

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Leberregeneration bei fortgeschrittener Leberzirrhose:  
Untersuchung Albumin-exprimierender Gallengangsproliferate mittels  
*in situ* Hybridisierung

D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

Monika Bobkowski  
aus Bütow/Polen

Mainz, 2013

Tag der Promotion: 09. Juli 2013

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
2. Literaturdiskussion	10
2.1. Leberzirrhose	10
2.2. Hepatokarzinogenese	11
2.2.1. Hepatitis-C-Virus	11
2.2.2. Hepatitis-B-Virus	12
2.2.3. Alkohol-induzierte Leberzirrhose	12
2.3. Grading und Staging chronischer Lebererkrankungen	14
2.3.1. Grading	14
2.3.2. Staging	16
2.4. Leberregeneration	18
2.5. <i>In situ</i> Hybridisierung	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Material	23
3.1.1. Antikörper	23
3.1.2. Chemikalien	23
3.1.3. Computer und Software	24
3.1.4. Enzyme	25
3.1.5. Gebrauchsmaterialien	25
3.1.6. Geräte	26
3.1.7. Kits	27
3.1.8. Nukleinsäuren	27
3.2. Molekularbiologische Techniken	28
3.2.1. Sterilisierung der Arbeitsmaterialien	28
3.2.2. PCR-Produkte als „Template“ für die <i>in vitro</i> Transkription	28
3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	29

3.2.4. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) Extraktion	30
3.2.5. Ethanolfällung	30
3.2.6. Herstellung der Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden durch <i>in vitro</i> Transkription	31
3.2.7. Alkoholische Hydrolyse	31
3.3. <i>In situ</i> Hybridisierung	32
3.3.1. Herstellung der Schnittpräparate	32
3.3.2. Vorbehandlung der Schnittpräparate	32
3.3.3. Proteinase K-Andau	34
3.3.4. Azetylierung	34
3.3.5. Prähybridisierung	34
3.3.6. Hybridisierung	34
3.3.7. Waschschritte	35
3.3.8. Immunhistochemischer Nachweis der hybridisierten Sonde	35
3.3.9. Farbreaktion der alkalischen Phosphatase mit NBT/BCIP	35
3.4. Auswertung der Schnitte	36
3.4.1. Statistische Auswertung	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Patientenkollektiv	37
4.2. Histologische Befundung der entzündlichen Aktivität	38
4.3. Vergleich der demographischen Daten	41
4.4. Histologische Befundung der Paraffinschnitte zum Nachweis der Albumin-mRNA in Gallengangsproliferaten bei Leberzirrhose mittels <i>in situ</i> Hybridisierung	41
4.5. Gallengangsproliferation in zirrhotischem Leberparenchym	44
4.6. Albuminexpression in Gallengangsproliferaten in zirrhotischem Leberparenchym	46
4.7. Hepatozelluläres Karzinom	49
4.8. Alter	50

5. Diskussion	52
5.1. Aktivierung hepatischer Progenitorzellen	52
5.2. Nachweis hepatischer Progenitorzellen	54
5.3. Zusammenhang mit dem Grad des Fibrorestadiums	55
5.4. Zusammenhang mit dem Grad der entzündlichen Aktivität	55
5.5. Vermehrte Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen abhängig vom Alter?	56
5.6. Rolle der hepatischen Progenitorzellen im Rahmen der Hepatokarzinogenese	57
5.7. Abschließende Bewertung	58
6. Zusammenfassung	60
7. Literaturverzeichnis	62
Danksagung	75
Tabellarischer Lebenslauf	76

---

**Abkürzungsverzeichnis**

A.	Arteria
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	bovine serum albumin
C	Celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CK	Cytokine
cm	Centimeter
cRNA	complementary ribonucleic acid
d.h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	hora
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C-Virus
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
LiCl	Lithiumchlorid

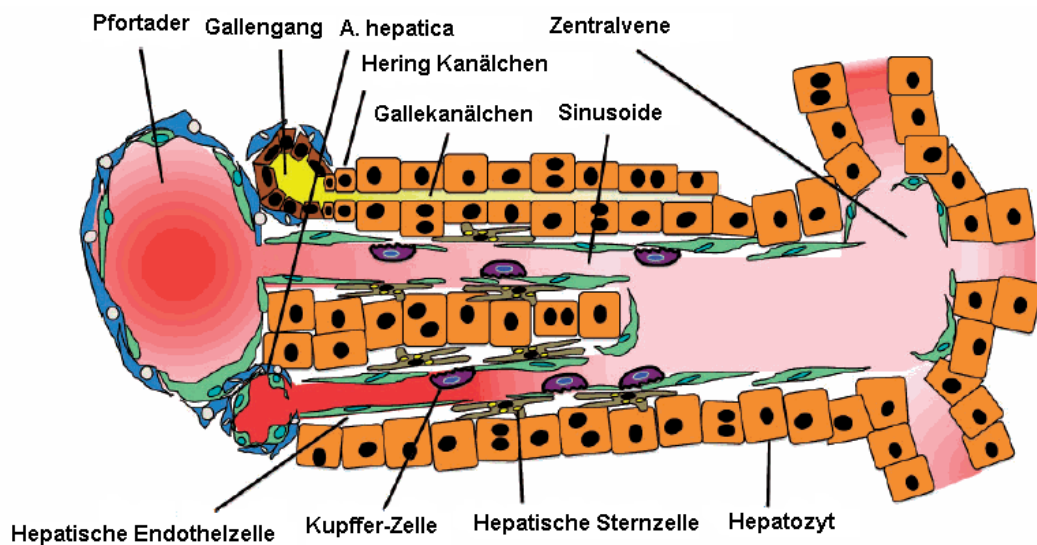
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
p.a.	pro analysi
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
SAMe	S-Adenosylmethionin
sec	Sekunde
SEC	small epithelial cells
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TGF-β	Transforming growth factor beta
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt

V.	Vena
Vv.	Venae
z.B.	zum Beispiel



## 1. Einleitung

Die Leber wird morphologisch in mehrere Leberläppchen unterteilt. Diese bestehen aus „Leberzellbalken“, in Strängen angeordnete Hepatozyten und den dazwischen liegenden Sinusoide. Diese werden von Kupffer-Zellen, hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen) und fenestrierten Endothelzellen ausgekleidet. Jedes Leberläppchen hat eine hexagonale Form mit einem Portalfeld an jeder der sechs Ecken, in diesem verlaufen jeweils eine A. interlobularis, eine V. interlobularis und ein Gallengang (97).



**Abbildung 1 Leberarchitektur.** Das Blut fließt aus Ästen der Pfortader und der A. hepatica über die Sinusoide in die Zentralvene. Entlang der Sinusoide finden sich fenestrierte Endothelzellen, Kupffer-Zellen und hepatische Sternzellen (Ito-Zellen). Hering-Kanälchen stellen die Verbindung zwischen den Gallekanälchen und dem Gallegängen dar (modifiziert nach Tanaka et al., 2011) (97).

Das zuführende Blut aus Ästen der Pfortader und der A. hepatica gelangt über die Arterien der Portalfelder in die Sinusoide, diese wiederum transportieren das Blut in die Zentralvene, die sich im Zentrum jedes Leberläppchens befindet. Von hier gelangt das Blut in die Vv. hepaticae und fließt auf diesem Weg aus der Leber ab. Die Galle wird in den Gallekanälchen sezerniert und fließt in entgegengesetzter

Richtung über die Hering-Kanälchen, die Duktuli und die interlobulären Gallengänge in Portalfeldern und schließlich über den rechten und linken Ductus hepaticus in den Ductus choledochus (97).

In den Hering-Kanälchen, die die Schaltstücke zwischen den Gallenkanälchen in der Läppchenperipherie und den interlobulären Gallengängen darstellen, sind die hepatischen Progenitorzellen, lokalisiert (1, 42, 49). Im Rahmen chronischer Lebererkrankungen wie Hepatitis B, Hepatitis C oder äthyltoxischer Hepatitis (55, 74, 81) kommt es zur Leberzellschädigung mit Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen, die durch Zellproliferation und –differenzierung für die Leberregeneration verantwortlich gemacht werden. Aufgrund ihrer bipotenten Differenzierungsfähigkeit, können aus den hepatischen Progenitorzellen sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten hervorgehen (18, 45). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte bereits der Nachweis einer Expression von hepatischen Markern wie z.B. HepPar1, Albumin und AFP sowie einer Expression von Gallengangsmarkern wie z.B. CK-7, CK-19 und OV-6 (31, 106) in hepatischen Progenitorzellen erbracht werden. In der Literatur werden die Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen sowie ihre Differenzierung in die hepatozelluläre oder biliäre Zelllinie als duktiläre Reaktion / Proliferation bezeichnet (76).

Eine Arbeitsgruppe, die Transplantatabstoßungen untersuchte, konnte in den dafür durchgeführten *in situ* Hybridisierungen ein positives Albumin-mRNA-Signal in den oval cells der Gallengänge nachweisen. Dieses wurde als Ausdruck der Leberregeneration aus den oval cells gedeutet (94). Die oval cells der Nagetiere stellen das Equivalent zu den hepatischen Progenitorzellen (19, 79) des Menschen dar.

Für die Untersuchungen einer positiven Albumin-mRNA-Expression in Gallengangsproliferaten bei menschlichen zirrhotischen Leberpräparaten, die im Rahmen der Leberregeneration aus hepatischen Progenitorzellen entstehen, bietet sich daher das bereits etablierte Verfahren der Albumin mRNA *in situ* Hybridisierung an, die – im Gegensatz zur Albumin-Immunhistochemie – zu einem spezifischen, rein zytoplasmatischen Signal führt. Zur Durchführung der Methode wurde ein bereits etabliertes Protokoll zur *in situ* Hybridisierung von mRNAs

peroxisomaler Proteine verwendet (86, 87).

Durch Immunhistochemische Untersuchungen und HE-Färbungen konnten bereits hepatische Progenitorzellen durch einige Marker wie CK7, CK8, CK18, CK19, chrom A, OV-6 und HepPar1 (52, 76, 77, 107) in menschlichen Leberpräparaten nachgewiesen werden. Allerdings gibt es bisher wenige Arbeiten (108) zum Nachweis von Albumin als Marker hepatischer Differenzierung in Gallengangsproliferaten menschlicher Leberpräparate.

Die zu untersuchende Hypothese dieser Arbeit besteht darin, dass die Albumin-mRNA-Expression in Gallengangsproliferaten, als Ausdruck hepatischer Differenzierung im Rahmen der Leberregeneration, möglicherweise Unterschiede zwischen zirrhotischen Lebererkrankungen, hervorgerufen durch Hepatitis B, Hepatitis C und durch äthyltoxische Schädigung aufweist, die möglicherweise mit dem unterschiedlichen Risiko der Entstehung eines HCCs korreliert.

Damit werden konkret folgende Ziele definiert:

- Nachweis von Gallengangsproliferation in Leberpräparaten mit Nachweis einer Leberzirrhose.
- Nachweis einer Albumin-mRNA-Expression in diesen Gallengangsproliferaten mittels *in situ* Hybridisierung als Ausdruck hepatischer Differenzierung dieser Proliferate im Rahmen der Regeneration.
- Feststellung von Unterschieden der Gallengangsproliferation in zirrhotischen Leberpräparaten verursacht durch Hepatitis B, Hepatitis C und äthyltoxischer Hepatitis.
- Feststellung von Unterschieden der Albumin-mRNA-Expression in den Gallengangsproliferaten in zirrhotischen Leberpräparaten verursacht durch Hepatitis B, Hepatitis und äthyltoxischer Hepatitis.
- Feststellung eines Zusammenhanges zwischen dem Ausmaß der Gallengangsproliferation und dem Ausmaß ihrer Albumin-mRNA-Expression mit Alter und dem Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1. Leberzirrhose

Die Zirrhose ist das Endstadium verschiedener chronischer Erkrankungen der Leber. Chronische Infektionen mit dem Hepatitis B-Virus (HBV) und dem Hepatitis C-Virus (HCV) sowie Alkohol-Abusus sind die Hauptursachen einer Leberzirrhose (31, 32, 33) mit etwa 80-85% (83).

Definiert ist die Leberzirrhose durch die Ausbildung von Nekrosen im Leberparenchym, Entstehung der Fibrogenese und Bildung von nodulären Regeneratknoten in der Leber (41). Durch die Einwirkung chronisch schädigender Noxen kommt es zur Nekrose von Hepatozyten mit Freisetzung von u.a. Mediatoren durch Kupffer-Zellen, Lebermakrophagen, Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten (3). Durch die Vermittlung dieser Mediatoren wie TGF- $\beta$ , IGF-1 oder PDGF kommt es zu einer Aktivierung der ruhenden hepatischen Sternzellen (Synonym: Ito-Zellen, hepatischer Lipozyt) (41). Die nicht aktivierten ruhenden hepatischen Sternzellen finden sich im Disse'schen Raum und gehören zu den nicht-parenchymatösen Zellen des Lebergewebes (41). Die aktivierten hepatischen Sternzellen, dann auch als Myofibroblasten bezeichnet, führen zu einer vermehrten Produktion und Ablagerung von Proteinen und damit zu einer qualitativ veränderten und quantitativ vermehrten extrazellulären Matrix. Daneben kommt es durch die Dichtezunahme der extrazellulären Matrix zu einem Verlust der sinusoidalen Fenestrierung und damit zu dem als Kapillarisierung der Sinusoide bezeichneten Vorgang, der durch eine Zunahme der Diffusionsstrecke zu Stoffwechselfunktionsstörungen der Leber führt (88). Durch die Ausbildung von bindegewebigen brückenförmigen Septen zwischen zwei Portalfeldern oder zwischen Portalfeld und Zentralvene (29, 41) kommt es zu einer irreversiblen Schädigung der Leberarchitektur. Zusätzlich lassen sich in diesen bindegewebigen Septen kleine Blutgefäße finden, die als funktionelle Shunts Blut

aus der splanchnischen in die systemische Zirkulation leiten (4). Des Weiteren kommt es kompensatorisch zu einer gesteigerten hepatozellulären Regeneration des verbliebenen Lebergewebes, die zu einer nodulären Veränderung der Leberarchitektur führt (4). Diese sogenannten Regeneratknoten können sich zu einer Größe von wenigen Millimetern bis zu einigen Zentimetern entwickeln. Diese Ausbildung von Regeneratknoten führt zu der makroskopischen Unterscheidung einer kleinknotigen (<3mm), einer großknotigen (>3mm) und einer gemischtknotigen Leberzirrhose (4).

## **2.2. Hepatokarzinogenese**

Die Leberzirrhose ist mit etwa 85-95 % der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (83). Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit die fünfthäufigste Krebsart (104).

### **2.2.1. Hepatitis-C-Virus**

Die chronische HCV-Infektion ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms. Dabei beeinflussen sowohl Virus-spezifische als auch Virus-unspezifische Immunantworten die Hepatokarzinogenese (44, 48).

Die chronische Entzündung führt zu einer Verkürzung der Lebensdauer der Hepatozyten von 150 Tagen auf lediglich ein paar Tage (32). Dieser Zustand äußert sich in einer Erhöhung der Proliferations- und der Regenerationsrate. Dies hat auch eine erhöhte Mutationsrate zur Folge und führt ebenso zur genetischen Instabilität. Weil die Hepatozyten die verschiedenen genetischen Defekte akkumulieren, ist eine maligne Transformation sehr wahrscheinlich. Zurzeit ist jedoch noch nicht geklärt, zu welchem Zeitpunkt diese genetischen Veränderungen irreversibel werden (23, 28).

Viele der HCV Genprodukte wie z.B. das HCV-core-Protein, NS3, NS4B und NS5A sind ursächlich durch Regulation von Apoptose und zellulärer Signaltansduktion an der malignen Transformation beteiligt (47).

### **2.2.2. Hepatitis-B-Virus**

Das Hepatitis-B-Virus spielt eine komplexe Rolle in der Hepatokarzinogenese. Es ist gekennzeichnet durch einen geringen zytopathischen Effekt auf die Hepatozyten. Die maligne Transformation der Hepatozyten wird über einen direkten als auch über einen indirekten Weg induziert (10, 15).

Der indirekte Weg führt über eine lange Periode der chronischen Entzündung zur Zerstörung der Leberzellen über eine zelluläre Immunreaktion. Die chronische Entzündung in der Leber führt zum fortlaufenden Zelltod der Hepatozyten. Dieser Zustand ist aber auch mit einer rapiden Proliferation und Regeneration verbunden. Daraus resultiert ein erhöhtes Vorkommen an Zellen mit einem malignen Potential und dem Risiko der malignen Entartung (15, 61, 93).

Die wichtigste Rolle im direkten Weg der Hepatokarzinogenese spielt das HBV-kodierte Protein HBX. Das HBX ist ein virales Onkoprotein, das als transkriptionaler Transaktivator fungiert und zur Expression zellulärer (p53, DDB1) als auch viraler Gene führt (15).

