl Med*. 1993;34(4):697–705. PubMed PMID: 8384256.
42. Bioulac-Sage P, Laumonier H, Couchy G, Le Bail B, Sa Cunha A, Rullier A, et al. Hepatocellular adenoma management and phenotypic classification: The Bordeaux experience. *Hepatology [Internet]*. 2009;50(2):481–9.
43. Cunha AS, Blanc JF, Lazaro E, Mellottee L, Le Bail B, Zucman-Rossi J, et al. Inflammatory syndrome with liver adenomatosis: the beneficial effects of surgical management. *Gut [Internet]*. 2007;56(2):307–9.
44. Bellamy, Christopher O C, Maxwell RS, Prost S, Azodo IA, Powell JJ, Manning JR. The value of immunophenotyping hepatocellular adenomas: consecutive resections at one UK centre. *Histopathology*. 2013;62(3):431–45. doi: 10.1111/his.12011.
45. Bioulac-Sage P, Laumonier H, Cubel G, Rossi JZ, Balabaud C. Hepatic resection for inflammatory hepatocellular adenomas: pathological identification of micronodules expressing inflammatory proteins. *Liver Int*. 2010;30(1):149–54. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02098.x.
46. Bioulac-Sage P, Laumonier H, Cubel G, Rossi JZ, Balabaud C. Hepatic resection for inflammatory hepatocellular adenomas: pathological identification of micronodules expressing inflammatory proteins. *Liver Int*. 2010;30(1):149–54. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02098.x. PubMed PMID: 19845852.
47. Bioulac-Sage P, Cubel G, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Revisiting the pathology of resected benign hepatocellular nodules using new immunohistochemical markers. *Semin. Liver Dis*. 2011;31(1):91–103. doi: 10.1055/s-0031-1272837.
48. Bioulac-Sage P, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Subtype classification of hepatocellular adenoma. *Dig Surg*. 2010;27(1):39–45. doi: 10.1159/000268406.

49. Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marques JM, Blanc J-F, Bui H, et al. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet.* 2002;32(2):312–5. doi: 10.1038/ng1001. PubMed PMID: 12355088.
50. Jeannot E, Poussin K, Chiche L, Bacq Y, Sturm N, Scoazec J-Y, et al. Association of CYP1B1 germ line mutations with hepatocyte nuclear factor 1alpha-mutated hepatocellular adenoma. *Cancer Res.* 2007;67(6):2611–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3947. PubMed PMID: 17363580.
51. Baumhueter S, Mendel DB, Conley PB, Kuo CJ, Turk C, Graves MK, et al. HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev.* 1990;4(3):372–9. PubMed PMID: 1970973.
52. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature.* 1996;384(6608):455–8. doi: 10.1038/384455a0. PubMed PMID: 8945470.
53. Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marques JM, Blanc J-F, Bui H, et al. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet.* 2002;32(2):312–5. doi: 10.1038/ng1001. PubMed PMID: 12355088.
54. Willson, J S B, Godwin TD, Wiggins, G A R, Guilford PJ, McCall JL. Primary hepatocellular neoplasms in a MODY3 family with a novel HNF1A germline mutation. *J Hepatol.* 2013;59(4):904–7. doi: 10.1016/j.jhep.2013.05.024. PubMed PMID: 23707370.
55. Iwen KA, Klein J, Hubold C, Lehnert H, Weitzel JM. Maturity-onset diabetes of the young and hepatic adenomatosis - characterisation of a new mutation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(6):368–71. doi: 10.1055/s-0033-1341519. PubMed PMID: 23616187.
56. Lerario AM, Brito LP, Mariani BM, Fragoso, Maria Candida B V, Machado, Marcel Autran Cesar, Teixeira R. A missense TCF1 mutation in a patient with mody-3 and liver adenomatosis. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(10):1059–60. PubMed PMID: 21120312.
57. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997;16(13):3797–804. doi: 10.1093/emboj/16.13.3797. PubMed PMID: 9233789.

58. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 2006;4(4):e115. doi: 10.1371/journal.pbio.0040115. PubMed PMID: 16602827.
59. de La Coste, A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8847–51. PubMed PMID: 9671767.
60. Singh Monga, Satdarshan Pal. beta-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury And Tumorigenesis. *Gastroenterology.* 2015. doi: 10.1053/j.gastro.2015.02.056. PubMed PMID: 25747274.
61. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet.* 2000;24(3):245–50. doi: 10.1038/73448. PubMed PMID: 10700176.
62. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, et al. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene.* 2002;21(31):4863–71. doi: 10.1038/sj.onc.1205591. PubMed PMID: 12101426.
63. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, et al. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene.* 2007;26(5):774–80. doi: 10.1038/sj.onc.1209824. PubMed PMID: 16964294.
64. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun.* 2013;4:2218. doi: 10.1038/ncomms3218. PubMed PMID: 23887712.
65. Huang H, Fujii H, Sankila A, Mahler-Araujo BM, Matsuda M, Cathomas G, et al. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol.* 1999;155(6):1795–801. PubMed PMID: 10595907.

66. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol.* 2000;157(3):763–70. PubMed PMID: 10980116.
67. Tannapfel A, Wittekind C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Arch.* 2002;440(4):345–52. doi: 10.1007/s00428-002-0617-x. PubMed PMID: 11956813.
68. Joseph NM, Ferrell LD, Jain D, Torbenson MS, Wu T-T, Yeh MM, et al. Diagnostic utility and limitations of glutamine synthetase and serum amyloid-associated protein immunohistochemistry in the distinction of focal nodular hyperplasia and inflammatory hepatocellular adenoma. *Mod Pathol [Internet].* 2014;27(1):62–72.
69. Bioulac-Sage P, Laumonier H, Rullier A, Cubel G, Laurent C, Zucman-Rossi J, et al. Over-expression of glutamine synthetase in focal nodular hyperplasia: a novel easy diagnostic tool in surgical pathology. *Liver Int.* 2009;29(3):459–65. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01849.x. PubMed PMID: 18803590.
70. Balabaud C, Al-Rabih WR, Chen P-J, Evason K, Ferrell L, Hernandez-Prera JC, et al. Focal Nodular Hyperplasia and Hepatocellular Adenoma around the World Viewed through the Scope of the Immunopathological Classification. *Int J Hepatol.* 2013;2013:268625. doi: 10.1155/2013/268625.
71. Laumonier H, Cailliez H, Balabaud C, Possenti L, Zucman-Rossi J, Bioulac-Sage P, et al. Role of contrast-enhanced sonography in differentiation of subtypes of hepatocellular adenoma: correlation with MRI findings. *AJR Am J Roentgenol.* 2012;199(2):341–8. doi: 10.2214/AJR.11.7046. PubMed PMID: 22826395.
72. Zhu XL, Chen P, Guo H, Zhang N, Hou WJ, Li XY, et al. Contrast-enhanced ultrasound for the diagnosis of hepatic adenoma. *J Int Med Res.* 2011;39(3):920–8. PubMed PMID: 21819725.
73. Roche V, Pigneur F, Tselikas L, Roux M, Baranes L, Djabbari M, et al. Differentiation of focal nodular hyperplasia from hepatocellular adenomas with low-mechanical-index contrast-enhanced sonography (CEUS): effect of size on diagnostic confidence. *Eur Radiol.* 2015;25(1):186–95. doi: 10.1007/s00330-014-3363-y. PubMed PMID: 25120205.

