

Hepatocelluläre Glykogenose und Hepatombildung beim Menschen * **

P. BANNASCH und O. KLINGE

Pathologisches Institut der Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. H.-W. Altmann)

Eingegangen am 6. Dezember 1970

Hepatocellular Glycogenosis and Hepatoma Development in Man

Summary. The relevance of experimental results for the morphogenesis of hepatoma cells in human pathology is examined on biopsies of 12 hepatocellular carcinomas and 5 adenomas by means of light and electron microscopy. The investigations show that metamorphosis of hepatocytes during carcinogenesis in experimental animals and in man is in principle identical: in both instances hepatocellular glycogenosis and the development of hepatomas are closely related.

Zusammenfassung. Die Gültigkeit experimentell begründeter Vorstellungen über die Morphogenese der Leberkrebszelle für die Humanpathologie wird an Biopsien von 12 hepatocellulären Carcinomen und 5 Adenomen licht- und z. T. auch elektronenmikroskopisch geprüft. Die Ergebnisse belegen, daß der Gestaltwandel der Hepatocyten während der Carcinogenese bei Mensch und Versuchstier prinzipiell übereinstimmt: In beiden Fällen besteht offenbar eine enge Beziehung zwischen hepatocellulärer Glykogenose und Hepatombildung.

Cytomorphologische Carcinogenesestudien an der Nitrosomorpholin-vergifteten Rattenleber haben ergeben, daß bei der Umwandlung von Hepatocyten in Hepatomzellen regelmäßig ein Stadium der übermäßigen Glykogenspeicherung (Glykogenose) durchlaufen wird (Bannasch und Müller, 1964; Bannasch, 1967, 1968). Ähnliche Beobachtungen wurden in den letzten Jahren auch nach anderen hepatotropen Carcinogenen gemacht (Epstein et al., 1967; Lesch et al., 1968; Schauer und Kunze, 1968; Friedrich-Freksa et al., 1969; Forget und Daoust, 1970). Die Glykogenspeicherzellen sind vergrößert und enthalten nur verhältnismäßig wenige, in periphere oder paranucleäre Regionen verdrängte Ergastoplasmaschollen. Im HE-Präparat erscheint ihr Cytoplasma meist „klar“, mitunter auch infolge einer Hypertrophie des agranulären endoplasmatischen Reticulums acidophil. An das Stadium der übermäßigen Glykogenspeicherung schließt sich eine Übergangsphase an, die vor allem durch allmähliche Glykogenreduktion und gleichzeitige Vermehrung der RNS-haltigen Ribosomen mit Umwandlung des agranulären in granuläres Reticulum gekennzeichnet ist (Bannasch, 1968). Die endgültige Hepatomzelle ist in der Regel kleiner als die Speicherzelle, weitgehend frei von Glykogen, doch relativ reich an basophilen Substanzen, die homogen, feinkörnig oder grobschollig verteilt sind.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** Die Ergebnisse wurden z. T. auf der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 1970, mitgeteilt (Bannasch und Klinge, 1970).

Die Dauer der Zelltransformation schwankt im Experiment zwischen einigen Wochen und vielen Monaten, so daß mitunter selbst innerhalb der Tumoren noch alle Entwicklungsstufen nebeneinander anzutreffen sind. Es erschien daher aussichtsreich, in Punktaten oder Biopsien von menschlichen Leberzellgeschwülsten die Relevanz der experimentellen Befunde für die Humanpathologie zu prüfen, insbesondere die Frage, ob der Geschwulstbildung auch hier eine übermäßige Glykogenspeicherung vorangeht.

Untersuchungsgut und Methodik

Lichtmikroskopisch wurden 13 hepatocelluläre Carcinome und 5 Adenome untersucht. Alter und Geschlecht der Patienten sind der Tabelle zu entnehmen. Fixierung des Gewebes in Formaldehyd oder Carnoyschem Gemisch. Einbettung in Paraffin. Färbungen: Hämatoxylin-Eosin, Kresylviolett, Tri-PAS. Die Darstellung des Glykogens mit der PAS-Reaktion gelingt auch am Formalin-fixierten Gewebe gut, wenn die Schnitte nicht auf Wasser, sondern auf 70%igem Alkohol gestreckt und sofort anschließend auf absoluten Alkohol überführt werden.