### **2.2.3. Alkohol-induzierte Leberzirrhose**

Der chronische Alkoholabusus von mehr als 80g/Tag über 10 Jahre hinweg führt laut der Bresica-Studie (21, 96) zur einer signifikanten Erhöhung des Risikos ein HCC zu entwickeln. Das Risiko, dass sich aus einer dekompenzierten Alkohol-induzierten Leberzirrhose ein HCC entwickelt, liegt bei 1% pro Jahr (58).

Die Mechanismen, die zu einer Hepatokarzinogenese in einer durch Alkohol induzierten Leberzirrhose führen, sind noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Es werden u.a. chromosomaler Verlust, oxidativer Stress, abnehmender Vitamin A-Spiegel in der Leber, veränderte DNA-Methylierung und genetische Beeinflussbarkeit verantwortlich gemacht. 30-40% aller Patienten mit einem HCC zeigen einen Verlust des langen Arms von Chromosom 4 (43). In einer Studie an französischen Patienten mit langjährigen Alkoholabusus wurde der Verlust von 4q34-35 berichtet, jedoch zeigten einige dieser Patienten zusätzlich eine HCV-Infektion (8).

Alkohol wird in der durch die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase zu Acetaldehyd abgebaut. Dieses Acetaldehyd wird wiederum durch die NAD-abhängige Aldehyddehydrogenase über Acetyl-CoA schließlich zu Acetat metabolisiert. Weiterhin wird der Alkohol mit geringer Effizienz vom Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) zu Acetaldehyd abgebaut. Studien, durchgeführt in Japan zeigen, dass bei Patienten mit einer Hepatitis-C-Infektion und einem chronischem Alkoholabusus verbunden mit dem Mangel an der Aldehyddehydrogenase das odds ratio (odds ratio 5.4; 95% confidence intervall:2.1-14) höher liegt als bei Patienten mit einer Hepatitis-C-Infektion und chronischem Alkoholabusus verbunden mit einer funktionierenden Aldehyddehydrogenase (37).

Das CYP2E1 führt zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen, die verantwortlich gemacht werden für den Zelltod, DNA-Zerstörung und die Entwicklung von Karzinomen (60). Ferner oxydiert das CYP2E1 Karzinogene wie Dimethylnitrosamin, Aflatoxin, Vinylchloride und Dimethylhydrazin (91).

Ein niedriger Vitamin-A-Spiegel, verursacht durch den chronischen Alkoholabusus, führt zur vermehrten Expression des AP-1 (13). AP-1 ist verantwortlich für eine erhöhte Hepatozyten-Proliferation, die das Risiko einer malignen Transformation birgt (14).

In Alkohol-induzierter Leberzirrhose ist das hepatische Enzym Methyladenosyltransferase II erniedrigt und damit ist die Bildung von S-adenosylmethionin (SAME) nicht möglich. Der Mangel an SAME führt zur insuffizienten DNA-Methylierung und damit steigt das Risiko einer Karzinom-Entwicklung (54, 69).

## 2.3. Grading und Staging chronischer Lebererkrankungen

Sowohl der Grad der entzündlichen Aktivität (Grading) als auch das Ausmaß der Fibrose (Staging) werden in definierten Scores festgehalten. Es gibt verschiedene sowohl deskriptive als auch numerische Scoring-Systeme. Zu den am häufigsten verwendeten gehören der Desmet/Scheuer-, der Ishak-, der Metavir- und der Batts/Ludwig-Score (89).

### 2.3.1. Grading

Desmet et al. (20) führten 1994 den Desmet-Scheuer-Score ein, der das Grading der entzündlichen Aktivität numerisch in 4 Grade einteilt und mit minimal, mild, mäßig und schwer beschreibt (Tabelle 1).

Grad	Verbal	Histologische Merkmale
1	minimal	geringe portale Entzündungszellinfiltration, keine oder minimale azinäre Parenchymzelluntergänge oder Entzündungszellinfiltrate, keine Grenzzonenhepatitis
2	mild/geringgradig	geringe oder mäßige portale Entzündungszellinfiltrate, fokale Grenzzonenhepatitis, einzelne parenchymatöse Einzelzellnekrosen, keine Gruppennekrosen
3	mäßig/mittelgradig	Erhebliche (mäßig bis schwere) portale Entzündungszellinfiltration, erhebliche Grenzzonenhepatitis, zahlreiche azinäre Einzelzellnekrosen, evtl. einzelne Gruppennekrosen, keine Brücken- oder panlobulären Nekrosen
4	schwer/hochgradig	Schwere portale Entzündungszellinfiltration und Grenzzonenhepatitis, schwere azinäre Entzündung mit Gruppennekrosen und evtl. Brücken- und panlobulären Nekrosen

**Tabelle 1: Grading bei chronischer Hepatitis** (nach Desmet et al. (20)).

1995 entwickelten Ishak et al. (35) den modifizierten histologischen Aktivitätsindex (mHAI), dieser stellt eine Weiterentwicklung des Knodell-Scores dar (89) (Tabelle 2). Er beschreibt in einem Score von 0-18 Punkte das Ausmaß der Interface-Hepatitis (sogenannte Grenzzonenhepatitis, früher als Mottenfrassnekrosen bezeichnet), der konfluierenden Nekrose, der Einzelzelluntergänge und der portalen Entzündung (35).



<b>Interface-Hepatitis</b>	0	keine
	1	fokal, wenige Portalfelder
	2	Fokal, Mehrzahl der Portalfelder
	3	Kontinuierlich um <50% der Portalfelder
	4	Kontinuierlich um >50% der Portalfelder
<b>Konfluente Nekrosen</b>	0	Keine
	1	Fokal
	2	Zone-3-Nekrosen, wenige
	3	Zone-3-Nekrosen, zahlreiche
	4	Zone-3- und einzelne portozentrale Brücken
	5	Zone-3- und multiple portozentrale Brücken
<b>Einzelzelluntergänge</b>	0	Keine
	1	Bis 1 Herd pro Gesichtsfeld (10er Objektiv)
	2	2-4 Herde pro Gesichtsfeld (10er Objektiv)
	3	5-10 Herde pro Gesichtsfeld (10er Objektiv)
	4	>10 Herde pro Gesichtsfeld (10er Objektiv)
<b>Portale Entzündung</b>	0	Keine
	1	Gering, weinge oder alle Portalfelder
	2	Mäßig, weinge oder alle Portalfelder
	3	Mäßig/ausgeprägt, alle Portalfelder
	4	Ausgeprägt, alle Portalfelder

**Tabelle 2: Modifizierter histologischer Aktivitätsindex (mHAI nach Ishak (35)).**

Zwei vereinfachte Scoring-Systeme wurden 1995 von Batts und Ludwig (Tabelle 4) sowie von der Metavir-Gruppe (Tabelle 3) beschrieben. Beide Systeme führten als Neuerung den Aktivitätsgrad 0 ein und beinhalten die Bestimmung der periportal (Mottenfrassnekrosen) und lobulären Entzündung (5, 7). Im Gegensatz zu den Scoring-Systemen von Desmet und Ishak wird die Bestimmung des portalen Entzündungsinfiltrates sowohl im Batts und Ludwig-Score als auch im Metavir-Score nicht berücksichtigt (5, 7, 89). Der Metavir-Score ist als einziges Scoring-System speziell für die bioptische Diagnostik der chronischen Hepatitis C entwickelt worden (7, 89).

Interface-Hepatitis	Azinäre nekroinflammatorische Foci	Score
0	0	A=0
0	1	A=1
1	0,1	A=1
0,1	2	A=2
2	0,1	A=2
2	2	A=3
3	0,1,2	A=3

Interface-Hepatitis: 0=keine, 1=gering, 2=mäßiggradig, 3=schwergradig

Azinäre Nekrosen: 0=keine, 1=gering, 2=mäßiggradig, 3=schwergradig

**Tabelle 3: Grading bei chronischer Hepatitis** (nach METAVIR (7)).

Einteilung der entzündlichen Aktivität		Kriterien	
semiquantitativ	deskriptiv	Mottenfrassnekrosen	lobuläre Entzündung und Nekrosen
0	keine	keine	keine
1	minimal	fleckförmig	fleckförmig, selten
2	mild	einige oder alle Portalfelder	wenige Zelluntergänge
3	mässig	alle Portalfelder	deutliche Zellveränderungen
4	schwer	auch Brückennekrosen	diffuse Zelluntergänge

**Tabelle 4: Einteilung der entzündlichen Aktivität** (nach Batts/Ludwig (5)).

### 2.3.2. Staging

Das Staging ist das wichtigste histopathologische Kriterium in der Prognoseabschätzung und damit relevant für die Therapieentscheidung bei chronischen Lebererkrankungen (89).

Der Desmet-Score (Tabelle 5) abgeleitet nach Scheuer teilt das Staging in 5 Grade ein von keiner Fibrose über eine milde, eine mäßige, eine schwere Fibrose bis zur Zirrhose (20, 89).

Score	Verbal	Histologische Merkmale
0	keine Fibrose	keine Faservermehrung
1	milde/geringgradige Fibrose	portale Faservermehrung, keine Septen
2	mäßige/mittelgradige Fibrose	Inkomplette oder komplette portoportale Fasersepten, erhaltene Architektur
3	schwere/hochgradige Fibrose	Septenbildende Faservermehrung mit Architekturstörung, kein Anhalt für kompletten zirrhotischen Umbau
4	Zirrhose	wahrscheinlicher oder definitiver zirrhotischer Umbau

**Tabelle 5: Staging bei chronischer Hepatitis** (nach Desmet et al. (20)).

Ishak et al. definieren die Fibrose in einem 7-stufigen Score (Tabelle 6). Hier wird bei der portalen Fibrose zusätzlich zwischen der Fibrose einzelner und der meisten Portalfelder sowie einem Stadium der inkompletten und einem Stadium der kompletten Zirrhose unterschieden (35).

Stadium	Histologische Merkmale
0	Keine Fibrose
1	Fibröse Verbreiterung einzelner Portalfelder ± kurze Septen
2	Fibröse Verbreiterung >50% der Portalfelder ± kurze Septen
3	Fibröse Verbreiterung >50% der Portalfelder, einzelne fibröse portoportale Brücken
4	Fibröse Verbreiterung der Portalfelder mit ausgedehnter brückenbildender Fibrose (auch portozentral!)
5	Inkomplette Zirrhose mit einzelnen Pseudolobuli
6	Komplette Zirrhose

**Tabelle 6: Staging bei chronischer Hepatitis** (nach Ishak et al. (35)).

Sowohl der Batts und Ludwig-Score (Tabelle 8) als auch der Metavir-Score (Tabelle 7) sind dem Scoring-System nach Desmet vergleichbar, aber unschärfer definiert (89).

Stadium	Histologische Merkmale
F0	Keine portale Fibrose
F1	Portale Fibrose ohne Septenbildung
F2	Portale Fibrose mit wenigen Septen
F3	Portale Fibrose mit zahlreichen Septen, keine Zirrhose
F4	Zirrhose

**Tabelle 7: Staging bei chronischer Hepatitis** (nach METAVIR [55]).

Stadium	Histologische Merkmale
0	Keine Fibrose
1	Portale Fibrose
2	Periportale Fibrose
3	Septenbildende Fibrose
4	Zirrhose

**Tabelle 8: Staging bei chronischer Hepatitis** (nach Batts/Ludwig (5)).

## 2.4. Leberregeneration

Die ersten Hinweise auf das enorme Regenerationspotential der Leber gehen bereits auf die griechische Mythologie zurück. Im Mythos des Prometheus (2) aus dem 8. Jahrhundert vor Christus, wird bereits berichtet, dass diesem, nachdem er von Zeus an einen Felsen gefesselt wurde, der Adler Ethon Teile seiner Leber fraß. Prometheus überlebte, da über Nacht seine Leber nachwuchs.

Die Leber besitzt ein großes physiologisches Potenzial nach chemischer, toxischer, traumatischer oder durch virale Erkrankungen (55, 73, 79, 95) verursachter Zellschädigung sich selbst zu regenerieren. In der Leber lassen sich zwei Zellkompartimente finden, die bei Schädigung von Leberzellen, entweder durch Hyperplasie, d.h. einer Volumenzunahme durch eine vermehrte Zellteilung und Erhöhung der Zellzahl oder durch Zellproliferation und –differenzierung von hepatischen Progenitorzellen für die Leberregeneration verantwortlich sind (73, 79).

Hepatozyten stellen hochdifferenzierte Zellen dar, die multiple synthetisierende und metabolische Funktionen besitzen. Aufgrund ihrer ruhenden Funktion sind Mitosen im normalen adulten Lebergewebe selten. Es findet sich etwa 1 Mitose auf 20.000 Hepatozyten (2). Allerdings sind die Hepatozyten in der Lage z.B. nach chirurgischer Resektion durch Steigerung der Mitoserate die Lebermasse wieder herzustellen. Reife ruhende Hepatozyten befinden sich normalerweise in der G<sub>0</sub>-Phase. Durch Leberschädigung treten sie in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus über (2). Anschließend folgt die S-Phase, etwa 12 Stunden z.B. nach partieller Hepatektomie, in der die DNA-Synthese stattfindet, dieser folgt 6 bis 8 Stunden später in der M-Phase die Mitose (2). Die Replikation der Nicht-Parenchymzellen beginnt erst 24 Stunden später (56). An diesem Prozess sind zudem einige Substanzen beteiligt, die die DNA-Synthese und die Mitose stimulieren. Zu den wichtigsten Stimulatoren der Leberregeneration zählen als wichtigster Wachstumsfaktor der *hepatocyte growth factor* (HGF), daneben weitere wie *epidermal growth factor* (EGF), *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), Interleukin-6 (IL-6) und *transforming growth factor-α* (TGF-α). Ein hervorragendes Beispiel für das enorme Proliferationspotential der Leber stellt die bei Nagetieren durchgeführte 2/3 partielle Hepatektomie (34, 64) dar. Die Leber bei Nagetieren weist eine multilobuläre Struktur auf, werden drei der fünf Lappen chirurgisch reseziert, entspricht dies 2/3 der Lebermasse (57). Die Leber ist in der Lage durch Hyperplasie ihrer Zellen innerhalb von 10 Tagen auf ihre ursprüngliche Größe anzuwachsen (unicommitted stem cell-Konzept (27, 56)). Durch die Weiterentwicklung der Transplantationsmedizin konnte gezeigt werden, dass dieses Tier-Modell auf die Regenerationsfähigkeit der menschlichen Leber übertragen werden konnte (103). Jedoch benötigt dieser Prozess bei Menschen einen Zeitraum von ungefähr 1 Monat (64).

Unter bestimmten Bedingungen, wenn die Leberregeneration durch Hepatozyten nicht möglich ist, wird ein anderes Zellkompartiment herangezogen. Dieses wird von den hepatischen Progenitorzellen, bei Nagetieren als oval cells bezeichnet, gebildet. Bereits 1937 postulierte Kinosita (39), dass Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften existieren, die sich in Hepatozyten differenzieren können. Der Begriff oval cell wurde von Faber (25) 1956 das erste Mal beschrieben. Nach

Behandlung von Ratten mit karzinogenen Substanzen wie Ethionine, 2-AAF und 3-Methyl-4-dimethylaminobenzene entdeckte er Zellen mit charakteristischer Morphologie. Er beschrieb diese Zellen als kleine ovale Zellen mit wenig basophilen Zytoplasma und fahlen bläulichem Nukleus. Diese oval cells stellen ca. 10µm große undifferenzierte Stammzellen der Leber dar. Sie besitzen einen ovalen Nukleus und die Kern/Plasma-Relation ist zugunsten des Kerns verschoben (101). Die hepatischen Progenitorzellen sind in den Hering-Kanälchen (1, 42, 49), diese stellen Schaltstücke zwischen den Gallenkanälchen in der Läppchenperipherie und den interlobulären Gallengängen dar, lokalisiert. Daneben finden sie sich auch in den intralobulären Gallengängen (42, 49).

Da die hepatischen Progenitorzellen eine bipotente Differenzierungsfähigkeit besitzen, können aus ihnen sowohl Hepatozyten als auch Gallengangszellen hervorgehen (18, 45).

