

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. HANS JÜRGEN SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss der „in-situ Split“-Leberresektion vs. Standard-  
Leberresektion auf Proliferation, Apoptose und Angiogenese**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Katharina Jöchle

2017



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. HANS JÜRGEN SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss der „in-situ Split“-Leberresektion vs. Standard-  
Leberresektion auf Proliferation, Apoptose und Angiogenese**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Katharina Jöchle

2017

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Sven A. Lang

2. Berichterstatter:

PD Dr. Philipp Wiggermann, MSc

Tag der mündlichen Prüfung:

19.06.2017

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Indikationen zur Leberresektion .....	5
1.1.1	Primäre Malignome der Leber.....	5
1.1.2	Sekundäre Leberräumforderungen .....	5
1.2	Prinzipien der Leberchirurgie.....	6
1.2.1	Komplette Tumorentfernung als Ziel der Leberresektion (R0) .....	6
1.3	Resektabilität.....	7
1.3.1	Funktionelle Resektabilität .....	7
1.3.2	Technische Resektabilität .....	8
1.3.3	Onkologische Resektabilität.....	9
1.4	Strategien zur Erhöhung der Resektabilität.....	9
1.4.1	Zweizeitige Resektion („two-stage hepatectomy“, TSH) .....	10
1.4.2	Portalvenöse Embolisation/Ligatur (PVE/PVL) .....	11
1.4.3	„In-situ Split“-Leberresektion (ISS-LR) .....	12
1.4.4	Risiko der Tumorprogression nach Hypertrophieinduktion.....	14
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	15
3	Patienten und Methoden.....	16
3.1	Gewebeproben.....	16
3.1.1	Art und Herkunft der Proben .....	16
3.1.2	Datensammlung .....	16
3.2	Methoden .....	17
3.2.1	Grundlagen der Immunhistochemie .....	17
3.2.2	Tumorvaskularisation (CD31 Gefäßfläche) .....	18
3.2.3	Apoptose.....	19
3.2.3.1	Caspase-3 .....	19
3.2.3.2	TUNEL.....	19
3.2.4	Tumorproliferation (MIB-1) .....	20
3.2.5	„Alpha-smooth muscle actin“ ( $\alpha$ SMA-Expression).....	20
3.3	Spezifische Auswertung .....	21
3.4	Statistische Analysen .....	21
4	Ergebnisse.....	22
4.1	Patientenkollektiv .....	22

## Inhaltsverzeichnis

4.2 Kolorektale Lebermetastasen.....	24
4.2.1 Gefäßdichte (CD31-Expression) .....	24
4.2.2 Apoptose .....	25
4.2.2.1 Caspase-3 .....	25
4.2.2.2 TUNEL .....	26
4.2.3 Tumorproliferation (MIB-1-Expression) .....	26
4.2.4 „Alpha-smooth muscle actin“ ( $\alpha$ SMA-Expression).....	28
4.2.5 Nekrotische Areale .....	29
4.3 Cholangiozelluläre Karzinome.....	30
4.3.1 Gefäßdichte (CD31-Expression) .....	30
4.3.2 Apoptose.....	31
4.3.2.1 Caspase-3 .....	31
4.3.2.2 TUNEL .....	32
4.3.3 Tumorproliferation (MIB-1-Expression) .....	33
4.3.4 „Alpha-smooth muscle actin“ ( $\alpha$ SMA-Expression).....	34
4.3.5 Nekrotische Areale .....	35
5 Diskussion .....	36
6 Zusammenfassung .....	46
7 Anhang .....	47
7.1 Tabellenverzeichnis.....	47
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	47
7.3 Abkürzungsverzeichnis .....	48
8 Literaturverzeichnis .....	51
9 Danksagung .....	64
10 Lebenslauf .....	65

## 1 Einleitung

### 1.1 Indikationen zur Leberresektion

Die Indikationen für leberchirurgische Eingriffe umgreifen ein weites Spektrum. Hinsichtlich maligner Prozesse wird zwischen primären und sekundären Malignomen unterschieden (1).

#### 1.1.1 Primäre Malignome der Leber

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist das häufigste primäre Lebermalignom (2). Aufgrund seiner Assoziation mit chronischen Leberfunktionsstörungen, besonders verursacht durch Alkoholkonsum und virale Infektionen wie Hepatitis B und C, aber auch als Folge des metabolischen Syndroms, gilt dessen Behandlung als komplex. Insbesondere die Veränderung des Lebergewebes (Steatose, chronische Entzündung, Fibrose oder Zirrhose) kann bei der Leberresektion als kurativem Ansatz problematisch sein. Alternativ stehen lokal ablativ Verfahren und die Lebertransplantation zur Verfügung. (3)

Die zweithäufigste primäre maligne Lebererkrankung stellt das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) dar, welches je nach Lokalisation in intrahepatisch, perihilär und extrahepatisch unterteilt wird. Hierunter macht das perihiläre cholangiozelluläre Karzinom mit 50-67% den Hauptteil aus, was wiederum nach Bismuth I-IV klassifiziert wird (4–6). Das cholangiozelluläre Karzinom kann sich auf dem Boden einer chronischen Entzündung oder Cholestase entwickeln und eine Assoziation mit der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) ist nachgewiesen (7). Als einzig kurativer Therapieansatz bei intrahepatischen und perihilären cholangiozellulären Karzinomen gilt die Leberresektion (4).

#### 1.1.2 Sekundäre Lebererkrankungen

Metastasen der Leber werden unter den sekundären Lebermalignomen zusammengefasst. Die mit Abstand häufigsten Metastasen, bei denen eine chirurgische Therapie indiziert ist, sind Metastasen kolorektaler Karzinome. Seltener wird die Chirurgie auch zur Behandlung von Metastasen anderer Primärtumore (Magen, Pankreas, Mamma, Ovar, Sarkom, Melanom) eingesetzt. Die Prognosen sind sehr unterschiedlich, jedoch kann bei kolorektalen Lebermetastasen häufig ein kurativer Ansatz verfolgt werden. (8)

## 1 Einleitung

Aus diesem Grund sind aggressive Resektionsstrategien insbesondere bei letzteren gerechtfertigt.

### 1.2 Prinzipien der Leberchirurgie

Prinzipiell unterscheidet man in der Leberchirurgie atypische und anatomische Leberresektionen (1, 9). Atypische Resektionen orientieren sich nicht an Segmentgrenzen und sind besonders bei peripher gelegenen Raumforderungen oder einer begrenzten Regenerationsreserve der Leber zu bevorzugen (1, 9). Anatomische Resektionen orientieren sich an den von Couinaud (10) beschriebenen Segmentgrenzen (1, 9). Man differenziert hierbei zwischen links-lateraler Resektion (Seg. II/III), Hemihepatektomie links (Seg. II-IV), Hemihepatektomie rechts (Seg. V-VIII), erweiterter Hemihepatektomie links (Seg. I-V + VIII) sowie erweiterter Hemihepatektomie rechts (Seg. IV-VIII, ggf. auch Seg. I). Insbesondere die erweiterten Resektionen sind mit einem deutlichen Risiko eines postoperativen Leberversagens (siehe unten) assoziiert.

#### 1.2.1 Komplette Tumorentfernung als Ziel der Leberresektion (R0)

Das Ziel jeder onkologischen Resektion stellt die komplette Tumorentfernung, die sogenannte R0-Resektion dar (8, 11). Im Gegensatz hierzu werden R1-Resektionen (mikroskopischer Tumorrest am Resektionsrand) und R2-Resektionen (makroskopischer Tumorrest am Resektionsrand) klassischerweise als nicht kurativ angesehen. Neben dem Resektionsrand ist auch das Ausmaß des Sicherheitsabstandes, d.h. der Abstand vom (tumorfreien) Resektionsrand bis zum Tumor selbst Gegenstand von Diskussionen (8). Bis vor einigen Jahren wurde ein Sicherheitsabstand von mindestens 1 cm unabhängig von der Tumorentität empfohlen (12–15). Für kolorektale Lebermalignome liegen mittlerweile auch Daten vor, die einen Benefit einer Resektion mit deutlich geringerem Sicherheitsabstand (bis 1 mm) oder sogar einer R1-Resektion belegen (16, 17). Bei primären Lebermalignomen wird die Breite des Resektionsabstandes hinsichtlich Rezidiv- und Überlebensraten ebenfalls kontrovers diskutiert, wobei der Einfluss eines weiten Sicherheitsabstandes für diese Tumorentitäten deutlich größer zu sein scheint (18–25). Sofern möglich wird bei hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen daher zur anatomischen Resektion geraten (9). Dieses Vorgehen gilt aufgrund der Gefahr der kontinuierlichen Tumorausbreitung und der diskontinuierlichen Satellitenmetastasierung als

## 1 Einleitung

onkologisch sinnvoller (1). Da sich primäre Lebermalignome jedoch oftmals auf chronischen Leberfunktionsstörungen gründen, muss die Entscheidung zur anatomischen Resektion individuell getroffen werden und immer das Schadensausmaß des Lebergewebes und die Leberfunktion mit berücksichtigen.

### 1.3 Resektabilität

Die Resektabilität von Lebertumoren ist nicht einheitlich definiert. Was als resektabel eingeschätzt wird, hängt, wie im Folgenden aufgeführt wird, von mehreren Faktoren ab. Neben der Grunderkrankung sowie Patienten-assoziierten Faktoren (Alter, Allgemeinzustand, Komorbiditäten) spielt bei der Einschätzung der Resektabilität die Erfahrung des Chirurgen eine entscheidende Rolle. Dies zeigte die CELIM-Studie, bei der trotz der Tatsache, dass sieben Spezialisten auf dem Gebiet der Leberchirurgie ausgewählt wurden, bezüglich der Resektabilität nur in 65% der Fälle Einigkeit bestand (26). Prinzipiell unterscheidet man funktionelle, technische und onkologische Resektabilität (bzw. Irresektabilität).