Von einem Patienten konnte ein zusätzliches Leberpunktat für vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen gewonnen werden. Fixierung: 1% OsO₄. Einbettung in Epon. Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleihydroxyd oder Uranylacetat. Siemens Elmiskop IA.

Ergebnisse und Erörterungen

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß von den 13 *Carcinomen* 11 wenig oder kein, 2 dagegen relativ viel Glykogen enthalten. Die glykogenarmen Tumoren sind überwiegend aus basophilen Zellen zusammengesetzt (Abb. 1c). Nur vereinzelt finden sich hellere Epithelien. In ihnen ist Glykogen zwar zweifelsfrei nachzuweisen, doch läßt sich eine übermäßige Glykogenspeicherung kaum sichern.

Demgegenüber zeigen die glykogenreicheren Carcinome neben intensiv basophilen zahlreiche große „klare“ Zellen, deren verstärkter Glykogengehalt schon an HE-Präparat ohne weiteres abzulesen ist (Abb. 1b). Übergänge zwischen den hellen Speicherzellen und den dunklen Tumorzellen sind häufig. Ebenso wie die glykogenspeichernden enthalten die intermediären Zellen mitunter acidophile Cytoplasmabezirke, die agranulären Membrankomplexen des ER entsprechen (vgl. Klinge und Bannasch, 1968).

In einem Fall ließ sich — bei einem 54jährigen Mann — das celluläre Spektrum der Geschwulstbildung an drei verschiedenen Punktaten genauer erfassen. Das erste Punktat ergab eine sehr glykogenreiche, sog. „hypernephroide“ Leberzellgeschwulst (vgl. Köhn, 1955; Hamperl, 1970), die nach dem vorherrschenden histologischen Bild noch als Adenom zu beurteilen ist (Abb. 1a). Die genauere cytologische Analyse zeigt allerdings neben zahlreichen Mitosen in vielen Zellen

Abb. 1a—c. Hepatocelluläre Tumoren mit und ohne Glykogenspeicherung. Alle Bilder: Hämatoxylin-Eosin, 460:1. a Sog. „hypernephroides“ Adenom, vorwiegend aus „klaren“ Glykogenspeicherzellen zusammengesetzt. In einzelnen Zellen (↓) Glykogenreduktion und herdförmige Zunahme der cytoplasmatischen Basophilie. b Sog. „hypernephroides“ Carcinom mit zahlreichen hellen Glykogenspeicherzellen und allen Übergängen zu dunklen (basophilen) Hepatomzellen. In einigen Zellen (↓) acidophile Cytoplasmareale (agranuläre Membrankomplexe des endoplasmatischen Reticulums). c Glykogenfreies basophiles Carcinom