Wie bereits beschrieben, besitzen Hepatozyten nach einer 2/3 partiellen Hepatektomie ein ausreichendes Potenzial zur Leberregeneration. Unter bestimmten Bedingungen jedoch wie nach massiver und chronischer Leberzellschädigung, z.B. einer durch alkohol-verursachten Leberzirrhose oder durch chronisch virale Hepatitis (55, 74, 81), können die Hepatozyten den entstandenen Defekt nicht kompensieren und die oval cells werden aktiviert (99, 106). Wird eine Schwelle von 50%igen Verlust von Hepatozyten überschritten kombiniert mit verminderter Proliferationsfähigkeit der verbliebenen Hepatozyten, so führt dieser Zustand zur Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen (38). Arbeiten, die die oval cell-Proliferation untersuchen, haben die Schädigung der Hepatozyten, damit diese die Fähigkeit zur Proliferation verlieren, verbunden mit der Stimulation der oval cell-Proliferation, gemeinsam. Die partielle Hepatektomie (34, 64) führt zur Leberregeneration durch Proliferation der Hepatozyten, ohne Aktivierung von oval cells. Dagegen wurde gezeigt, dass 2-Acetylaminoflouran kombiniert mit einer partiellen Hepatektomie (2-AAF/PH) zur Unterdrückung der Hepatozyten-Proliferation führt und damit die Proliferation der oval cells erlaubt. Die toxische Schädigung mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) (26) führt ebenso wie die Partielle Hepatektomie zur einer Proliferation bereits existenter Hepatozyten und

damit ist die Proliferation von oval cells nicht möglich (24, 68). Wird dagegen das Lebergewebe durch andere chemische Toxine wie Ethionine (92) oder Galaktosamine (45, 46) geschädigt, findet die Leberregeneration durch Proliferation und Differenzierung von oval cells statt. Bei der periportalen Schädigung durch Allylalkohol wurde beschrieben, dass periduktal gelegene oval cells zur Leberregeneration aktiviert werden (92). Die oval cells zeigen neben einer Expression von hepatischen Markern wie CK-18, Albumin und AFP und Gallengangsmarkern wie CK-7, CK-19 und OV-6 (31, 106) ebenfalls eine Expression von hämatopoetischen Stammzellmarkern wie CD34, c-kit, Flt-3 und Thy-1 (6, 17, 67) (Tabelle 9).

Marker	Hepatoblasten	Oval cells	Hepatozyten	Gallengangszellen
AFP	+	+	-	-
ALB	+	+	+	-
CD34	+	+	-	+
CK7	-o.+?	-o.+?	-	+
CK8	+	+	+	+
CK18	+	+	+	+
CK19	+	+	-	+
Flt-3	not detected	+	-	+
OV-6	+	+	-	+

**Tabelle 9:** Häufig verwendete Marker zur Differenzierung der Zellen in der Leber (31, 106).

## 2.5. *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) zählt zu den Standardtechniken in der Molekularbiologie bzw. -pathologie und findet hauptsächlich Anwendung im Nachweis von Virus-Nukleinsäuren sowie in der Diagnostik von Gen- und Chromosomendefekten.

Die *in situ* Hybridisierung ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen der DNA und RNA in Gewebeschnitten, fixierten Zellen

oder Metaphasechromosomen.

Die Methode der *in situ* Hybridisierung wurde Ende der 1960er Jahre von den US-amerikanischen Biologen Mary Lou Pardue und Joe Gall (30, 65) entwickelt. Die damals verwendete Methode der *in situ* Hybridisierung mittels radioaktiv markierter Sonden war auf die Nutzung eines Röntgenfilmes zur Auswertung der Präparate angewiesen. Nachteile waren neben den allgemeinen mit Radioaktivität verbundenen Problemen, die räumliche Auflösung verglichen mit den heutigen Verfahren.

Die heute vor allem verwendete Methode stellt die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung dar. Das Prinzip dieser Technik (109) beruht auf der Bindung einer zuvor synthetisierten und in ihrer Sequenz bekannten sowie zuvor markierten Sonde an die im Präparat vorliegende komplementäre Nukleotidsequenz. Als Sonden kommen Oligonukleotide, cDNA und cRNA in Frage. Die Markierung der Sonde kann indirekt mittels Haptenen (wie Digoxigenin, Biotin oder Dinitrophenol) erfolgen. Das häufig zur Markierung der Sonden eingesetzte Verfahren ist die PCR. Zusätzlich muss die als Doppelstrang vorliegende DNA denaturiert werden. Dies kann entweder durch Verschiebung des pH-Wertes in den sauren oder alkalischen Bereich oder durch Hitze erreicht werden. Um die Struktur der Chromosomen bei der Denaturierung durch Hitze weniger stark zu zerstören, wird durch die Zugabe von Formamid der Schmelzpunkt auf 70-75 °C abgesenkt. Hierdurch wird die Polarität der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Einzelsträngen abgeschwächt. Während der Hybridisierung kann die Sonde durch das Gewebe diffundieren und bindet überall dort, wo sich komplementäre Sequenzen finden. Anschließend besteht das Präparat aus Hybridmolekülen der Nukleinsäuren des Präparates und der Sonde. Sondenmoleküle, die nicht oder nur unspezifisch gebunden wurden, werden heraus gewaschen, damit die gebundenen Sondenmoleküle nachgewiesen werden können. Die Detektion der Hybride geschieht indirekt über Antikörperfärbung. Die Antikörper sind mit einem Enzym gekoppelt, welches durch Zusatz von chromogenen Substanzen einen Farbstoff bildet, der kovalent im Gewebe gebunden bleibt. Anschließend werden die Präparate mikroskopisch ausgewertet.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Antikörper

Anti-Digoxigenin Fab-AP

Roche Diagnostics, Mannheim

##### 3.1.2. Chemikalien

Agarose

STARLAB GmbH, Hamburg

Aqua destillare

Universitätsmedizin Mainz

Baysilone

Bayer AG, Leverkusen

BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-  
Phosphat)

Promega Wisconsin, USA

Blocking-Reagenz

Roche Diagnostics, Mannheim

Borsäure

Merck, Darmstadt

BSA (bovine serum albumin)

Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Chloroform-Isoamylalkohol

Roth, Karlsruhe

DEPC-H<sub>2</sub>O

Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Dextransulfat

Sigma-Aldrich, Missouri, USA

dNTPs

Roche Diagnostics, Mannheim

EDTA

AppliChem, Darmstadt

Essigsäureanhydrid

Merck, Darmstadt

Ethanol 70%

Universitätsmedizin Mainz

Ethanol 80%

Universitätsmedizin Mainz

Ethanol 95%

Universitätsmedizin Mainz

Ethanol 100%

Universitätsmedizin Mainz

Ethidiumbromid

AppliChem, Darmstadt

Ficoll-400

Merck, Darmstadt

Fixogum

Marabu GmbH &amp; Co. KG, Tamm

Formalin

Universitätsmedizin Mainz

Formamid

Merck, Darmstadt

Glyzeringelatine	Merck, Darmstadt
Hämotoxylin	VWR International, Darmstadt
HCl 1M	Merck, Darmstadt
HCl 37%	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O	Universitätsmedizin Mainz
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
LiCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
MgCl <sub>2</sub>	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumazetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Fulka, Neu-Ulm
NaCl	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NBT (Nitro Blue Tetrazolium)	Promega, Wisconsin, USA
PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol)	Roth, Karlsruhe
Platinum (Taq-Polymerase)	Invitrogen, California, USA*
PVP (Polyvinylpyrollidon)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
RNase free water	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase PCR Buffer	Invitrogen, Kalifornien, USA*
TBE	Universitätsmedizin M <sup>1</sup> ainz
TEA (Triethanolamin)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Xylol	Universitätsmedizin Mainz

### 3.1.3. Computer und Software

Bildverarbeitungshard- und Software Softmaging System Cell F	Olympus Company, Tokio, Japan
Computer Intel Pentium 4, 320 GHz	Universitätsmedizin Mainz
Laptop Sony Vaio	Sony, Tokio, Japan
Monitor SyncMaster 713BM	Samsung, Seoul, Südkorea

\* die Produkte von Invitrogen, California, USA werden inzwischen von Life Technologies, California, USA vertrieben

Monitor SyncMaster 913BM	Samsung, Seoul, Südkorea
Statistisches Datenanalyseprogramm SPSS (Version 11.5)	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA
SigmaPlot for Windows (Version 11.0)	Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA
Wissenschaftliche Zitatsoftware Endnote (Version 9.0.0)	Thomson Reuters, Philadelphia, Pennsylvania, USA

### 3.1.4. Enzyme

Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K (EC 3.4.21.64)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
T7-RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6)	Promega, Wisconsin, USA
T3-RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6)	Promega, Wisconsin, USA

### 3.1.5. Gebrauchsmaterialien

Deckgläser (24 x 24 mm)	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Filterpapier Fisherbrand QL 100	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Glaswaren	Schott AG, Mainz
HybriSlip	Grace Bio-Labs, Bend, Oregon, USA
Laborfilm (Parafilm «M»)	American National Can, Chicago, Illinois, USA
Objektträger SuperFrost Ultra Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Parafilm	Pechiney, Plastic Packing W.I.
Petrischalen Steriplan (d=100mm, Höhe 15mm)	Schott, Mainz
Pipettenspitzen epT.I.P.S.	Eppendorf, Hamburg
Tubes (1,5µl, 2µl)	Eppendorf, Hamburg

**3.1.6. Geräte**

Autoklav	H+P Labortechnik, München
Brutschrank BB 6060	Haraeus, Osterode
Eismaschine AF 100	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois, USA
Elektrophoresekammer WidE Mini-SUB cEU GT	Bio-Rad, München
Eppendorfzentrifuge Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Geltrockner	Bio-Rad, München
Hybridisierungssofen HB-1000 UVP	Laboratory Products Inc, Seaford, Delaware, USA
Kühlschrank +4°C	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizung IKAMAG RCT	Janke & Kunke IKA® Labortechnik, Staufen i. Br.
Mikroskop Axioskop 40	Carl-Zeiss AG, Göttingen
Mikroskop Olympus BX 51	Olympus Company, Tokyo, Japan
Mikrotiterplatte	Roth, Karlsruhe
Mikrowellenherd 800	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Paraffin-Arbeitsplatz Histocentre 2	Shandon, Frankfurt
pH-Meter pH DIGI 520	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Schlittenmikrotom SM 200 RH	Leica, Bensheim
Sequenzierapparatur (GeneAmp PCR System 9700)	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA* <sup>2</sup>
Sofortbildkamera Universal Hood 2	Bio-Rad, München
Spannungsquellen für Elektrophorese	Bio-Rad, München
Spectrophotometer ND-1000	NanoDrop Products, Wilmington, Delaware, USA
Sterile Werkbank mcl 6	Waldner Laboreinrichtung, Wangen im Allgäu

\*<sup>2</sup>die Produkte von Applied Biosystems, California, USA werden inzwischen von Life Technologies, California, USA vertrieben

Thermoblock  
Tischzentrifuge UNIMAX 210

VWR International, Darmstadt  
Heidolph Instruments, Schwabach

### **3.1.7. Kits**

Digoxigenin-RNA-Labelin-Kit

Roche Diagnostics, Mannheim

### **3.1.8. Nukleinsäuren**

Plasmide: Albumin, GAPDH

Universitätsmedizin Mainz

Poly-A-RNA

Roche Diagnostics, Mannheim

Primer: T3, T7, SP6

Biomers.net, Ulm

Primer: pBSK-s, pBSK-r

Roth, Karlsruhe

t-RNA

Roche Diagnostics, Mannheim

## 3.2. Molekularbiologische Techniken

### 3.2.1. Sterilisierung der Arbeitsmaterialien

Soweit vorhanden wurden stets sterilisierte Flüssigkeiten des Institutes für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz verwendet, ansonsten erfolgte die Sterilisierung dieser mittels Filtration durch 0,2 µm Filter. Materialien aus Polypropylen, wie Eppendorf-tubes oder Pipettenspitzen sowie Glasgeräte wurden sterilisiert verwendet. Die Durchführungen aller Arbeiten erfolgten unter RNase-freien Bedingungen.

### 3.2.2. PCR-Produkte als „Template“ für die *in vitro* Transkription

Für die Herstellung der einzelsträngigen Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung dienten als Ausgangsmaterial cDNA-Fragmente, die für die einzelnen Enzyme und Proteine kodierten. Mittels *in vitro* Transkription, bei der die DNA durch spezifische RNA-Polymerasen in Digoxigenin-markierte RNA umgeschrieben wird, wurden die Sonden hergestellt (85).

Vor der *in vitro* Transkription wurden die Plasmide zusammen mit den beiden RNA-Polymerase-Promotoren mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Auf diese Weise konnten »antisense«- und »sense«-Sonden aus derselben DNA-Präparation hergestellt werden. Sämtliche Inserts konnten mit dem folgenden Primer-Paar amplifiziert werden, da nur pBluescript-Vektoren verwendet wurden:

Primer für pBluescript-Vektoren:

pBSK-s      5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTACGC-3'

pBSK-r      5'TGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGC-3'

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit einem Thermocycler der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Pro Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 559,4  $\mu$ l wurden 8 Stammlösungen angefertigt:

Stammlösung-220: enthielt SP6-220-F und T7-220-R

Stammlösung-272: enthielt SP6-272-F und T7-272-R

Stammlösung 292: enthielt SP6-292-F und T7-292-R

Stammlösung 334: enthielt SP6-334-F und T7-334-R

Stammlösung343: enthielt SP6-343-F und T7-343-R

Stammlösung 353: enthielt SP6-353-F und T7-353-R

Stammlösung 361: enthielt SP6-361-F und T7-361-R

Stammlösung 396: enthielt SP6-396-F und T7-396-R

In jede dieser 8 Stammlösungen wurden jeweils 62,5  $\mu$ l 10xPCR Rxn Buffer, 37,5  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 50  $\mu$ l dNTPs (2,5), 37,5  $\mu$ l des entsprechenden SP6, 37,5 $\mu$ l des entsprechenden T7 und 334,4 $\mu$ l  $H_2O$  zusammen pipettiert.

Anschließend wurden pro Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 82,24  $\mu$ l 24 weitere Lösungen hergestellt. 16 Lösungen setzten sich zusammen aus jeweils 3,5  $\mu$ l cDNA (1:10), jeweils 78,3  $\mu$ l der 8 Stammlösungen und jeweils 0,44  $\mu$ l Platinum. Die restlichen 8 Lösungen enthielten jeweils 3,5  $\mu$ l genomische Lösung (702-8), jeweils 78,3  $\mu$ l der 8 Stammlösungen und jeweils 0,44  $\mu$ l Platinum. Die 24 Ansätze wurden je 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden sie über 30 Zyklen bei 95°C für je 30 sec, bei 65°C für je 30 sec und bei 72°C für 1.3 0 min sowie abschließend bei 72°C für 7 min inkubiert.

### **3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Reaktionen wurden auf Agarose-Gelen kontrolliert und fotografiert. Für die Herstellung eines 1%igen 9cm x 8cm x 1cm messenden Agarose Gels wurden in einem 500 ml Erlenmeyerkolben 3g Agarose mit 300 ml TBE-Puffer (Stammlösung 10xTBE: 1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA) versetzt und bei 500 bis 800 Watt in der Mikrowelle aufgeköcht, bis schließlich die Agarose zum Schmelzen gebracht wurde. Nachdem der Ansatz unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur auf 50°C abgekühlt ist, wurde Ethidiumbromid aus 1%iger Stocklösung (15 $\mu$ l/300ml Ansatz =

1:20.000) in dem Ansatz vollständig verrührt. Anschließend wurde die noch flüssige Lösung in Geltrays (mit 30er Kämmen) gegossen. Nach Verfestigung des Gels wurde es in mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammern überführt. In die designierten Wells einer Mikrotiterplatte (ROTH, V-Profil) wurden jeweils 2 µl des 6 x Ladepuffers vorpipettiert und schließlich 8 µl der 24 Lösungen mit dem Ladepuffer vermischt. Jeweils 10 µl der Proben aus der Mikrotiterplatte wurden zügig auf das Gel geladen. Das Gel wurde zuvor mit 10 µl 100bp-Marker flankiert und zwischen den 8 verschiedenen Stammlösungen wurde das Gel zusätzlich mit 2-3 µl 50bp-Marker geladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 75 V für 45 min durchgeführt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht digital fotografiert. Im Anschluss wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit nachfolgender Ethanol-Präzipitation als Vorbereitung für die *in situ* Hybridisierung durchgeführt.

#### **3.2.4. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) Extraktion**

In einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden 500 µl der zu reinigenden DNA mit 800 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) plus etwas hochvisköser Baysilone mindestens 2 min auf dem Vortex-Gerät gemischt. Anschließend folgte die Zentrifugation für 2-5 min bei 18.000 rpm und 22 °C. Die Zentrifugation führte zur Entstehung von 2 Phasen. Die obere Phase enthielt die DNA, die untere Phase Proteine mit Phenol und Chloroform, dazwischen die Baysilone-Paste. Die DNA-Phase wurde nachfolgend in ein frisches Tube mit 800 µl Chloroform-Isoamylalkohol überführt und wieder mindestens 2 min auf dem Vortex-Gerät gemischt und nochmals 1-2 min anzentrifugiert. Anschließend wurde etwa 50% mehr Baysilone zugegeben als bei der PCI s.o. und für 2-3 min bei 18.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde die entstandene DNA-Phase in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und die Ethanol-Fällung angeschlossen.