#### 1.3.1 Funktionelle Resektabilität

Als limitierender Faktor bei der Durchführung erweiterter Leberresektionen gilt das nach Operation verbleibende Leberrestvolumen („future liver remnant“, FLR) (8). Ein zu geringes Restvolumen der Leber kann postoperativ zu der schwerwiegenden Komplikation des postoperativen Leberversagens („post-hepatectomy liver failure“, PHLF) führen (27). Dies beschreibt den Ausfall einer oder mehrerer synthetischer und exkretorischer Leberfunktionen, wozu Hyperbilirubinämie, Hypoalbuminämie, verlängerte Prothrombin-Zeit, erhöhtes Serum Laktat und hepatische Enzephalopathie zählen (27–30). Zugleich ist es mit einer hohen postoperativen Mortalität assoziiert (31–33). Im klinischen Alltag am weitesten verbreitet ist die Definition einer verlängerten Prothrombin-Zeit und die Erhöhung des Gesamt-Bilirubins im Serum mit hepatischer Enzephalopathie und/oder Aszites im postoperativen Verlauf (34). Eine weitere gebräuchliche Definition ist das sogenannte „fünfzig-fünfzig Kriterium“: eine Prothrombin-Zeit <50% (ausgedrückt als Prozentsatz des Normalwerts der Prothrombin-Zeit bzw. INR >1,7) und ein Bilirubin-Wert >50 µmol/l (bzw. >2,9 mg/dl) am fünften postoperativen Tag (34). Eine Studie von Balzan *et al.* (30) konnte zeigen, dass Patienten, die jeweils beide dieser Merkmale aufwiesen, ein Mortalitäts-Risiko von 59% hatten, verglichen mit 1,2% bei denjenigen Patienten, die diese Kriterien nicht

## 1 Einleitung

erfüllten. Um dieser schwerwiegenden Komplikation entgegen zu wirken, kann mit Hilfe der CT-Volumetrie das FLR berechnet werden. Zur Sicherung einer adäquaten postoperativen Leberfunktion wird im Falle normaler Leberfunktion ein FLR von mindestens 20-30% empfohlen (34–38). Weisen Patienten aber Leberfunktionsstörungen oder Leberschäden (Zirrhose, Cholestase, Steatose, CALI („chemotherapy-associated liver injury“)) auf, wird ein höheres FLR von mindestens 30-40% angesetzt (34, 39, 40). Bestehen multifokale Tumorherde oder aus biliärer oder vaskulärer Obstruktion resultierende, nicht funktionelle Gewebeabschnitte, können diese zu einer Fehleinschätzung des FLR führen (41). Um diesen Ungenauigkeiten aus dem Weg zu gehen, kommt im klinischen Alltag auch die Bestimmung des FLR anhand des Verhältnisses von Leberrestvolumen zu Körpergewicht zum Tragen (42). Dabei stellten Truant *et al.* (42) fest, dass Patienten, bei denen dieses Verhältnis  $\leq 0,5\%$  lag, ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung postoperativer Komplikationen zeigten sowie eine signifikant höhere Mortalitätsrate aufwiesen – verglichen mit denjenigen Patienten, deren Verhältnis  $> 0,5\%$  lag. Daneben war dieser Wert spezifischer, den postoperativen Verlauf nach erweiterter Hemihepatektomie aufzuzeigen als die alleinige CT-Volumetrie des FLR (42). Um die Qualität des Lebergewebes präoperativ zu bestimmen, stehen zudem mehrere Funktionstests zur Verfügung (34) (ICG-Clearance, LiMAX, MRT mit leberspezifischem Kontrastmittel, SPECT („Single-Photon-Emission Computerized Tomography“) mit Technetium-99-m Galactosyl). Diese Tests werden jedoch nicht flächendeckend eingesetzt.

### 1.3.2 Technische Resektabilität

Neben der funktionellen Resektabilität spielt auch die technische Machbarkeit im chirurgischen Vorgehen eine große Rolle. Um diese beurteilen zu können, ist ein fundiertes Wissen über die Leberanatomie notwendig (43). Diese war lange Zeit unbekannt und wurde erst im Jahre 1957 von Couinaud *et al.* (10) im Sinne der segmentalen Aufteilung beschrieben. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass diese Segmententeilung sehr idealisiert ist und nur bei ungefähr 50% der Patienten wirklich zutrifft (44, 45). Zudem muss die genaue Ausdehnung des Tumors bzw. der Metastasen innerhalb der Leber und ein möglicher Bezug zu Gefäßen oder Gallengängen mittels präoperativer Bildgebung bestimmt werden (1). Oftmals werden diese Informationen nochmals im intraoperativen Ultraschall verifiziert (46). Bei der

## 1 Einleitung

Einschätzung der technischen Resektabilität spielt ebenso die Erfahrung des Chirurgen eine wichtige Rolle, insbesondere bezüglich der Möglichkeit von Gefäßresektionen, -rekonstruktionen oder der Anwendung innovativer Techniken (z.B. ante-situ Resektionen, ex-situ Resektionen).

### 1.3.3 Onkologische Resektabilität

Die onkologische Resektabilität beschreibt am ehesten die Sinnhaftigkeit einer Leberresektion im gesamten Behandlungskonzept der zugrundeliegenden Tumorerkrankung. Können beispielsweise bei Pankreas- oder Magenkarzinomen mehrere periphere Lebermetastasen vorliegen, die technisch und funktionell klar resektabel sind, ist jedoch der onkologische Sinn dieser Resektion zumindest fragwürdig. Bei primären Lebermalignomen wird eine extrahepatische Tumormanifestation (mit Ausnahme lokaler Lymphknoten, die im Rahmen der Lymphadenektomie entfernt werden können) oder ein multilokulärer Befall als onkologische Kontraindikation angesehen (3, 4). Bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome stellt eine extrahepatische Tumormanifestation hingegen keine absolute Kontraindikation dar, sofern diese reseziert werden kann (47). Für die Einschätzung der onkologischen Resektabilität spielt auch das zeitliche Auftreten eine Rolle (z.B. Rezidivresektion bei cholangiozellulären Karzinomen oder Lebermetastasen).

### 1.4 Strategien zur Erhöhung der Resektabilität

Verschiedene Möglichkeiten zur Erhöhung der Resektabilität sind beschrieben. Hierunter fällt z.B. die Einleitung sogenannter Konversionschemotherapien, die bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome zu einem Rückgang der Metastasenlast in der Leber führen und damit eine Resektion ermöglichen können (8, 48). Ein weiteres Konzept zur Erhöhung der Resektabilität ist die Kombination verschiedener Verfahren, z.B. Resektion und intraoperative Ablation einer zentralen Metastase. Zudem kann durch verschiedene Strategien eine Vergrößerung des FLR erreicht werden. Hierzu zählen die zweizeitige Leberresektion („two-stage hepatectomy“, TSH), die portalvenöse Embolisation/Ligatur (PVE/PVL) und die „in-situ Split“-Leberresektion (ISS-LR).

### 1.4.1 Zweizeitige Resektion („two-stage hepatectomy“, TSH)

Die zweizeitige Resektion ist eine Operationsmethode, welche im Jahre 2000 erstmals von Adam *et al.* (49) für kolorektale Lebermetastasen beschrieben wurde und mittlerweile als etabliertes Verfahren für diese Tumorentität gilt (50–52). Im ersten operativen Schritt erfolgt bei Patienten mit primär nicht kurativ resektablem, bilobärem Leberbefall die Resektion einer größtmöglichen Anzahl von Metastasen, klassischerweise im linken Leberlappen. Die zweite Resektion wird nach kompensatorischer Regeneration des verbleibenden Lebergewebes sowie gegebenenfalls systemischer Chemotherapie, welche das Wachstum der verbliebenen Tumorlast eindämmen soll, durchgeführt. Meist wird hierbei eine Hemihepatektomie rechts (ggf. erweitert) durchgeführt. So wird insgesamt ein kurativer Ansatz verfolgt und ein mögliches postoperatives Leberversagen, bedingt durch ein zu geringes FLR, vermieden. (49, 53–55)

Der Zeitpunkt der zweiten Leberresektion hängt ab von einer adäquaten Hypertrophie der Restleber mit entsprechend guter Leberfunktion, Wachstumskontrolle der restlichen Metastasen durch die Chemotherapie sowie Machbarkeit der intendierten kurativen Resektion (49, 52, 55). Diese kann im Mittel  $8 \pm 4$  Wochen nach erster Resektion erfolgen (51). In einem systematischen Review von zehn Studien zur zweizeitigen Resektion konnten Lam *et al.* (56) zeigen, dass 23% der Patienten, die ursprünglich für ein zweizeitiges Vorgehen vorgesehen waren, der zweiten Operation nicht zugeführt werden konnten. Gründe hierfür waren progredientes Tumorwachstum nach erfolgter erster Resektion, ungenügende Hypertrophie mit entsprechend inadäquatem Volumen des FLR, Thrombose der *Vena portae* oder Tod nach erster Operation (56).

Das mittlere Gesamtüberleben nach TSH liegt bei 37 Monaten mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von im Mittel 59% und einer 5-Jahres-Überlebensrate von im Mittel 42% (56). Diese Daten sind vergleichbar zu den Überlebensraten von Patienten, die eine kurative einzeitige Resektion erhielten (52, 55). Das rezidivfreie Überleben beläuft sich nach 3 bzw. 5 Jahren im Mittel auf 20% bzw. 15,7% (56). Die Morbiditäts- und Mortalitätsraten nach erster Resektion betragen im Mittel 17% und 0,5%, nach zweiter Resektion 40% und 3% (56).