74. Dietrich CF, Mertens JC, Braden B, Schuessler G, Ott M, Ignee A. Contrast-enhanced ultrasound of histologically proven liver hemangiomas. *Hepatology*. 2007;45(5):1139–45. doi: 10.1002/hep.21615. PubMed PMID: 17464990.
75. Assy N, Nasser G, Djibre A, Beniashvili Z, Elias S, Zidan J. Characteristics of common solid liver lesions and recommendations for diagnostic workup. *World J Gastroenterol*. 2009;15(26):3217–27. PubMed PMID: 19598296.
76. Liu G-J, Lu M-D. Diagnosis of liver cirrhosis with contrast-enhanced ultrasound. *World J Radiol*. 2010;2(1):32–6. doi: 10.4329/wjr.v2.i1.32. PubMed PMID: 21160737.
77. Ichikawa T, Federle MP, Grazioli L, Nalesnik M. Hepatocellular adenoma: multiphasic CT and histopathologic findings in 25 patients. *Radiology*. 2000;214(3):861–8. doi: 10.1148/radiology.214.3.r00mr28861. PubMed PMID: 10715059.
78. Mathieu D, Bruneton JN, Drouillard J, Pointreau CC, Vasile N. Hepatic adenomas and focal nodular hyperplasia: dynamic CT study. *Radiology*. 1986;160(1):53–8. doi: 10.1148/radiology.160.1.3520655. PubMed PMID: 3520655.
79. Choi CS, Freeny PC. Triphasic helical CT of hepatic focal nodular hyperplasia: incidence of atypical findings. *AJR Am J Roentgenol*. 1998;170(2):391–5. doi: 10.2214/ajr.170.2.9456952. PubMed PMID: 9456952.
80. Grazioli L, Olivetti L, Mazza G, Bondioni MP. MR Imaging of Hepatocellular Adenomas and Differential Diagnosis Dilemma. *Int J Hepatol [Internet]*. 2013;2013:374170.
81. van Aalten, Susanna M, Thomeer, Maarten G J, Terkivatan T, Dwarkasing RS, Verheij J, de Man, Robert A, et al. Hepatocellular adenomas: correlation of MR imaging findings with pathologic subtype classification. *Radiology*. 2011;261(1):172–81. doi: 10.1148/radiol.11110023.
82. Arrive L, Flejou JF, Vilgrain V, Belghiti J, Najmark D, Zins M, et al. Hepatic adenoma: MR findings in 51 pathologically proved lesions. *Radiology*. 1994;193(2):507–12. doi: 10.1148/radiology.193.2.7972769. PubMed PMID: 7972769.
83. Chung KY, Mayo-Smith WW, Saini S, Rahmouni A, Golli M, Mathieu D. Hepatocellular adenoma: MR imaging features with pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol*. 1995;165(2):303–8. doi: 10.2214/ajr.165.2.7618545. PubMed PMID: 7618545.
84. Laumonier H, Bioulac-Sage P, Laurent C, Zucman-Rossi J, Balabaud C, Trillaud H. Hepatocellular adenomas: magnetic resonance imaging features as a function of