#### **3.2.5. Ethanolfällung**

Hierzu wurde zu den 400 µl der nun aufgereinigten DNA-Präparation (sollte weniger als 400 µl DNA übrig bleiben, so wurde mit H<sub>2</sub>O oder mit 5 mM Tris auf 400 µl aufgefüllt) 1/10 des Volumens (40 µl) 3 M Natriumazetat (pH 5,2) und das 2,5fache des Volumens Ethanol 100% p.a. (1000 µl) hinzugefügt und 5 min auf dem Vortex-Gerät gemischt. Die Fällung erfolgte dann bei -20°C über Nacht. Anschließend folgte



15 min die Zentrifugation bei 18.000 rpm und 22°C. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol p.a. gewaschen sowie mindestens 2 min bei 18.000 rpm und 22 °C wieder zentrifugiert. Der wieder entstandene Überstand wurde verworfen und das übrig gebliebene Pellet im Heizblock 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde zum getrockneten Pellet 50 µl RNase free water hinzugefügt und 1 min auf dem Vortex-Gerät gemischt sowie 1 min bei 18.000 rpm zentrifugiert.

### **3.2.6. Herstellung der Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden durch *in vitro* Transkription**

Für die Herstellung der cRNA-Sonden wurde ein „RNA-Labeling-Kit“ verwendet. In einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Ansatz wurden 1 µg „Template“-DNA, 2 µl 10x Puffer, 2 µl der entsprechenden T7-, SP6- oder T3-RNA-Polymerase und 2 µl des NTP-Labeling-Mix, dieser enthielt neben den vier NTPs das Digoxigenin-markierte UTP, zusammenpipettiert. Anschließend folgte die Inkubation des Ansatzes für 2h bei 37°C. Durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA wurde der Reaktionsverlauf gestoppt und die dabei entstandene RNA mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl Ethanol bei -80°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min mit 18.000 rpm wurde das entstandene Pellet mit 50 µl RNase free water gelöst. Die Konzentration der RNA-Sonde wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

### **3.2.7. Alkalische Hydrolyse**

Voraussetzung für eine bessere Penetration in die Schnitte bei der *in situ* Hybridisierung, waren Sonden mit einer Länge unter 0,5kb. Um dieses zu erreichen wurden durch limitierte alkalische Hydrolyse die Schnitte auf eine durchschnittliche Länge von ca. 0,2kb gekürzt (86). Die Ausgangslänge für die Albumin-Sonde betrug 1,6kb und für die GAPDH-Sonde 1,2kb (86).

Hierzu wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Ansatz 10 µl RNA-Sonde mit 50 µl 40 mM NaHCO<sub>3</sub>, 60 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10,2) zusammen pipettiert und bei 60°C für eine bestimmte Zeit inkubiert, die sich nach folgender Formel berechnet (16):

$$\text{Hydrolysezeit in min} = \frac{\text{Ausgangslänge in kb} - \text{Solllänge in kb}}{0,11 \times \text{Ausgangslänge in kb} \times \text{Solllänge in kb}}$$

Die Reaktionen wurde durch Zugabe von 32,2 µl 0,37% HCl gestoppt und nach Zugabe von 300 µl Ethanol über Nacht bei -80°C ausgefällt. Nach Zentrifugation für 15 min mit 18000 rpm wurde das Pellet mit 50 µl 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend wieder zentrifugiert, luftgetrocknet und schließlich in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der Hydrolysate wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

### 3.3. *In situ* Hybridisierung

In Tabelle 10 findet sich eine Übersicht des Standard-Protokolls zum nichtradioaktiven Nachweis von RNAs in perfusionsfixiertem Gewebe mit der alkalischen Phosphatase-Farbreaktion.

#### 3.3.1. Herstellung der Schnittpräparate

Anhand der Patienten-Daten wurden die entsprechenden 50 Blockpräparate für die *in situ* Hybridisierung aus dem Archiv des Institutes für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz heraus gesucht. Aus den, mit einer Kühlplatte vorgekühlten Blockpräparaten wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 2-4 µm dicke Schnittpräparate hergestellt. Diese wurden zur Streckung auf ein ca. 37°C warmes Wasserbad überführt und anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen.

#### 3.3.2. Vorbehandlung der Schnittpräparate

Der erste Schritt mit Inkubation der Objektträger bei 60°C für ca. 15 min diente der bestmöglichen Adhäsion der Schnitte sowie dem vollständigen Herauslösen des Paraffins aus den Schnitten. Darauf folgend wurden die Schnitte in Xylol für 2x 10 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 min in absolutem,

95%igem, 80%igem und 70%igem Ethanol sowie in Aqua dest. für 2x 5 min rehydriert. Schließlich folgte die erste unspezifische Deproteinierung mit 0,1 M HCl für 10 min. Die Schnitte wurden anschließend zweimal für je 5 min in PBS (87,6 g/l NaCl, 22,8 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) gespült.

Verfahren	Substanzen	Zeitangaben
<b>Entparaffinierung</b>	Xylol	2 x 10 min
<b>Rehydrierung</b>	abs. 95%, 80%,70% Ethanol Aqua dest.	je 5 min 2 x 5 min
<b>Deproteinierung</b>	0,1 M HCl PBS Proteinase K (30 µg/ml)	10 min 2 x 5 min 30 min bei 37°C
<b>Postfixierung</b>	Formalin PBS	5 min 2 x 5 min
<b>Azetylierung</b>	Essigsäureanhydrid in TEA PBS	20 min 2 x 5 min
<b>Dehydrierung</b>	70%, 80%, 95% Ethanol Lufttrocknung	je 5 min
<b>Hybridisierung</b>	Prähybridisierungslösung Hybridisierungslösung	2 h bei 45°C über Nacht bei 45°C
<b>Waschschritte</b>	2 x SSC 1 x SSC, 50% Formamid 0,5 x SSC 0,2 x SSC TBS	30 min bei 53°C 1 h bei 53°C 2 x 10 min 10 min 10 min
<b>Blocken für Digoxigenin-Nachweis</b>	Blocking-Puffer	30 min
<b>Digoxigenin-Nachweis</b>	alkalische Phosphatase- markierte anti-Digoxigenin-Fab- Fragmente 1:500 in Blocking- Puffer TBS TNM (pH 9,5)	über Nacht bei 4°C 2 x 15 min 2 min
<b>Farbreaktion</b>	NBT/BCIP/TNM	4-24 h bei 37°C
<b>Waschschritte</b>	Aqua dest.	2 x 10 min
<b>Gegenfärbung</b>	Hämatoxylin Leitungswasser Aqua dest. Eindeckeln mit Glyzeringelatine	20-60 sec 5 min

**Tabelle 10:** Protokoll zum nichtradioaktivem Nachweis von RNAs in perfusionsfixiertem Gewebe mit der alkalischen Phosphatase-Farbreaktion (86).

### **3.3.3. Proteinase K-Andau**

Für den nun folgenden Andau der Schnitte mit Proteinase K wurde eine Konzentration von 30 µl/ml gelöst in PK-Puffer 10x (1 M Tris, 0,5 M EDTA, pH 8,0) gewählt. Durchgeführt wurde der Proteinase K-Andau in einzelnen feuchten Kammern bei 37°C für 30 min. Zum stoppen der Reaktion wurden die Schnitte mit Formalin 5 min nachfixiert und nachfolgend 2x 5 min in PBS gespült.

### **3.3.4. Azetylierung**

Zur Vermeidung möglich entstandener unspezifischer Reaktionen an geladenen funktionellen Gruppen im Gewebe, wurden die Schnitte mit Essigsäureanhydrid azetyliert. 0,5 ml Essigsäureanhydrid (das Volumen, das für die Endkonzentration von 0,25% in einem Gesamtvolumen von 200 ml benötigt wurde) wurden hierfür in eine trockene Küvette gefüllt und frisch angesetzter TEA-Puffer (0,1 M Triethanolamin, pH 8,0) dazu gegeben. In der so initial entstehenden Suspension wurden die Schnitte etwa 1 min bewegt bis entstandene Blasen wieder verschwunden sind und anschließend wurden die Schnitte in der Suspension für 20 min inkubiert. Nachfolgend folgte die Spülung der Schnitte 2x 5 min mit PBS sowie die Rehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 min mit 70%igem, 80%igem sowie 95%igem Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet.

### **3.3.5. Prähybridisierung**

Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden die Schnitte in einzelnen feuchten Kammern für 2 h bei 45°C mit jeweils 100 µl Prähybridisierungslösung pro Schnitt vorinkubiert. Diese Prähybridisierungslösung bestand aus 50 % Formamid, 100 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 40 mM NaCl, 500 µg/ml t-RNA und 5x Denhardt`s-Lösung (50x Denhardt`s Lösung: je 1% Ficoll-400, PVP und BSA in H<sub>2</sub>O).

### **3.3.6. Hybridisierung**

Der für die Hybridisierung verwendete Hybridmix enthielt 5 ng/µl Digoxigenin-markierte cRNA-Sonde, 50% Formamid, 0,33 M NaCl, 20 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 500 ng/µl t-RNA, 100 ng/µl poly-A-RNA, 1x Denhardt`s-Lösung und 10% Dextransulfat. Pro Schnitt wurden 20 µl dieses Hybridmixes aufgetragen. Jeder

Schnitt wurde nachfolgend mit einem silikonisierten Kunststoff-Deckgläschen („Hybrid-Slips“) eingedeckelt und mit Montagekleber („Fixogum“) versiegelt. Die nun folgende Hybridisierung wurde bei 45°C über Nacht durchgeführt.

### **3.3.7. Waschschritte**

Um unspezifisch gebundene Digoxigenin-markierte cRNA-Sonde aus den Schnitten zu spülen, wurden diese in einer Serie von Waschschritten mit absteigender NaCl-Konzentration in einzelnen feuchten Kammern gewaschen. Die für die Waschschritte benötigte Stammlösung 20x SSC enthielt 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,2. Für den ersten Waschschritt wurden die Deckgläschen entfernt und schließlich die Schnitte für 30 min bei 53°C in 2x SSC inkubiert. Als nächstes folgte die Inkubation der Schnitte für 1 h bei 53°C in 1x SSC mit 50% Formamid. Anschließend wurden die Schnitte in Küvetten überführt und jeweils bei Raumtemperatur für 2x 10 min mit 0,5x SSC, für 10 min mit 0,2x SSC und für 10 min mit TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 7,5) gespült.

### **3.3.8. Immunhistochemischer Nachweis der hybridisierten Sonde**

Für den Nachweis der spezifisch hybridisierten Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde wurden konjugierte alkalische Phosphatase Fab-Fragmente gegen Digoxigenin verwendet. Der erste Schritt bestand aus dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit einem Blocking-Puffer. Dieser Blocking-Puffer enthielt 1% „Blocking-Reagenz“, 0,5% BSA und 1x TBS. 100 µl des Blocking-Puffers wurden auf die Schnitte aufgetragen und für 30 min in einzelnen feuchten Kammern inkubiert. Anschließend wurden die alkalische Phosphatase-anti-Digoxigenin Fab-Konjugate in dem Blocking-Puffer in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt, davon wurden jeweils 30 µl auf die Schnitte aufgetragen und in feuchten Kammern bei 4°C über Nacht inkubiert.

### **3.3.9. Farbreaktion der alkalischen Phosphatase mit NBT/BCIP**

Zur Vorbereitung auf die NBT/BCIP-Farbreaktion wurden die Schnitte 2x 15 min mit TBS gespült. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in TNM-Puffer (200 mM Tris, 200 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) auf den für die Farbreaktion nötigen alkalischen pH-Wert eingestellt. Die für die Farbreaktion benötigten Substrate waren

NBT (Nitro Blue Tetrazolium) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat). Der AP-Entwicklungspuffer bestand aus 90 µl NBT, 70 µl BCIP in 20 ml TNM. Hiervon wurde jeweils 1 ml pro Schnitt aufgetragen und die Reaktion in einzelnen feuchten Kammern im Dunkeln bei 37°C zwischen 4-24 Stunden durchgeführt. Die Farbreaktion führte zu einer bräunlich bis blau-schwarzen Färbung der Schnitte. Anschließend wurden die Schnitte für 2x 10 min in Aqua dest. gewaschen, für 20-60 sec mit Hämotoxylin gegengefärbt, für 5 min in Leitungswasser gebläut, wieder in Aqua dest. gewaschen und schließlich mit Glyzeringelatine eingedeckelt.

### **3.4. Auswertung der Schnitte**

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Mikroskop Olympus BX 51. Anschließend wurden ausgewählte Bereiche mit einer Kamera (Kamerasystem ColorView III, Soft Imaging System, Olympus Company, Tokji, Japan) aufgenommen und mit einem Softwaresystem (SoftImaging System Cell F, Olympus Company, Tokyo, Japan) verarbeitet und gespeichert.

#### **3.4.1. Statistische Auswertung**

Die Bearbeitung und Auswertung der Schnitte erfolgte mittels des Betriebssystems Microsoft Windows XP Professional unter Verwendung von Microsoft Excel XP und Microsoft Word XP. Die statistische Auswertung erfolgte durch das Computerprogramm SPSS (Version 11.5) und SigmaPlot (Version 11). Stetige Variablen wurden anhand von Boxplots dargestellt. Die Werteverteilung der kategorialen Variablen veranschaulichten Balkendiagramme. Für die statistische Auswertung kategorialer Variablen wurden Kreuztabellen in Verbindung mit dem exakten Fisher-Test verwendet. Als signifikant wurden p-Werte  $p < 0,05$  definiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Patientenkollektiv

Insgesamt wurden von 50 Patienten histologische Leberpräparate in die Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien waren eine auf dem Boden einer Hepatitis B oder Hepatitis C entstandene Leberzirrhose oder eine äthyltoxisch bedingte Leberzirrhose. Alle Leberpräparate wurden zwischen Februar 2004 und Oktober 2007 in der Klinik für Transplantationschirurgie, Chirurgie von Leber, Gallenwegen, Pankreas der Universitätsmedizin Mainz operativ entnommen. Alle Präparate stammen von Leberexplantaten ab, die im Rahmen einer Lebertransplantation explantiert wurden. Diese Leberexplantate wurden im Institut für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz histologisch aufgearbeitet und befundet sowie im Archiv gelagert. Das Patientenkollektiv bestand aus 9 (18%) weiblichen und 41 (82%) männlichen Patienten im Alter von 40 bis 69 Jahren (Median=53, 25 %-Perzentile=49, 75%-Perzentile=60). Bei 7 (14%) der insgesamt 50 Patienten wurde eine Leberzirrhose auf dem Boden einer Hepatitis B und bei 24 (48%) Patienten eine Hepatitis C diagnostiziert. 19 (38%) Patienten waren an einer äthyltoxisch-bedingten Leberzirrhose erkrankt (Abbildung 2). Im Rahmen der histologischen Befundung wurde bei insgesamt 23 (46%) Patienten ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) diagnostiziert. Die demographischen Daten der Patienten können der Tabelle 11 entnommen werden.

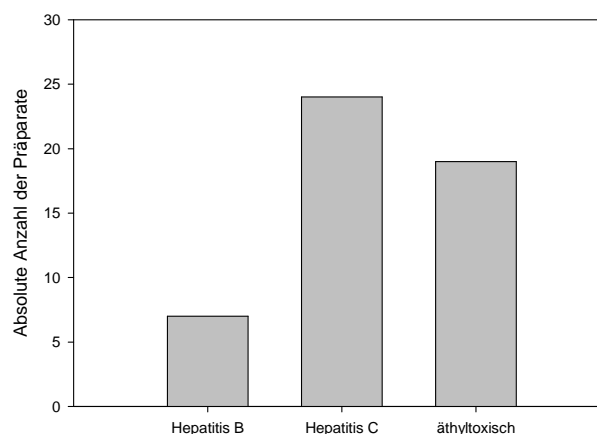


Abbildung 2: Absolute Anzahl der Präparate der unterschiedlichen Ätiologien der Leberzirrhose.

Charakteristika	Anzahl
Patienten	50 (100%)
Weiblich	9 (18%)
Männlich	41 (82%)
Alter, Jahre	
Mittelwert (in Jahren)	47
Standardabweichung (in Jahren)	7,32
Median (in Jahren)	53
25%-Perzentile (in Jahren)	49
75%-Perzentile (in Jahren)	60
Leberzirrhose	
Hepatitis B	7 (14%)
Hepatitis C	24 (48%)
Äthyltoxisch	19 (38%)
Lebertransplantation	50 (100%)
Hepatozelluläres Karzinom	23 (46%)

**Tabelle 11: Demographische Daten.** Angegeben sind die absoluten und zusätzlich in Klammern die relativen Häufigkeiten.