Falls das Risiko einer ungenügenden Leberregeneration besteht, kann eine portalvenöse Embolisation (PVE) der im Verlauf zu resezierenden Leberhälfte

## 1 Einleitung

durchgeführt werden. Damit werden (wie unten aufgeführt) höhere Hypertrophieraten der kontralateralen, nicht embolisierten Seite erreicht (52, 54, 55).

### 1.4.2 Portalvenöse Embolisation/Ligatur (PVE/PVL)

Als sehr effektives und bewährtes Verfahren zur Hypertrophieinduktion gilt die PVE, die bereits im Jahre 1986 von Kinoshita *et al.* beschrieben wurde (57). Sie kommt sowohl bei primären als auch sekundären Lebermalignomen zum Einsatz (58). Hierbei wird über präoperative Embolisation eines Pfortaderastes der entsprechende portalvenöse Blutfluss in diejenigen Lebersegmente unterbunden, welche reseziert werden sollen (58). Infolgedessen resultiert die Atrophie der ipsilateralen und die kompensatorische Hypertrophie der kontralateralen, auch nach Operation bestehenden Lebersegmente (FLR) (58). Dank zunehmender Verfügbarkeit interventioneller Radiologie gilt heute die perkutan transhepatische Pfortaderembolisation (PTPE) als Standardtechnik der PVE (58). Dabei kann transhepatisch ipsilateral (59, 60) oder transhepatisch kontralateral vorgegangen werden (57). Die technische Erfolgsrate der PVE liegt zwischen 97% und 99% (58, 61). Im Mittel 4 bis 8 Wochen nach PVE kann die Leberresektion bei mittlerer FLR-Zunahme von  $37,9 \pm 0,1\%$  erfolgen (58, 62, 63). Diese liegt zwar in einem weiten Streuungsbereich von 20,5% bis 69,4%, ist aber nur bei 2,8% bis 3,5% der Patienten trotz erfolgreich durchgeführter PVE nicht ausreichend (58, 61). Neben der ungenügenden Hypertrophie liegt ein weiterer Grund, weshalb die Resektion nicht machbar sein kann, in der Neumanifestation von Tumorherden im FLR bzw. extrahepatisch (61). Inwieweit die durch PVE erreichte Hypertrophie des FLR auch gleichzeitig zur Tumorinduktion und dessen Progress führt, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen (64–66). Laut Studienlage sind 80-85% der Patienten, welche präoperativ eine PVE erhielten, resektabel (58, 63). Die Morbiditäts- und Mortalitätsraten betragen bei Resektion nach PVE 21,7% und 3,3% (58). Kann die geplante Resektion nach PVE durchgeführt werden, so liegt das 3- und 5-Jahres-Gesamtüberleben bei 67% und 40% (67), das rezidivfreie Überleben nach 3 bzw. 5 Jahren bei 19% und 5% (62).

Die PVE findet neben der präoperativen Durchführung auch Anwendung in Verbindung mit dem zweizeitigen Vorgehen (52, 54, 55). Betragen die Hypertrophieraten im alleinigen zweizeitigen Vorgehen ohne PVE ca. 28%, so werden bei zweizeitiger Resektion mit kombinierter PVE 50% erreicht (68).

## 1 Einleitung

Neben der radiologisch interventionell durchgeführten PVE besteht im chirurgischen Vorgehen mit der portalvenösen Ligatur (PVL) eine weitere Möglichkeit zur portalvenösen Okklusion (69). Dabei weist keine der beiden Techniken einen klaren Vorteil auf. Die PVL zeigt sich laut neuerer Studien hinsichtlich der erreichten kontralateralen Hypertrophie als ebenso effektiv wie die PVE (70, 71).

### 1.4.3 „In-situ Split“-Leberresektion (ISS-LR)

Das als „in-situ Split“ bzw. ALPPS („Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy“) bezeichnete Verfahren ist eine neue zweizeitige Strategie, um eine sehr schnelle und ausgeprägte Hypertrophie des FLR und somit eine kurative Leberresektion zu ermöglichen (72–76). Es kann bei primären und sekundären Lebermalignomen angewendet werden (77).

Die Entwicklung dieses Vorgehens geht dabei auf einen Zufall zurück: intraoperativ wurde bei einer Patientin, die aufgrund eines Klatskin-Tumors für eine rechts-erweiterte Hemihepatektomie vorgesehen war, ein zu geringes Volumen der Segmente II und III aufgefunden, womit die postoperative Leberfunktion vermutlich nicht hätte aufrecht erhalten werden können. Da diese Segmente auch eine ausgeprägte Cholestase aufwiesen, erfolgte zunächst „nur“ die Anlage einer biliodigestiven Anastomose zur Drainage des links-lateralen Gallengangssystems, wozu die Parenchydissektion entlang des *Lig. falciforme* notwendig war. Um zudem eine Hypertrophieinduktion des zukünftigen Leberrestgewebes zu erreichen, wurde der rechte Pfortaderast intraoperativ abgesetzt. Bereits am achten postoperativen Tag wurde zur Kontrolle der Volumenzunahme eine CT durchgeführt, welche einen 94-prozentigen Zuwachs im Vergleich zum präoperativen FLR zeigte, sodass bereits am neunten postoperativen Tag die ursprünglich geplante Resektion erfolgen konnte. (76, 78)

Wurde anfänglich die Indikation zu diesem Vorgehen bei marginaler bzw. primärer Irresektabilität aufgrund eines zu geringen FLR nur bei unilateralem Befall gesehen (72), wird sie nun auch bei bilateraler Tumorlast gestellt (74, 78, 79). Mittlerweile wurden zudem verschiedene operative Strategien beschrieben (74, 75, 79, 80), wobei im Folgenden besonders die Regensburger Technik (78) erläutert werden soll, anhand derer die dieser Studie zugrundeliegenden Patienten reseziert wurden. Im ersten Schritt der verfolgten zweizeitigen Strategie werden gegebenenfalls vorhandene Tumorherde des links-lateralen Leberlappens reseziert. Anschließend wird der rechte

## 1 Einleitung

Pfortaderast aufgesucht und abgesetzt. Die rechte Leberarterie sowie der rechte Hauptgallengang werden hingegen geschont und ggf. mittels eines „vessel-loop“ angeschlungen. Im Anschluss erfolgt die Parenchydissektion entlang des *Lig. falciforme* bis zur *Vena cava inferior*. Diese ist notwendig, um der reaktiven Perfusion des rechten Leberlappens nach Absetzen des rechten Pfortaderastes über intrahepatische bzw. interlobäre Kollateralen entgegen zu wirken (81, 82). Die arterielle Versorgung sowie die biliäre Drainage des Segmentes IV sollten, wenn möglich, belassen werden, um Nekrosen und Galleleckagen zu verhindern (74). Zur besseren Übersicht können die rechte und mittlere Lebervene mittels Gefäßschlingen markiert werden (78). Der so nur noch arteriell versorgte und *in situ* verbleibende rechte Leberlappen fungiert nun als eine Art funktionelle Hilfestellung für den links-lateralen Leberlappen, um diesen innerhalb der ersten und besonders kritischen Woche nach Resektion zu unterstützen (76). Vor Beendigung der Operation wird in den Spalt der Parenchydissektion eine Plastikfolie eingebracht, um Adhäsionen entlang der Dissektionslinie bis zur Komplettierungsoperation zu vermeiden (78). Nach ca. 7-9 Tagen wird mittels CT-Volumetrie die ausreichende Volumenzunahme des FLR überprüft und anschließend die Komplettierungsoperation geplant (78). Dabei wird die Adhäsionsprophylaxe entfernt und die angeschlungenen Gefäße sowie der rechte Gallengang abgesetzt, sodass der rechte Leberlappen und das Segment IV (ggf. inkl. Seg. I) entfernt werden können (78).

Der Zeitraum zwischen den beiden Operationen variiert je nach Publikation zwischen im Mittel 6 und 13 Tagen (72–75, 79, 80, 83). Die Hypertrophieraten, die innerhalb dieses kurzen Zeitintervalls erzielt werden können, sind bemerkenswert hoch und liegen zwischen 74% und 87,2% (72, 74, 83–85). Neben diesen beeindruckenden Ergebnissen werden immer wieder hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten aufgegriffen. Komplikationen Grad IIIa oder höher traten nach der Dindo Clavien-Klassifikation (86) bei 44% (38-50%) der Patienten auf, die 90-Tage-Mortalität betrug 11% (8-16%) (77). Aufgrund der Neuheit dieses Verfahrens existieren bisher nur wenige Daten zum Langzeitüberleben nach ISS-LR. Das Gesamtüberleben bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen beträgt nach ein bzw. zwei Jahren 88% bzw. 74%. Das rezidivfreie Überleben liegt nach dieser Zeit bei 59% und 41% und im Mittel bei 14 Monaten (87).