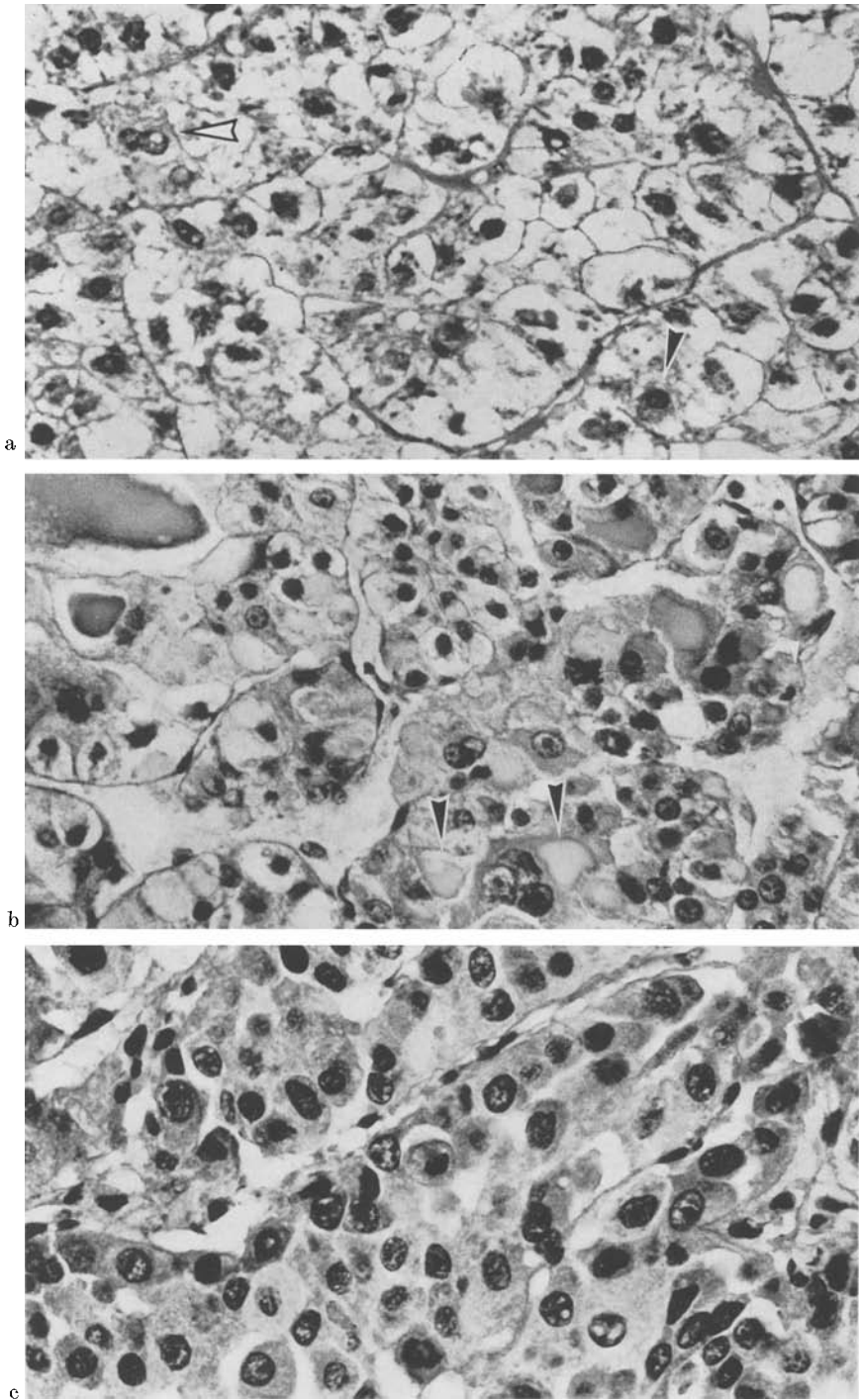


Abb. 1 a—c

Tabelle. *Glykogengehalt hepatocellulärer Tumoren nach Schätzungen am PAS-Präparat*

Kenn-Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Geschwulst-art	Glykogen-gehalt
1	64	♀	Carcinom	+
2	65	♂	Carcinom	++
3	64	♀	Carcinom	0
4	67	♂	Adenom	++
5	58	♂	Adenom	+++
6	56	♂	Carcinom	+
7	54	♂	Carcinom	+
8	61	♀	Carcinom	+
9	86	♂	Adenom	+++
10	64	♂	Carcinom	++
11	55	♂	Adenom	+++
			Carcinom	? postmortales Punktat
12	31	♂	Adenom	++
13	70	♂	Carcinom	0
14	18	♀	Carcinom	+
15	80	♂	Carcinom	+
16	70	♀	Carcinom	+
17	65	♀	Carcinom	0

0 = kein Glykogen; + = geringe Glykogenspeicherung; ++ = stärkere, in zahlreichen Zellen übermäßige Glykogenspeicherung; +++ = starke übermäßige Glykogenspeicherung in ausgedehnten Tumorbezirken.

