

**Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der Universität Tübingen  
Institut für Pathologie und Neuropathologie  
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie**

**VEGFR-2 Expression in hepatozellulären und  
cholangiozellulären Leberkarzinomen und duktalem  
Pankreaskarzinomen und klinische Korrelation mit  
dynamischem Kontrastmittel-verstärktem CT am Beispiel von  
hepatozellulären Neubildungen**

**Inaugural–Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Dr.med.univ. (Innsbruck) Hans Bösmüller**

**2017**

**Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend**

**2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bauer**

**Tag der Disputation: 02.06.2017**

# Inhaltsverzeichnis

|   |          |
|---|----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>   | <b>7</b> |
| <br>  |          |
| <b>1. Einleitung.....</b>   | <b>8</b> |
| <br>  |          |
| 1.1. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor .....   | 8        |
| 1.2. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor in Tumoren, Therapieansatz .....   | 10       |
| 1.3. Hepatozelluläres Karzinom, cholangiozelluläres Karzinom, pankreatisches duktales Adenokarzinom .....   | 12       |
| 1.4. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor-2 in hepatozellulären, cholangiozellulären und pankreatischen duktales Adenokarzinomen ..... | 13       |
| 1.5. Hepatozelluläres Karzinom und Computertomographie .....  | 15       |
| 1.6. Cholangiozelluläres Karzinom, pankreatisches duktales Adenokarzinom und Computertomographie .....  | 16       |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden.....</b>   | <b>16</b> |
| 2.1       | Sampling und Herstellung der Tissue Micro Arrays.....   | 16        |
| 2.2       | Sampling Studienkohorte dysplastischer Knoten -<br>hepatozelluläres Karzinom/Computertomographie.....                                 | 19        |
| 2.3       | Immunhistochemie des vaskulären endothelialen<br>Wachstumsfaktor Rezeptor-2; Immunoreaktiver Score.....                               | 20        |
| 2.4       | Computertomographie /Kontrastmittel.....  | 21        |
| 2.5       | Statistische Auswertung Computertomographie.....  | 23        |
| 2.6       | Statistische Auswertung Immunhistochemie.....   | 23        |
| <br>      |   |           |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>24</b> |
| 3.1       | Immunhistochemische Interpretation der tissue micro arrays<br>allgemein.....  | 24        |
| 3.2       | Hepatozelluläres Karzinom an tissue micro arrays.....   | 24        |
| 3.3       | Cholangiozelluläres Karzinom an tissue micro arrays.....  | 27        |
| 3.4       | Pankreatisches duktales Adenokarzinom, chronische Pankreatitis,<br>reguläres Pankreas an tissue micro arrays.....                     | 29        |
| 3.5       | Immunhistochemische Ergebnisse am klinischen Kollektiv<br>(Regeneratknoten, dysplastischer Knoten, hepatozelluläres<br>Karzinom)..... | 33        |
| 3.6       | Vergleich Computertomographie/Immunhistochemie.....   | 35        |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 3.7 | Vergleich Computertomographie-kontrastmittelverstärkte Computertomographie..... | 36 |
|-----|---|----|

**4. Diskussion.....37**

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 4.1 | Studienziel: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor-2 Expression im hepatozellulären Karzinom, cholangiozellulären Karzinom, chronischer Pankreatitis, pankreatischen ductalen Adenokarzinom und regulären Pankreasparenchym ..... | 37 |
|-----|---|----|

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4.2 | Immunhistochemische Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor-2 in hepatozellulären Läsionen..... | 37 |
|-----|--|----|

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4.3 | Immunhistochemische Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor-2 in intrahepatischen cholangiozellulären Läsionen..... | 40 |
|-----|--|----|

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 4.4 | Immunhistochemische Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor-2 in chronischer Pankreatitis, duktalem Pankreaskarzinom und regulärem Pankreas..... | 41 |
|-----|---|----|

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4.5 | Immunhistochemische Ergebnisse und klinische Vergleichbarkeit in bildgebenden Verfahren..... | 42 |
|-----|--|----|

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4.6 | Therapeutische Aspekte der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor-2 Expression..... | 44 |
|-----|--|----|

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>5. Zusammenfassung.....</b>        | <b>45</b> |
| <b>Literaturverzeichnis.....</b>      | <b>46</b> |
| <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>     | <b>49</b> |
| <b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b> | <b>51</b> |
| <b>Danksagung.....</b>                | <b>52</b> |

## **Abkürzungen**

ALP; Arterielle Leber Perfusion;

AUC; area under curve;

ANOVA; analysis of variance;

BF; blood flow;

BV; Blutvolumen;

CCC; Cholangiozelluläres Karzinom;

CP; Chronische Pankreatitis;

DLN; Dysplastischer Knoten;

FDA; food and drug administration;

HCC; Hepatozelluläres Karzinom;

HPI; Hepatischer Perfusions Index;

MIP; Maximum Intensitäts Projektion;

PDA; Pankreatisches Duktales Adenokarzinom;

PVP; Portal venöse Perfusion;

RLN; Regeneratknoten;

ROC; receiver operating characteristics curve;

SD; standard deviation;

TKI; Tyrosinkinaseinhibitor

VEGF; vascular endothelial growth factor;

VEGFR-2; vascular endothelial growth factor receptor 2;

VPCT; Volumen Perfusions Computertomographie;

## **1) Einleitung**

### **1.1 VEGF und VEGFR**

Tumorangiogenese beeinflusst Tumorwachstum und Metastasenentwicklung, und wird von mehreren proangiogenetischen Faktoren beeinflusst. Die wichtigste Rolle spielt dabei der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). VEGF ist eine Familie von homodimeren Glykoproteinen (A-E), wird von reproduktionsfähigen Zellsystemen exprimiert, fördert Mitogenese und Migration von Endothelien, wodurch Tumorwachstum und Metastasenentwicklung beschleunigt werden. Die Regulation von VEGF in Tumorzellen wird durch genetische Alterationen und Hypoxie beeinflusst. Im Signalweg stellt VEGF die extrazelluläre Domäne der Signalkaskade dar, die intrazelluläre Domäne wird durch die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptoren 1-3 (VEGFR 1-3) gebildet, die Tyrosinkinase-Rezeptoren sind. Anbindung von VEGF an die VEGF-

Rezeptoren lösen Autophosphorylierung aus und aktiviert nachfolgende Signalkaskaden für die Proliferation, Migration Lebensdauer von Endothelien (Abb1) [1, 2]

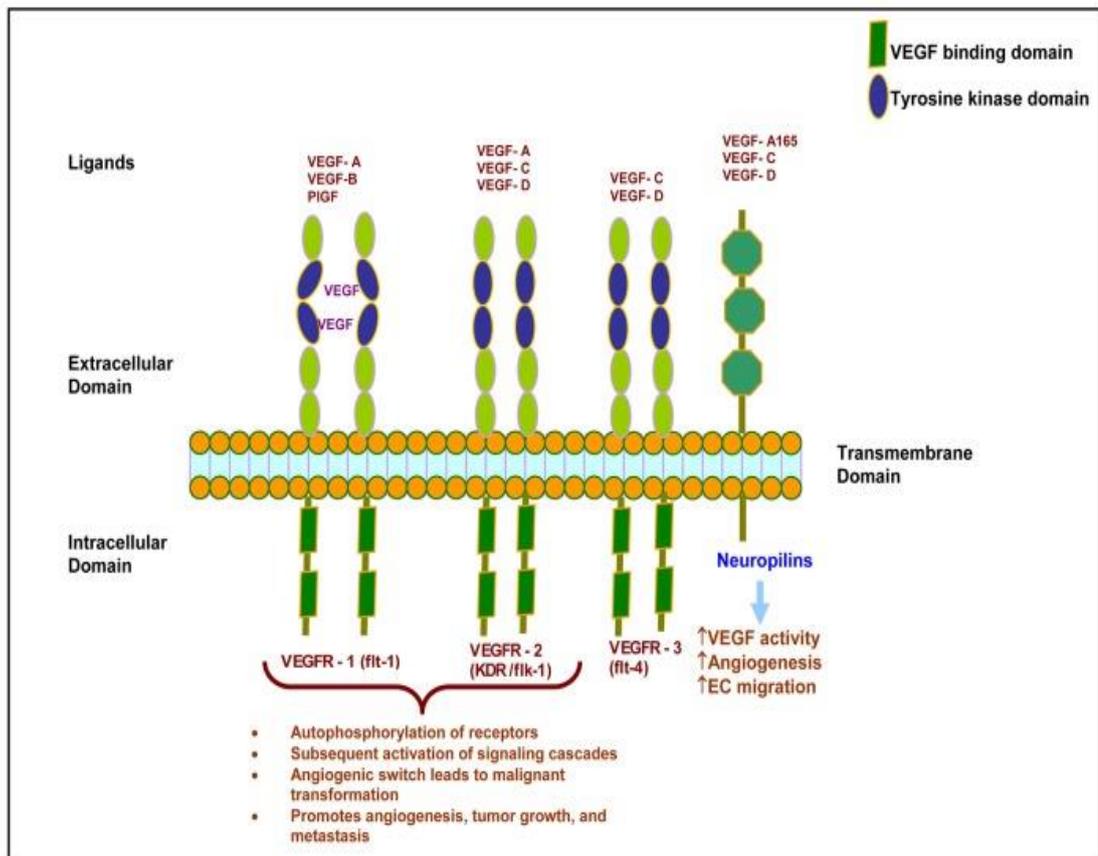


Abb.1 Aufbau der Domänen von VEGF und VEGFR (aus Nandy D. et al; Cancers 2011, 3, 841-871)

Den hinsichtlich seiner Signalkaskade aktivste Komplex stellt die Verbindung VEGF und VEGFR-2 dar.

Angioneogenese spielt bei der Entwicklung von zahlreichen Tumoren eine große Rolle, wobei dies bei HCCs gut dokumentiert ist [3, 4]. Auch bei duktalem Adenokarzinomen des Pankreas wurde dieser Prozess bereits untersucht [5, 6], ebenso bei CCCs [7-9].

## 1.2 VEGFR in Tumoren, Therapieansatz

Der komplexe Zusammenhang zwischen VEGF und VEGFR-2 lässt mehrere Möglichkeiten für medikamentöse Interaktionen offen. Derzeit sind von der FDA folgende antiangiogenetische medikamentöse Strategien zugelassen (Abb.2) [10]:

- 1) Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) blockieren die ATP Bindungsstellen und unterbinden die Phosphorylierung des Rezeptors mit konsekutiver Ausschaltung der nachfolgenden Kaskaden. Beispielhaft seien Sorafenib und Sunitinib erwähnt. Die Bindung zwischen VEGF und VEGFR-2 bleibt davon unbeeinflusst, allerdings werden andere Rezeptortypen mit beeinflusst (platelet derived growth factor/PDGFR oder c-kit). Sorafenib wurde diesbezüglich in der letzten Zeit verstärkt bei HCCs angewandt [3, 11], wobei das Expressionsprofil von VEGFR zur Darstellung der potentiellen Effektivität antiangiogeneogetischer Therapie verwendet wird [4]. Erste Studien am Mausmodell für Sunitinib-Therapie am PDA liegen vor [12].
- 2) Eine monoklonale Antikörpertherapie gegen zirkulierendes VEGF-A ist seit 2004 im Einsatz. Bevacizumab wird bei vielen Tumorthérapien, zumeist gemeinsam mit einer Chemotherapie verabreicht. Einzelne Studien berichten über die kombinierte Verabreichung von Bevacizumab und TKI bei HCC [13] und PDA [14], weiters wird die Motilität von Tumorzellen des PDA durch die Verabreichung von Bevacizumab und Sunitinib beeinflusst [6]. Bei CCCs deutet verstärkte Expression von VEGFR 2 zunehmende Resistenz bei der Verwendung von Bevacizumab an [9].

- 3) Aflibercept ködert Bindungsstellen mehrerer angiogene Wachstumsfaktoren (VEGF-A, VEGF-B, placental growth factor/PlGF) und verhindert eine Aktivierung der nachfolgenden Kaskaden, ist aber derzeit bei hepatozellulären Karzinomen nur im Mausmodell im Einsatz, Berichte bezüglich CCC oder PDA gibt es nicht [15]
- 4) Durch die Blockade der extrazellulären Domäne von VEGFR-2 wird die Interaktion zwischen VEGF und Rezeptor unterbunden. Dies wird erreicht durch die Verabreichung des monoklonalen Antikörpers Ramucirumab. Entsprechende Studien als Zweitlinientherapie beim HCC liegen vor [16],

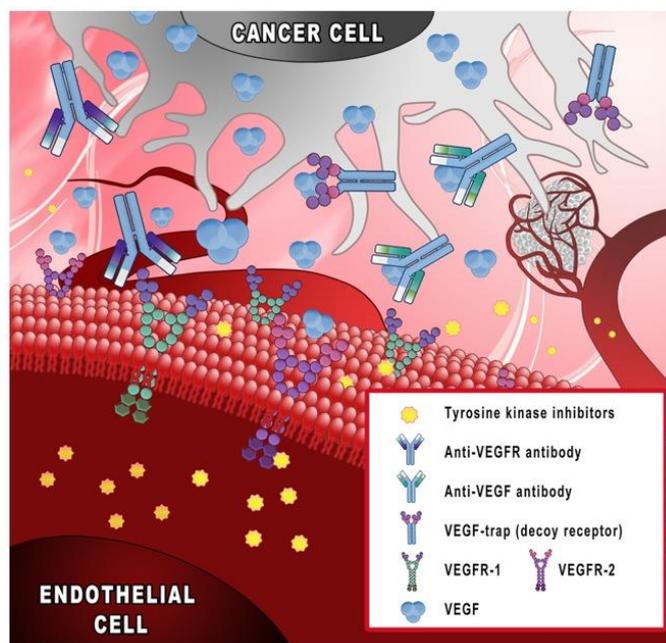


Abb.2 Medikamentöse Ansätze antiangiogenetischer Therapie (aus Maj.E et al; [Int J Oncol](#). 2016 Nov; 49(5): 1773–1784.)