#### 1.4.4 Risiko der Tumorprogression nach Hypertrophieinduktion

Obwohl sich die beschriebenen Strategien sehr effektiv hinsichtlich der Hypertrophieinduktion zeigen und hierzu besonders die PVE im klinischen Alltag etabliert ist, gibt es auch Kontroversen bezüglich deren Anwendung. Ergebnisse klinischer und experimenteller Studien legen nahe, dass die PVE Einfluss auf das Tumorwachstum nimmt, sowohl im okkludierten als auch im nicht okkludierten Leberlappen (64–66, 88–94). Dabei zeigten lebereigene Tumoren und kolorektale Lebermetastasen nach PVE/PVL ein vergrößertes Tumolvolumen, eine Zunahme der Wachstumsrate oder eine erhöhte Mitoserate (64–66, 88, 91–94). Daneben konnten auch gegenteilige Ergebnisse verzeichnet werden (65, 89, 95). Für die ISS-LR ist die Datenlage diesbezüglich noch sehr eingeschränkt. Klinische Beobachtungen z.B. von Oldhafer *et al.* (80) beschrieben bei sechs von sieben Patienten, die aufgrund kolorektaler Lebermetastasen eine ISS-LR erhielten, Tumorrezidive in der Leber nach 8 Monaten (Median). Zudem wiesen drei der sieben Patienten zu diesem Zeitpunkt Lungenmetastasen auf, sodass die Autoren auf einen Tumorprogress nach ISS-LR schlossen und die verkürzte Wartezeit bis zur Komplettierungsoperation im Vergleich zur PVE nicht – wie teilweise angeführt (72, 75) – als Vorteil sahen, dieses Risiko zu reduzieren. Histologische Untersuchungen von Tanaka *et al.* (96) verglichen Patienten nach ISS-LR und klassischer zweizeitiger Resektion mit PVE/PVL hinsichtlich der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67. Nach der ersten Operation ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Proliferationsrate zwischen beiden Gruppen, jedoch zeigte sich nach der Komplettierungsoperation ein signifikant erhöhter Proliferationsindex in der Gruppe zweizeitig resezierter Patienten mit PVE/PVL. Im Gegensatz hierzu beschrieben Fukami *et al.* (97) die Zunahme des Ki-67-Indexes einer Patientin mit kolorektalen Lebermetastasen zwischen erster und zweiter Operation im ISS-Vorgehen.

Welches pathophysiologische Korrelat sich hinter der mit der Leberregeneration einhergehenden möglichen Tumorprogression verbirgt, ist noch unklar. Vermutet werden durch die portalvenöse Okklusion induzierte Veränderungen der Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, der Blutzufuhr und die hervorgerufene lokale Zellantwort im verschlossenen Leberlappen (98).

## **2 Problemstellung und Zielsetzung**

Es wurden verschiedene Methoden zur Erhöhung der Resektabilitätsraten durch Vergrößerung des FLR entwickelt. Eine neue, innovative Strategie ist die ISS-LR, mit der Hypertrophieraten von 74% bis 87% innerhalb weniger Tage (im Median 9 Tage) erreicht werden können (72, 74, 83–85). Bislang ist jedoch der Einfluss der schnellen Hypertrophie auf das Tumorwachstum vollkommen unklar. Daher untersuchten wir in der vorliegenden, retrospektiven Analyse den Einfluss der ISS-LR auf tumorspezifische Charakteristika (Proliferation, Vaskularisation, Apoptose, Tumor-assoziierte Fibroblasten, Ausmaß an Nekrose) in kolorektalen Lebermetastasen und cholangiozellulären Karzinomen (CCC). Als Vergleichsgruppe dienten Proben von Patienten nach Standard-Leberresektionen (SLR), d.h. einzeitig resezierte Lebermalignome.

## **3 Patienten und Methoden**

### **3.1 Gewebeproben**

#### **3.1.1 Art und Herkunft der Proben**

In der vorliegenden Studie wurden retrospektiv Proben von insgesamt 24 Patienten untersucht. 17 Patienten wurden aufgrund kolorektaler Lebermetastasen operiert, während 7 Patienten aufgrund eines cholangiozellulären Karzinoms reseziert wurden. Alle Patienten wurden zwischen 2002 und 2012 in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Regensburg behandelt. Bei 8 Patienten (6 kolorektale Lebermetastasen, 2 cholangiozelluläre Karzinome) wurde eine ISS-LR durchgeführt, während 16 Patienten (11 kolorektale Lebermetastasen, 5 cholangiozelluläre Karzinome) eine Standard-Leberresektion (SLR), also eine einzeitige Resektion erhielten. Repräsentative Gewebeschnitte der resezierten Malignome wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg genehmigt (Nr. 15-101-0039).

#### **3.1.2 Datensammlung**

Anhand der klinischen Daten sowie der histopathologischen Befunde konnten zu den 8 Patienten, die eine ISS-LR erhielten, im Verhältnis 1:2 (kolorektale Lebermetastasen) bzw. 1:3 (cholangiozelluläre Karzinome) passende Proben von Patienten nach SLR identifiziert werden. Hierbei wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

- Tumorlokalisierung und TNM-Klassifikation des Primarius
- neoadjuvante Therapie
- Metastasen- bzw. Tumorgröße (größter Durchmesser)
- Metastasenanzahl und zeitliches Auftreten der Metastasen (syn-/metachron)
- Patientencharakteristika (Alter, Geschlecht)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden auf repräsentativen Gewebeschnitten der jeweils größten resezierten Lebermetastase bzw. des primären Lebertumors ausgeführt. Für alle Färbungen wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte verwendet, welche auf positiv geladenen Superfrost Plus Objektträgern der Firma Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet waren. Das Prinzip immunhistochemischer Färbungen liegt darin, mittels spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen bestimmte Zell- bzw. Gewebedeterminanten zu identifizieren und somit Rückschlüsse auf bestimmte Vorgänge im untersuchten Gewebe ziehen zu können. Dabei wurden neben monoklonalen Antikörpern, welche gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind und auch spezifisch nur dieses Epitop detektieren, auch polyklonale Antikörper verwendet, die mit unterschiedlichen Epitopen des Antigens reagieren.

Zunächst bindet der Primärantikörper an das gesuchte Antigen. Der Sekundärantikörper, welcher anschließend zugegeben wird, erkennt wiederum Antigene des Primärantikörpers. Zusätzlich ist der Sekundärantikörper mit bestimmten Enzymmolekülen (z.B. Streptavidin) gekoppelt, die im letzten Reaktionsschritt ihre Substrate in einen unlöslichen Farbstoff umwandeln.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden unter Verwendung unten aufgelisteter Antikörper in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg mit dem Färbeautomaten Roche Ventana BenchMark ULTRA (Tucson, Arizona, USA) und entsprechendem ultraView Diaminobenzidin (DAB) Färbe-Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) durchgeführt. Dabei erfolgte jeweils nach Erwärmung des Schnittes auf 75° C die Deparaffinisierung. Die anschließende Vorbehandlung diente der Aufhebung von Epitop-Quervernetzungen und variierte für die einzelnen Färbungen. Nun wurde der entsprechende Färbe-Kit, welcher sich je nach Färbung im Primärantikörper unterschied, angewandt. Dieser setzt sich aus fünf Bestandteilen zusammen: der ultraView DAB Inhibitor mit 3-prozentigem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Blockung der endogenen Peroxidase, der jeweilige Primär- und Sekundärantikörper (ein HRP-Enzym markiertes Multimer), der DAB Farbstoff zur Farbentwicklung (zusammen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Kupfer als Metallverstärker für DAB. Es folgte die Gegenfärbung mit Hematoxylin, sowie die Nach-Gegenfärbung mittels Bluing

### 3 Patienten und Methoden

Reagent. Nachdem der Färbedurchgang durchgeführt worden war, schloss sich ein Spülvorgang an. Mittels heißen Wassers und handelsüblichen Handspülmittels konnte LCS, ein temperaturbeständiges Öl, welches sich zum Schutz vor Austrocknung auf den Schnitten befand, entfernt werden. Abschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70% Ethanol, 2 x 96% Ethanol, 2 x 100% Propanol, 2 x 100% Xylol) dehydriert und mit Entellan® (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Tab. 1. Zur Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Antikörper/ Enzym	Isotyp (Klon)	Verdünnung	Hersteller
Anti-Human CD31	Maus mAB; IgG1 (JC70A)	1:20	Dako (Glostrup, Dänemark)
Cleaved Caspase-3	Rabbit pAB	1:100	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Anti-Human Ki-67	Maus mAB; IgG1 (MIB-1)	1:100	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-Human Actin	Maus mAB; IgG2a (ASM-1)	1:500	Chemicon (Darmstadt, Deutschland)

#### 3.2.2 Tumervaskularisation (CD31 Gefäßfläche)

Um die Vaskularisation der Lebermetastasen und cholangiozellulären Karzinome zu analysieren, setzten wir Färbungen für CD31 ein.

CD31, auch unter „platelet endothelium cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) bekannt, ist ein transmembranes Glykoprotein, welches sich auf allen kontinuierlichen Endothelien findet und u.a. an der Herstellung von Zell-Zell-Junktionen zwischen Endothelzellen Anteil hat. Da es sowohl eine hohe Spezifität als auch Sensitivität für Endothelzellen aufweist, gilt es als verlässlichster Endothelmarker und kann als Anhaltspunkt für die Gefäßdichte und Angiogenese in Gewebeschnitten herangezogen werden. (99–102)

### 3.2.3 Apoptose

#### 3.2.3.1 Caspase-3

Caspasen („Cysteine-dependent aspartate-specific Proteases“) gelten als die Hauptmediatoren der Apoptose und liegen zunächst als Procaspasen, also inaktive Vorstufen vor. Diese werden kaskadenartig über proteolytische Schritte aktiviert. Dabei erfolgt die Spaltung der Zielproteine jeweils hinter Aspartat. Im Falle von Caspase-3 als Effektorcaspase betrifft dies Proteine, welche für die Zelle lebenswichtig sind und durch Spaltung zum Tode der Zelle führen. Solche Substrate sind Proteine des Zytoskeletts, Endonuklease-Inhibitoren, Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und hnRNPs (Komplexe aus hnRNA und Proteinen), wodurch die DNA aus dem Zellkern freigesetzt und fragmentiert wird. (103)

Der verwendete Antikörper (cleaved Caspase-3) erkennt spezifisch das nach Spaltung der Caspase-3 neu entstandene Epitop des großen Fragments (17/19 kDa) der aktivierten Caspase-3 und reagiert weder mit Procaspase-3 noch anderen aktivierten Caspasen, sodass nur apoptotische Zellen aufgezeigt werden (104).