- molecular pathological classification. *Hepatology*. 2008;48(3):808–18.
doi: 10.1002/hep.22417. PubMed PMID: 18688875.
85. Mohajer K, Frydrychowicz A, Robbins JB, Loeffler AG, Reed TD, Reeder SB.
Characterization of hepatic adenoma and focal nodular hyperplasia with gadoxetic acid.
J Magn Reson Imaging. 2012;36(3):686–96. doi: 10.1002/jmri.23701. PubMed
PMID: 22674623.
86. Grieser C, Steffen IG, Seehofer D, Kramme I-B, Uktolseya R, Scheurig-Muenkler C, et al.
Histopathologically confirmed focal nodular hyperplasia of the liver: gadoxetic acid-
enhanced MRI characteristics. *Magn Reson Imaging*. 2013;31(5):755–60.
doi: 10.1016/j.mri.2012.11.006. PubMed PMID: 23219272.
87. Grazioli L, Olivetti L, Mazza G, Bondioni MP. MR Imaging of Hepatocellular Adenomas
and Differential Diagnosis Dilemma. *Int J Hepatol*. 2013;2013:374170.
doi: 10.1155/2013/374170.
88. Bioulac-Sage P, Taouji S, Le Bail B, Possenti L, Balabaud C. Value and limits of routine
histology alone or combined with glutamine synthetase immunostaining in the
diagnosis of hepatocellular adenoma subtypes on surgical specimens. *Int J Hepatol*.
2013;2013:417323. doi: 10.1155/2013/417323.
89. Bioulac-Sage P, Cubel G, Taouji S, Scoazec J-Y, Leteurtre E, Paradis V, et al.
Immunohistochemical markers on needle biopsies are helpful for the diagnosis of focal
nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma subtypes. *Am. J. Surg. Pathol*.
2012;36(11):1691–9. doi: 10.1097/PAS.0b013e3182653ece.
90. Aseni P, Sansalone CV, Sammartino C, Benedetto FD, Carrafiello G, Giacomoni A, et al.
Rapid disappearance of hepatic adenoma after contraceptive withdrawal. *J Clin
Gastroenterol*. 2001;33(3):234–6. PubMed PMID: 11500616.
91. Terkivatan T, de Wilt, J H, de Man, R A, van Rijn, R R, Tilanus HW, IJzermans JN.
Treatment of ruptured hepatocellular adenoma. *Br J Surg*. 2001;88(2):207–9.
doi: 10.1046/j.1365-2168.2001.01648.x.
92. Ault GT, Wren SM, Ralls PW, Reynolds TB, Stain SC. Selective management of hepatic
adenomas. *Am Surg*. 1996;62(10):825–9. PubMed PMID: 8813164.

93. Terkivatan T, de Wilt, J H, de Man, R A, van Rijn, R R, Zondervan PE, Tilanus HW, et al. Indications and long-term outcome of treatment for benign hepatic tumors: a critical appraisal. *Arch Surg.* 2001;136(9):1033–8. PubMed PMID: 11529826.
94. van Aalten, S M, Terkivatan T, de Man, R A, van der Windt, D J, Kok, N F M, Dwarkasing R, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular adenoma in the Netherlands: similarities and differences. *Dig Surg.* 2010;27(1):61–7. doi: 10.1159/000268587. PubMed PMID: 20357453.
95. Farges O, Ferreira N, Dokmak S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis V. Changing trends in malignant transformation of hepatocellular adenoma. *Gut.* 2011;60(1):85–9. doi: 10.1136/gut.2010.222109. PubMed PMID: 21148580.
96. Barthelmes L, Tait IS. Liver cell adenoma and liver cell adenomatosis. *HPB (Oxford).* 2005;7(3):186–96. doi: 10.1080/13651820510028954. PubMed PMID: 18333188.
97. Abu Hilal M, Di Fabio F, Wiltshire RD, Hamdan M, Layfield DM, Pearce NW. Laparoscopic liver resection for hepatocellular adenoma. *World J Gastrointest Surg.* 2011;3(7):101–5. doi: 10.4240/wjgs.v3.i7.101.
98. Herman P, Coelho FF, Perini MV, Lupinacci RM, D'Albuquerque, Luiz Augusto Carneiro, Ceconello I. Hepatocellular adenoma: an excellent indication for laparoscopic liver resection. *HPB (Oxford).* 2012;14(6):390–5. doi: 10.1111/j.1477-2574.2012.00463.x. PubMed PMID: 22568415.
99. Atwell TD, Brandhagen DJ, Charboneau JW, Nagorney DM, Callstrom MR, Farrell MA. Successful treatment of hepatocellular adenoma with percutaneous radiofrequency ablation. *AJR Am J Roentgenol.* 2005;184(3):828–31. doi: 10.2214/ajr.184.3.01840828. PubMed PMID: 15728604.
100. Rhim H, Lim HK, Kim Y-S, Choi D. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular adenoma: initial experience in 10 patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(8 Pt 2):e422-7. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.05177.x. PubMed PMID: 17944897.
101. Rocourt DV, Shiels WE, Hammond S, Besner GE. Contemporary management of benign hepatic adenoma using percutaneous radiofrequency ablation. *J Pediatr Surg.* 2006;41(6):1149–52. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2006.01.064. PubMed PMID: 16769351.