### 1.3 HCC, CCC, PDA

Hepatozelluläre Karzinome (HCC) sind die häufigsten primären malignen Erkrankungen der Leber, wobei insbesondere die Erkennung im Frühstadium in Hinsicht auf erfolgversprechende Therapieoptionen große Bedeutung hat [17]. Trotz Fortschritten in der Technik bildgebender Verfahren bei der Darstellbarkeit kleiner Läsionen, ist es notwendig dysplastische Knoten der Leber und HCCs so früh wie möglich zu erkennen, zumal die Inzidenz derartiger Läsionen im Steigen begriffen ist [17]. Dysplastische Knoten (DLN) der Leber bei bekannter Leberzirrhose haben ein erhöhtes Potential für maligne Transformation und führen die Liste der Differentialdiagnosen des HCC an, aber auch andere Tumore der Leber in der zirrhotischen Leber sind differentialdiagnostisch relevant, z.B. cholangiozelluläre Karzinome. Auch histologisch kann die Abgrenzung dysplastischer Knoten von HCCs Grad 1 zytologisch und strukturell nicht eindeutig sein. Regeneratknoten (RLN) der zirrhotisch umgebauten Leber sind noch als benigne einzustufen, können aber bei fortbestehender Erkrankung zu DLNs und letztendlich zu HCCs transformieren [18].

Die Inzidenz von CCCs bei Leberzirrhose ist erhöht, und bereitet in Abgrenzung zu HCCs sowohl in bildgebenden Verfahren als auch in der Histologie bisweilen differentialdiagnostische Schwierigkeiten. Cholangiozelluläre Karzinome der Leber treten in zirrhotisch und nicht zirrhotisch veränderten Lebern auf, und sind morphologisch und immunhistochemisch von Karzinomen der äußeren Gallenwege und von duktalem Pankreaskarzinomen nicht zu unterscheiden. Da die Herkunft insbesondere bei fortgeschrittenen Tumoren ohne bekannte Leberzirrhose

schwierig ist, werden diese auch vermehrt unter Karzinome des pankreatobiliären Types zusammengefasst.

Duktale Adenokarzinome des Pankreas treten gehäuft bei Patienten mit chronischer Pankreatitis auf, diese stellt auch eine wichtige klinische und histologische Differentialdiagnose dar. Im Falle bereits hepatisch metastasierter PDAs kann anhand einer Stanze die Frage nach einem Primum/CCC der Leber versus Metastase/PDA unbeantwortet bleiben.

#### **1.4 VEGFR in HCCs, CCCs, PDAs**

In der vorliegenden Studie wird das immunhistochemische VEGFR-2 Expressionsprofil von HCCs, CCCs, PDAs, chronischer Pankreatitis und regulären Pankreas miteinander verglichen. Dahinter stehen neben pathologisch-diagnostischen auch klinische Fragestellungen. Die zunehmende Vaskularisierung lässt sich mittels VEGFR-2 Färbung gut erkennbar quantifizieren, was die Diskriminierung von Regeneratknoten, dysplastischen Knoten und HCCs in zirrhotischen Lebern erleichtert. Quantifizierende bildgebende Verfahren können diese Neovaskularisierung indirekt wiedergeben, und dadurch nicht-invasive Diagnostik erweitern. Aus onkologischer Sicht kann anhand dieser Methoden der Erfolg einer angioneogenetischen oder interventionellen radiologischen Therapie abgeleitet werden.

Die verstärkte Vaskularisation von HCCs lässt sich herkömmlich mit Nachweis von CD34 positiven Endothelien in den Sinusoiden darstellen, doch sind insbesondere auch die Ergebnisse hochregulierter Angiogenese mit VEGFR2

Immunhistochemie vielversprechend [19]. Auch der molekularpathologische Nachweis von VEGFR mittels hochregulierter mRNA wurde bereits mehrfach untersucht [4, 20]. VEGFR in PDAs sind vergleichsweise weniger untersucht, vereinzelte Publikationen diskutieren VEGFR bei PDAs als Prognoseparameter und Therapieansatz, wobei zwischen der Expression in den Tumorzellen als Therapieoption und Expression in den tumorassoziierten vaskulären Strukturen unterschieden wird [6, 12, 21]. Studien bezüglich CCC und VEGFR-2 Expression sind spärlich, und beziehen sich ebenso auf potentielle targeted therapy [9].

Vielversprechend ist der klinisch-radiologische Ansatz zunehmende Vaskularisation von Tumoren mit dynamischen Kontrastmittel-angereicherten Verfahren im CT oder MR indirekt wiederzugeben. Direkt wird die Tumor-assoziierte Angiogenese immunhistochemisch durch die VEGFR-2 Expression charakterisiert, somit ist ein Vergleich dieser beiden Methoden morphologisch interessant. Bisher wurden derartige Untersuchungen nur experimentell bei antiangiogenetisch behandelten Mäusen mit Mammakarzinomen durchgeführt [22]

Unter diesen Aspekten ist der Vergleich immunhistochemischer VEGFR-2 Expression und dynamischer Kontrastmittelverstärkter CTs bei hepatozellulären Neubildungen unter dem Aspekt der Dignitätseinschätzung insbesondere kleiner Läsionen von klinischem Interesse, um Therapieindikationsstellung zu erleichtern und um Therapieerfolge zu überprüfen [23]. Derartige Untersuchungen gibt es bis dato nicht für das intrahepatische CCC.

Die VEGFR-2 Expression pankreatischer Läsionen (PDA, CP) wurde bisher im Zusammenhang mit onkologischen Fragestellungen bei antiangiogenetischer

Therapie untersucht, mit bildgebenden Verfahren an der Leber vergleichbare Untersuchungen gibt es bis dato nicht [5, 6, 12]

## **1.5 HCC und CT**

Dynamisches kontrastmittelverstärktes MRI und CT ermöglichen aufgrund quantifizierbarer Perfusionsparameter die Erkennung prämaligener und maligner Tumore unter 1cm Größe, welche bis dato als unklassifizierbar gelten [24, 25]. Beim DCE-CT (oder VPCT) werden repetitive CT scans der Leber verwendet, um Perfusionsparameter während der Kontrastmittelgabe von entsprechenden Bildinformationen abzuleiten [26-29]. Derartige Perfusionsparameter sind in Hinsicht auf ein Therapiemonitoring von Vorteil [30], eignen sich aber auch um Frührezidive z.B. nach trans-arterieller Chemoembolisation (TACE) zu erkennen [31]. Über die Rolle von VEGFR 2 bei der Entwicklung von HCCs gibt es zahlreiche Untersuchungen, ebenso über DCE-CT in neugebildeten Knoten der Leber. Bis jetzt wurden aber vergleichende Untersuchung von VEGFR2 Immunhistochemie und DCE-CT (oder VPCT) unseres Wissens nicht publiziert. Wir untersuchten die Korrelation der in-vivo Perfusionsergebnisse der DCE-CT (oder VPCT) mit den unterschiedlichen immunhistochemischen Expressionsmustern bei HCC, DLN und RLN bei Patienten ohne Vorbehandlung. Aus radiologischer Sicht interessierte die Fragestellung ob VEGFR2 Expression unter Anwendung eines non-invasiven DCE-CT (oder VPCT) ausreichend Aufschlüsse für therapeutische Ansätze prämaligener und maligner hepatozellulärer Läsionen gibt. Aus der Sicht der Pathologie richtete sich

*die Frage auf ein mögliches messbares zunehmendes immunhistochemisches Reaktionsprofil bei der Entwicklung eines HCC aus DNLs und RNLs.*

## **1.6 CCC, PDA, CP und CT**

Bei CCCs wurden derartige Untersuchungen bisher nicht durchgeführt, wobei der ursächliche Zusammenhang mit Leberzirrhose als seltener im Vergleich zum HCC einzustufen ist, aber bei bildgebenden Verfahren eine Differentialdiagnose darstellt. Einen anderen Aspekt stellt die differentialdiagnostische Darstellung von pankreatischen Raumforderungen dar. Hier wurde am Mausmodell VEGFR-2 als tracer im kontrastmittelangereicherten Ultraschall untersucht [21, 32]. Antiangiogene Effekte wurden mittels kontrastmittelangereichertem MRI experimentell am PDA quantifiziert, allerdings ohne Vergleich mit VEGFR-2[33].

## **2) Material und Methoden**

### **2.1 Sampling und Herstellung der tissue micro arrays.**

Um große Anzahlen von Gewebeproben z.B. hinsichtlich immunhistochemischer Expressionsmuster zu untersuchen und zu vergleichen, werden tissue micro arrays angefertigt. Je nach Gewebeart werden dabei je nach Gewebetyp und Anforderung

von 0,5 bis 1,5mm durchmessende und bis 3mm lange Stanzzylinder aus den Paraffinblöcken entnommen, und zusammen in einen neuen Paraffinblock übertragen. Die Anordnung der Stanzzylinder erfolgt semiautomatisch (Estigen/Beecher; Tartu/Estland) Je nach Durchmesser der Stanzzylinder können dadurch bis 300 Proben auf einen Objektträger gebracht werden (Abb.3).

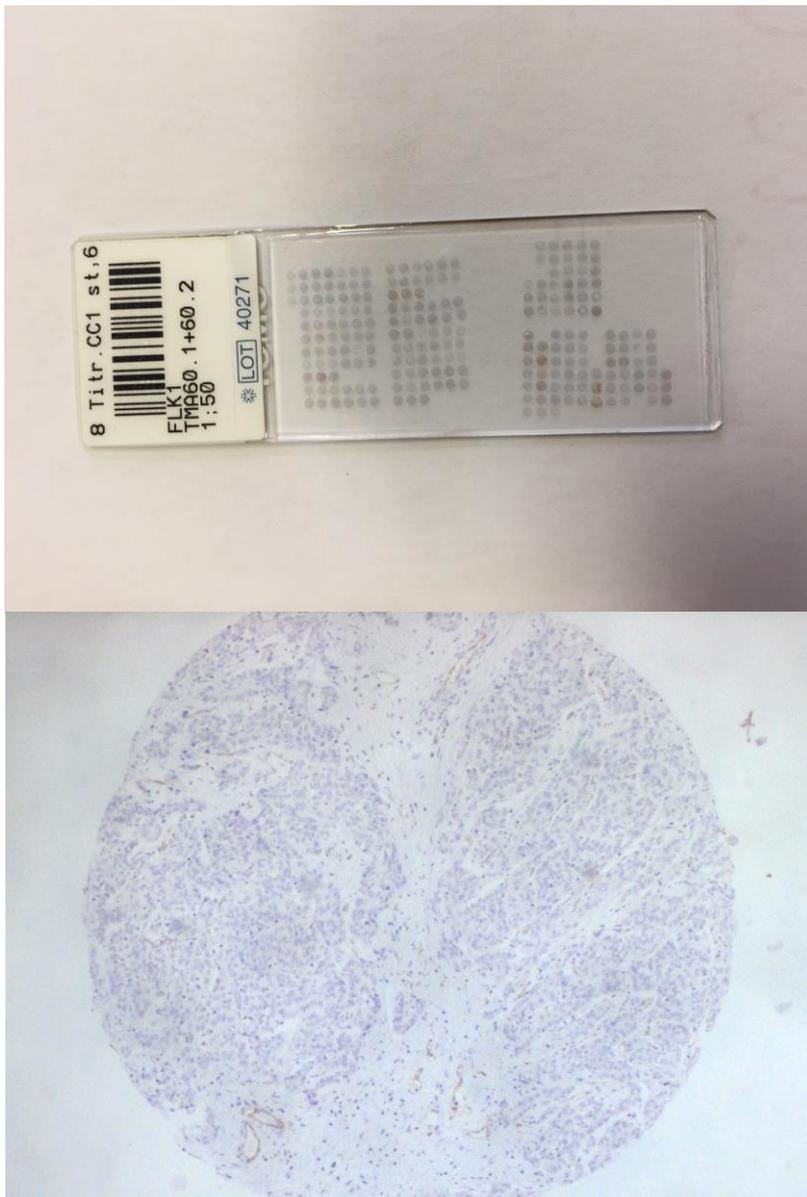


Abb.3 TMA Präparat und Schnitt

Bei den hier vorliegenden HCC und CCC Fällen wurden pro Patient je drei Tumorstanzen und je drei Stanzen aus nicht tumorösem Leberparenchym in einer Linie zwecks besserer Beurteilbarkeit zusammen platziert. Bei den TMAs aus den Entitäten PDA und CP wurden pro Patient 3 Stanzen entnommen, es gab keine Kontrollen aus Normalgewebe. Beim TMA aus regulärem Pankreas wurden pro Patient ebenso je 3 Stanzen entnommen.