Um die Gewebeschnitte für die Caspase-3-Färbung vorzubehandeln, wurden mehrmalige Waschvorgänge mittels ULTRA Cell Conditioner 1 (ULTRA CC1) (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA), ein Tris/Borat/EDTA-Puffer, bei pH 8,0-8,5 angewandt.

#### 3.2.3.2 TUNEL

Durch die TUNEL- (=„TdT-mediated dUTP nick end labelling“) Methode lassen sich basierend auf einer enzymatischen Reaktion durch Endonuklease Aktivität entstandene Strangbrüche in der DNA und damit apoptotische Zellen detektieren (105, 106). Dabei bindet die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) gekoppelte Nukleotide (dUTP) an das 3'-OH-Ende der DNA-Fragmente von 180-200 bp Länge (106, 107). Im verwendeten DeadEnd™ Colorimetric Tunel System der Firma Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA) sind die Nukleotide wiederum mit Biotin gekoppelt (107). Daran bindet nun HRP-Streptavidin (Horseradish Peroxidase-markiertes Streptavidin), sodass mittels einer Peroxidase-abhängigen Färbereaktion die apoptotischen Kerne sichtbar gemacht werden können (107).

Die Gewebeschnitte wurden durch Xylol deparaffinisiert und mittels absteigender Alkoholreihe (100%, 95%, 85%, 60% und 50% Ethanol), 0,85% NaCl und PBS-Puffer hydriert sowie mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Der Gewebeporpermabilisierung diente

### 3 Patienten und Methoden

die anschließende Immersion in Proteinkinase K. Die Schnitte wurden mit Äquilibrationspuffer bedeckt, worauf die Zugabe des rTdT-Reaktionsgemisches (Äquilibrationspuffer, biotinylierter Nukleotid-Mix und rTdT-Enzym) folgte. Nach Beendigung der ablaufenden Reaktionen durch citratgepufferte Salzlösung (SSC) wurde die endogene Peroxidase mittels 0,3-prozentiger Hydrogenperoxidlösung blockiert. Es schloss sich die Zugabe von Streptavidin (Streptavidin HRP) an, welches an die biotinylierten Nukleotide band und das daraufhin zugefügte Diaminobenzidin (DAB) oxidierte, sodass die apoptotischen Kerne dunkelbraun gefärbt wurden. Zuletzt erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) und Eindeckelung mit Aquatex (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland).

#### **3.2.4 Tumorproliferation (MIB-1)**

Ki-67 ist ein monoklonaler Antikörper, welcher mit einem nukleären Antigen interagiert, das nur in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, allerdings nicht in der G0-Phase. Da aber auch die Expression in der G1-Phase variabel und nur durchgängig positiv bei Zellen war, die schon einmal die Mitose durchlaufen hatten, deutete dies auf eine de-novo Synthese des Ki-67 Antigens während der ersten G1-Phase nach der Wachstumsstimulation hin. (108, 109)

Als Nachteil dieses Antikörpers galt, dass er nur bei Gefrierschnitten angewandt werden konnte. Im Jahre 1992 jedoch gelang Cattoretti *et al.* (110) die Entdeckung des MIB-1-Antikörpers, welcher rekombinante Teile des Ki-67 Antigens erkannte. Dieser zeigte den Vorteil, dass er nach Erwärmung in der Mikrowelle auch bei in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben verwendet werden konnte (110), sodass wir diesen Antikörper als Proliferationsmarker verwendeten.

Die Vorbehandlung der MIB-1-Färbung unterschied sich von der der Caspase-3-Färbung nur durch eine zusätzliche Waschung mittels ULTRA CC1 (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA).

#### **3.2.5 „Alpha-smooth muscle actin“ ( $\alpha$ SMA-Expression)**

$\alpha$ SMA ist eine der drei Isoformen von Aktin und dient als Marker für Cancer-assoziierte Fibroblasten im Tumorstroma (111). Diese exprimieren hiervon einen großen Anteil (111). Daneben gilt  $\alpha$ SMA als Marker für myogene Weichteiltumore und glattmuskuläre Differenzierung (112). Der verwendete Antikörper reagiert mit vielen Typen glatter

### 3 Patienten und Methoden

Muskelzellen, welche in Gefäßwänden, intestinaler Muscularis Mucosae und Propria präsent sind, aber auch im Myometrium und Stroma verschiedener Gewebe (112).

#### 3.3 Spezifische Auswertung

In den gefärbten Schnitten wurden lichtmikroskopisch jeweils vier bis acht zufällig ausgewählte Gebiete der Tumorproliferationszone in 40-facher Vergrößerung abfotografiert. Zusätzlich wurde für die TUNEL-Färbung je eine Übersichtsaufnahme angefertigt. Zur Mikroskopie und Durchführung entsprechender Aufnahmen wurde das Mikroskop AxioVision Observer.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) genutzt.

Die Quantifizierung für die Caspase-3-, die MIB-1- und die TUNEL-Färbung (Tumorfront) erfolgte jeweils mittels Auszählung positiv reagierender Zellen bzw. Zellkerne pro Gesichtsfeld unabhängig ihrer Intensität.

Die Berechnung der  $\alpha$ SMA- und CD31-positiven Fläche erfolgte mit Hilfe des Programmes ImageJ (Version 1.48v). Alle Aufnahmen wurden zu Graustufen konvertiert und anhand eines einheitlich festgelegten Schwellenwerts ausgewertet. Die jeweils gemessene Fläche wurde in pixels/HPF („high-power field“) angegeben. Für die Flächenmessung der nekrotischen Areale in der TUNEL-Färbung wurde ebenfalls das Programm ImageJ benutzt. Die Ergebnisse wurden als Prozentwert der gesamten Tumorfläche angegeben.

#### 3.4 Statistische Analysen

Alle akquirierten Daten wurden in Microsoft Excel®-Tabellen gesammelt. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA). Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz unserer Daten wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Hinsichtlich der Gruppenmerkmale nutzten wir zur Signifikanzprüfung zudem den Fisher's exact Test.

Für alle eingesetzten Tests galt  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant.

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, die Fehlerindikatoren der Diagramme als Standardfehler des Mittelwerts.

## 4 Ergebnisse

## 4 Ergebnisse

## 4.1 Patientenkollektiv

Für diese Arbeit wurden Tumorbiopsien kolorektaler Lebermetastasen und cholangiozellulärer Karzinome von insgesamt 24 Patienten untersucht. Das Kollektiv kolorektaler Lebermetastasen bestand aus 17 Patienten. Das Kollektiv der Patienten mit cholangiozellulären Karzinomen umfasste 7 Patienten. Entsprechend des 2:1- (kolorektale Lebermetastasen) bzw. 3:1- (cholangiozelluläre Karzinome) „Matchings“ fehlte jeweils ein Patient in der SLR Gruppe, da kein Tumormaterial mehr zur Verfügung stand. Die Charakteristika dieser beiden Patientenkollektive, sowie das jeweilige Resektionsausmaß der beiden Gruppen sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Tab. 2. Patientenkollektiv mit kolorektalen Lebermetastasen

	ISS-LR (n=6)	SLR (n=11)	p-Wert
<b>Alter</b>	67,59 ± 8,52	64,07 ± 11,44	0,52
<b>männlich/weiblich</b>	4/2	5/6	0,62
<b>T-Stadium</b>			
<b>1</b>	0	0	1,0
<b>2</b>	1	1	1,0
<b>3</b>	3	7	0,64
<b>4</b>	2	3	1,0
<b>N-Stadium</b>			
<b>0</b>	3	4	0,64
<b>1</b>	2	3	1,0
<b>2</b>	1	4	0,60
<b>Grading</b>			
<b>1</b>	0	0	1,0
<b>2</b>	4	8	1,0
<b>3</b>	2	3	1,0
<b>Anzahl der Metastasen</b>	3,17 ± 3,13	2,55 ± 1,81	0,61
<b>Metastasengröße in cm</b>	6,80 ± 3,57	4,06 ± 1,82	0,13
<b>syn-/metachrones Auftreten</b>	3/3	6/5	1,0
<b>neoadjuvante Chemotherapie</b>	3	4	0,64

## 4 Ergebnisse

Tab. 3. Patientenkollektiv mit cholangiozellulären Karzinomen

	ISS-LR (n=2)	SLR (n=5)	p-Wert
<b>Alter</b>	63,59 ± 17,54	66,73 ± 9,24	0,76
<b>männlich/weiblich</b>	1/1	3/2	1,0
<b>T-Stadium</b>			
1	2	2	0,43
2	0	2	1,0
3	0	1	1,0
4	0	0	1,0
<b>N-Stadium</b>			
0	2	5	1,0
1	0	0	1,0
<b>M-Stadium</b>			
0	2	2	0,43
X	0	3	0,43
<b>Grading</b>			
1	0	0	1,0
2	2	2	0,43
3	0	3	0,43
<b>Tumorgröße in cm</b>	7,70 ± 1,56	8,50 ± 2,71	0,72
<b>neoadjuvante Chemotherapie</b>	0	0	1,0

Tab. 4. Resektionsausmaß

	ISS-LR (n=8)	SLR (n=16)
<b>kolorektale Lebermetastasen</b>	erweiterte Hemihepatektomie rechts (n=3) erweiterte Hemihepatektomie rechts + Seg. I (n=3)	erweiterte Hemihepatektomie rechts (n=2) Hemihepatektomie rechts (n=1) Hemihepatektomie links (n=1) Hemihepatektomie links + atypische Resektion (n=1) atypische Resektion (n=6)
<b>cholangiozelluläre Karzinome</b>	erweiterte Hemihepatektomie rechts (n=2)	erweiterte Hemihepatektomie rechts (n=2) Hemihepatektomie rechts (n=1) Hemihepatektomie rechts + atypische Resektion (n=2)

## 4 Ergebnisse

## 4.2 Kolorektale Lebermetastasen

## 4.2.1 Gefäßdichte (CD31-Expression)

Die Gefäßdichte (CD31-Expression) in der Tumorproliferationszone kolorektaler Lebermetastasen lag in den Proben nach ISS-LR mit einer Fläche/Gesichtsfeld von im Mittel 239,46 ( $\pm 9,12$ ) pixels/HPF unter derjenigen der Vergleichsgruppe nach SLR mit im Mittel 244,43 ( $\pm 3,66$ ) pixels/HPF. Hieraus ergab sich mit  $p=0,149$  kein statistisch signifikanter Unterschied (ISS-LR vs. SLR 239,46 vs. 244,43 pixels/HPF CD31-positive Fläche/Gesichtsfeld;  $p=0,149$ ; Abb. 4-1.; Abb. 4-2.).