102. Stoot, J H M B, van der Linden, E, Terpstra OT, Schaapherder, A F M. Life-saving therapy for haemorrhaging liver adenomas using selective arterial embolization. *Br J Surg.* 2007;94(10):1249–53. doi: 10.1002/bjs.5779.
103. Huurman, Volkert A L, Schaapherder, Alexander F M. Management of ruptured hepatocellular adenoma. *Dig Surg.* 2010;27(1):56–60. doi: 10.1159/000268427.
104. Leese T, Farges O, Bismuth H. Liver cell adenomas. A 12-year surgical experience from a specialist hepato-biliary unit. *Annals of Surgery [Internet].* 1988;208(5):558–64.
105. Erdogan D, van Delden, Otto M, Busch, Olivier R C, Gouma DJ, van Gulik, Thomas M. Selective transcatheter arterial embolization for treatment of bleeding complications or reduction of tumor mass of hepatocellular adenomas. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2007;30(6):1252–8. doi: 10.1007/s00270-007-9108-4. PubMed PMID: 17605070.
106. Kent DR, Nissen ED, Nissen SE, Ziehm DJ. Effect of pregnancy on liver tumor associated with oral contraceptives. *Obstet Gynecol.* 1978;51(2):148–51. PubMed PMID: 622225.
107. Monks PL, Fryar BG, Biggs WW. Spontaneous rupture of an hepatic adenoma in pregnancy with survival of mother and fetus. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1986;26(2):155–7. PubMed PMID: 3021108.
108. Hayes D, Lamki H, Hunter IW. Hepatic-cell adenoma presenting with intraperitoneal haemorrhage in the puerperium. *Br Med J.* 1977;2(6099):1394. PubMed PMID: 201337.
109. Rosel HD, Baier A, Mesewinkel F. Exsanguination caused by liver cell adenoma and rupture of the hepatic capsule as cause of maternal death. *Zentralbl Gynakol.* 1990;112(21):1363–7. PubMed PMID: 2177583.
110. Bis KA, Waxman B. Rupture of the liver associated with pregnancy: a review of the literature and report of 2 cases. *Obstet Gynecol Surv.* 1976;31(11):763–73. PubMed PMID: 790241.
111. Noels JE, van Aalten, Susanna M, van der Windt, Dirk J, Kok, Niels F M, de Man, Rob A, Terkivatan T, et al. Management of hepatocellular adenoma during pregnancy. *J. Hepatol.* 2011;54(3):553–8. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.022.
112. Bröker, Mirelle E E, Ijzermans, Jan N M, van Aalten, Susanna M, de Man, Robert A, Terkivatan T. The management of pregnancy in women with hepatocellular adenoma: a plea for an individualized approach. *Int J Hepatol.* 2012;2012:725735. doi: 10.1155/2012/725735.