**TMA 1 HCC:** 42 Fälle HCC der Jahre 2006-2014 des Universitätsklinikum Tübingen wurden herangezogen, davon 32 männliche Patienten (10-79 Jahre; Durchschnittsalter 65) und 10 Patientinnen (45-84 Jahre; Durchschnittsalter 60). Der Stanzdurchmesser betrug 1mm.

**TMA 2 HCC:** 53 ausgewählte Fälle HCC der Jahre 2008 -2010 des Universitätsklinikum Tübingen wurden herangezogen, davon 47 männliche Patienten (23-80 Jahre; Durchschnittsalter 66) und 8 Patientinnen (17-79 Jahre; Durchschnittsalter 60).

**TMA CCC:** 47 ausgewählte Fälle CCC der Jahre 1998-2011 des Universitätsklinikum Tübingen wurden herangezogen, davon 22 männliche Patienten (51-83 Jahre; Durchschnittsalter 66 Jahre) und 25 Patientinnen (17-77 Jahre; Durchschnittsalter 59 Jahre).

**TMA PDA:** Es wurden 74 externe Fällen der Jahre 2002-2008 (Klinikum Heidelberg) herangezogen, davon 43 männliche Patienten (45-79 Jahre; Durchschnittsalter 64 Jahre) und 31 Patientinnen (41-80 Jahre; Durchschnittsalter 65 Jahre).

**TMA Chronische Pankreatitis:** Aus 24 externen ausgewählten Fällen chron. Pankreatitis wurden Stanzen mit einem Durchmesser von 1,5 mm entnommen.

**TMA reguläres Pankreas:** Aus 23 externen regulären Pankreata (14 Männer, Alter 14-75 Jahre/Durchschnitt 55 Jahre; 9 Frauen, Alter 39-70 Jahre/Durchschnitt 59 Jahre) wurden Stanzen mit einem Durchmesser von 1,5 mm entnommen.

## **2.2 Sampling Leber DLN-HCC/CT/Studienkohorte**

Retrospektiv wurden aus dem Patientengut des UKT (2009-2015) 34 Fälle (Durchschnittsalter 63.6 Jahre; absolut 45.7-85.6 Jahre, 7 Frauen, 27 Männer) ermittelt, bei welchen Biopsie oder OP wegen suspekter DLN oder HCC nach vorangegangener DCE-CT (oder VPCT) erfolgte. Die UKT Ethikkommission stimmte den Perfusionsstudien mit vergleichender Histologie zu, weiters liegen Zustimmungserklärungen der Patienten mit Aufklärung über Strahlenbelastung vor. Von der Studie ausgenommen waren Patienten mit Anti-VEGFR Therapie, TACE oder andersweitiger interventioneller Therapie. Zwischen DCE-CT (oder VPCT) und Biopsieentnahme oder OP lagen durchschnittlich 52.5 Tage (absolut 6-209 Tage)

## 2.3 Immunhistochemie VEGFR2, IRS

Für die Immunhistochemie wurden folgende Antikörper und Reagentien verwendet: VEGFR-2 (monoclonal rabbit, 55B11, Cell signaling, Danvers, USA). Die auf Objektträger aufgezogenen Schnittpräparate wurden mit EDTA-Puffer CC1 Standard (pH 8.6) bei 95 °C für 64 min vorbehandelt. Der Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:50 für 32 min bei 37° Celsius inkubiert. Als Färbe-Detektionssystem wurde OptiView DAB Detection Kit von Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Immunfärbung wurde vollautomatisch mit einem BenchMark ULTRA Färbeautomaten. (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) durchgeführt.

Für die semiquantitative Auswertung der VEGFR2 Färbung wurde der immunreaktive Score nach Remmele und Stegner herangezogen [34]. Je nach Färbeintensität von Endothelien oder Tumorzellen (PDA) wurde das immunhistochemische Expressionsprodukt mit 0-3 gradiert. Null wurde für negative, 1 für schwache, 2 für mäßige und 3 für starke Reaktion eingesetzt. Der IRS Score errechnete sich aus dem Produkt Färbeintensität x Prozentsatz der positive Zellen (0–10%/1; 10–50%/2; 50–80%/3; 80–100%/4) IRS scores von 8, 9 und 12 wurden als stark positiv, IRS scores 4 und 6 als mäßig positiv, und score 1, 2, 3 als schwach positiv eingestuft.

## 2.4 CT/Kontrastmittel

Eingesetzt wurde die Kontrastmittel-verstärkte computertomographische Analyse (Syngo Volume Perfusion CT Body; Siemens Healthcare, Forchheim, Germany) mit dem Vorteil zeitnaher Bewegungskorrektur, Reduktion des Rauschen und Elimination von Überlagerungen durch Knochen, Fett und Luft. [16]. Das Zielgebiet (region of interest/ROI) wurde innerhalb der maximalen Außenkontur der Läsion definiert und aufgezeichnet [17] [18] (Abb.4). Blutfluss (BF; ml/100 ml/min), Blutvolumen (BV; ml/100 ml) und arterielle Leberperfusion (ALP; ml/100 ml/min) stellen den arteriellen Anteil an Perfusion des Leberparenchyms oder des Lebertumors dar, portale venöse Perfusion (PVP; ml/100 ml/min) repräsentiert den Anteil an portal-venös versorgtem Leberparenchym oder Lebertumor) und der hepatische Perfusionsindex (HPI; %) stellt die prozentuale Relation zwischen ALP und PVP dar.

Diese Daten wurden für HCC, DLN und RL ermittelt. Um zu vermeiden, dass Fehlmessungen entstehen aufgrund zu zarter z.B. hepatischer Arterien, wird der arterielle Input über Messungen in der Milz bestimmt, die nahezu Zeit synchron mit der Leber arteriell angeflutet wird (Abb.5)

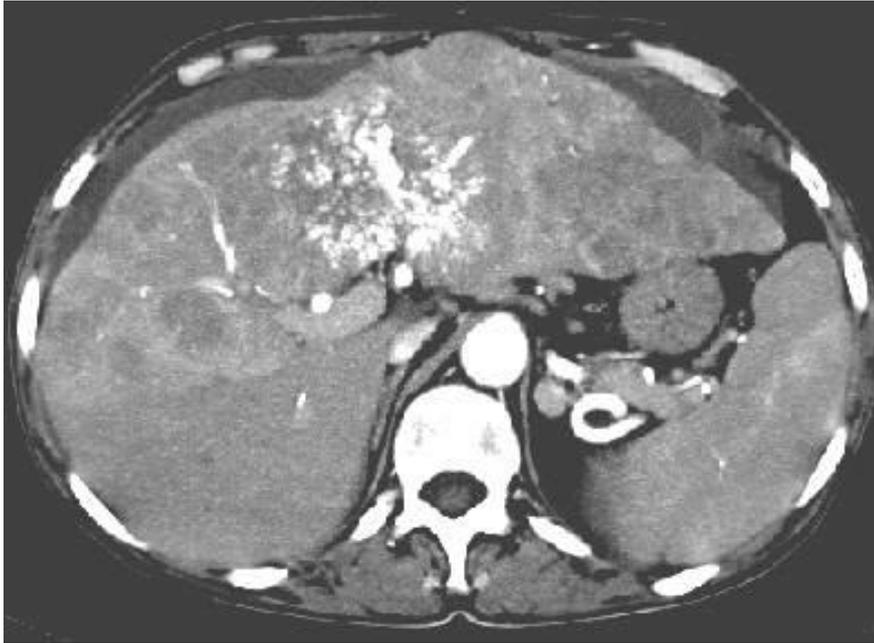


Abb 4. MIP-Abbildung eines hypervaskularisierten HCC (aus Thaiss et al Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041

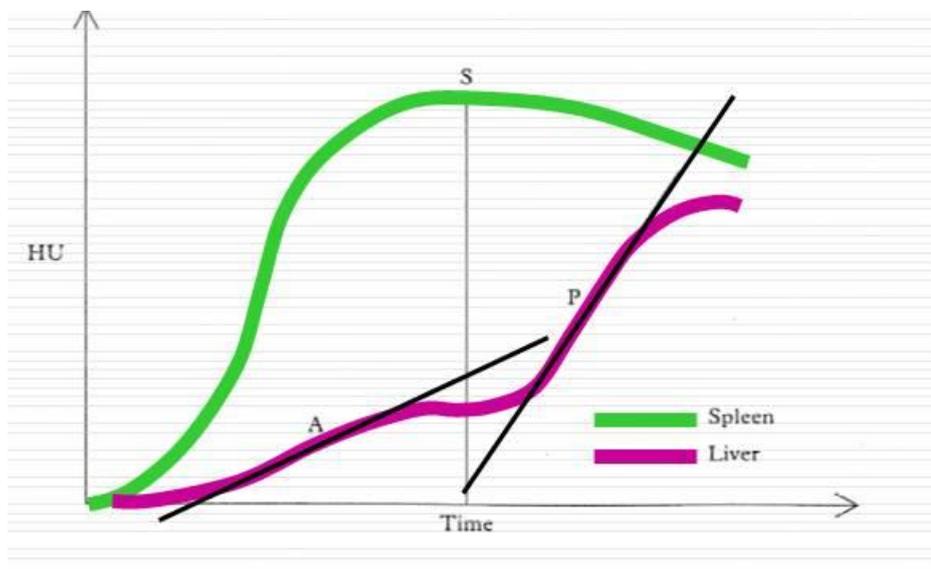


Abb.5 Grafik der Zeit-Dichte-Kurven für die A. hepatica (grüne Kurve) und der Pfortader (lila Kurve) die aufeinander angepasst (gefittet) werden. Daraus resultieren zwei verschiedenen Spitzenwerte für die beiden Gefäße mit Verdeutlichung des Zeitversatzes zwischen den beiden. (aus Thaiss et al Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041

## **2.5 Statistische Auswertung CT**

Die Statistiken wurden mit dem System Prism kalkuliert (GraphPad software, La Jolla, CA, USA), die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standard Abweichung (SD) dargestellt. Für Gruppenvergleiche wurde eine einfache Varianzanalyse mit Tukey Korrektur, für Korrelationen und ROC Pearson's r verwendet. Für alle Kalkulationen galten p-Werte  $< 0.05$  als signifikant.

## **2.6 statistische Auswertung Immunhistochemie**

Für die Reihung zweier Parameter wurde nach Mann-Whitney getestet, im Einwegsystem Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Wert errechnet HCC/Normalgewebe; CCC/Normalgewebe. Bei Parametern  $>2$  wurden Ranges und Signifikanzen nach Kruskal-Wallis gerechnet (Vergleich innerhalb des Normalgewebes, Gegenüberstellung normales Pankreas, chron. Pankreatitis und PDA). Als Software verwendeten wir SSPS (Superior Performing Software System, IBM)

### **3) Ergebnisse**

#### **3.1 Immunhistochemische Interpretation der TMAs allgemein**

Die immunhistologischen Ergebnisse an den TMAs wurden getrennt für die Entitäten HCC, CCC, chron. Pankreatitis, PDA und reguläres Pankreas ausgewertet. On-slide Kontroll-Biopsien lagen für HCC und CCC für jeden Patienten vor. PDAs, chronische Pankreatitis und reguläres Pankreas wurden als Kollektive verglichen. In HCC, und CCC waren nur vaskuläre Strukturen reagibel. In den Kollektiven reguläres Pankreas, chron. Pankreatitis, und PDA wurden vaskuläre und epitheliale Strukturen getrennt ausgewertet, wobei nur bei PDA Tumorzellen immunhistochemisch positiv reagierten, Gangstrukturen und Azini waren sowohl im regulären und inflammatorischen Pankreas, als auch, so repräsentiert, im PDA Kollektiv negativ. Fälle mit nur 1 beurteilbaren core (Tumor oder Normalgewebe) wurden mit einbezogen.