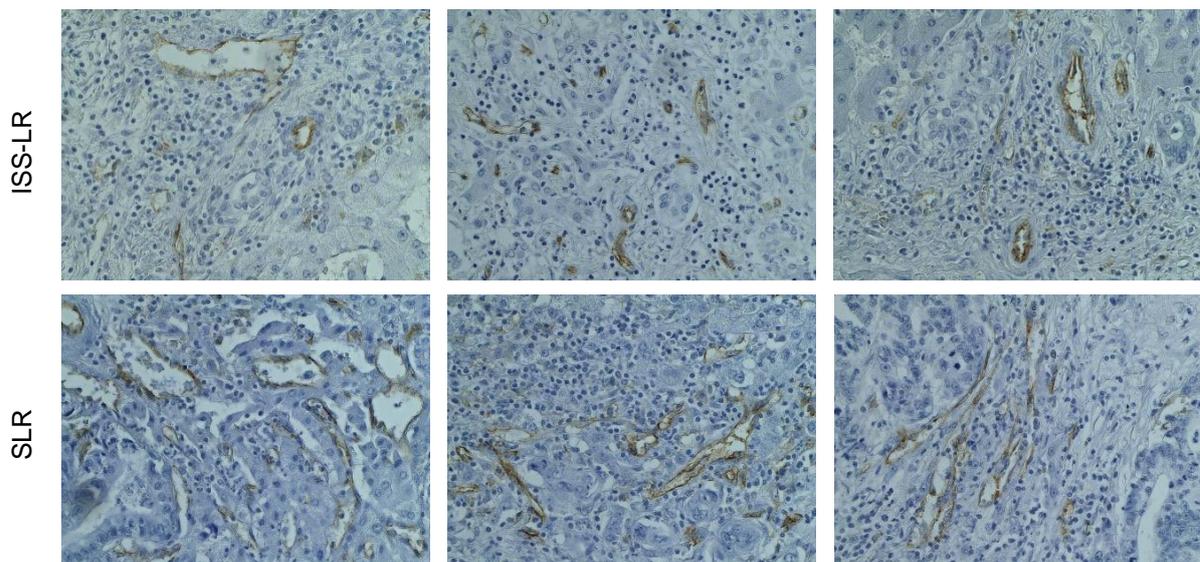


Abb. 4-1. Repräsentative Färbungen der CD31-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

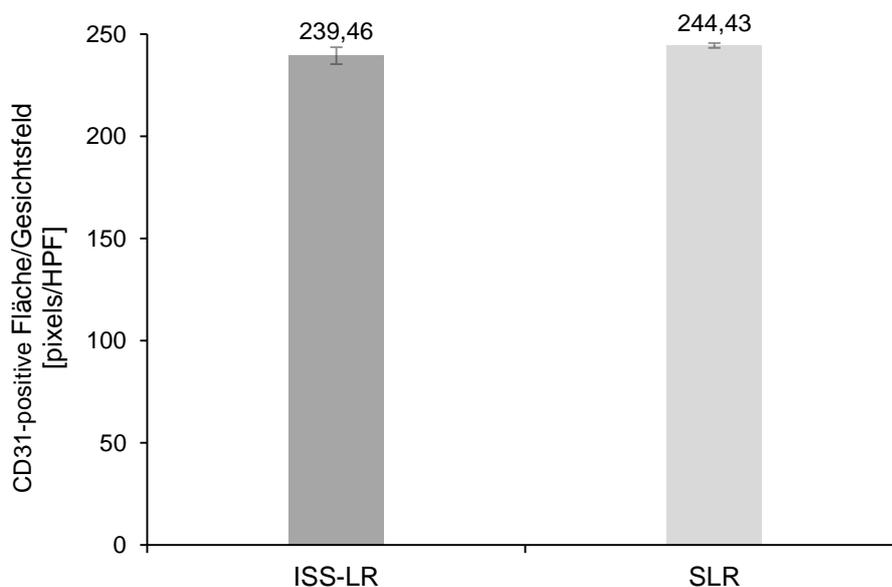


Abb. 4-2. CD31-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,149$

## 4 Ergebnisse

## 4.2.2 Apoptose

## 4.2.2.1 Caspase-3

In der Gruppe nach ISS-LR waren im Mittel 4,19 ( $\pm 0,94$ ) Caspase-3-positiv gefärbte Zellen nachweisbar. In der Vergleichsgruppe nach SLR lag dieser Wert bei 11,73 ( $\pm 3,31$ ). Der Unterschied war mit  $p < 0,0001$  statistisch signifikant (ISS-LR vs. SLR 4,19 vs. 11,73 Caspase-3-positive Zellen/Gesichtsfeld;  $p < 0,0001$ ; Abb. 4-3.; Abb. 4-4.).

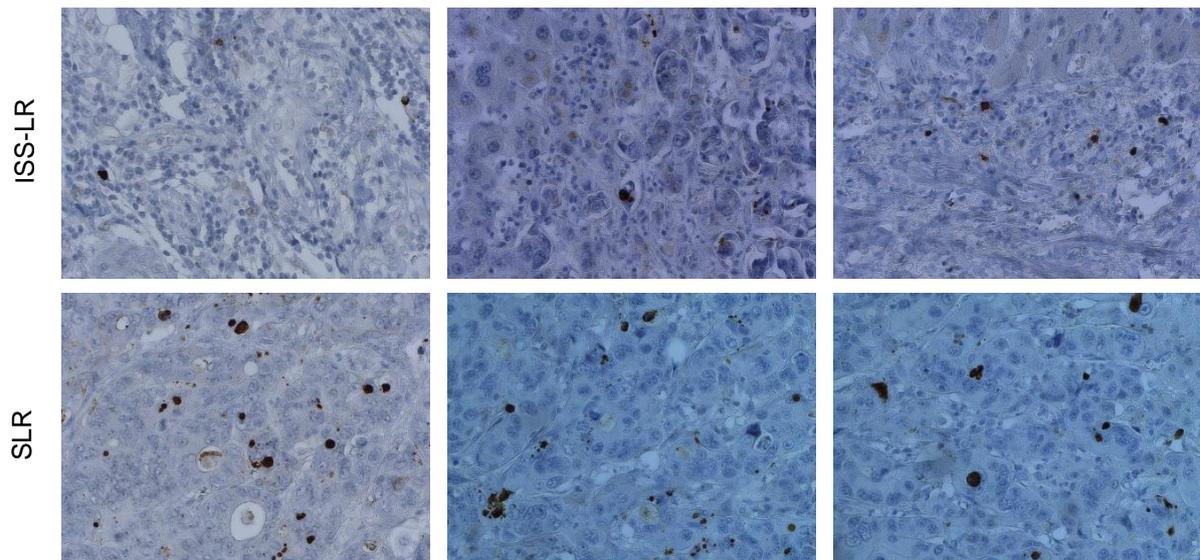


Abb. 4-3. Repräsentative Färbungen der Caspase-3-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR

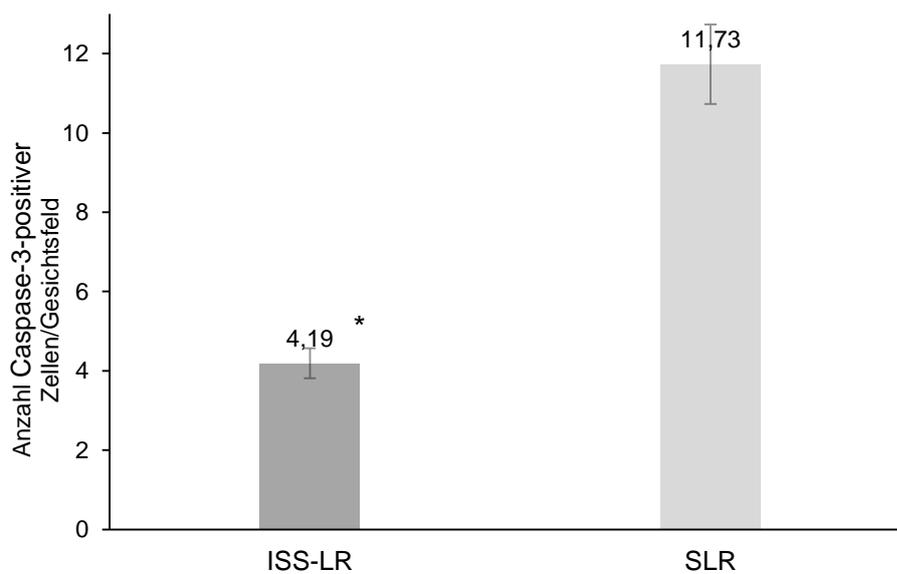


Abb. 4-4. Caspase-3-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR; \* $p < 0,0001$

## 4 Ergebnisse

## 4.2.2.2 TUNEL

Der Mittelwert TUNEL-positiver Zellkerne pro Gesichtsfeld lag in der Gruppe nach ISS-LR bei 5,52 ( $\pm 4,76$ ) und in der Vergleichsgruppe nach SLR bei 6,60 ( $\pm 6,77$ ). Der Unterschied war mit  $p=0,734$  statistisch nicht signifikant (ISS-LR vs. SLR 5,52 vs. 6,6 TUNEL-positive Zellkerne/Gesichtsfeld;  $p=0,734$ ; Abb. 4-5.; Abb. 4-6.).