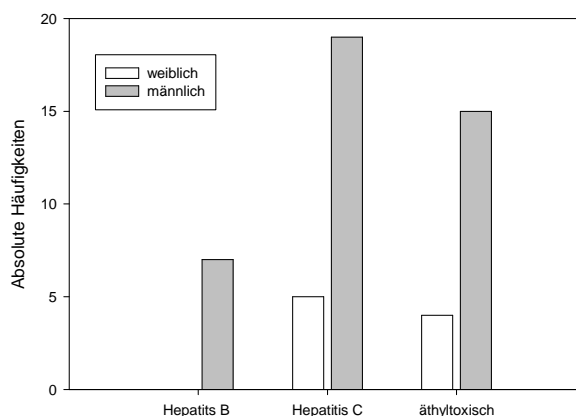
## 4.2. Histologische Befundung der entzündlichen Aktivität

Jedem pathologisch-anatomischen Befundbericht des Instituts für Allgemeine Pathologie zugeordnet zu dem jeweiligem histologischen Leberpräparat wurde die entzündliche Aktivität nach Desmet und Scheuer (Grad 1 – Grad 4) entnommen. Bei allen Präparaten lag eine Leberzirrhose, Stadium 4 nach Desmet und Scheuer, vor. Die Häufigkeiten der entzündlichen Aktivität und des Fibrosestadiums aufgeteilt nach Ursache sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Abbildung 4-6 stellen die Verteilung des Geschlechtes, des Alters und des Vorliegens eines hepatozellulären Karzinoms nach Ursache der Leberzirrhose dar.

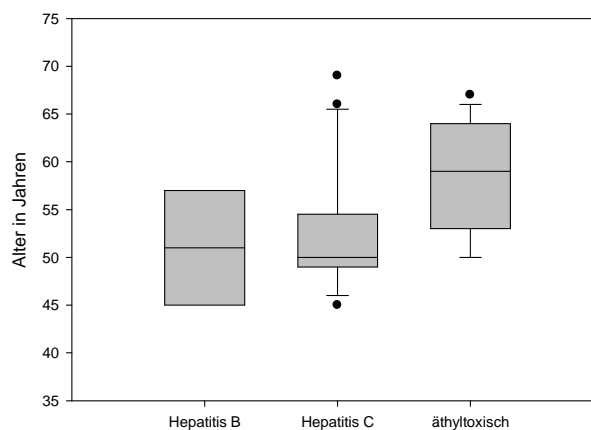


	Hepatitis B	Hepatitis C	Äthyltoxisch
Patienten	7 (100%)	24 (48%)	19 (38%)
Weiblich	0 (0%)	5 (20,83%)	4 (21,05%)
Männlich	7 (100%)	19 (79,17)	15 (78,95%)
Alter			
Mittelwert (in Jahren)	51,86	52,83	58,11
Standardabweichung (in Jahren)	9,37	6,84	6,05
Median (in Jahren)	51	50	59
25%-Perzentile (in Jahren)	45,25	49	53
75%-Perzentile (in Jahren)	56,75	54	63,75
HCC	4 (57,14%)	13 (54,17%)	6 (31,58%)
Aktivitätsstadium (nach Desmet und Scheuer)			
1 minimal	0 (0%)	0 (0%)	3 (15,79%)
2 mild/geringgradig	6 (85,71%)	16 (66,67%)	12 (63,16%)
3 mäßig/mittelgradig	1 (14,29%)	7 (29,17%)	4 (21,05%)
4 schwer/hochgradig	0 (0%)	1 (4,17%)	0 (0%)
Fibrosestadium (nach Desmet und Scheuer)			
0 keine Fibrose	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
1 milde/geringgradige Fibrose	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2 mäßige/mittelgradige Fibrose	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3 schwere/hochgradige Fibrose	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4 Zirrhose	7 (100%)	24 (100%)	19 (100%)

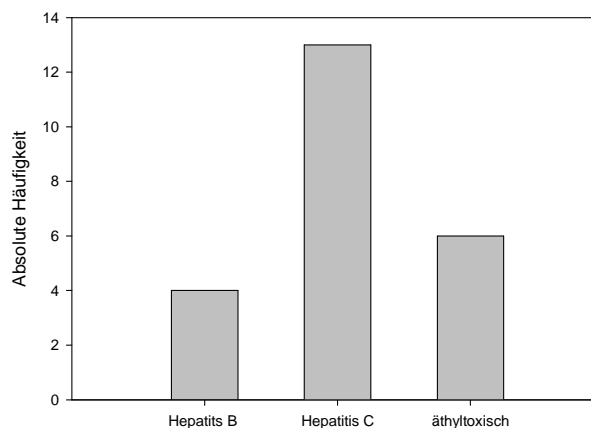
**Tabelle 12: Histologische Befundung und demographische Daten nach Ursache der Leberzirrhose.** Angegeben sind die absoluten und zusätzlich in Klammern die relativen Häufigkeiten.



**Abbildung 4: Geschlechterverteilung innerhalb der jeweiligen Ursache der Leberzirrhose.**



**Abbildung 5: Alter (in Jahren) bei Diagnosestellung der Patienten zugeordnet zu der jeweiligen Ursache der Leberzirrhose.**



**Abbildung 6: Vorliegen eines HCC innerhalb der jeweiligen Ursache der Leberzirrhose.**

### 4.3. Vergleich der demographischen Daten

Ein Vergleich der verschiedenen demographischen Daten (Tabelle 13-15) zeigte hinsichtlich des Geschlechtes ( $p=0,684$ ), des Vorhandenseins eines hepatozellulären Karzinoms ( $p=0,289$ ) sowie hinsichtlich des Aktivitätsstadiums ( $p=0,414$ ) kein signifikantes Ergebnis zwischen den 3 Ursachen der Leberzirrhose im exakten Fisher-Test.

		Ursache der Leberzirrhose			Gesamt
		Hepatitis B	Hepatitis C	äthyltoxisch	
Geschlecht	männlich	7	19	15	41
	weiblich	0	5	4	9
Gesamt		7	24	19	50

**Tabelle 13:** Kreuztabelle für die Variablen Geschlecht und Ursache der Leberzirrhose.

		Ursache der Leberzirrhose			Gesamt
		Hepatitis B	Hepatitis C	äthyltoxisch	
HCC	nein	3	11	13	27
	ja	4	13	6	23
Gesamt		7	24	19	50

**Tabelle 14:** Kreuztabelle für die Variablen HCC und Ursache der Leberzirrhose.

		Ursache der Leberzirrhose			Gesamt
		Hepatitis B	Hepatitis C	äthyltoxisch	
Aktivitätsstadium	minimal	0	0	3	3
	mild/geringgradig	6	16	12	34
	mäßig/mittelgradig	1	7	4	12
	schwer/hochgradig	0	1	0	1
Gesamt		7	24	19	50

**Tabelle 15:** Kreuztabelle für die Variablen Aktivitätsstadium und Ursache der Leberzirrhose.

#### 4.4. Histologische Befundung der Paraffinschnitte zum Nachweis der Albumin-mRNA in Gallengangsproliferaten bei Leberzirrhose mittels *in situ* Hybridisierung

Albumin zeigt in der gesunden Leber unter physiologischen Bedingungen, wie bereits in der Literaturdiskussion beschrieben, eine starke Expression in den Hepatozyten mit einem deutlichen Gradienten innerhalb des Leberläppchens mit stärkerer Expression in periportalen Bereich als in perizentralen Bereich (70, 84, 100). Zudem wird Albumin unter physiologischen Bedingungen nicht von Endothelzellen, Gallengangsepithel oder Kupffer-Zellen (70, 84) exprimiert. Als zusätzliche Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet, da es im Vergleich zu Albumin einen

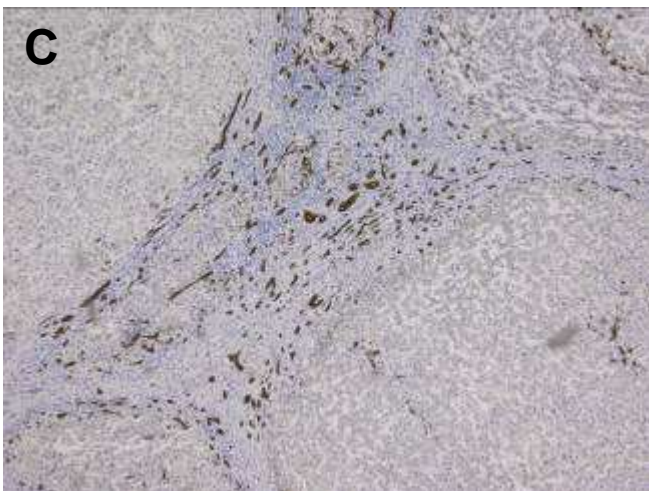
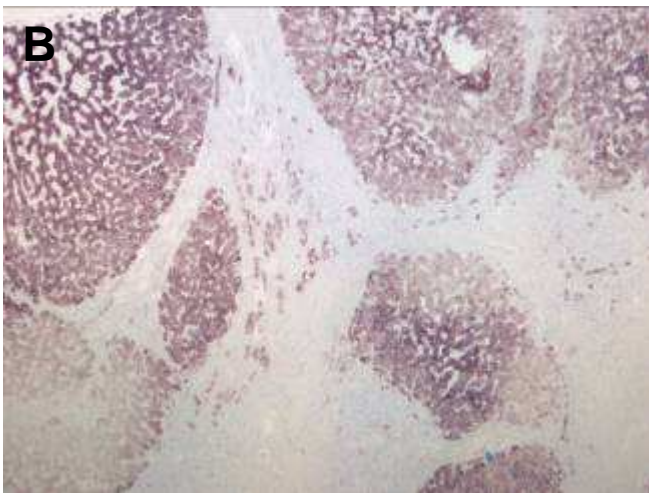
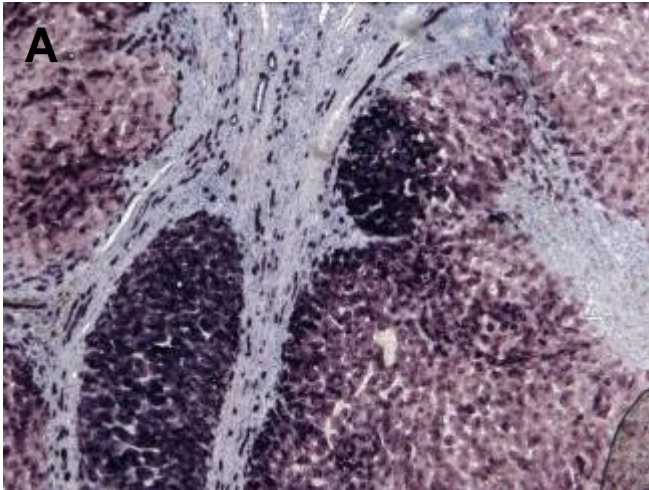
umgekehrten Gradienten mit einer stärkeren Expression in perizentralen Abschnitten des Leberläppchens, aufweist.

Die ersten Fragestellungen dieser Arbeit befasst sich damit, ob es möglich ist, mittels der *in situ* Hybridisierung die Gallengangsproliferation und die Expression von Albumin in den Gallengangsproliferaten und damit in den hepatischen Progenitorzellen nachzuweisen.

Die Leberzirrhose wird definiert durch die Ausbildung von Nekrosen im Leberparenchym, Entstehung der Fibrogenese und Bildung von nodulären Regeneratknoten in der Leber (41). Hierdurch bedingt wird die ursprüngliche gleichmäßige Leberarchitektur aufgehoben und durch eine andere Struktur, bestehend aus Regeneratknoten und breiten Bindegewebssepten ersetzt (4, 41). Abbildung 7 zeigt histologische Schnitte von zirrhotischen Leberpräparaten, die zum einen Bindegewebssepten als Ausdruck der Leberzirrhose und zum anderen Gallengangsproliferate in den Bindegewebssepten als Ausdruck der Leberregeneration aufweisen.

Mikroskopisch zeigte sich in nahe zu allen Präparaten eine Gallengangsproliferation innerhalb der bindegewebigen Septen. Wie bereits verschiedene andere Untersuchungen zeigen konnten, dass mittels Immunhistochemie die Zellen der Gallengangsproliferate positiv für CK7 (19, 49, 79) sind, ist es uns nun gelungen, eine Albumin-Expression dieser Zellen mittels *in situ* Hybridisierung nachzuweisen. Einen Vergleich zwischen einer *in situ* Hybridisierung zum Albumin-mRNA-Nachweis und als Gegenkontrolle eine *in situ* Hybridisierung mit GAPDH durchgeführt sowie ebenfalls als Beispiel für einen positiven Nachweis eine Immunhistochemie mit CK7 zeigt Abbildung 7.

Jedes Präparat wurde hinsichtlich einer Gallengangsproliferation und einer Albuminexpression in den Gallengangsproliferaten untersucht.

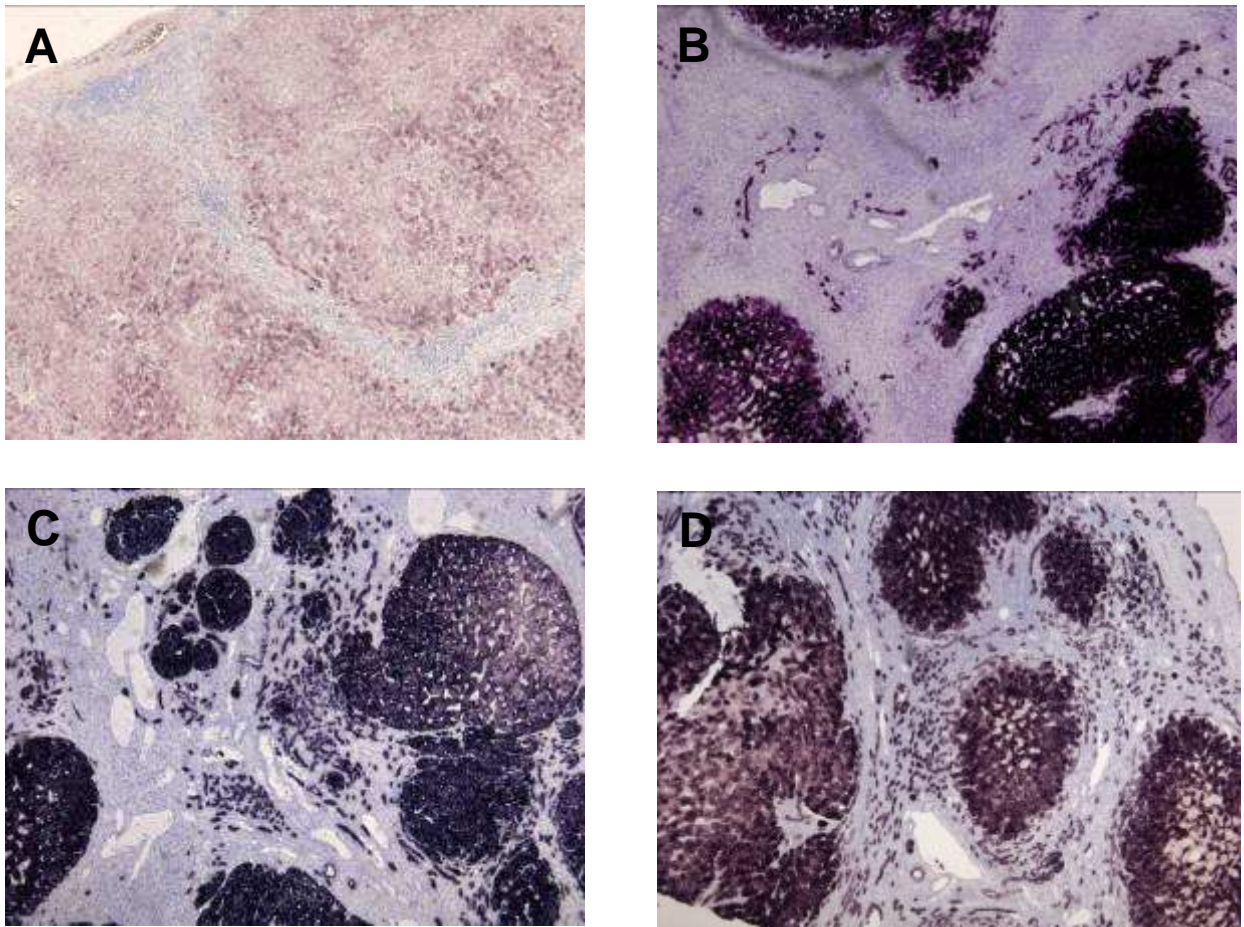


**Abbildung 7:** **A - B** In situ Hybridisierung durchgeführt an Paraffinschnitten von leberzirrhosischen Präparaten. Innerhalb der bindegewebigen Septen lassen sich Gallengangsproliferate finden. **A** Die Gallengangsproliferate lassen sich mittels Albumin-ISH anfärben. **B** Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Positivkontrolle. **C** Die Gallengangsproliferate in den bindegewebigen Septen sind ebenfalls positiv für CK7 (Immunhistochemie).