bereits eine herdförmige Zunahme der cytoplasmatischen Basophilie. Ein zweites Punktat wurde einige Tage später gewonnen und vorwiegend elektronenmikroskopisch untersucht: Die Glykogenspeicherung ist in dieser Gewebeprobe weniger ausgeprägt. Manche Zellen enthalten aber neben umfangreichen, z.T. stark dilatierten Ergastoplasmaformationen noch recht ausgedehnte Glykogenzonen (Abb. 2, 3). Darin eingelassen sind oft vesiculäre Strukturen des agranulären endoplasmatischen Reticulums. In glykogenarmen Zellen besteht das endoplasmatische Reticulum demgegenüber fast ausschließlich aus granulären, also Ribosomen-besetzten Cisternen, die häufig taschenförmig eingebuchtet sind (Abb. 4) — ein Phänomen, das auch in späten Stadien der experimentellen Hepatocarcinogenese zu beobachten ist (Bannasch, 1968). Es ist anzunehmen, daß solche ungewöhnlichen Bildungen des endoplasmatischen Reticulums aus ursprünglich agranulären Membrankomplexen hervorgehen, die während der cellulären Transformation durch Ribosomen besetzt werden. Die Mitochondrien sind meist regelhaft gestaltet; mitunter ist jedoch eine Rarefizierung ihrer Cristae festzustellen. Sechs Monate nach der zweiten Punktion starb der Patient. Die Obduktion wurde leider verweigert, doch war in einem postmortalen Punktat die Diagnose eines hepatocellulären Carcinoms eindeutig zu stellen.

Was die vier übrigen *Adenome* angeht, so zeigen sie — ebenso wie das Adenom des eben geschilderten Falles — durchweg in ausgedehnten Bezirken starke Glykogeneinlagerungen (Tabelle). Auf die Häufigkeit dieses Befundes haben kürzlich auch Garancis und Mitarbeiter (1969) sowie Hamperl (1970) hingewiesen. Nach