#### **3.2 Ergebnisse HCC TMA**

Es waren 81 von insgesamt 95 Fällen auf 2 verschiedenen TMAs HCC auswertbar, das Expressionsprofil war ausschließlich vaskulär, Tumorzellen waren nicht gefärbt. Das Kontrollmaterial lag in Form von normalem, fibrotisch und zirrhotisch verändertem Parenchym vor. Der IRS bei Normalgewebe und Fibrose reichte von 0-

6, bei Zirrhose von 0-4,6. Innerhalb dieser einzelnen Gruppen, waren keine unterschiedlichen Signifikanzen zu erkennen ( $p=0,065$ ). Beim HCC waren, vergleichbar dem klinischen Kollektiv, die Dichte und Intensität der VEGFR positiven endothelialen Strukturen deutlich erhöht (HCC score Mittelwert 3,576; Standardabweichung 1,77; range 0-8; Kontrolle score Mittelwert 2,202; Standardabweichung 1,5394; range 0-6). Die VEGFR-2 Expression war beim Tumorkollektiv signifikant gegenüber dem Kontrollkollektiv erhöht. ( $p<0,001$ ) (Abb 6-9)

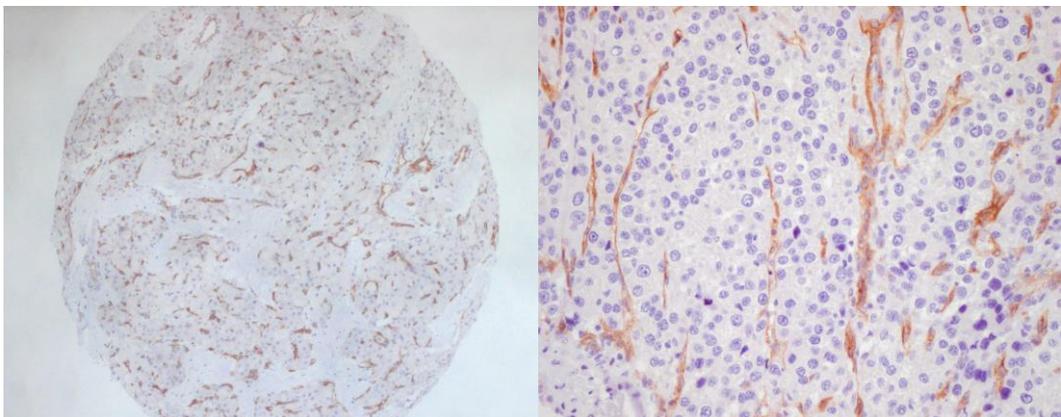


Abb.6 TMA HCC VEGFR-2 IRS9 (50x, 200x)

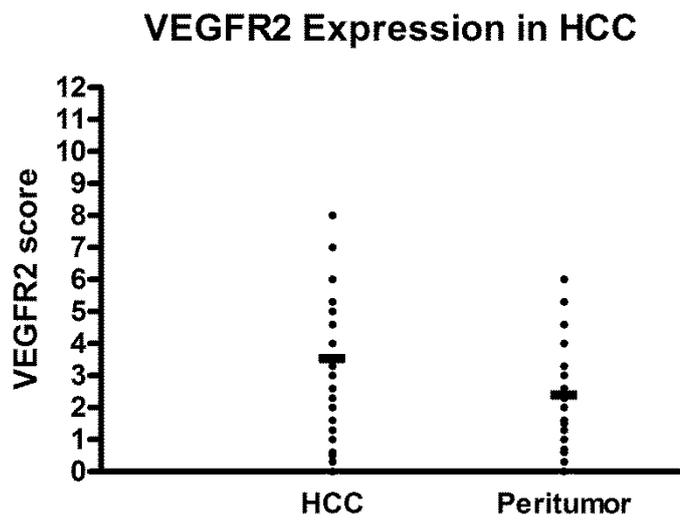


Abb.7 Starke VEGFR-2 Expression in HCC (Mittelwert 3,576)

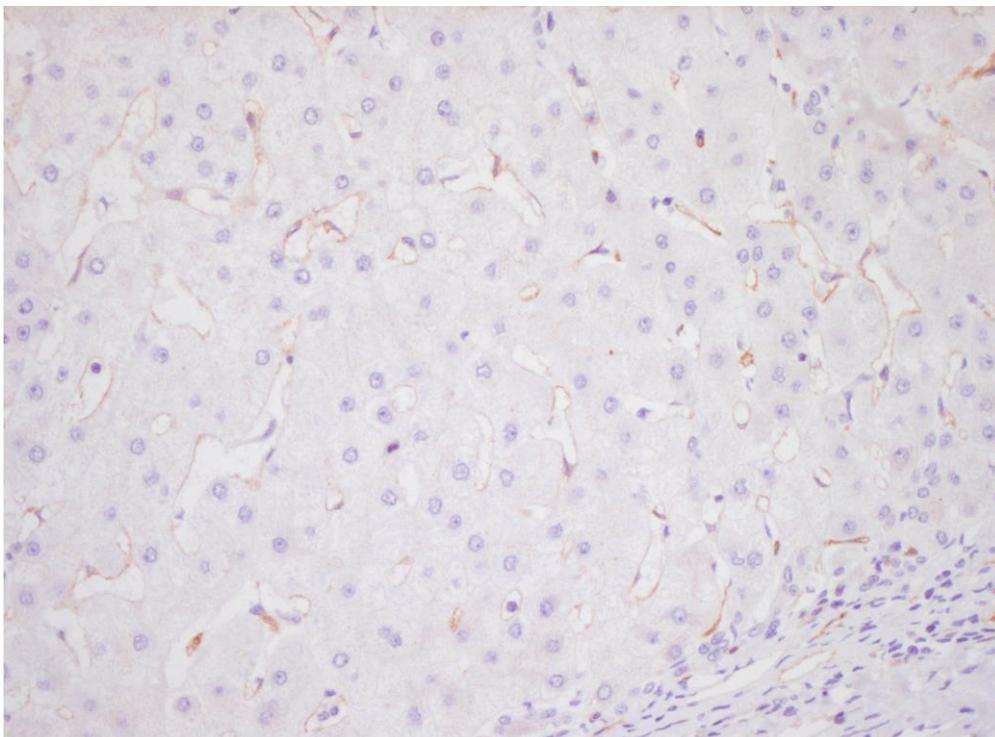


Abb.8 TMA Kontrolle Leber VEGFR-2 IRS 2

## VEGFR2 Expression in peritumoralem Gewebe

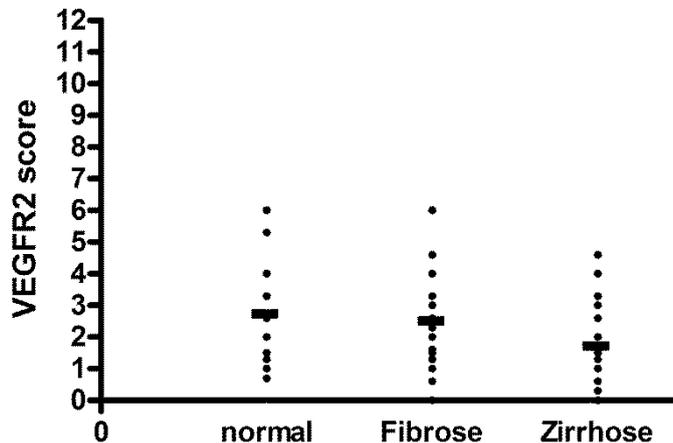


Abb.9 Kein signifikanter Unterschied der VEGFR-2 Expression in der Kontrollgruppe Leber

### 3.3 Ergebnisse CCC TMA

Alle 47 Fälle waren auswertbar, das Expressionsprofil im TMA CCC war ausschließlich vaskulär, Tumorzellen waren nicht angefärbt. Das Kontrollmaterial der Leber umfasste Normalgewebe, fibrotisches und zirrhotisches Leberparenchym und Areale mit Cholangitis. Signifikante Unterschiede waren nicht zu erkennen ( $p=0,276$ ). Der IRS des Kontrollgewebe lag signifikant über dem Tumorgewebe (CCC score Mittelwert 1,557; Standardabweichung 1,45; range 0-6; Kontrolle score Mittelwert 3,036; Standardabweichung 1,58; range 0-7;  $p<0,001$ ) (Abb. 10,11)

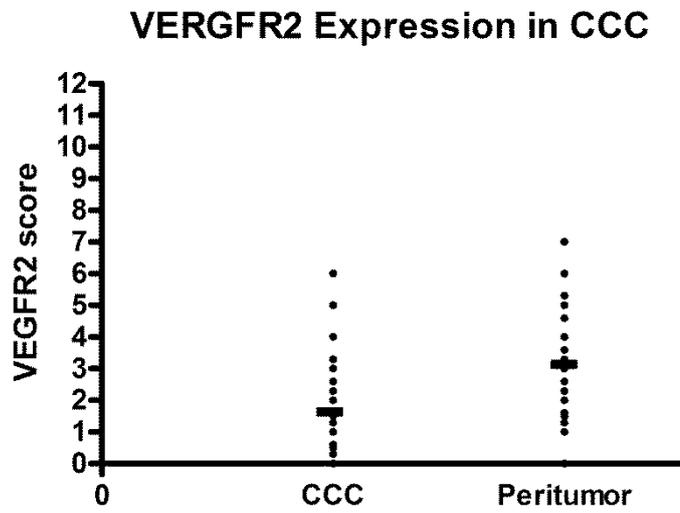


Abb.10 Signifikant erhöhte vaskuläre VEGFR-2 Expression im Kontrollgewebe Leber bei CCC (Mittelwert 3,036)

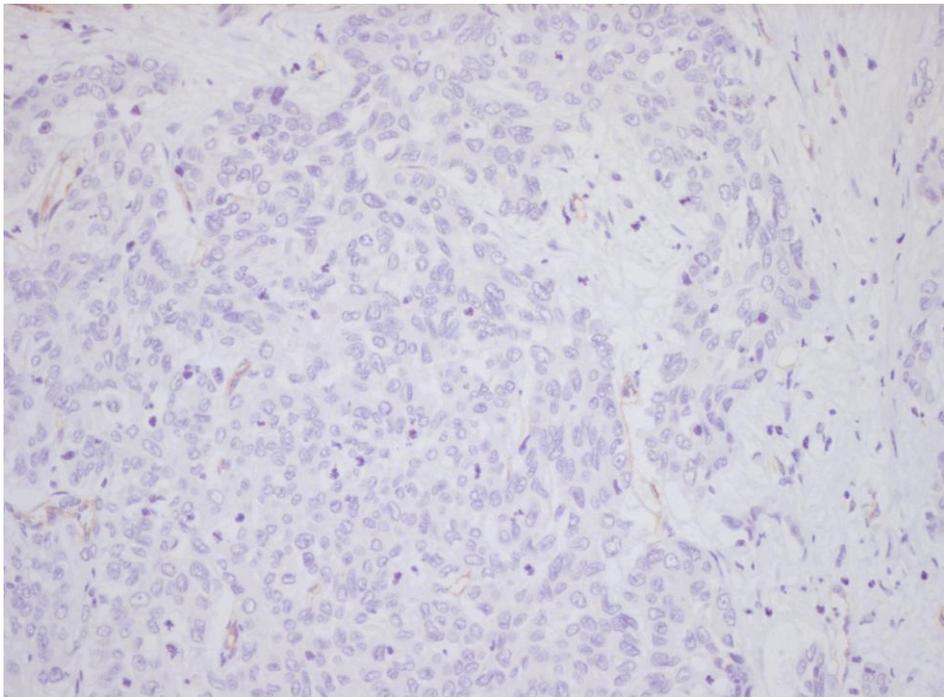


Abb.11 TMA CCC VEGFR-2 IRS 1

### 3.4 Ergebnisse PDA, CP, reguläres Pankreas, TMA

Die TMAs Pankreas wurden getrennt für Expressionsprofile Tumor und vaskulär begutachtet.

**TMA PDA:** 65 von 74 Fällen waren beurteilbar, Kontrollgewebe war nicht angelegt. Während reguläre Pankreasazini und Gangstrukturen nicht mit VEGFR 2 reagierten, konnte man zytoplasmatische Expression von Tumorzellen in PDAs erkennen. (PDA IRS score Mittelwert 2,10; Standardabweichung 2,22; range 0-8;  $p < 0,001$ ) (Abb.12,13). Der vaskuläre IRS/PDA wurde ebenso ausgewertet (IRS Mittelwert 2,87; Standardabweichung 2,23; range 0-9).