#### **4.5. Gallengangsproliferation in zirrhotischem Leberparenchym**

Histologisch erkennt man in dem zirrhotisch umgebauten Leberparenchym in 96 % (48/50) aller Präparate eine Gallengangsproliferation. Die Untergliederung hinsichtlich der Ursache zeigt, dass die Hepatitis B-bedingte Leberzirrhose in 85,7 % (6/7), die Hepatitis C-bedingte Leberzirrhose in 100 % (24/24) und die äthyltoxisch verursachte Leberzirrhose in 94,7 % (18/19) Gallengangsproliferate aufweisen. Jedes Präparat wurde hinsichtlich einer Gallengangsproliferation und einer Albuminexpression in den Gallengangsproliferaten untersucht.

Bei Vorliegen einer Gallengangsproliferation wurde deren Ausprägung in 4 Grade (0=keine, 1=wenig, 2=mäßig und 3=stark) eingeteilt (Abbildung 8). Die Tabelle 16 und Abbildung 8 zeigen die Verteilung der Gallengangsproliferation innerhalb der 3 Gruppen.



**Abbildung 8: Ausmaß der Gallengangsproliferation bei Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie.**

**A** Innerhalb der bindegewebigen Septen ist keine Gallengangsproliferation erkennbar. **B** Es zeigen sich wenige Gallengangsproliferate. **C** Die Gallengangsproliferation ist mäßig ausgeprägt oder **D** Die Gallengangsproliferation ist stark ausgeprägt.

Gallengangsproliferation		Hepatitis B	Hepatitis C	Äthyltoxisch
0	keine	1 (14,29%)	0 (0%)	1 (5,26%)
1	wenig	4 (57,14%)	9 (37,5%)	5 (26,32%)
2	mäßig	1 (14,29%)	8 (33,33%)	10 (52,63%)
3	stark	1 (14,29%)	7 (29,17%)	3 (15,79%)

**Tabelle 16:** Gradeinteilung der Gallengangsproliferation der unterschiedlichen Ätiologien zirrhotischer Lebererkrankungen. Angegeben sind die absoluten und zusätzlich in Klammern die relativen Häufigkeiten.

		Ursache der Leberzirrhose			Gesamt
		Hepatitis B	Hepatitis C	äthyltoxisch	
Gallengangsproliferation	keine	1	0	1	2
	wenig	4	9	5	18
	mäßig	1	8	10	19
	stark	1	7	3	11
Gesamt		7	24	19	50

**Tabelle 17:** Kreuztabelle für die Variablen Gallengangsproliferation und Ursache der Leberzirrhose.

Ein möglicher signifikanter Unterschied, ob der Grad einer Gallengangsproliferation auf eine bestimmte Ursache der Leberzirrhose zurück zuführen ist, ließ sich mit einem p-Wert von 0,247 (exakter Fisher-Test) nicht eruieren (Tabelle 17).

#### 4.6. Albuminexpression in Gallengangsproliferaten in zirrhotischem Leberparenchym

Die untersuchten Präparate wurden nach Bestimmung einer Gallengangsproliferation, danach beurteilt, ob Albumin-mRNA in diesen Gallengangsproliferaten exprimiert wurde.

Insgesamt zeigten 74 % (37/50) der untersuchten Präparate eine Albuminexpression. Die Unterteilung ergab bei 71,4 % (5/7) der Hepatitis B Präparate, 83,3 % (20/24) der Hepatitis C Präparate und 63,2 % (12/19) der äthyltoxisch verursachenden Leberzirrhose eine positive Albuminexpression.



Die Albuminexpression wurde ebenfalls in Grade eingeteilt. Dabei wurde zwischen keiner (Grad 0), einer intermediären (Grad 1) und einer starken (Grad 2) Albuminexpression unterschieden (Abbildung 9 und Tabelle 18).

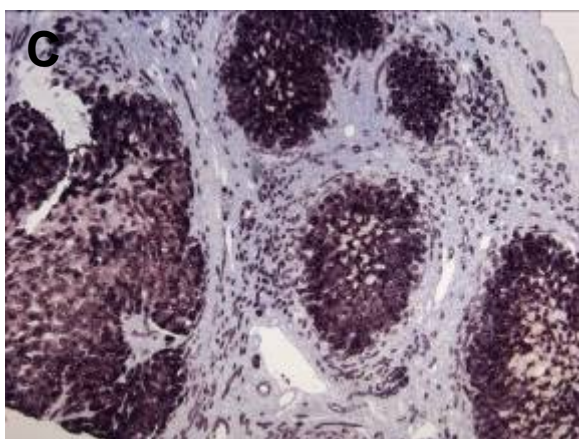
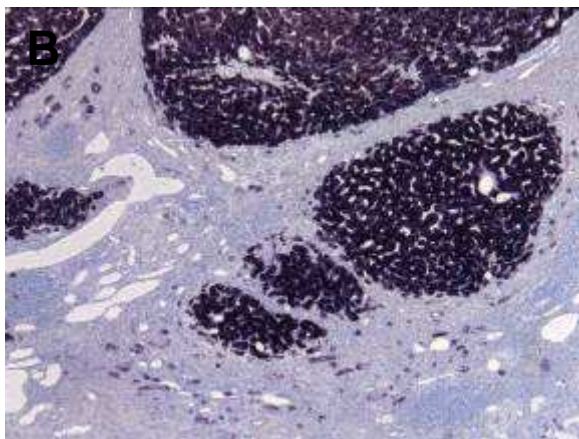
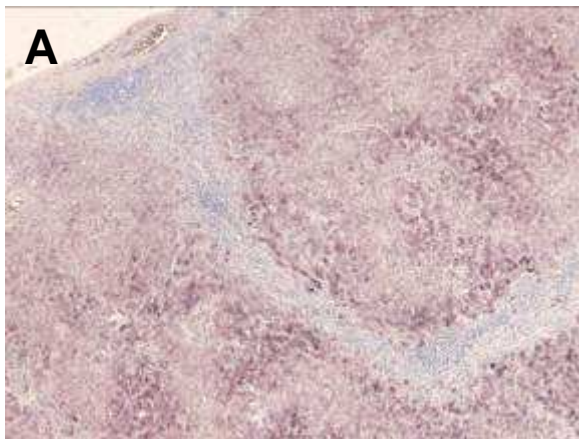
Hier waren mit einem p-Wert von 0,586 (exakter Fisher-Test) keine signifikanten Ergebnisse zwischen der Gradeinteilung der Albuminexpression und den 3 Gruppen zu erkennen (Tabelle 19).

Albuminexpression		Hepatitis B	Hepatitis C	Äthyltoxisch
0	keine	2 (28,57%)	4 (16,67%)	7 (36,84%)
1	intermediär	4 (57,14%)	12 (50%)	7 (36,84%)
2	stark	1 (14,29%)	8 (33,33%)	5 (26,32%)

**Tabelle 18:** Gradeinteilung der Albuminexpression der unterschiedlichen Ätiologien zirrhotischer Lebererkrankungen. Angegeben sind die absoluten und zusätzlich in Klammern die relativen Häufigkeiten.

		Ursache der Leberzirrhose			Gesamt
		Hepatitis B	Hepatitis C	äthyltoxisch	
Albuminexpression	kein	2	4	7	13
	intermediär	4	12	7	23
	stark	1	8	5	14
Gesamt		7	24	19	50

**Tabelle 19:** Kreuztabelle für die Variablen Albuminexpression und Ursache der Leberzirrhose.



**Abbildung 9: Grad der Albuminexpression in zirrhotischen Leberpräparaten unterschiedlicher Ätiologien. A** Hier zeigt sich keine Albuminexpression in einer Hepatitis B-Leberzirrhose. **B** Eine intermediäre Albuminexpression in den Gallengangsproliferaten, in einer Leberzirrhose durch Hepatitis C verursacht, lässt sich darstellen. **C** Eine äthyltoxische-Leberzirrhose mit einer starken Albuminexpression in den Gallengangsproliferaten.

## 4.7. Hepatozelluläres Karzinom

Ein hepatozelluläres Karzinom wurde bei 23 der 50 (46%) untersuchten Präparate im Rahmen der histologischen Untersuchung diagnostiziert. Tabellen 20 und 22 bilden die Gradeinteilung der Gallengangsproliferation (Tabelle 20) und die Gradeinteilung der Albuminexpression (Tabelle 22) bei Präparaten mit und ohne das Vorliegen eines HCC ab. Zwischen den Präparaten mit einem HCC und ohne HCC ergaben sich hinsichtlich des Grades der Gallengangsproliferation mit einem p-Wert von 0,803 im exakten Fisher-Test keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 21). Auch in Bezug auf die Gradeinteilung der Albuminexpression zeigte sich mit einem p-Wert von 0,275 (exakter Fisher-Test) kein signifikanter Unterschied zwischen den 2 Gruppen (Tabelle 23).

Gallengangsproliferation		Präparate ohne HCC	Präparate mit HCC
0	Keine	1 (3,79%)	1 (4,35%)
1	Wenig	10 (37,04%)	8 (34,78%)
2	Mäßig	12 (44,44%)	7 (30,43%)
3	stark	4 (14,81%)	7 (30,43%)

**Tabelle 20:** Gradeinteilung der Gallengangsproliferation bei Präparaten ohne und mit einem HCC. Angegeben sind die absoluten und zusätzlich in Klammern die relativen Häufigkeiten.

		HCC		Gesamt
		ja	nein	
Gallengangsproliferation	keine	1	1	2
	wenig	9	9	18
	mäßig	12	7	19
	stark	5	6	11
Gesamt		27	23	50

**Tabelle 21:** Kreuztabelle für die Variablen Gallengangsproliferation und Vorliegen eines HCC.

Albuminexpression		Präparate ohne HCC	Präparate mit HCC
0	keine	4 (14,81%)	9 (39,13%)
1	intermediär	13 (48,15%)	10 (43,48%)
2	stark	10 (37,04%)	4 (17,39%)

**Tabelle 22:** Gradeinteilung der Albuminexpression bei Präparaten ohne und mit HCC. Angegeben sind die absoluten und zusätzlich in Klammern die relativen Häufigkeiten.

		HCC		Gesamt
		ja	nein	
Albuminexpression	keine	8	5	13
	intermediär	14	9	23
	stark	5	9	14
Gesamt		27	23	50

Tabelle 23: Kreuztabelle für die Variablen Albuminexpression und Vorliegen eines HCC.

#### 4.8. Alter

Das untersuchte Patientenkollektiv war zwischen 40 und 69 Jahre (Tabelle 11) alt. Zur Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen jungen und alten Patienten wurden 2 Gruppen gebildet. Die erste Gruppe (insgesamt 36 Patienten) beinhaltete Patienten, die jünger als 60 Jahre alt waren. Die zweite Gruppe (insgesamt 14 Patienten) wurde von Patienten gebildet, die älter als 60 Jahre alt waren. Zwischen beiden Gruppen zeigten sich mit einem p-Wert von 0,709 (exakter Fisher-Test) keine signifikanten Ergebnisse hinsichtlich des Grades der Gallengangsproliferation bei Patienten jünger und älter als 60 Jahre (Tabelle 24). Ebenfalls zeigte sich mit einem p-Wert von 0,613 (exakter Fisher-Test) kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten jünger und älter als 60 Jahren hinsichtlich der Gradeinteilung der Albuminexpression. (Tabelle 25).

		Alter		Gesamt
		<60 Jahre	≥60 Jahre	
Gallengangsproliferation	keine	1	1	2
	wenig	12	6	18
	mäßig	15	4	19
	stark	8	3	11
Gesamt		36	14	50

Tabelle 24: Kreuztabelle für die Variablen Gallengangsproliferation und Alter (<60 Jahre / ≥ 60 Jahre).

		Alter		Gesamt
		<60 Jahre	≥60 Jahre	
Albuminexpression	keine	8	5	13
	intermediär	17	6	23
	stark	11	3	14
Gesamt		36	14	50

Tabelle 25: Kreuztabelle für die Variablen Albuminexpression und Alter (<60 Jahre / ≥ 60 Jahre).

## 5. Diskussion

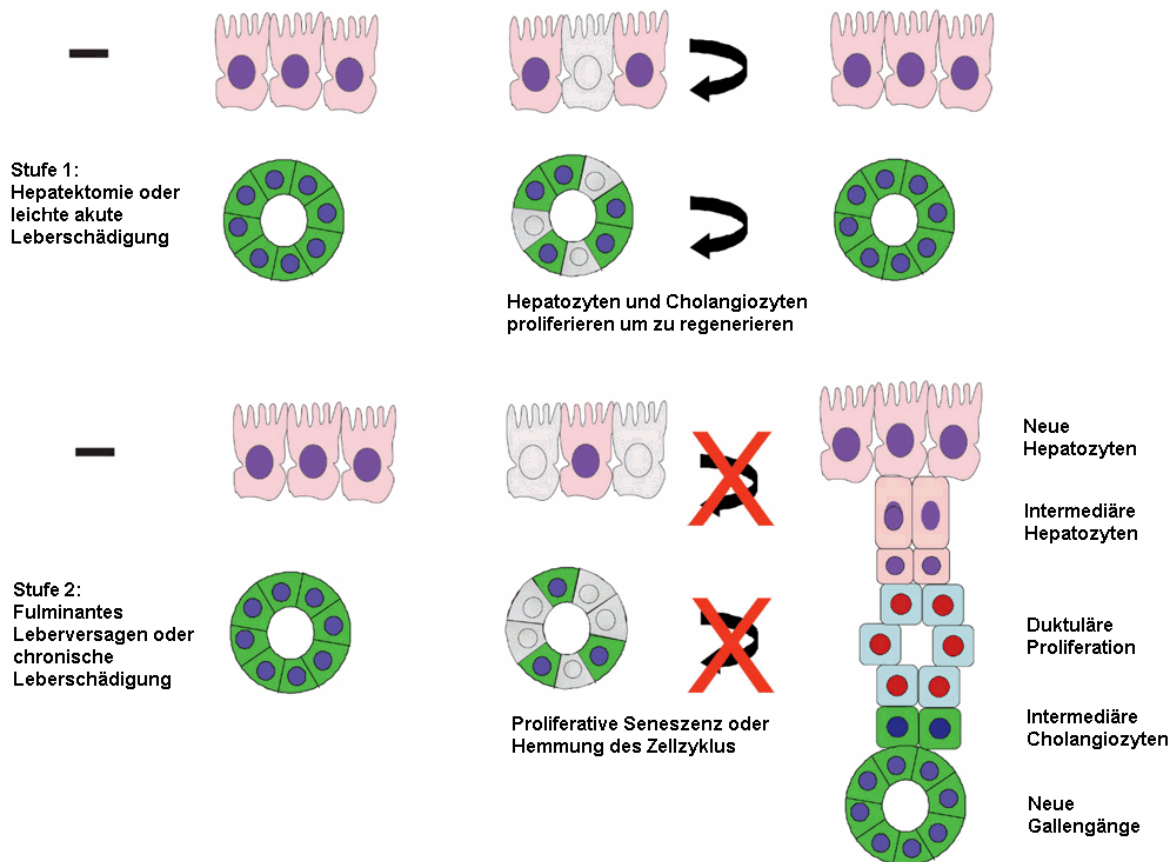
### 5.1. Aktivierung hepatischer Progenitorzellen

Hepatische Progenitorzellen sind kleine epitheliale Zellen mit einem ovalen Kern, schmalem Zytoplasma und einer Lokalisation in den Hering-Kanälchen. Sie stellen somit das humane Equivalent zu den oval cells bei Nagetieren dar (79). In humaner Leberschädigung konnten die hepatischen Progenitorzellen in den duktilären Reaktionen identifiziert werden (71, 72).

Unter duktilärer Reaktion, auch als duktiläre Proliferation bezeichnet, wird die steigende Anzahl von Gallengängen und zwar den feinsten Verästelungen des Gallenwegssystems verstanden (76).

Die Aktivierung hepatischer Progenitorzellen im Rahmen chronischer Leberschädigung oder fulminatem Leberversagens bezeichnet die steigende Anzahl von Progenitorzellen und ihre Differenzierung (73) zur hepatozellulären oder biliären Zelllinie (siehe Abbildung 10).

In der menschlichen Leber äußert sich die Differenzierung der hepatischen Progenitorzellen zur biliären Linie in einer Bildung von reaktiven Gallengangszellen, während die Differenzierung zur hepatozellulären Linie in intermediären Hepatozyten in Erscheinung tritt. Reaktive Gallengangszellen bestehen aus anastomosierenden Strängen unreifer biliärer Zellen mit einem ovalen Zellkern und einem schmalen Zytoplasmasaum (79).