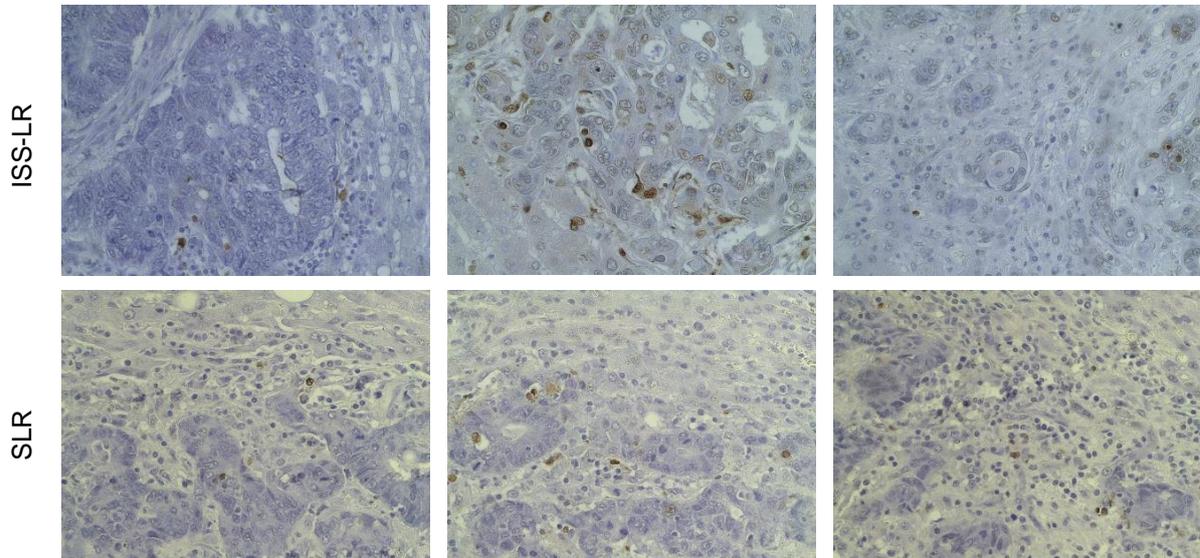


Abb. 4-5. Repräsentative Färbungen der TUNEL-Methode in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

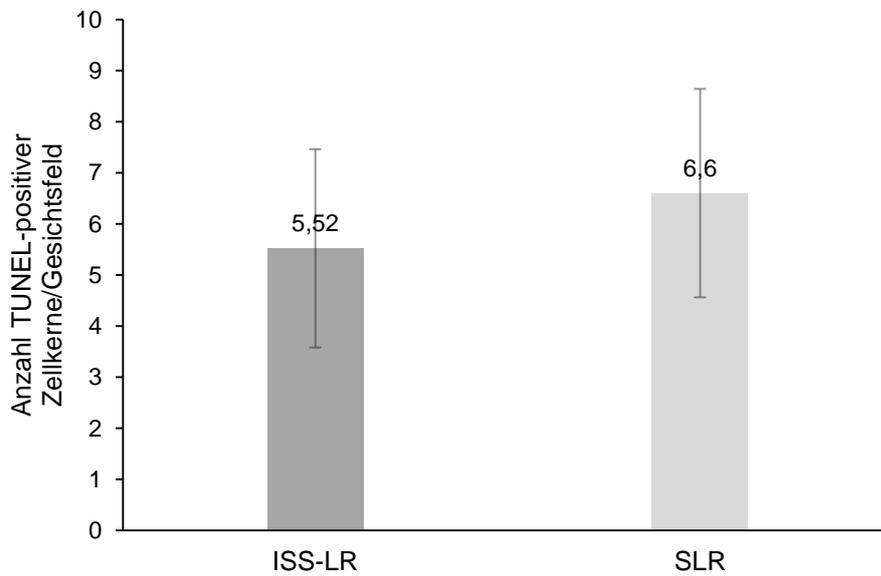


Abb. 4-6. TUNEL-Methode in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,734$

## 4 Ergebnisse

## 4.2.3 Tumorproliferation (MIB-1-Expression)

MIB-1-positive Zellen wurden ebenfalls in der Proliferationszone kolorektaler Lebermetastasen untersucht. In der Gruppe nach ISS-LR waren im Mittel 46,08 ( $\pm 48,59$ ) MIB-1-positive Zellen/Gesichtsfeld nachweisbar, in der Gruppe nach SLR 74,73 ( $\pm 43,91$ ). Hieraus ergab sich mit  $p=0,244$  kein statistisch signifikanter Unterschied (ISS-LR vs. SLR 46,08 vs. 74,73 MIB-1-positive Zellen/Gesichtsfeld;  $p=0,244$ ; Abb. 4-7.; Abb. 4-8.).

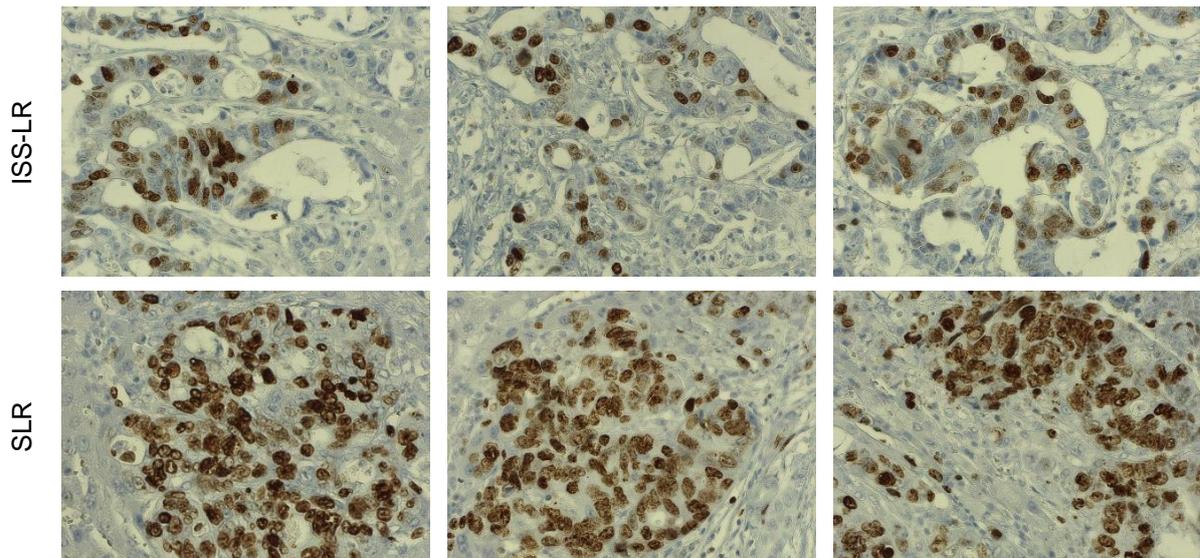


Abb. 4-7. Repräsentative Färbungen der MIB-1-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

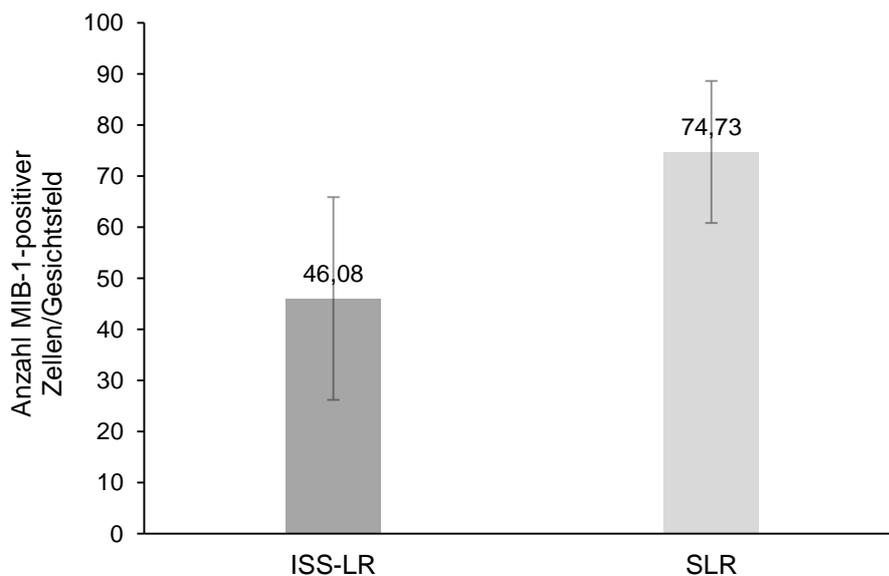


Abb. 4-8. MIB-1-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,244$

## 4 Ergebnisse

4.2.4 „Alpha-smooth muscle actin“ ( $\alpha$ SMA-Expression)

In den Proliferationszonen kolorektaler Lebermetastasen zeigte sich in den Proben der Gruppe nach ISS-LR im Mittel eine Fläche/Gesichtsfeld von 19,49 ( $\pm 7,18$ ) pixels/HPF  $\alpha$ SMA-positiv. In der Vergleichsgruppe nach SLR lag dieser Wert bei 27,42 ( $\pm 13,53$ ) pixels/HPF. Der Unterschied war mit  $p=0,205$  statistisch nicht signifikant (ISS-LR vs. SLR 19,49 vs. 27,42 pixels/HPF  $\alpha$ SMA-positive Fläche/Gesichtsfeld;  $p=0,205$ ; Abb. 4-9.; Abb. 4-10.).