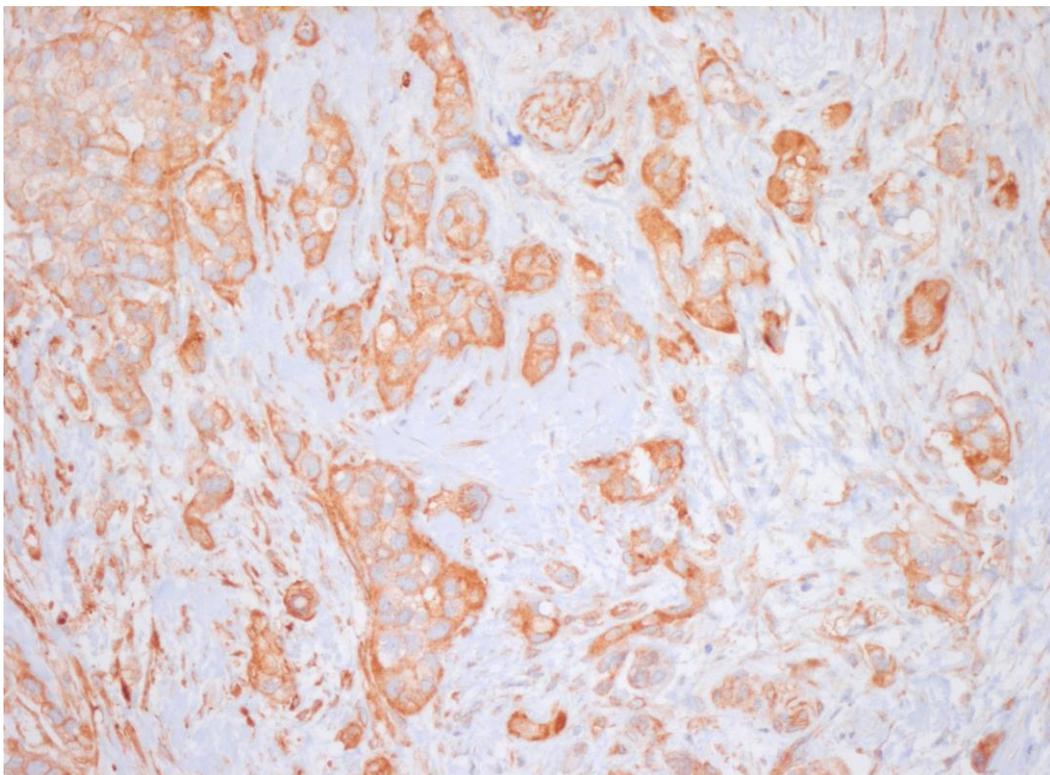


Abb.12: TMA PDA Starke Expression von VEGFR-2 in den Tumorzellen (IRS 8)

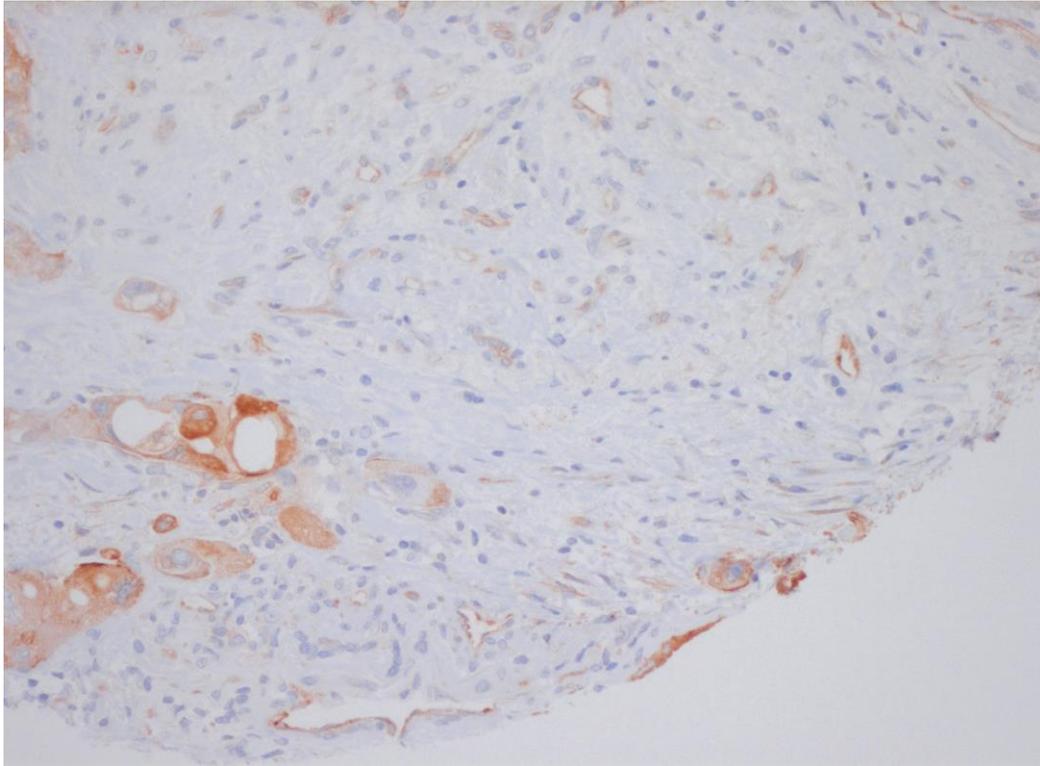


Abb. 13: TMA PDA schwächere VEGFR-2 Exp. von vaskulären Strukturen (IRS2)

**TMA CP:** Alle 24 Stanzen waren beurteilbar, Kontrollmaterial war nicht vorhanden, klinische Daten lagen nicht vor. Die vaskuläre Expression von VEGFR-2 war im Kollektiv der chronischen Pankreatitis am stärksten entwickelt (Abb.14, 15) (IRS Mittelwert 7,2; Standardabweichung 1,79; range 0-12).

**TMA reguläres Pankreas:** Alle 23 Stanzen waren beurteilbar, die Expression war ausschließlich vaskulär entwickelt (regulär IRS Mittelwert 4,37; Standardabweichung 2,21, range 0-9)(Abb.16).

**TMA Pankreas im Vergleich:** Der IRS des regulären Pankreas lag im Expressionsprofil über dem des PDA. Der IRS PDA lag am niedrigsten Die Expression des VEGFR-2 der chronischen Pankreatitis war signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ) (Abb.17)

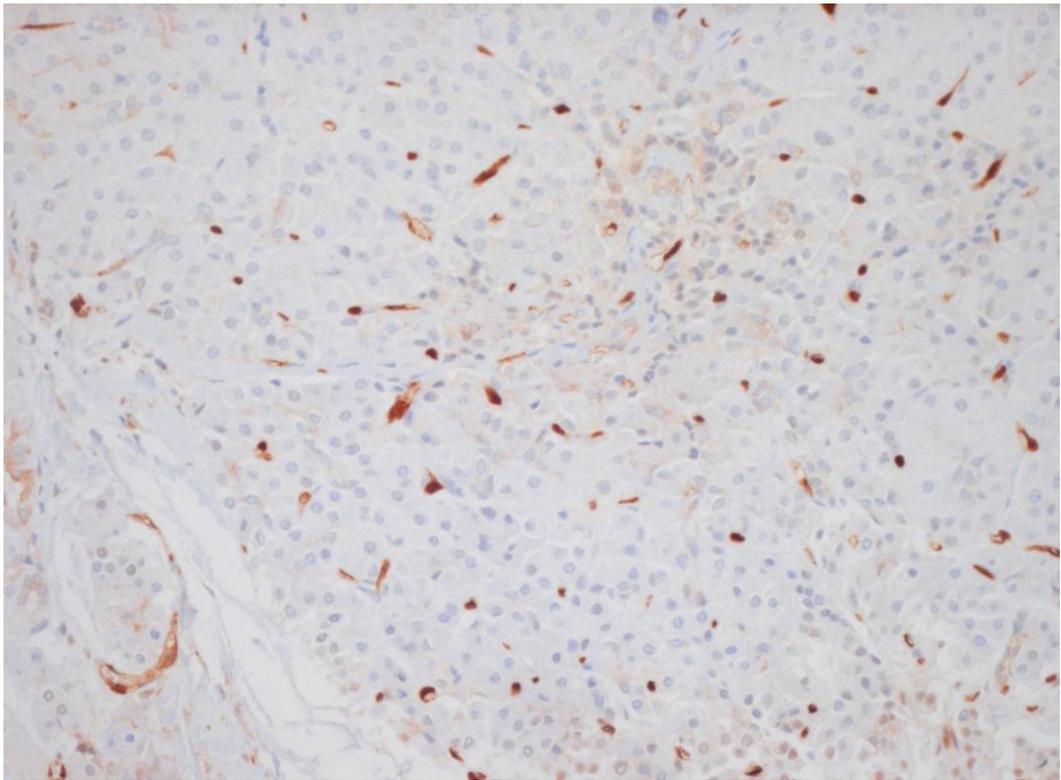


Abb.14 TMA CP VEGFR-2 IRS 9

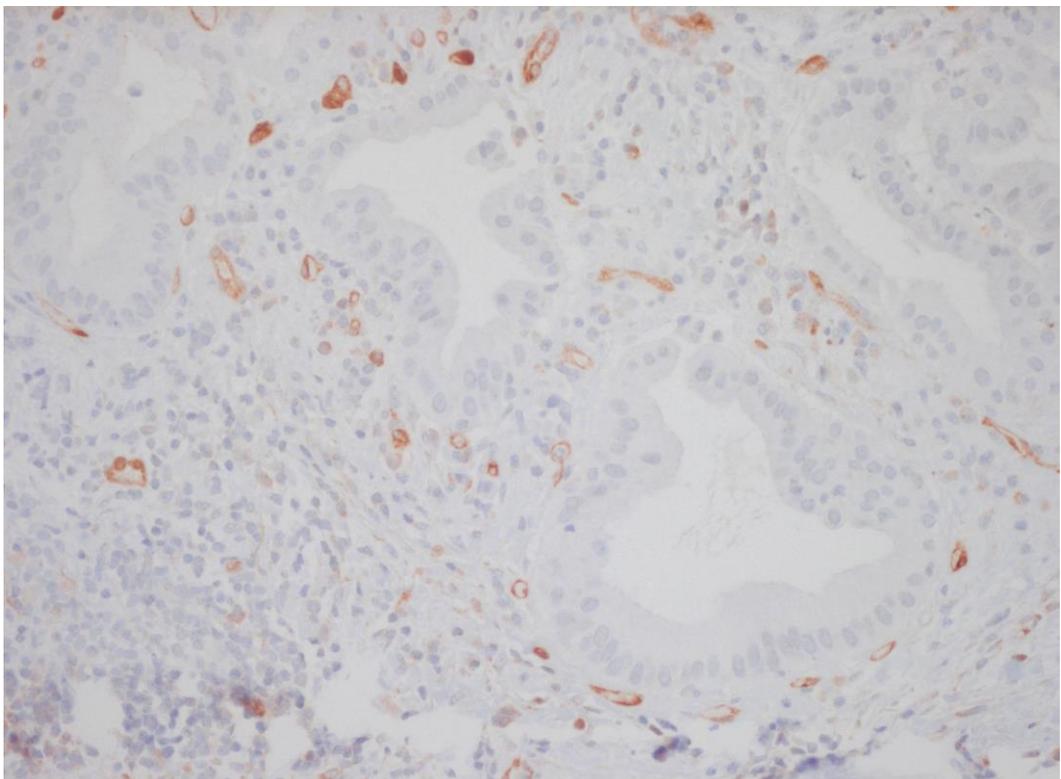


Abb.15 TMA CP VEGFR-2 IRS 6

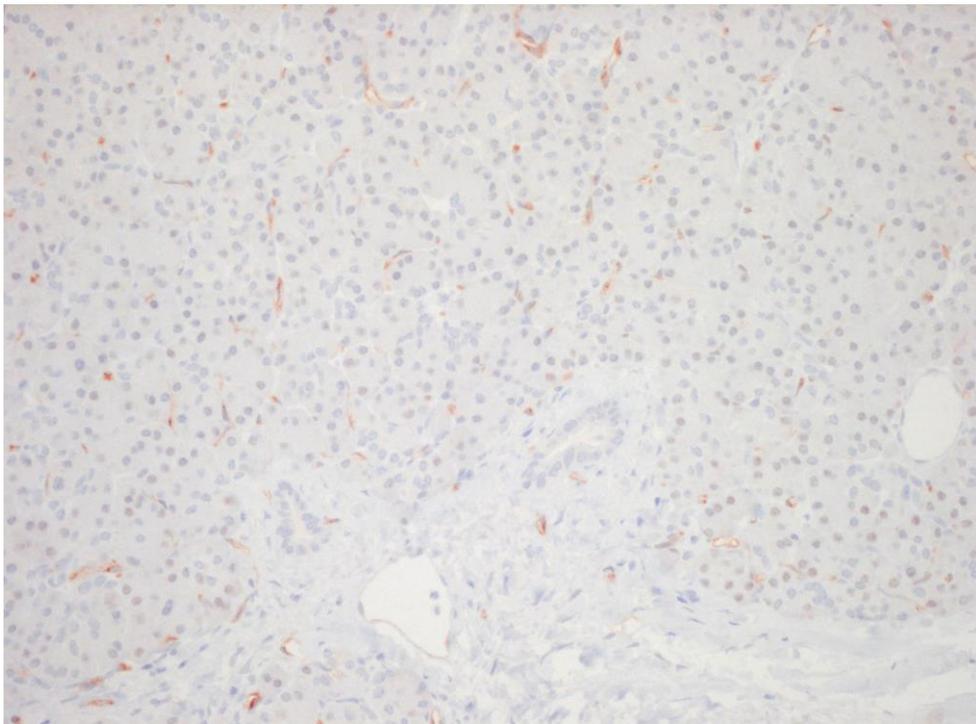


Abb.16 TMA Reguläres Pankreas, VEGFR-2 IRS 4

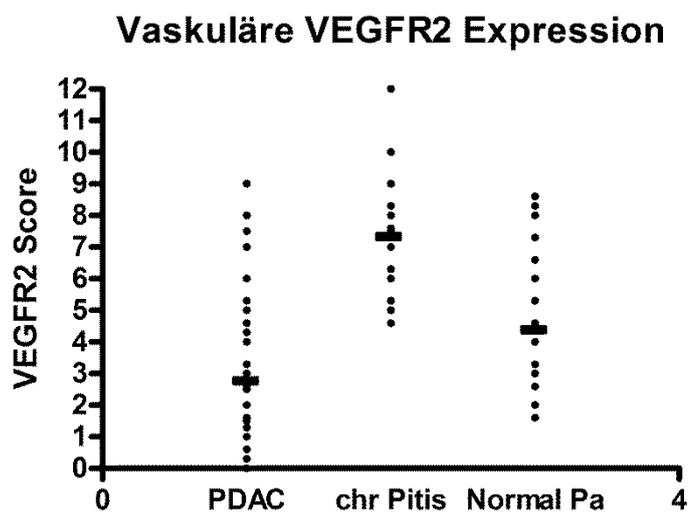


Abb. 17 signifikante Erhöhung des IRS VEGFR-2 bei CP (IRS Mittelwert 7,02)

### **3.5 Immunhistochemische Ergebnisse am klinischen Kollektiv (RLN, DLN, HCC)**

Alle Patienten wiesen histologische und morphologische Kriterien für eine Zirrhose der Leber auf. Ätiologisch waren Hepatitis C (N=11), Hepatitis B (n=4, ein Patient mit Hepatitis B und C), Alkoholabusus (n=12), NASH (n=1), primär biliäre Zirrhose (n=1) und kryptogene Zirrhose (n=6). Der Child Pugh Score verteilte sich folgendermaßen A = 13, B = 13, C = 4, nicht bekannt bei 4 Patienten.