113. van Aalten, Susanna M, Bröker, Mirelle E E, Busschbach, J J V, de Koning, Harry J, de Man, Robert A, Steegers, Eric A P, et al. Pregnancy and liver adenoma management: PALM-study. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:82. doi: 10.1186/1471-230X-12-82.
114. Lang G. *Histotechnik.* Vienna: Springer Vienna; 2013.
115. Albert H. Coons, Hugh J. Creech, R. Norman Jones, Ernst Berliner. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *The Journal of Immunology.* 1942;45(3):159–70.
116. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986;55(2):244–8. PubMed PMID: 3525985.
117. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998;4(7):844–7. PubMed PMID: 9662379.
118. Bioulac-Sage P, Sempoux C, Balabaud C. Immunohistochemical pitfalls in the diagnosis of focal nodular hyperplasia and inflammatory hepatocellular adenoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014;38(3):245–9. doi: 10.1016/j.clinre.2014.01.001. PubMed PMID: 24525010.
119. Kakar S, Torbenson M, Jain D, Wu T-T, Yeh M, Ferrell LD. Immunohistochemical pitfalls in the diagnosis of hepatocellular adenomas and focal nodular hyperplasia: accurate understanding of diverse staining patterns is essential for diagnosis and risk assessment. *Mod Pathol [Internet].* 2015;28(1):159–60.
120. van Aalten, Susanna M, Terkivatan T, van der Linden, Edwin, Verheij J, de Man, Rob A, Ijzermans, Jan N M. Management of liver adenomatosis by radiofrequency ablation. *Dig Surg.* 2011;28(3):173–7. doi: 10.1159/000323746. PubMed PMID: 21540605.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Soweit die Abkürzungen noch nicht im Text selbst oder in den Legenden der jeweiligen Diagramme und Tabellen erläutert sind, seien sie hier erklärt:

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AFP	Alpha Feto Protein
AT	arriving time
atyp.	atypisch
B-HCA	betacateninmutiertes Leberzelladenom
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CEUS	Kontrastmittelgestützter Ultraschall
CK	Cytokeratin
cm	Zentimeter
CRP	C-Reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTNNB 1	catenin beta 1
CYP1B1	Cytochrom P450 Familie 1, Subfamilie, B Nummer 1
DD	Differentialdiagnose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

et al.	et alii
etc.	et cetera
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FNH	Fokale Noduläre Hyperplasie
ggf.	gegebenenfalls
GS	Glutaminsynthetase
GSD I/ II	Glycogenspeicherkrankheit I und II
Hb	Hämoglobin
HCA	Hepatozelluläres Adenom/ Leberadenom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
H&E Färbung	Hämatoxylin- und Eosin Färbung
Hemihep.	Hemihepatektomie
H-HCA	HNF1-A mutiertes Leberadenom
HNF1- A	hepatocyte-nuclear factor 1 alpha
IHC	Immunhistochemie
IHCA	inflammatorisches Leberadenom
Inc.	Incorporated
k.A.	keine Angaben
KM	Kontrastmittel
kg/m ²	Kilogramm pro Quadratmeter (Einheit des BMI)
lat.	lateral
LCA	Leberzelladenom
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
Leberes.	Leberresektion
li.	links
LOH	loss- of- heterocygotiy
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MRT	Magnetresonanztomographie
ng	Nanogramm
NPV	Negativer Prädiktiver Wert
o.g.	oben genannt

OK	Orale Kontrazeptiva
PPV	Positiver Prädiktiver Wert
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PT	peak time
re.	Rechts
Res.	Resektion
RT	retrogression time
S	Segment
SAA	Serum Amyloid A
Segmentres.	Segmentresektion
TCF	T- Zell- Faktor
typ.	Typisch
u.a.	unter anderem
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vs.	Versus
z.B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Schlitt, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg für die Überlassung der Räumlichkeiten und des nötigen Equipments.

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Farkas als Betreuer für die Überlassung dieses Themas sowie für die exzellente und unkomplizierte Betreuung.

Frau PD Dr. med. Petra Rümmele für die gute Betreuung pathologischerseits.

Den MTAs Frau Monika Kerscher und Frau Doris Gaag. Ein herzlicher Dank für das Erlernen der Techniken sowie Einführung in die Methodik und den tatkräftigen Beistand.

Last but not least, meinen Eltern Heike und Wolfgang Wehrmann, die mich sowohl durch das gesamte Studium der Humanmedizin als auch durch die doch lange Zeit der Fertigstellung der Dissertation hervorragend begleitet und unterstützt haben.