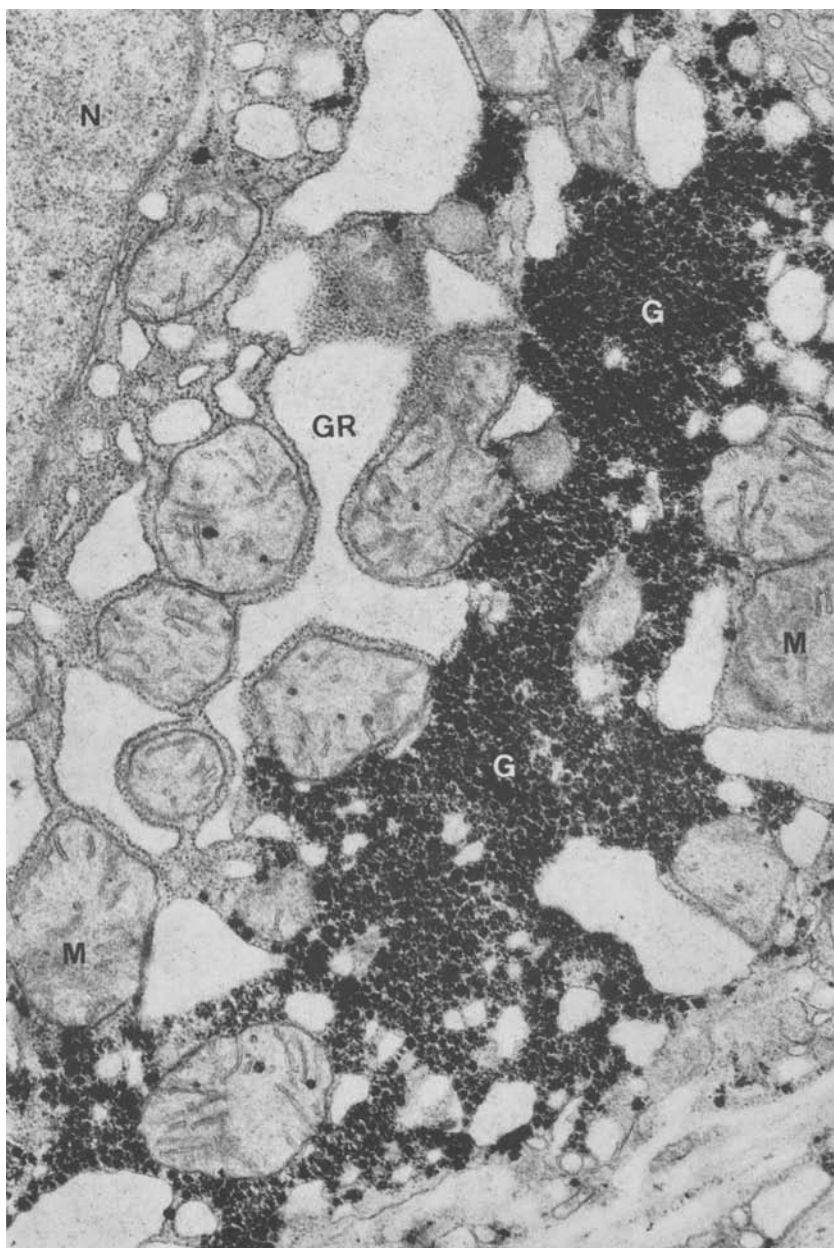


Abb. 2. Ausschnitt einer Leberparenchymzelle (Hepatoma-Leber Nr. 11) mit herdförmiger Glykogenspeicherung (*G*) und ausgedehnten, z. T. stark dilatierten Ergastoplasmaformationen (*GR*). *M* Mitochondrien, *N* Zellkern. Bleihydroxyd, 21400:1