Da mit Ganzschnitten gearbeitet wurde, konnten HCC, DLN und RLN am selben Schnitt nebeneinander beurteilt werden. Histologisch bestätigt wurden HCC (n = 10), dysplastischer Knoten (n = 7) und Regeneratknoten (n = 34). Die VEGFR-2 Färbung war ausschließlich vaskulär, Parenchymzellen färbten sich nicht. Immunhistologisch lag der durchschnittliche IRS/VEGFR-2 für HCC bei 9.1 (Standardabweichung 3.0), bei 7.3 (Standardabweichung 1.6) für DLN und bei 5.2 (Standardabweichung 2.8) für RLN ( $p = 0.0004$  für HCC vs. RLN;  $p = 0.06$  für HCC vs. DLN, nicht signifikant). (Abb.18,19)

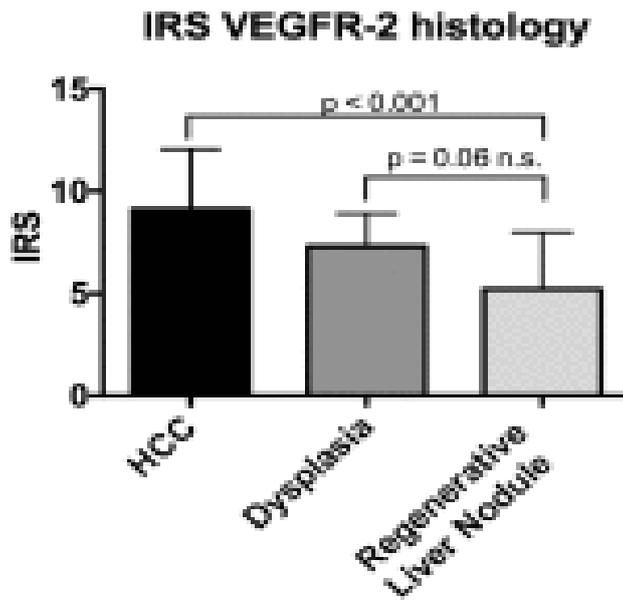


Abb.18 Signifikanter Expressionsunterschied VEGFR-2 RLN/HCC (aus Thaiss et al Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041)

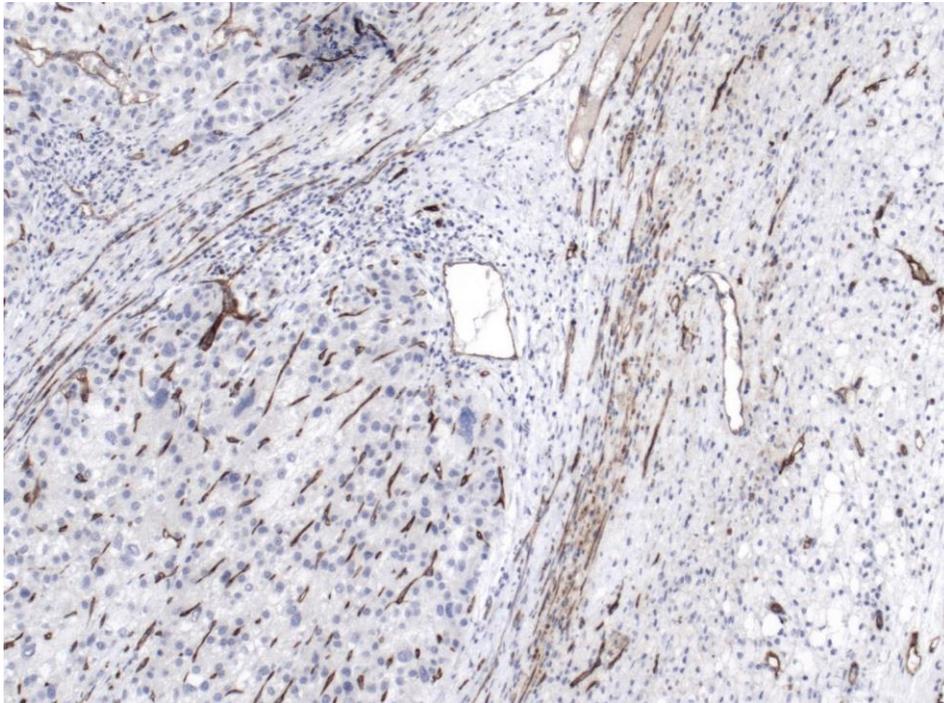


Abb.19 Zirrhrotische Leber VEGFR-2 IRS 4; HCC IRS 9 (aus Thaiss et al Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041)

### 3.6 Vergleich CT/Immun

#### Korrelation IRS/ DCE-CT (oder VPCT) Perfusionsparameter

Unter der Annahme eines direkten Zusammenhanges von VEGFR-2 Expression und Perfusionseigenschaften des nodulären Läsionen der Leber wurden die Ergebnisse der DCE-CT (oder VPCT) Perfusion mit den immunhistochemischen Ergebnissen an den Schnittpräparaten korreliert. Signifikante Korrelation wurde zwischen blood flow und VEGFR-2-IRS Ergebnissen bei HCCs beobachtet ( $r = 0.88$ ,  $p < 0.01$ ). Beim dyplastischen Knoten war diese Korrelation nicht signifikant ( $r = 0.84$ ,  $p = 0.16$ ). Hingegen korrelierte der hepatische Perfusionsindex (HPI) bei in HCC und DLN mit dem IRS ( $r = 0.85$ ,  $p < 0.04$  für HCC und  $r = 0.9$ ,  $p < 0.01$  für DLN). Inverse Korrelationen wurden zwischen portaler venöser Perfusion PVP und IRS für HCC und DLN beobachtet ( $r = -0.79$ ,  $p = 0.05$  für HCC und  $r = -0.99$ ,  $p = 0.006$  für DLN). IRS von Regeneratknotten (RLN) korrelierten nicht mit den entsprechenden Perfusionsdaten (Abb.20)

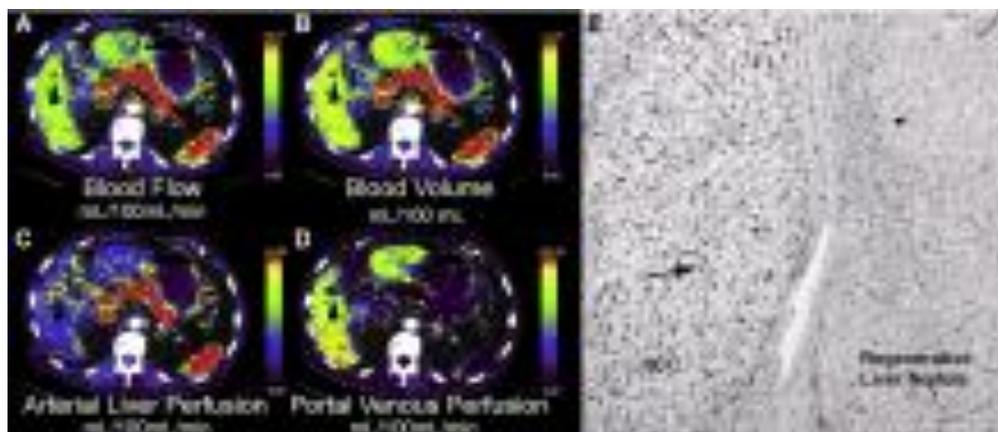


Abb.20 Fokale Leberläsion mit erhöhtem BF, BV sowie ausschließlich arterieller Versorgung (Pfeil, ALP) und korrespondierend fehlender Versorgung über die Pfortader (PVP) (aus Thaiss et al Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041)

### **Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Analyse)**

Basierend auf diesen Ergebnissen gehen wir davon aus, dass anhand der quantitativen Parameter des DCE-CT (oder VPCT) eine differentialdiagnostische Aussage hinsichtlich Unterscheidung DLN oder HCC versus RLN möglich sei. Die Histologie als diagnostischer Goldstandard vorausgesetzt ergab sich eine Sensitivität/Spezifität für HPI von >46.75% und 90.0%/96.9% (Wahrscheinlichkeitsquotient 29.7, AUC 0.99) und für BF von >41.2 ml/100 ml/min von 100%/97.1% (Wahrscheinlichkeitsquotient 34.0, AUC 0.98).

### **3.7 Vergleich CT DCE-CT Parameter**

Die mittlere Größe der benutzten ROIs war  $3.1 \pm 2.3 \text{ cm}^2$  (Spanne, 0.8–6.4  $\text{cm}^2$ ); für die DLN Gruppe  $2.3 \pm 1.1 \text{ cm}^2$  (Spanne, 1.4–3.7  $\text{cm}^2$ ) und für die RLN Gruppe  $2.9 \pm 1.8 \text{ cm}^2$  (Spanne, 1.2–6.4  $\text{cm}^2$ ). Die Perfusionsparameter haben eine mittlere BF von  $73.3 \pm 22.1 \text{ ml/100 ml/min}$ , mittlere BV von  $15.3 \pm 3.6 \text{ ml/100 ml}$  und ALP von  $49.4 \pm 15.9 \text{ ml/100 ml/min}$ , PVP  $1.4 \pm 1.8 \text{ ml/100 ml/min}$  und HPI von  $97.8 \pm 3.0\%$  ergeben. Für DLN BF war  $46.3 \pm 3.4 \text{ ml/100 ml/min}$ , BV  $13.8 \pm 1.0 \text{ ml/100 ml}$ , ALP  $40.9 \pm 9.3 \text{ ml/100 ml/min}$ , PVP  $26.7 \pm 23.5 \text{ ml/100 ml/min}$  und HPI von  $74.4 \pm 18.4\%$ ; RLN haben BF Werte von  $27.7 \pm 9.5 \text{ ml/100 ml/min}$ , durchschnittlich BV von  $5.7 \pm 4.4 \text{ ml/100 ml}$ , ALP  $13.2 \pm 5.8 \text{ ml/100 ml/min}$ , PVP  $67.7 \pm 34.2 \text{ ml/100 ml/min}$  und HPI von  $17.8 \pm 9.3\%$  ergeben.

## **4) Diskussion**

### **4.1 Studienziel: VEGFR-2 Expression in HCC, CCC, CP, PDA und regulärem Pankreasparenchym**

Ziel der hier vorgelegten Studie war die quantitative Darstellung von Endothel- assoziiertem VEGFR-2 in:

1)HCC im Vergleich zu zirrhotischem, fibrotischem und regulärem Leberparenchym

2)CCC im Vergleich zu zirrhotischem, fibrotischem, cholangitischem und regulärem Leberparenchym

3)PDA, CP und regulärem Pankreasparenchym im Vergleich zueinander

Als Basis diene die Publikation von Thaiss et al, welche die Umsetzbarkeit immunhistochemischer VEGFR-2 Expressionsprofile auf dynamisches kontrastmittelangereichertes CT beschreibt [23]

### **4.2. Immunhistochemische Expression von VEGFR-2 in hepatozellulären Läsionen**

VEGFR-2 ist ein gut reproduzierbarer immunhistochemischer Marker für die Neovaskularisation im Rahmen der Tumorentstehung und Tumorausbreitung [1] Tumore mit ausgeprägter Angiogenese zeigen ein entsprechend verstärktes

Expressionsprofil, wobei beim HCC die diese Eigenschaft als differentialdiagnostisches Kriterium gegenüber benignen Läsionen herangezogen wird. Endothelmarker wie CD34 finden daher für die Dignitätseinschätzung hepatozellulärer Läsionen in der Histologie häufige Anwendung. Analog zu CD34 färbt VEGFR-2 Endothelzellen, markiert aber hier spezifisch induzierte VEGF Rezeptoren, die bei hepatozellulären Neubildungen verstärkt gebildet werden [18, 35]. Daraus leiten sich je nach Färbemuster, zytoplasmatisch tumorassoziiert oder vaskulär, einerseits differentialdiagnostische Überlegungen, aber auch Expressionsprofile für den Einsatz von Antikörpern oder Inhibitoren ab. Bisher wurde die Expression von VEGFR-2 beim HCC überwiegend unter therapeutischen Aspekten untersucht. Diese Studien beziehen sich fast ausschließlich auf die zytoplasmatische VEGFR-2 Expression von Tumorzellen, wobei hier andere Antikörper in der immunhistochemischen Färbung oder andere VEGFR-2 Nachweismethoden, wie RNA Extraktion, verwendet wurden [3, 4, 20, 36, 37]. Zytoplasmatische Expression wurde bei der Analyse der TMAs HCC nicht beobachtet und war auch beim klinischen Kollektiv nicht entwickelt. Ein Vergleich mit anderen kommerziell erhältlichen immunhistochemisch anwendbaren VEGFR-2 Antikörpern wurde nicht untersucht.