**Abbildung 10 Leberregeneration.** Durch Gewebeverlust wie im Rahmen einer Hepatektomie oder leichter akuter Leberschädigung erfolgt die Leberregeneration durch Hyperplasie der Hepatozyten und Cholangiozyten. Bei chronischer Leberschädigung oder fulminantem Leberversagen erfolgt die Leberregeneration ausgehend von duktulären Proliferation über intermediäre Zwischenstufen in neue Hepatozyten und Cholangiozyten (modifiziert nach Riehle, 2011 (73)).

Wie Libbrecht et al. (52) zeigen konnten, kann die Aktivierung der Progenitorzellen in Form von kleinen einzelnen Zellen in der periportalen Region oder als reaktive duktuläre Strukturen in den portal-parenchymalen Übergangsstellen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte diese Arbeitsgruppe (52) eine Korrelation zwischen der Schwere der Interface-Hepatitis und dem Grad der duktulären Reaktion in den portal-parenchymalen Übergangsstellen beweisen. Hieraus schließen die Autoren der Studie, dass dieser Zusammenhang daraufhin deuten kann, dass die Entzündungsreaktion ein Trigger für die duktuläre Reaktion darstellt. Darüber hinaus wird von den Autoren geäußert, dass die Schwere und Lokalisation der entzündlichen Infiltrate die Aktivierung und Lokalisation der Progenitorzellen

beeinflussen und dies die Vermutung nahe legt, dass die entzündlichen Infiltrate ein oder mehrere Zytokine produzieren, die als Wachstums- oder chemotaktische Faktoren auf die Progenitorzellen wirken. He et al. (33) konnten schließlich *in vitro* nachweisen, dass hepatische Progenitorzellen durch Einfluss von epidermal growth factor (EGF) und hepatocyte growth factor (HGF) in reife Hepatozyten differenzieren.

## 5.2. Nachweis hepatischer Progenitorzellen

Die hepatischen Progenitorzellen zeigen neben einer Expression von hepatischen Markern wie HepPar1, Albumin und AFP und Gallengangsmarkern wie CK-7, CK-19 und OV-6 ebenfalls eine Expression von NCAM-1/CD56 (50, 76, 77, 78).

Durch Immunhistochemische Untersuchungen und HE-Färbungen konnten bereits durch Marker wie CK7, CK8, CK18, CK19, chrom A, OV-6 und HepPar1 intermediate hepatische Progenitorzellen und die duktiläre Reaktion identifiziert werden (52, 77, 80, 107). Libbrecht et al. (50) haben als erste immunhistochemisch die Expression von *neural cell adhesion molecule* (NCAM) in den duktilären Reaktionen nachweisen können.

Xiao et al. (108) konnten in einer Untersuchung an humanen HBV-positiven Leberzirrhose-Präparaten zeigen, dass kleine epitheliale Zellen der proliferierenden Gallengänge („small epithelial cells“=SEC), ähnlich den oval cells bei Nagetieren, in immunhistochemischen Färbungen sowohl für CK7 ebenso, wenn auch in geringerem Maße, positiv für Albumin sind. Die Anzahl der SEC war allerdings höher in Fällen mit einer duktilären Proliferation. Es bestand kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl der SEC bei Vorliegen eines HCC oder bei Präparaten ohne HCC.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mittels der *in situ* Hybridisierung ein Nachweis der Gallengangsproliferation in leberzirrotischen Präparaten unterschiedlicher Ätiologien gelingt. Zudem kann diese Arbeit beweisen, dass die Gallengangsproliferate Albumin exprimieren und dass dieser Nachweis der Albuminexpression mittels der *in situ* Hybridisierung möglich ist.

Hepatische Progenitorzellen konnten bereits in fortgeschrittenen Stadien vieler Lebererkrankungen beim Menschen nachgewiesen werden, nämlich dann wenn Hepatozyten aufgrund der Seneszenz oder einer Inhibition nicht in der Lage zur



Proliferation sind. Zu diesen Lebererkrankungen zählen die ethyltoxisch-bedingte Zirrhose und auch die chronische virale Hepatitis (53, 55, 74, 107).

So konnte z.B. in einer Studie an 38 Hepatitis-B-zirrhosischen und 32 Hepatitis-C-zirrhosischen Fällen anhand von Lichtmikroskopie und Immunhistochemie die Rolle der oval cells untersucht werden (95). Diese Studie zeigte, dass oval cells sowohl in Hepatitis-B-assoziiierter als auch in Hepatitis-C-assoziiierter Leberzirrhose nachgewiesen werden können und dass die Anzahl der oval cells sich zwischen beiden Gruppen nicht unterscheidet. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Lowes et al. (55) überein, die oval cells in ethyltoxisch-bedingten und durch Hepatitis-C-verursachten Lebererkrankungen identifiziert haben, nicht aber in normalem Lebergewebe.

### **5.3. Zusammenhang mit dem Grad des Fibrosestadiums**

Das Stadium der Lebererkrankung wird durch die Ausprägung der Fibrose bzw. durch das Vorliegen einer Leberzirrhose im Endstadium bestimmt. Ebenso wie der Grad der Aktivität der hepatischen Progenitorzellen mit dem Grad der entzündlichen Aktivität zusammenhängt, konnten einigen Studien eine Assoziation mit steigender Aktivität der hepatischen Progenitorzellen mit dem steigenden Grad der Fibrose nachweisen. Delladetsima et al. konnten anhand immunhistochemischer Untersuchungen an 50 HCV-Leberbiopsien eine signifikante Assoziation zwischen steigender Anzahl der hepatischen Progenitorzellen und zunehmender Schwere der Fibrose bzw. Leberzirrhose nachweisen (19, 81). Da die in dieser Arbeit untersuchten Leberpräparate alle eine Leberzirrhose, also das Stadium 4 der Fibrose, zeigten, ist eine Beurteilung hierzu aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

### **5.4. Zusammenhang mit dem Grad der entzündlichen Aktivität**

Der Nachweis der Aktivierung von hepatischen Progenitorzellen im Rahmen von Lebererkrankungen führt zur der Frage, ob das Ausmaß der Aktivierung mit dem Grad der entzündlichen Aktivität zusammenhängt. Libbrecht et al. (52) untersuchten diese Fragestellung an 50 Leberbiopsien mit chronischer Hepatitis B und/oder C. Sie

konnten nachweisen, dass die Anzahl der hepatischen Progenitorzellen signifikant mit der Schwere der entzündlichen Aktivität ansteigt. Zudem fanden sich in dieser Untersuchung die hepatischen Progenitorzellen stets verstreut in den Läppchen (zentrolobular, mid-zonal, periportal), vor allem aber hauptsächlich in räumlicher Assoziation zum Entzündungsfokus. Dieses konnten ein Jahr zuvor Lowes et al. (55) ebenfalls nachweisen. Sie zeigten, dass die Anzahl der oval cells signifikant mit der Progression der Schwere der Lebererkrankung sowohl bei Hepatitis C als auch bei äthyltoxischer Ursache ansteigt. Diese Arbeit konnte beweisen, dass der Nachweis einer Albuminexpression mittels *in situ* Hybridisierung in zirrhotischen Leberpräparaten bedingt durch Hepatitis B, Hepatitis C und äthyltoxischer Hepatitis verwendet werden kann. Die Korrelation einer Gallengangsproliferation und Albuminexpression mittels der *in situ* Hybridisierung mit dem Grad der entzündlichen Aktivität war nicht die zu Beginn der Arbeit eine der zu bearbeitenden Fragestellungen. Aufgrund vor allem der im Stadium 1 und 4 der entzündlichen Aktivität zu wenig vorliegenden Präparate konnte diese Annahme bei der Auswertung der Daten nicht verwendet werden. Allerdings stellt sich für weitere mögliche Untersuchungen aus dieser vorliegenden Arbeit die Frage, ob ebenfalls mittels der *in situ* Hybridisierung, wie die immunhistochemischen Untersuchungen (52, 55) zeigen, eine signifikant erhöhte Gallengangsproliferation und Albuminexpression mit steigender entzündlicher Aktivität bei leberzirrhotischen Präparaten unterschiedlicher Ätiologien besteht.

### **5.5. Vermehrte Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen abhängig vom Alter?**

In Tierversuchen wurden verschiedene Faktoren beschrieben, die Einfluss auf die Leberregeneration nehmen. Dabei scheint auch das Alter des Tieres eine Rolle zu spielen. Studien durchgeführt von Bucher et al (11, 12) zeigten, dass in jungen Ratten die DNA-Synthese keinen Anstieg aufweist, allerdings steigt bei 6-8 Wochen alten Ratten die DNA-Synthese linear zum Ausmaß der Leberresektion an. Bei alten Tieren zeigte sich der maximale DNA-Anstieg erst 7 Tage später. Die Albumin-Synthese, ebenfalls in Tierversuchen an Ratten durchgeführt, steigt bei älteren Tieren nach Resektion später als bei den Jüngeren an (63).

Schmucker et al. konnte aufweisen, dass die Leberregeneration in alten Tieren und älteren Menschen beeinträchtigt ist. Grund hierfür ist vor allem eine Reduktion des Leberegenerationsgrades als die regenerative Kapazität (90). Im Gegensatz hierzu beschrieben Delladetsima et al., dass die Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen in Leberbiopsien mit Nachweis einer chronischer Hepatitis C mit steigendem Alter der Patienten (>40 Jahre) assoziiert ist (19).

Das in dieser Studie untersuchte Patientenkollektiv wurde in 2 Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe beinhaltete Patienten, die jünger als 60 Jahre alt waren, die zweite Gruppe wurde von Patienten, die älter als 60 Jahre alt waren gebildet. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Gallengangsproliferation oder der Albuminexpression. In dieser Arbeit war der jüngste Patient 40 Jahre alt und die Einteilung der Altersgruppen daher different zwischen dieser und der Arbeit von Delladetsima et al (19).

## **5.6. Rolle der hepatischen Progenitorzellen im Rahmen der Hepatokarzinogenese**

Die Aktivierung hepatischer Progenitorzellen unter hepatokarzinogenen Bedingungen wie sie bei chronisch viralen Hepatitiden oder äthyloxisch-bedingter Lebererkrankung vorliegen, konnte bereits veranschaulicht werden (52, 55, 81). Daher wird angenommen, dass die hepatischen Progenitorzellen eine Zielpopulation für Karzinogene (52, 75) darstellen. Allerdings stellt dies nur eine theoretische Hypothese dar, experimentelle Daten hierzu liegen noch nicht vor (52, 75). Bekräftigt wird diese Hypothese jedoch durch den Nachweis der Expression einiger hepatischer Progenitorzell-Marker wie CK7 oder CK19 in hepatozellulären Karzinomen (102). Ein weiterer Indikator für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms aus hepatischen Progenitorzellen ist die Beobachtung, die durch experimentelle Studien an Tiermodellen durchgeführt worden sind und zeigen konnten, dass hepatische Progenitorzellen an der Hepatokarzinogenese beteiligt sind (9, 22). Allerdings sollte diese Ableitung mit Vorsicht betrachtet werden. Dumble et al (22) isolierten aus Mäusen p53 Null transformierte oval cells und transplantierten diese in athymische Mäuse, die daraufhin ein hepatozellulären

Karzinom entwickelten. Wird dagegen bei Nagetieren wie im Rahmen einer experimentellen Studie mittels *CDE diet* die Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen inhibiert, so ist dies mit einer Reduktion der Inzidenz kanzerogener Läsionen assoziiert (40).

Im Rahmen der chronischen Entzündung der Leber bei Menschen mit Leberzellschädigung und folgender Regeneration, die sich in der Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen äußert, entstehen erste Läsionen, die als Foci kleiner Zelldysplasien oder geringgradige dysplastische Knötchen beschrieben werden (51). Alison et al. (1) vermuten daher, dass weitere Mutationen und klonale Expansion letztendlich zum hepatozellulären Karzinom führen.

Wenn vermutet wird, dass hepatische Progenitorzellen durch Mutationen Vorläuferzellen von kanzerogenen Läsionen beim Menschen darstellen, wie von einigen Autoren vermutet (1, 40), so wäre hypothetisch in Präparaten mit dem Nachweis eines hepatozellulären Karzinoms die Aktivierung von hepatischen Progenitorzellen vermutlich stärker als in Präparaten ohne den Nachweis eines hepatozellulären Karzinoms. Bei insgesamt 23 der untersuchten 50 Leberpräparate in dieser Arbeit war ein hepatozelluläres Karzinom diagnostiziert worden. Dabei zeigte sich hinsichtlich der Gallengangsproliferation kein signifikanter Unterschied zwischen dem Vorliegen oder der Absenz eines hepatozellulären Karzinoms. Allerdings konnte bei Präparaten mit Absenz eines hepatozellulären Karzinoms ebenfalls keine signifikant stärkere Albuminexpression nachgewiesen werden als bei Präparaten mit Nachweis eines hepatozellulären Karzinoms. Diese Ergebnisse schließen anders als vermutet auf keine erhöhte Aktivierung von hepatischen Progenitorzellen bei Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms. Eine andere mögliche Hypothese wäre, dass hepatische Progenitorzellen in Präparaten mit Nachweis eines hepatozellulärem Karzinoms wieder minder aktiviert sind, weil sich bereits aus ihnen ein hepatozelluläres Karzinom entwickelt hat.

## 5.7. Abschließende Bewertung

Die zu untersuchende Fragestellung dieser Arbeit galt dem Nachweis eines möglichen Unterschiedes zwischen zirrhotischen Lebererkrankungen, hervorgerufen durch Hepatitis B, Hepatitis C und durch äthyltoxische Schädigung hinsichtlich der

---

Albumin-mRNA-Expression in Gallengangsproliferaten, als Ausdruck hepatischer Differenzierung im Rahmen der Leberregeneration, und mit einem möglichen Zusammenhang mit der Entstehung eines HCCs.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mittels der *in situ* Hybridisierung ein Nachweis der Gallengangsproliferation in leberzirrhotischen Präparaten unterschiedlicher Ätiologien möglich ist. Zudem kann diese Arbeit beweisen, dass die Gallengangsproliferate Albumin-mRNA exprimieren und dass dieser Nachweis der Albuminexpression ebenfalls mittels der *in situ* Hybridisierung möglich ist.

Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der Albumin-mRNA-Expression in Gallengangsproliferaten in zirrhatischen Lebererkrankungen der unterschiedlichen Ätiologien nachgewiesen werden. Damit kann ein Zusammenhang zwischen einer unterschiedlichen Albumin-mRNA-Expression in Gallengangsproliferaten der unterschiedlichen zirrhatischen Lebererkrankungen und dem Risiko für die Entstehung eines HCC in dieser Arbeit abschließend nicht gezeigt werden.

Es konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den 2 Altersgruppen (Patienten <60 Jahre und Patienten ≥60 Jahre) und der Gallengangsproliferation sowie der Albuminexpression gezeigt werden. Delladetsima et al. zeigte im Gegensatz, dass die Aktivierung der hepatischen Progenitorzellen in Leberbiopsien mit Nachweis einer chronischer Hepatitis C mit steigendem Alter der Patienten assoziiert ist, allerdings verglich dieser Patienten jünger 40 Jahre und Patienten älter als 40 Jahre. (19). In dieser Arbeit war der jüngste Patient 40 Jahre alt.

Inwieweit ein Unterschied zwischen der Gallengangsproliferation und Albuminexpression in zirrhatischen Lebern zwischen Patienten jünger und älter als 40 Jahre besteht, könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Leber besitzt das Potential nach verursachter Zellschädigung durch chemische, toxische, traumatische oder virale Einwirkung (55, 73, 79, 95) sich selbst zu regenerieren. Dies geschieht entweder durch Hyperplasie der Hepatozyten, d.h. einer Volumenzunahme durch vermehrte Zellteilung und Erhöhung der Zellzahl (73, 79). Bei massiver und chronischer Leberzellschädigung, wie z.B. alkohol- verursachter Leberzirrhose oder durch chronisch virale Hepatitis (55, 74, 81) können die Hepatozyten den entstandenen Defekt nicht kompensieren und die oval cells, Bezeichnung im Rahmen der Nagetiermodelle, werden aktiviert (98, 105). Das humane Equivalent zu den oval cells bei Nagetieren stellen die hepatischen Progenitorzellen dar (79), diese sind in den Hering-Kanälchen lokalisiert (1, 42, 49). Aufgrund ihrer bipotenten Differenzierungsfähigkeit, können aus den hepatischen Progenitorzellen sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten hervorgehen (18, 45). Für die Untersuchungen einer positiven Albumin-mRNA-Expression in Gallengangsproliferaten bei menschlichen zirrhotischen Leberpräparaten, die im Rahmen der Leberregeneration aus hepatischen Progenitorzellen entstehen, bietet sich das bereits etablierte Verfahren der Albumin mRNA *in situ* Hybridisierung an. Zur Durchführung der Methode wurde ein bereits etabliertes Protokoll zur *in situ* Hybridisierung von mRNAs peroxisomaler Proteine verwendet (86, 87).

Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 50 Patienten (9 weiblichen und 41 männlichen), im Alter von 40 bis 69 Jahren (Median=53, 25 %-Perzentile=49, 75%-Perzentile=60). Sieben Patienten zeigten eine Leberzirrhose auf dem Boden einer Hepatitis B, 24 Patienten eine Leberzirrhose auf dem Boden einer Hepatitis C und 19 Patienten waren an einer äthyltoxisch-bedingten Leberzirrhose erkrankt. Zusätzlich wurde bei insgesamt 23 Patienten im Rahmen der histologischen Befundung ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) diagnostiziert.

Mikroskopisch zeigte sich in 48 von 50 Präparaten eine Gallengangsproliferation innerhalb der bindegewebigen Septen. Bei Vorliegen einer Gallengangsproliferation wurde deren Ausprägung in 4 Grade (0=keine, 1=wenig, 2=mäßig und 3=stark) eingeteilt. Ein möglicher signifikanter Unterschied, ob der Grad einer Gallengangsproliferation auf eine bestimmte Ursache der Leberzirrhose zurück zu

führen ist, ließ sich mit einem p-Wert von 0,247 nicht eruieren. Ebenso wie die Gallengangsproliferation wurde die Albuminexpression in Grade eingeteilt. Dabei wurde zwischen keiner (Grad 0), einer intermediären (Grad 1) und einer starken (Grad 2) Albuminexpression unterschieden. Hier waren mit einem p-Wert von 0,586 keine Unterschiede zwischen der Gradeinteilung der Albuminexpression und den 3 Gruppen zu erkennen.

Zwischen den Präparaten mit einem HCC und ohne HCC ergaben sich hinsichtlich des Grades der Gallengangsproliferation mit einem p-Wert von 0,803 keine signifikanten Unterschiede. In Bezug auf die Gradeinteilung der Albuminexpression zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,275 zwischen Präparaten mit und ohne Nachweis eines HCCs. Ebenfalls zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gallengangsproliferation (p-Wert von 0,709) und Albuminexpression (p-Wert von 0,613) zwischen Patienten jünger und älter als 60 Jahre.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mittels der *in situ* Hybridisierung ein Nachweis der Gallengangsproliferation in leberzirrotischen Präparaten unterschiedlicher Ätiologien gelingt. Zudem kann diese Arbeit beweisen, dass die Gallengangsproliferate Albumin exprimieren und dass der Nachweis dieser Albuminexpression mittels *in situ* Hybridisierung möglich ist. Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Albumin-mRNA-Expression in den Gallengangsproliferaten zwischen den unterschiedlichen Ätiologien der Leberzirrhose und ebenfalls nicht im Vergleich von Leberzirrhosen unterschiedlicher Genese mit und ohne gleichzeitigem Nachweis eines HCCs.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Alison MR, Lovell MJ. Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Proliferation*. 2005;38:407-421.
2. Ankoma-Sey V. Hepatic Regeneration – Revisiting the Myth of Prometheus. *News Physiol. Sci*. 1999;14: 149-55.
3. Armbrust T, Ramadori G: Mononuclear phagocytes of acutely injured rat liver abundantly synthesize and secrete fibronectin in contrast to kupffer cells of normal liver. *Biochem Bioph Res Co* 1995;213:752-758.).
4. Bahr MJ, Manns MP: Leberzirrhose. *Der Internist*. 1999;40:1308-1322.
5. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1409-1417.
6. Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* 1999;30:112-17.
7. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24:289-293.
8. Bluteau O, Beaudoin JC, Pasturaud P, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P, Zacman-Rossi J. Specific association between alcohol intake, high grade of differentiation and 4q34-q35 deletions in hepatocellular carcinomas identified by high resolution allelotyping. *Oncogene*. 2002;21:1225-1232.



9. Braun L, Mikumo R, Fausto N. Production of hepatocellular carcinoma by oval cells: cell cycle expression of c-myc and p53 at different stages of oval cell transformation. *Cancer Res* 1989;49:1554-1561.
10. Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology*. 2004;127:56-61.
11. Bucher NLR, Swaffield MN. Rate of incorporation of labelled thymidine into deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to amount of liver excised. *Cancer Res* 1964;24:1611-1615.
12. Bucher NLR, Swaffield MN, di Troia JF. Influence of age upon incorporation of thymidine-2-C14 into DANN of regenerating rat liver. *Cancer Res* 1964;24:509-5012.
13. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell*. 1988;54:541-552.
14. Chung J, Liu C, Smith DE, Seitz HK, Russell RM, Wang XD. Restoration of retinoic acid concentration suppresses ethanol-enhanced c-Jun expression and hepatocyte proliferation in rat liver. *Carcinogenesis*. 2001;22:1213-1219.
15. Cougot D, Neuveut C, Buendia MA. HBV-induced carcinogenesis. *Journal of Clinical Virology*. 2005;34 Suppl.1:75-78.
16. Cox KH, DeLeon DV, Angerer LM, Angerer RC. Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol* 1984;101:485-502
17. Crosbie OM, Reynolds M, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. In vitro evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology* 1999;29:1193-8.

18. Dabeva MA, Shafritz DA. Activation, proliferation and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 1993;143:1606-20.
19. Delladetsima J, Alexandrou P, Giaslakitou K, Psychogiou M, Hatzis G, Sypsa V, Tiniakos D: Hepatic progenitor cells in chronic hepatitis C: a phenomenon of older age and advanced liver disease. *Virchows Arch.* 2010;457(4):457-66
20. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology.* 1994;19:1513-1520.
21. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002;155:323-331.
22. Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002;23:435-445.
23. Edwald D, Li M, Efrat S, Auer G, Wall RJ, Furth PA, Hennighausen L. Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science.* 1999;273:1384-1386.
24. Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. In vivo differentiation of rat oval cells into hepatocyte. *Cancer Res* 1989;49:1541-7.
25. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956;16:142-148.
26. Farber JL, Gerson RJ, Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. *Pharmacol Rev* 1984;36:71S-75S.

27. Fausto N. Liver regeneration. *Hepatology* 2000;32:19-31.
28. Felsher DW, Bishop JM. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell*. 1999;4:199-207.
29. Friedman SL: The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Eng J Med* 1993;328:1828-1835.
30. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 1969;63(2):378-383.
31. Grisham JW, Thorgeirsson SS. Liver stem cells. *The Stem Cell Handbook* (Potten CS., ed) Academic Press, New York In press. 1996
32. Guo JT, Zhou H, Liu C, Aldrich C, Saputelli J, Whitaker T, Barrasa MI, Mason WS, Seeger C. Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections. *J Virol*. 2000;74:1495-1505.
33. He ZP, Tan WQ, Tang YF, Feng MF. Differentiation of putative hepatic stem cells derived from adult rats into mature hepatocytes in the presence of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor. *Differentiation* 2003;71:281-290.
34. Higgins GM., Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186-202.
35. Ishak K, Bapista A, Bianchi L et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995;22:696-699.
36. Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*. 1999;284:1998-2003.

- 37.Kato S, Tajiri T, Matsukura N, Taniai N, Mamada H, Yoshida H, Kiyam T, Naito Z. Genetic polymorphisms of aldehyde dehydrogenase 2, cytochrome p450 2E1 for liver cancer risk in HCV antibody-positive Japanese patients and the variations of CYP2E1 mRNA expression levels in the liver due to its polymorphism. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:886-893.
- 38.Katoonizadeh A, Nevens F, Verslype C, et al. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver Int* 2006;26: 1225-1233.
- 39.Kinosita R. Studies on the carcinogenic chemical substances. *Trans. Soc. Pathol. Jpn.* 1937;27:665-727.
- 40.Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, Faust N. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor type 1 knockout mice. *J Exp Med* 2000;192:1809-1818
- 41.Knittel T, Ramadori G: Current concepts of liver fibrosis. *Forum Trends Exp Clin Med* 1994;4:236-257.
- 42.Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendswaard E, Theise ND. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology*. 2008;47(6):1994-2002.
- 43.Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Genetic alternations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 2001;120:1763-1773.
- 44.Laurer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001;345:41-52.

45. Lenzi R, Liu MH, Tarsetti F, et al. Histogenesis of bile duct-like cells proliferating during ethionine carcinogenesis: evidence for a biliary epithelial nature of oval cells. *Lab Invest* 1992;66:390-402.
46. Lernire JM, Shiojiri N, Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol.* 1991 Sep;139(3):535-52.
47. Liang TJ, Heller T. Pathogenesis of Hepatitis C-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:62-71.
48. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med.* 2000;132:296-305.
49. Libbrecht L. Hepatic progenitor cells in human liver tumor development. *World Journal of Gastroenterology.* 2006;12(39):6261-6265.
50. Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, Roskams T. Expression of neural cell adhesion molecule in human liver development and in congenital and acquired liver diseases. *Histochem Cell Biol* 2001;116:233-299.
51. Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver International* 2005; 25: 16–27.
52. Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J pathol* 2000; 192:373-378.
53. Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2002;13:389-96.

- 54.Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology*. 1994;106:1085-1105.
- 55.Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver disease are directly related to disease severity. *Am. J. Pathol*. 1999; 154: 537-41.
- 56.Michalopoulos GK, Defrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-6.
- 57.Michalopolulos GK, Liver Regeneration. *J Cell Physiol*. 2007; 213(2): 286-300.
- 58.Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5Suppl 1):87-96.
- 59.Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127:87-96.
- 60.Nair J, Sonne H, Nagao M, Barbin A, Bartsch H. Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of Long Evans cinnamon (LEC) rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56:1267-1271.
- 61.Nakamoto Y, Guidotti LG, Kuhlen CV, Fowler P, Chisari FV. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med*. 1998;188:341-50.
- 62.Nissen NN, Martin P. Hepatocellular carcinoma: the high-risk-patients. *J Clin Gastroenterol*. 2002;35:79-85.
- 63.Obenrader M, Chen J, Ove P, Lansing AI. Functional regeneration in liver of old rats after partial hepatectomy. *Experimental Gerontology* 1974;9:181-190.
- 64.Oertel M.,Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1782:61-74.

65. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 1969;64(2):600-604.
66. Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2007;94:153-156.
67. Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 1998;27:433-45.
68. Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* 1998;27:1030-8.
69. Pogribny IP, Basnakian AG, Miller BJ, Lopatina NG, Poirier LA, James SJ. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. *Cancer Res*. 1995;55:1894-1901.
70. Poliard AM, Bernuau D, Tournier I, Legres LG, Schoevaert D, Feldmann G, Sala-Trepat JM (1986). Cellular analysis by in situ hybridization and immunoperoxidase of alpha-fetoprotein and albumin gene expression in rat liver during the perinatal period. *J Cell Biol* 1986;103:777-786.
71. Popper H. The relation of mesenchymal cell products to hepatic epithelial systems. *Prog Liver Dis* 1990;9:27-38.
72. Popper H, Kent G, Stein R. Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury. *J Mt Sinai Hosp* 1957;24:551-556.
73. Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jul;26(7):1218.

74. Roskams T. Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus. *J. Hepatol.* 2003;39: 431-4.
75. Roskams T, Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2006, 25;3818-3822.
76. Roskams T, Desmet V. Ductular reaction and its diagnostic significance. *Semin Diagn Pathol* 1998;15(4):259-269.
77. Roskams T, De Vos R, Van Eyken P et al. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatology* 1998;29:455-463.
78. Roskams T, De Vos R, Desmet V. "Undifferentiated progenitor cells" in focal nodular hyperplasia of the liver. *Histopathology* 1996;28:291-299.
79. Roskams T, Libbrecht L, Desmet V. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003;23:385-396.
80. Roskams T, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P et al. Nomenclature of the Finer Branches of the Biliary Tree: Canals, Ductules, and Ductular Reactions in Human Livers. *Hepatology* 2004;39:1739-1745.
81. Roskams T, Yang SQ, Koteish A et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Path.* 2003; 163:1301-11.
82. Rossi JM, Dunn NR, Hogan BLM, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* 2001;15:1998-2009.



83. Ruzzenente A, Valdegamberi A et al, Hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with portal hypertension: is liver resection always contraindicated? *World J Gastroenterol* 2011;17(46):5083-8.
84. Saber MA, Novikoff PM, Shafritz DA. Albumin and collagen mRNA expression in normal and analbuminemic rodent liver: analysis by in situ hybridization using biotinylated probes. *J Histochem Cytochem* 1990;38:199–207
85. Sambrook J, Fritsch GF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2. Aufl . Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
86. Schad A, Fahimi HD, Völkl A, Baumgart E. Nonradioactive in situ hybridization for detection of peroxisomal proteins: Heterogeneous hepatic lobular distribution after treatment with a single dose of bezafibrate. *J Histochem Cytochem* 1996;44:825–834.
87. Schad A, Fahimi HD, Völkl A, Baumgart E. Nonradioactive in situ Hybridization for detection of mRNAs of peroxisomal enzymes in rat liver. *Ann NY Acad Sci* 1996;804:736–738.
88. Schaffner F, Popper H: Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology* 1963;44:239-242).
89. Schirmacher P, Fleig WE, Dienes HP. Biopsische Diagnostik der chronischen Hepatitis – Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Kompetenznetzes Hepatitis (HepNet). *Gastroenterol* 2004; 42: 175-185.
90. Schmucker DL, Sanchez H. Liver regeneration and aging: a current perspective. *Curr Gerontol Geriatr Res*. 2011; 2011: 526379.

91. Seitz HBR. Effect of ethanol on procarcinogen activation. In: Watson R, ed. Alcohol and Cancer. Boca Raton: CRC Press. 1992:55-72.
92. Shinozuka II, Lombardi B, Sell S et al. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. Cancer Res 1978;38:1092-8.
93. Singh M, Kumar V. Transgenic mouse models of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. Rev Med Virol 2003;13:243-53.
94. Steinmetz I, Schad A, Dietmann G, Weber T, Hanisch E, Kusterer K, Völkl A, Fahimi HD, Angermüller S. Expression of albumin and catalase mRNAs studied by northern blotting and in situ hybridization in rat liver after acute rejection induced by allogeneic transplantation. Eur J Cell Biol 1998;75:114.
95. Sun C, Jin XL, Xiao JC. Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study. Histopathology 2006;48:546-555.
96. Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, Albertini A, Fasola M, Boffetta P, Nardi G. Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma; the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. Bresica HCC study. Int J Cancer. 1999;81:695-699.
97. Tanaka M, Itoh T, Tanimizu N, Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. J. Biochem. 2011;49(3):231-239.
98. Taniguchi H, Kondo R, Suzuki A, et al. Evidence for the presence of hepatic stem cells in the murine fetal liver. Transplant Proc. 1999;31:454
99. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. The FASEB Journal 1996;10:1249-1256.

100. Tournier I, Bernuau D, Poliard A, Schoevaert D, Feldmann G. Detection of albumin mRNAs in rat liver by in situ hybridization: usefulness of paraffin embedding and comparison of various fixation procedures. *J Histochem Cytochem.* 1987;35:453–459.
101. Tsamandas AC, Antonacopoulou A, Kalogeropoulou C, Tsota I, Zabakis P, Giannopoulou E, Liava A, Tzelepi V, Tepetes K, Petsas T, Kardamakis D, Kalofonos HP. Oval cell proliferation in cirrhosis in rats. An experimental study. *The Japan Society of hepatology.* 2007;37:755-764.
102. Van Eyken P, Sciort R, Paterson A et al. Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1988; 562-568.
103. Van Thiel DH, Gavaler JS, Kam I, Francavilla A, Polimeno L, Schade PR, Smith J, Diven W, Penkrot RJ, Starzl TE. Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology* 1989;93:1414-1419.
104. Zhang DY, Friedman SL: Fibrosis-Dependent Mechanisms of Hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2012;56(2):769-75.
105. Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology.* 2005;41:956-967.
106. Zheng YW and Taniguchi H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin. Liver Dis.* 2003;23:337-348.
107. Zhou H, Rogler LE, Teperman L, Morgan G, Rogler CE. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology.* 2007;45:716-24.

108. Xiao JC, Ruck P, Adam A, Wang TX, Kaiserling E. Small epithelial cells in human liver cirrhosis exhibit features of hepatic stem-like cells: immunohistochemical, electron microscopic and immunoelectron microscopic findings. *Histopathology* 2003;2:141-149.
  
109. Roche Applied Science. DIG Application Manuel for Nonradioactive In Situ Hybridization. 3<sup>rd</sup> edition. 2002 by Roche Diagnostics GmbH.