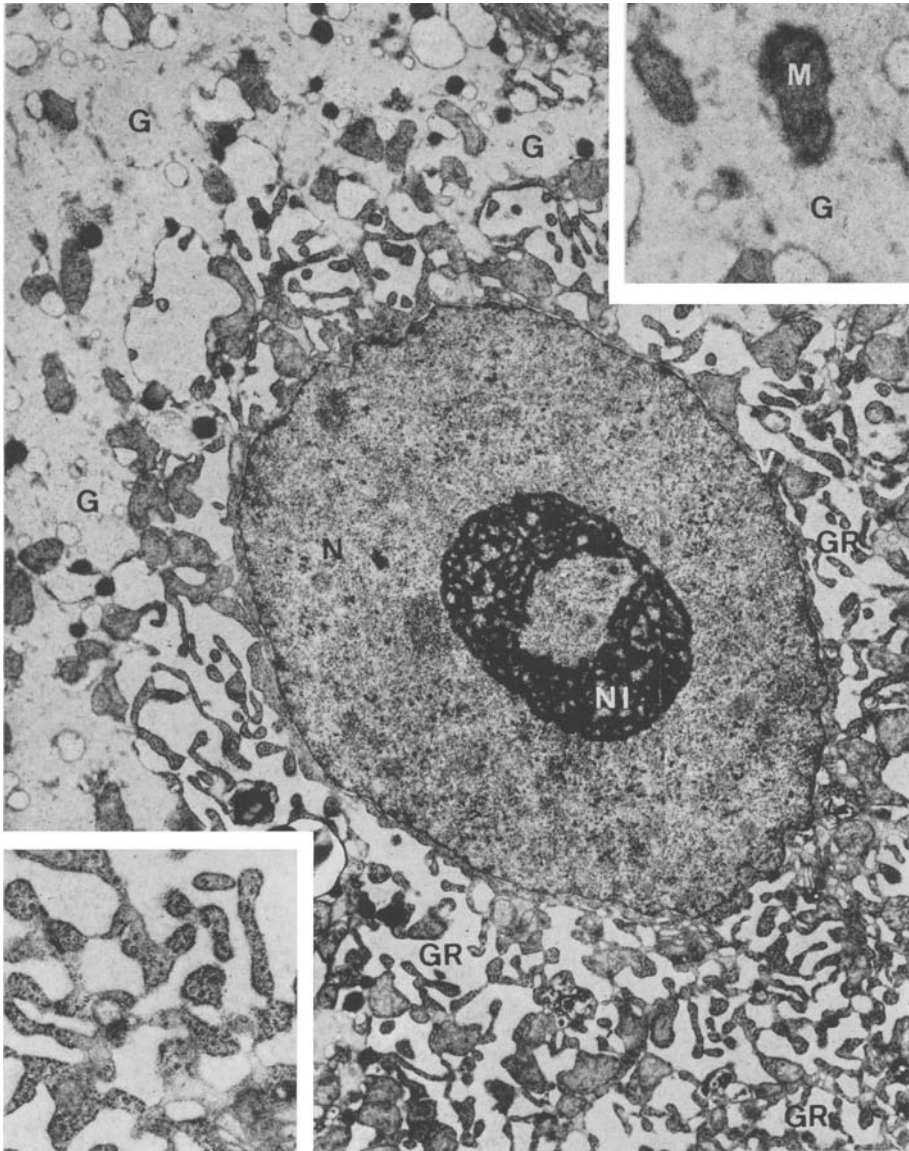


Abb. 3. Ausschnitt einer „intermediären“ Zelle (Hepatoma-Leber Nr. 11). Ausgedehnte helle Glykogenzonen (G) oben und links seitlich, Glykogenarmut und unregelmäßig angeordnete Ergastoplasmaformationen (GR) in Bildmitte und besonders rechts unten. Zellkern (N) mit vergrößertem Nucleolus (NI). Uranylacetat, 5700:1 (Photomontage)

den tiereperimentellen Erfahrungen ist anzunehmen, daß solche glykogenreichen Adenome in der Regel nur sehr langsam wachsen (vgl. Bannasch, 1968). Sie haben aber wahrscheinlich alle die Potenz, nach einer mehr oder weniger langen Latenzzeit in glykogenarme oder -freie, dann schneller wachsende Tumoren überzugehen.

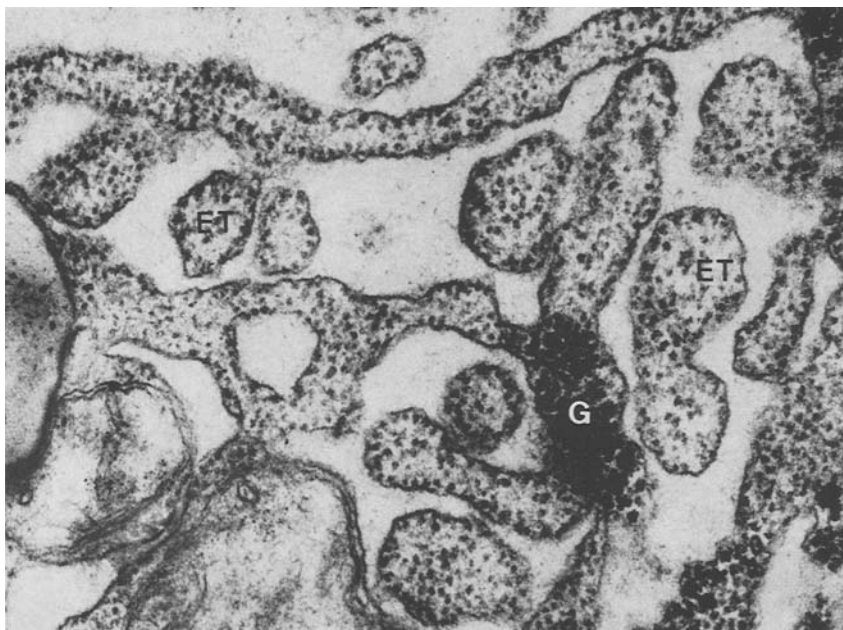


Abb. 4. Ausschnitt einer ausgesprochen glykogenarmen Zelle (Hepatom-Leber Nr. 11) mit ungewöhnlichen, vorwiegend granulären Formationen des endoplasmatischen Reticulums, die zahlreiche taschenförmige Einbuchtungen zeigen („Ergastoplasmataschen“ *ET*). Agranuläre Membranabschnitte in unmittelbarer Nachbarschaft eines kleinen Glykogenkomplexes (*G*). Bleihydroxyd, 51300:1