Die hier durchgeführte Studie hatte ausschließlich die immunhistochemische VEGFR-2 Expression in den Sinus und den vaskulären Strukturen zum Ziel. Die differentialdiagnostische Problematik bei HCCs stellt sich histologisch in der Abgrenzung von dysplastischen Knoten und Regeneratknoten bei zirrhotischen Lebern insbesondere bei Vorliegen kleiner Läsionen im Stanzpräparat. Endothelialisierung von hepatischen sinus gilt als immunmorphologisches Kriterium

für Malignität. Trotz dieses Antikörpereinsatzes bleiben einzelne Fälle in der Differentialdiagnose unklar, da auch DLN als Vorstufe zum HCC CD34 als Endothelmarker exprimieren können. Der immunhistochemische Einsatz von VEGFR-2 hat in einer ersten Studie eine kontinuierliche Zunahme von VEGFR-2 exprimierenden Endothelien bei Regeneratknoten, dysplastischen Knoten und HCCs gezeigt, allerdings signifikant nur in der Abgrenzung gegenüber RLN versus DLN und HCC [23]. Diese Studie mit 54 Patienten wurde mit der hier durchgeführten Untersuchung anhand einer größeren Fallzahl mit insgesamt 81 Patienten (2 TMAs zu 48 bzw. 31 Patienten) ergänzt. Wir fanden eine für HCCs gültige signifikante erhöhte Expression von VEGFR ( $p < 0,001$ ), in der Kontrollgruppe ergaben sich keine relevanten Unterschiede.

Die Ergebnisse spiegeln das Konzept der zunehmenden Vaskularisierung in der Entwicklung des HCC wider. Diese postuliert eine zunehmende Verschiebung der Blutversorgung von Leberherden von prädominant portal-venös nach arteriell aufgrund der Tumor-assoziierten Angiogenese, beginnend bei low grade DLN, high grade DLN, hin zu HCC G1 und HCC G2 [38]. Die praktische Bedeutung davon liegt in der besseren Unterscheidbarkeit zwischen HCC, DLN und RLN, mit entsprechenden Auswirkungen auf bildgebende Diagnostik und Behandlungsstrategien. DLN gelten als prä-maligne Läsionen von HCCs, somit hat die Abgrenzung von RLN klinische Relevanz [36].

### **4.3 Immunhistochemische Expression von VEGFR-2 in intrahepatischen cholangiozellulären Läsionen**

Histomorphologisch fallen intrahepatische CCCs in die Gruppe der hepatobiliären Karzinome, und sind somit morphologisch ident mit extrahepatischen Gallengangskarzinomen und metastasierten duktaalen Pankreaskarzinomen . Die Differentialdiagnose HCC versus CCC in zirrhotischen Lebern ist histologisch und radiologisch in Einzelfällen nicht immer eindeutig. Non-biliäre Leberzirrhose ist ein Risikofaktor für CCCs, wenngleich in geringerem Ausmaß als bei HCCs. Das Konzept der zunehmenden Vaskularisierung bei HCCs hat uns daher veranlasst, diese in der zweitgrößten Kohorte hepatischer Neubildungen, dem CCC, zu untersuchen. Entgegen den Ergebnissen beim HCC, war das Kollektiv CCC signifikant hypovaskularisiert im Vergleich zum HCC (IRS/Mittelwert des Kontrollgewebes 3,036 versus IRS Mittelwert Tumor 1,557). Bei differentialdiagnostischen Grenzfällen zwischen HCC und CCC ist zunehmende Endothelialisierung u.a. ein diskriminierender Faktor und somit eine potentielle Einsatzmöglichkeit für VEGFR-2 Immunhistochemie, hier sind weitere Untersuchungen abzuwarten. Histomorphologisch sind intrahepatische CCCs in zirrhotischen und nicht-zirrhotischen Lebern gleichartig aufgebaut, weisen insgesamt aber meist einen deutlich höheren Stroma- und Fasergehalt im Vergleich zum HCC auf.

Zytoplasmatische VEGFR-2 Expression in Tumorzellen fanden wir in dem uns zur Verfügung stehenden Kollektiv nicht. Vergleichbare Untersuchungen gibt es nicht, nur eine einzige Studie orientierte sich an der VEGFR-2 Tumorzellexpression von CCCs in Zellkulturen in Hinblick auf Therapiemöglichkeiten mit Bevacizumab, diese waren immunhistochemisch negativ [9].

#### **4.4 Immunhistochemische Expression von VEGFR-2 in chronischer Pankreatitis, ductalem Pankreaskarzinom und regulärem Pankreas.**

Die immunhistochemische VEGFR-2 Expression wurde in einigen Studien an Tumorzellen von duktalem Pankreaskarzinomen unter funktionellen und therapeutischen Aspekten untersucht [5, 6, 12]. Im Gegensatz zu den Entitäten CCC und HCC fanden wir eine zytoplasmatische Expression von VEGFR-2 in den Tumorzellen, während Epithelien von Azini und Gängen des regulären Pankreas negativ blieben (IRS Mittelwert 2,1;  $p < 0,001$ ). Doi untersuchte Zelllinien von duktalem Pancreaskarzinomen und fand bei 50% eine immunhistochemische Expression. Diese war mit extrapancreatischer Ausbreitung und schlechter Prognose assoziiert. Er wies in seiner Studie auf die synchrone Expression in Tumorzellen und Gefäßen hin, wobei er endotheliale Expressionsmuster nicht näher fokussierte [6]. Auch Büchler beschrieb eine VEGFR-2 Expression von Pankreaskarzinomzellen in mehr als 50% und leitete aus vermehrter Expression verstärktes Invasions- und Migrationsverhalten ab [39]. In unserem Kollektiv fanden wir nur wenig Endothel-assoziierte Expression von VEGFR-2 bei Pankreaskarzinomen, diese lag mit einem Durchschnittswert von 2,87 IRS/Mittelwert unter jenem regulären Parenchyms mit 4,37 IRS/Mittelwert.

Die chronische Pankreatitis gilt als Risikofaktor für duktales Pankreaskarzinome. Auf die Endothel-assoziierte VEGFR-2 Expression in chronischer Pankreatitis und in normalem Pankreas wird in einem review von Nandy [2] näher eingegangen, hier sind verstärkte immunhistochemische Expressionsprofile nicht beschrieben.

Erhöhte vaskuläre VEGFR-2 Expression wird hier als Eigenschaft von duktalem Pankreaskarzinomen beschrieben. In unserem Kollektiv war die vaskuläre Expression von VEGFR-2 bei chronischer Pankreatitis signifikant gegenüber Karzinom und regulärem Parenchym erhöht (IRS Mittelwert 7,2;  $p < 0,001$ ). Diese Beobachtung fanden wir nicht nur in Arealen von floridem Granulationsgewebe, sondern auch in Arealen mit relativ geringer entzündlicher Beteiligung und beginnender Vernarbung.

#### **4.5 Immunhistochemische Ergebnisse und klinische Vergleichbarkeit in bildgebenden Verfahren**

VEGFR-2 als tracer für bildgebende Verfahren (Ultraschall) wurde bereits versuchsweise im Tiermodell bei dysplastischen Knoten der Leber und beim Pankreaskarzinom eingesetzt [21, 40]. Das Modell einer VEGFR-2 assoziierten verstärkten Arterialisierung mit entsprechender quantitativer Darstellung im dynamischen Kontrastmittel-CT als indirektes VEGFR-2 Messparameter bei hepatozellulären Läsionen wurde vor kurzem publiziert [23]. Derzeit liegen noch keine Daten vor, inwieweit die in dieser Studie gefundenen immunhistochemischen VEGFR-2 Expressionsmuster bei CCCs, PDAs und CP auf entsprechende bildgebende Verfahren umsetzbar sind.

In der Studie von Thaiss [23] wurden Perfusionsparameter bei HCCs und deren Vorläuferläsionen (DNLs und RNLs) mit DCE-CT (oder VPCT) untersucht und mit den immunhistochemischen VEGFR-2 Expressionsprofilen/IRS score korreliert. Die Ergebnisse bestätigen eine signifikant erhöhte VEGFR-2 Expression in HCCs, in

geringerem Ausmaß auch in DLNs im Vergleich zu Regeneratknoten. Ebenso waren die Spitzenwerte der meisten gemessenen Perfusionsparameter (Blutfluss, Blutvolumen, arterielle Leberperfusion und hepatischer Perfusionsindex) in HCCs und DLNs höher als die in RLNs aufgezeichneten. Diese Ergebnisse entsprechen früher publizierten Daten, bei denen höhere VEGFR-2 Expressionen in Tumorzellen und tumorassoziierten Gefäßen im Vergleich zum Normalgewebe beschrieben wurden [35, 41]. Nakamura et al. beobachteten diffuse VEGFR-2 Expression in dysplastischen Hepatocyten zugleich mit verstärkter Kapillarisation. Noch wesentlich deutlicher stellte sich die Endothelialisierung von HCCs dar, während im Vergleich die VEGFR-2 Expression des umgebenden Parenchyms negativ blieb [36]

Bisher waren VEGFR-2- Messungen im Gewebe mit invasiven Verfahren verknüpft, und es stellte sich die Frage nach äquivalenten non invasiv gewonnenen Parametern, mit einer der Immunhistochemie vergleichbaren Ergebnisqualität. Eine entsprechende Alternative stellt das bereits etablierte DCE-CT (oder VPCT) dar, dieses könnte wegen der Genauigkeit seiner quantitativen Messmethoden invasive VEGFR-2 Quantifizierung ersetzen. Im Rahmen dieses spezifischen Modells bestätigten unsere Ergebnisse eine Korrelation zwischen den Markern VEGFR-2-expression, Blutfluss und hepatischer Perfusionsindex, und dem Ausmaß der Tumorarterialisierung bei HCCs, bzw. zwischen HPI und DLN. Auf RLN war diese Korrelation nicht anwendbar. Entsprechend fanden wir eine inverse Korrelation zwischen portal-venöser Perfusion und VEGFR-2-IRS bei HCC und DLN. Anhand dieser Ergebnisse könnten VEGFR-2 gelabelte Kontrastmittel, z.B. im Ultraschall, zu einer spezifischeren Differentialdiagnostik nodulärer Läsionen in zirrhotischen

Lebern beitragen. [40, 42]. Der Höhe der VEGFR-2-Expression in der Leber wird prognostische Bedeutung zugemessen, da deutlichere VEGFR-2 Expression bei aggressiveren Tumoren beschrieben ist, und ein erhöhtes Risiko für Fernmetastasen besteht [32].

Serum VEGFR-2 wurde bereits erfolgreich als Response-Parameter bei Patienten nach transarterieller Chemoembolisation (TACE) verwendet [43].

#### **4.6. Therapeutische Aspekte der vaskulären VEGFR-2 Expression**

VEGFR-2 ist bereits als target in der Tumorthherapie im Einsatz. [44]. Die nicht-invasiven Bestimmung der VEGFR-2 Expression gewinnt hinsichtlich Vorauswahl potentiell geeigneter Patienten für entsprechende Therapien eine zunehmende Bedeutung. VEGFR-2 Bestimmung wäre somit auch ein Parameter für ein sensitives response-monitoring.

Die hier präsentierten Daten unterstützen die Theorie, dass Perfusionsparameter wie Blutfluss oder hepatischer Perfusionsindex für die Risikostratifikation von Leberherden geeignet sind, da Werte  $>41.2$  mL/100 mL/min für BF and HPI  $>46.75\%$  hohe Sensitivität und Spezifität für die Differenzierung von DLN und HCC gegenüber RLN aufwiesen.

Analoge Untersuchungen für CCC und PDA existieren bis dato nicht.

## 5 Zusammenfassung

Der immunhistochemische Einsatz von VEGFR-2 diskriminiert zwischen hyper- und hypovaskularisierten Tumoren. Die zunehmende Arterialisierung bei der Genese von HCC ließ sich anhand signifikanter Zunahme der VEGFR-2 Expression darstellen. CCCs und PDAs waren bei Färbung mit VEGFR-2 hypovaskularisiert. Ebenso wie in der Studie von Thaiss [23] war die hier vorliegende Untersuchung retrospektiv ausgerichtet und konnte nicht mit aktualisierten klinischen Daten verglichen werden.