Die geschilderten Befunde scheinen uns hinreichend zu belegen, daß der Gestaltwandel der Leberzelle während der Krebsentstehung bei Mensch und Versuchstier prinzipiell übereinstimmt. In beiden Fällen besteht offenbar eine enge Beziehung zwischen hepatocellulärer Glykogenose und Hepatombildung. Hierfür spricht auch, daß aus der Kinderpathologie immerhin 3 Fälle von angeborener hepatorener Glykogenspeicherkrankheit mit Ausbildung multipler Leberzelltumoren im Alter von 7—14 Jahren bekannt sind (Mason und Andersen, 1955; Fraumeni et al., 1968; Zangeneh et al., 1969). Die Frage nach einem möglichen kausalen Zusammenhang zwischen Glykogenose und Geschwulstbildung (Bannasch, 1968) ist demnach durchaus begründet, zumal nahezu identische cytopathologische Erscheinungen für die Genese „hypernephroider“ Nierengeschwülste kennzeichnend sind (Bannasch und Schacht, 1968, 1970).

Literatur

- Bannasch, P.: Nitrosamin-induzierte Glykogenose und Geschwulstbildung in der Rattenleber. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **51**, 343—349 (1967).
 — The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis. Light and electron microscopic investigations of the nitrosomorpholine-intoxicated rat liver. *Rec. Res. Canc. Res.* vol. 19. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.

- Bannasch, P., Klinge, O.: Hepatocelluläre Glykogenose und Hepatombildung beim Menschen (Kurzfassung). *Verh. dtsh. Ges. Path.* **54**, 666 (1970).
- Müller, H. A.: Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus. *Arzneimittel-Forsch.* **14**, 805—814 (1964).
- Schacht, U.: Nitrosamin-induzierte tubuläre Glykogenspeicherung und Geschwulstbildung in der Rattenniere. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* **1**, 95—97 (1968).
- — Morphogenese und Mikromorphologie experimenteller Nierentumoren vom Typ des sog. Hypernephroms. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **54**, 464—470 (1970).
- Epstein, S. H., Ito, N., Merkow, L., Farber, E.: Cellular analysis of liver carcinogenesis: the induction of large hyperplastic nodules in the liver with fluorenylacetamide or ethionine and some aspects of their morphology and glycogen metabolism. *Cancer Res.* **27**, 1702—1711 (1967).
- Forget, A., Daoust, R.: Histochemical study on rat liver glycogen during DAB carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **5**, 404—409 (1970).
- Fraumeni, J. F., Miller, R. W., Hill, J. A.: Primary carcinoma of the liver in childhood: an epidemiologic study. *J. nat. Cancer Inst.* **40**, 1087—1099 (1968).
- Friedrich-Freksa, H., Gössner, W., Börner, P.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergabe von Diäthylnitrosamin. *Z. Krebsforsch.* **72**, 226—239 (1969).
- Garancis, J. C., Tang, Th., Panares, R., Jurevics, I.: Hepatic adenoma. Biochemical and electron microscopic study. *Cancer* **24**, 560—568 (1969).
- Hamperl, H.: On the "adrenal rest-tumors" (hypernephromas) of the liver. *Z. Krebsforsch.* **74**, 310—317 (1970).
- Klinge, O., Bannasch, P.: Zur Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulum in Hepatozyten menschlicher Leberpunktate. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **52**, 568—573 (1968).
- Köhn, K.: Der primäre Leberkrebs. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- Lesch, R., Meinhardt, K., Oehlert, W.: Lichtmikroskopische und autoradiographische Befunde bei der Cancerisierung der Rattenleber mit Methyl-Allyl-Nitrosoharnstoff. *Z. Krebsforsch.* **70**, 267—280 (1968).
- Mason, H. H., Andersen, D. H.: Glycogen disease of the liver (von Gierke's disease) with hepatomata: case report with metabolic studies. *Pediatrics* **16**, 785—799 (1955).
- Schauer, A., Kunze, E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin. *Z. Krebsforsch.* **70**, 252—266 (1968).
- Zangeneh, R., Limbeck, G. A., Brown, B. L., Emch, J. R., Arcasoy, M. M., Goldenberg, V. E., Kelley, V. C.: Hepatorenal glycogenosis (type I glycogenosis) and carcinoma of the liver. *J. Pediat.* **74**, 73—83 (1969).

Dozent Dr. P. Bannasch
Dozent Dr. O. Klinge
Pathologisches Institut der Universität
BRD-8700 Würzburg, Luitpoldkrankenhaus
Deutschland