Das retrospektive Studiendesign im klinischen Kollektiv [23] und die relative geringe Fallzahl von DEC-CTs mit konsekutiver Histologie ohne unmittelbare Therapie oder initialem MRI vor Therapie schränkten die Aussagekraft der vorliegenden Studie etwas ein. Zusammenfassend fanden wir für HCC, DLN, RLN unterschiedliche VEGFR-2 Expressionsmuster, die gut mit nicht invasiven Perfusionsparametern bei Anwendung eines DCE-CT (oder VPCT) korrelierten. Beide Parameter ermöglichten somit eine Unterscheidung zwischen HCC und seinen Vorläuferläsionen, und sind auf Grund ihrer engen Korrelation für den Einsatz und als monitoring im Rahmen einer VEGFR-2-targeted therapy geeignet.

Inwieweit die Anwendung beider Parameter bei der Differentialdiagnose HCC/CCC in zirrhotischen Lebern und für die Beurteilung von cholangiozellulären Läsionen in der Leber herangezogen werden kann, bleibt abzuwarten.

Bei der chronischen Pankreatitis als Vorläuferläsion des duktales Pankreaskarzinomes war eine signifikant erhöhte Vaskularisierung zu erkennen, allerdings bezogen sich diese Ergebnisse auf flächenmäßig kleine TMAs. Diese Beobachtung muss in einer weiteren Studie mit regulären Schnittpräparaten verglichen werden, zumal duktales Pankreaskarzinome in unserer Untersuchung eindeutig hypovascularisiert waren. Bisher gibt es noch keinen Vergleich mit DCE-CT (oder VPCT) in Analogie zu den Ergebnissen beim HCC.

## Literatur

1. Takahashi, T., H. Ueno, and M. Shibuya, *VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells*. *Oncogene*, 1999. **18**(13): p. 2221-30.
2. Nandy, D. and D. Mukhopadhyay, *Growth factor mediated signaling in pancreatic pathogenesis*. *Cancers (Basel)*, 2011. **3**(1): p. 841-71.
3. Chen, J., et al., *Potential molecular, cellular and microenvironmental mechanism of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma*. *Cancer Lett*, 2015. **367**(1): p. 1-11.
4. Peng, S., et al., *Autocrine vascular endothelial growth factor signaling promotes cell proliferation and modulates sorafenib treatment efficacy in hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2014. **60**(4): p. 1264-77.
5. Zhou, R., et al., *A novel association of neuropilin-1 and MUC1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role in induction of VEGF signaling and angiogenesis*. *Oncogene*, 2016. **35**(43): p. 5608-5618.
6. Doi, Y., et al., *VEGF-A/VEGFR-2 signaling plays an important role for the motility of pancreas cancer cells*. *Ann Surg Oncol*, 2012. **19**(8): p. 2733-43.

7. Sang, H., et al., *Gab1 regulates proliferation and migration through the PI3K/Akt signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(11): p. 8367-77.
8. Sang, H., et al., *Down-regulation of Gab1 inhibits cell proliferation and migration in hilar cholangiocarcinoma*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e81347.
9. Vaeteewoottacharn, K., et al., *Inhibition of carbonic anhydrase potentiates bevacizumab treatment in cholangiocarcinoma*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(7): p. 9023-35.
10. Maj, E., D. Papiernik, and J. Wietrzyk, *Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review)*. *Int J Oncol*, 2016. **49**(5): p. 1773-1784.
11. Bruix, J., M. Reig, and M. Sherman, *Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(4): p. 835-53.
12. Martinez-Bosch, N., et al., *The pancreatic niche inhibits the effectiveness of sunitinib treatment of pancreatic cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(30): p. 48265-48279.
13. Kaseb, A.O., et al., *Phase II trial of bevacizumab and erlotinib as a second-line therapy for advanced hepatocellular carcinoma*. *Onco Targets Ther*, 2016. **9**: p. 773-80.
14. Awasthi, N., et al., *Evaluation of poly-mechanistic antiangiogenic combinations to enhance cytotoxic therapy response in pancreatic cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38477.
15. Torimura, T., et al., *Antiangiogenic and Antitumor Activities of Aflibercept, a Soluble VEGF Receptor-1 and -2, in a Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma*. *Neoplasia*, 2016. **18**(7): p. 413-24.
16. Kudo, M., et al., *Ramucirumab as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Japanese subgroup analysis of the REACH trial*. *J Gastroenterol*, 2016.
17. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. *CA Cancer J Clin*, 2014. **64**(1): p. 9-29.
18. Hanna, R.F., et al., *Cirrhosis-associated hepatocellular nodules: correlation of histopathologic and MR imaging features*. *Radiographics*, 2008. **28**(3): p. 747-69.
19. Sia, D., et al., *VEGF signaling in cancer treatment*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(17): p. 2834-42.
20. Kwon, J.H., et al., *Actionable gene expression-based patient stratification for molecular targeted therapy in hepatocellular carcinoma*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e64260.
21. Pysz, M.A., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor type 2-targeted contrast-enhanced US of pancreatic cancer neovasculature in a genetically engineered mouse model: potential for earlier detection*. *Radiology*, 2015. **274**(3): p. 790-9.
22. Stantz, K.M., et al., *Monitoring the longitudinal intra-tumor physiological impulse response to VEGFR2 blockade in breast tumors using DCE-CT*. *Mol Imaging Biol*, 2011. **13**(6): p. 1183-95.
23. Thaïss, W.M., et al., *VEGFR-2 expression in HCC, dysplastic and regenerative liver nodules, and correlation with pre-biopsy Dynamic Contrast Enhanced CT*. *Eur J Radiol*, 2016. **85**(11): p. 2036-2041.
24. Davarpanah, A.H. and J.C. Weinreb, *The role of imaging in hepatocellular carcinoma: the present and future*. *J Clin Gastroenterol*, 2013. **47 Suppl**: p. S7-10.
25. Ippolito, D., et al., *Hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver disease: functional computed tomography with perfusion imaging in the assessment of tumor vascularization*. *Acad Radiol*, 2008. **15**(7): p. 919-27.
26. Kambadakone, A.R. and D.V. Sahani, *Body perfusion CT: technique, clinical applications, and advances*. *Radiol Clin North Am*, 2009. **47**(1): p. 161-78.

27. Miles, K.A., *Perfusion CT for the assessment of tumour vascularity: which protocol?* Br J Radiol, 2003. **76 Spec No 1**: p. S36-42.
28. Miles, K.A., et al., *Application of CT in the investigation of angiogenesis in oncology.* Acad Radiol, 2000. **7**(10): p. 840-50.
29. Petralia, G., et al., *CT perfusion in solid-body tumours. Part I: Technical issues.* Radiol Med, 2010. **115**(6): p. 843-57.
30. Ippolito, D., et al., *Quantitative evaluation of CT-perfusion map as indicator of tumor response to transarterial chemoembolization and radiofrequency ablation in HCC patients.* Eur J Radiol, 2014. **83**(9): p. 1665-71.
31. Lee, J.A., et al., *Dual-energy CT to detect recurrent HCC after TACE: initial experience of color-coded iodine CT imaging.* Eur J Radiol, 2013. **82**(4): p. 569-76.
32. Baron Toaldo, M., et al., *Use of VEGFR-2 targeted ultrasound contrast agent for the early evaluation of response to sorafenib in a mouse model of hepatocellular carcinoma.* Mol Imaging Biol, 2015. **17**(1): p. 29-37.
33. Raatschen, H.J., et al., *Non-invasive quantification of anti-angiogenic therapy by contrast-enhanced MRI in experimental pancreatic cancer.* Acta Radiol, 2014. **55**(2): p. 131-9.
34. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue].* Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
35. Huang, J., et al., *Prognostic significance and potential therapeutic target of VEGFR2 in hepatocellular carcinoma.* J Clin Pathol, 2011. **64**(4): p. 343-8.
36. Nakamura, K., et al., *Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1alpha are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver.* Hum Pathol, 2007. **38**(10): p. 1532-46.
37. Chu, J.S., et al., *Expression and prognostic value of VEGFR-2, PDGFR-beta, and c-Met in advanced hepatocellular carcinoma.* J Exp Clin Cancer Res, 2013. **32**: p. 16.
38. Inoue, T., et al., *Assessment of Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI for HCC and dysplastic nodules and comparison of detection sensitivity versus MDCT.* J Gastroenterol, 2012. **47**(9): p. 1036-47.
39. Buchler, P., et al., *VEGF-RII influences the prognosis of pancreatic cancer.* Ann Surg, 2002. **236**(6): p. 738-49; discussion 749.
40. Grouls, C., et al., *Liver dysplasia: US molecular imaging with targeted contrast agent enables early assessment.* Radiology, 2013. **267**(2): p. 487-95.
41. Kaufmann, S., et al., *Characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) lesions using a novel CT-based volume perfusion (VPCT) technique.* Eur J Radiol, 2015. **84**(6): p. 1029-35.
42. Sugimoto, K., et al., *Quantification in molecular ultrasound imaging: a comparative study in mice between healthy liver and a human hepatocellular carcinoma xenograft.* J Ultrasound Med, 2012. **31**(12): p. 1909-16.
43. Zheng, Y.B., et al., *Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor receptor 2 response in patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization.* Med Oncol, 2014. **31**(3): p. 843.
44. Kiselyov, A., K.V. Balakin, and S.E. Tkachenko, *VEGF/VEGFR signalling as a target for inhibiting angiogenesis.* Expert Opin Investig Drugs, 2007. **16**(1): p. 83-107.

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Aufbau der Domänen von VEGF und VEGFR  
(aus Nandy D. et al; *Cancers* 2011, 3, 841-871)

Abb.2 Medikamentöse Ansätze antiangiogenetischer Therapie  
(aus Maj.E et al; [Int J Oncol.](#) 2016 Nov; 49(5): 1773–1784.)

Abb.3 Bild TMA Präparat und Schnitt

Abb.4 MIP-Abbildung eines hypervaskularisierten HCC (aus Thais et al *Eur J Radiol*, 2016. **85**(11): p. 2036-2041)

Abb.5 Grafik der Zeit-Dichte-Kurven für die A. hepatica (grüne Kurve) und der Pfortader (lila Kurve) die aufeinander angepasst (gefittet) werden. Daraus resultieren zwei verschiedenen Spitzenwerte für die beiden Gefäße mit Verdeutlichung des Zeitversatzes zwischen den beiden. (aus Thais et al *Eur J Radiol*, 2016. **85**(11): p. 2036-2041)

Abb.6 Bild TMA HCC VEGFR-2 IRS9

Abb.7 Grafik: Starke VEGFR-2 Expression in HCC (Mittelwert 3,576)

Abb.8 Bild TMA Kontrolle Leber VEGFR-2 IRS 2

Abb.9 Grafik: Kein signifikanter Unterschied der VEGFR-2 Expression in der Kontrollgruppe Leber

Abb.10 Grafik: Signifikant erhöhte vaskuläre VEGFR-2 Expression im Kontrollgewebe Leber bei CCC (Mittelwert 3,036)

Abb.11 Bild TMA CCC VEGFR-2 IRS 1

Abb.12 Bild TMA PDA Starke Expression von VEGFR-2 in den Tumorzellen (IRS 8)

Abb.13 Bild TMA PDA schwächeres VEGFR-2 Reaktionsprodukt von vaskulären Strukturen (IRS2)

Abb.14 Bild TMA CP VEGFR-2 IRS 9

Abb.15 Bild TMA CP VEGFR-2 IRS 6

Abb.16 Bild TMA Reguläres Pankreas, VEGFR-2 IRS 4

Abb.17 Grafik: signifikante Erhöhung des IRS VEGFR-2 bei CP (IRS Mittelwert 7,02)

Abb.18 Grafik: Signifikanter Expressionsunterschied VEGFR-2 RLN/HCC

(aus Thais et al Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041)

Abb.19 Bild Zirrhatische Leber VEGFR-2 IRS 4; HCC IRS 9

(aus Thais et al Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041)

Abb.20 Fokale Leberläsion mit erhöhtem BF, BV sowie ausschließlich arterieller Versorgung (Pfeil, ALP) und korrespondierend fehlender Versorgung über die Pfortader (PVP) (aus Thais et al Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041)

## Erklärung zum Eigenanteil

Teile der hier vorliegenden Dissertation wurden bereits in der Publikation **Thaiss et al** „*VEGFR-2 expression in HCC, dysplastic and regenerative liver nodules, and correlation with pre-biopsy Dynamic Contrast Enhanced CT*. Eur J Radiol, 2016. **85**(11): p. 2036-2041“ veröffentlicht. Gemeinsam mit Prof. Marius Horger war ich Letztautor in dieser Arbeit. Ich habe in dieser Publikation alle histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt und ausgewertet. Die klinischen Vergleiche in der Dissertation stammen aus dieser Publikation.

Alle Analysen, die die Studie an den tissue micro arrays betreffen, wurden von mir veranlasst, ausgewertet, und geschrieben. Diese Ergebnisse sind neu und nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Ich danke Prof. Bence Sipos für die Zurverfügungstellung der tissue micro arrays und seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ich danke Prof. Marius Horger für das kritische Lesen der klinisch-radiologischen Ausführungen.

Ich danke Prof. Falko Fend für die Betreuung und Prof. Jürgen Bauer für die Begutachtung des Manuskriptes.