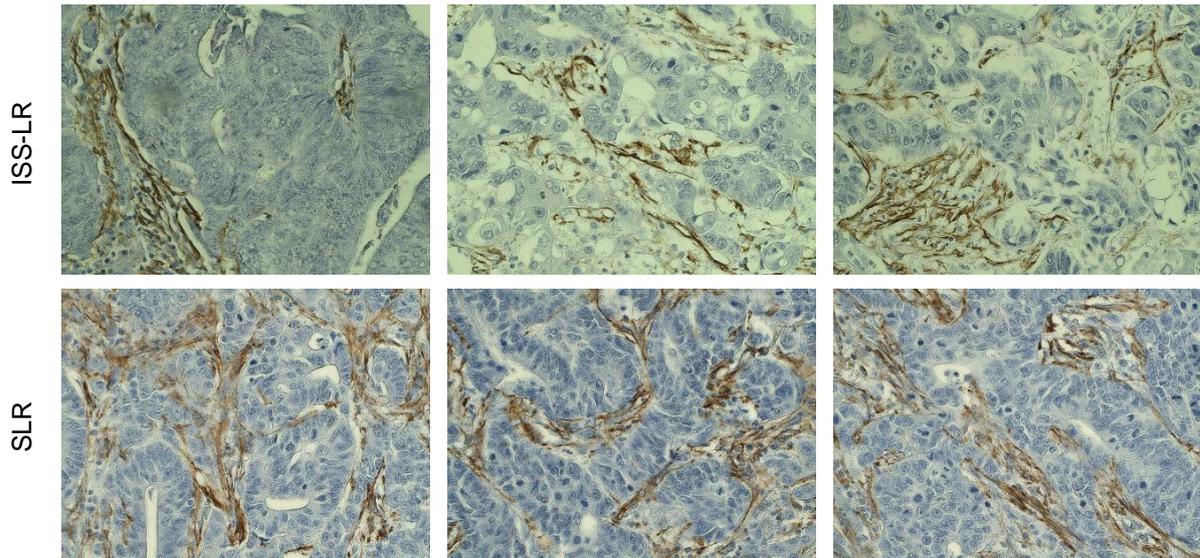


Abb. 4-9. Repräsentative Färbungen der  $\alpha$ SMA-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

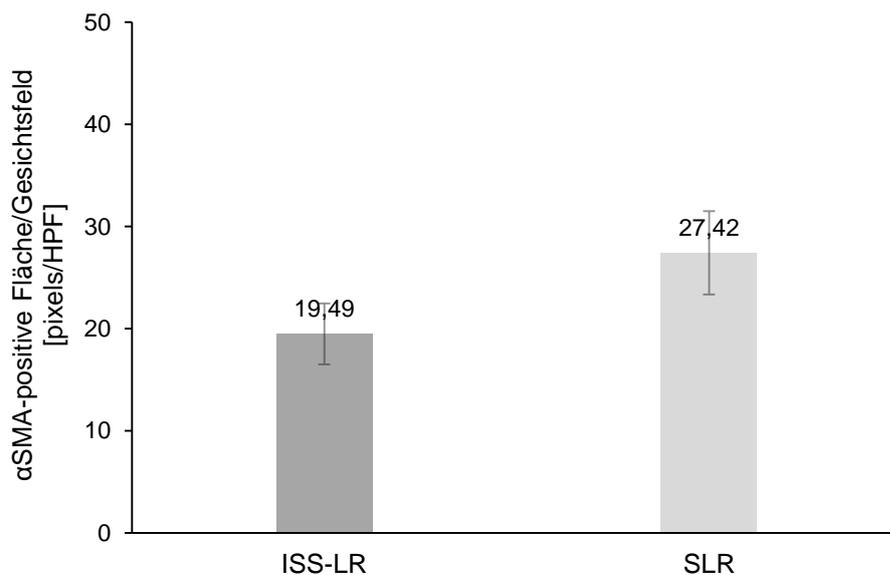


Abb. 4-10.  $\alpha$ SMA-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,205$

## 4 Ergebnisse

## 4.2.5 Nekrotische Areale

Mit dem TUNEL-Assay wurden neben apoptotischen Zellen auch nekrotische Areale analysiert. Der prozentuale Anteil nekrotischer Areale zur gesamten Tumorfläche lag in der Gruppe nach ISS-LR bei 19,63% ( $\pm 20,82\%$ ) und in der Gruppe nach SLR bei 11,67% ( $\pm 14,86\%$ ). Hieraus ergab sich mit  $p=0,373$  kein statistisch signifikanter Unterschied (ISS-LR vs. SLR 19,63% vs. 11,67% prozentualer Anteil nekrotischer Areale zur gesamten Tumorfläche;  $p=0,373$ ; Abb. 4-11.; Abb. 4-12.).

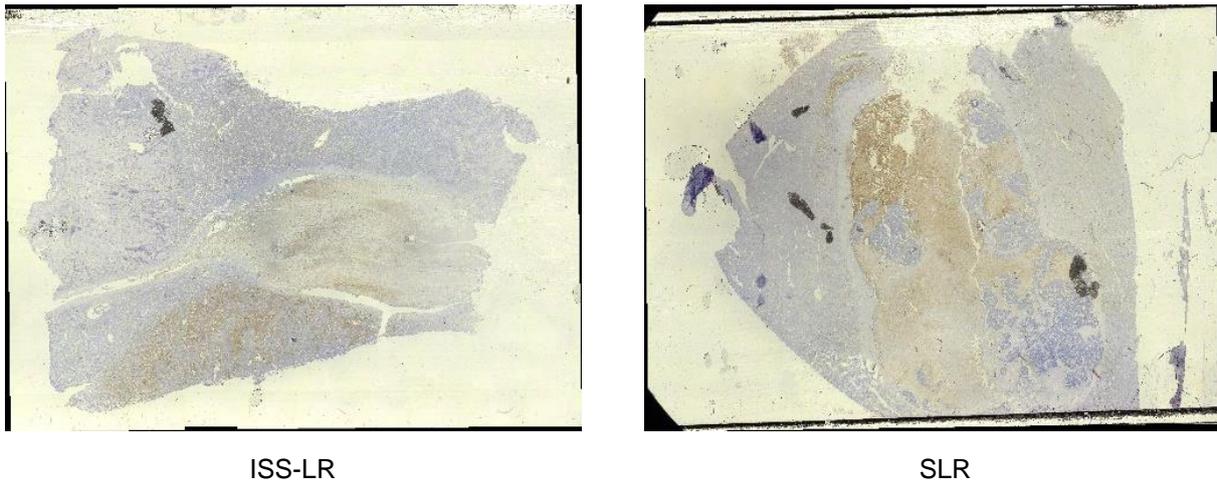


Abb. 4-11. Repräsentative Färbungen nekrotischer Areale kolorektaler Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in der Übersichtsaufnahme

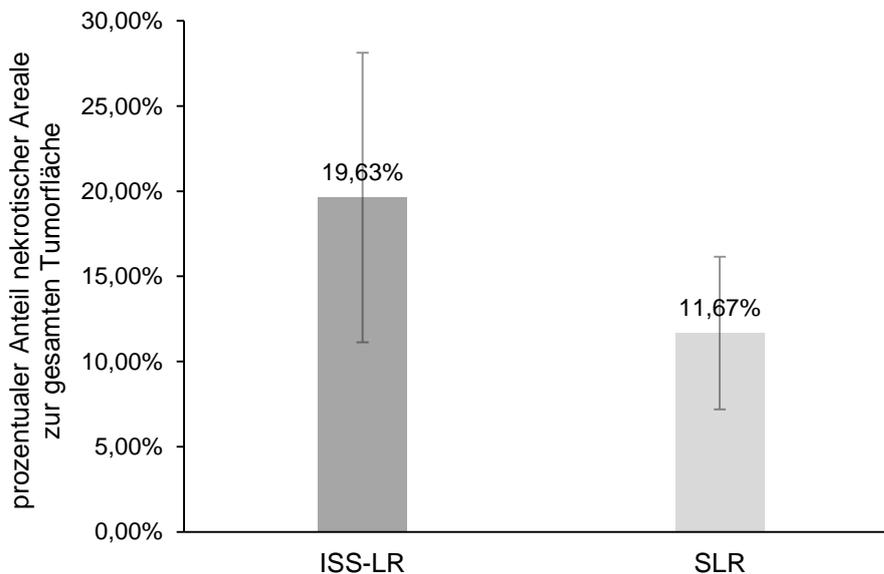


Abb. 4-12. Anteil nekrotischer Areale prozentual zur gesamten Tumorfläche in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,373$

## 4 Ergebnisse

## 4.3 Cholangiozelluläre Karzinome

## 4.3.1 Gefäßdichte (CD31-Expression)

Die Analyse der Gefäßdichte ergab in der Gruppe nach ISS-LR eine CD31-positive Fläche/Gesichtsfeld von im Mittel 241,43 ( $\pm 5,83$ ) pixels/HPF. Diese lag in der Gruppe nach SLR bei im Mittel 238,72 ( $\pm 2,65$ ) pixels/HPF. Der Unterschied war mit  $p=0,401$  statistisch nicht signifikant (ISS-LR vs. SLR 241,43 vs. 238,72 pixels/HPF CD31-positive Fläche/Gesichtsfeld;  $p=0,401$ ; Abb. 4-13.; Abb. 4-14.).

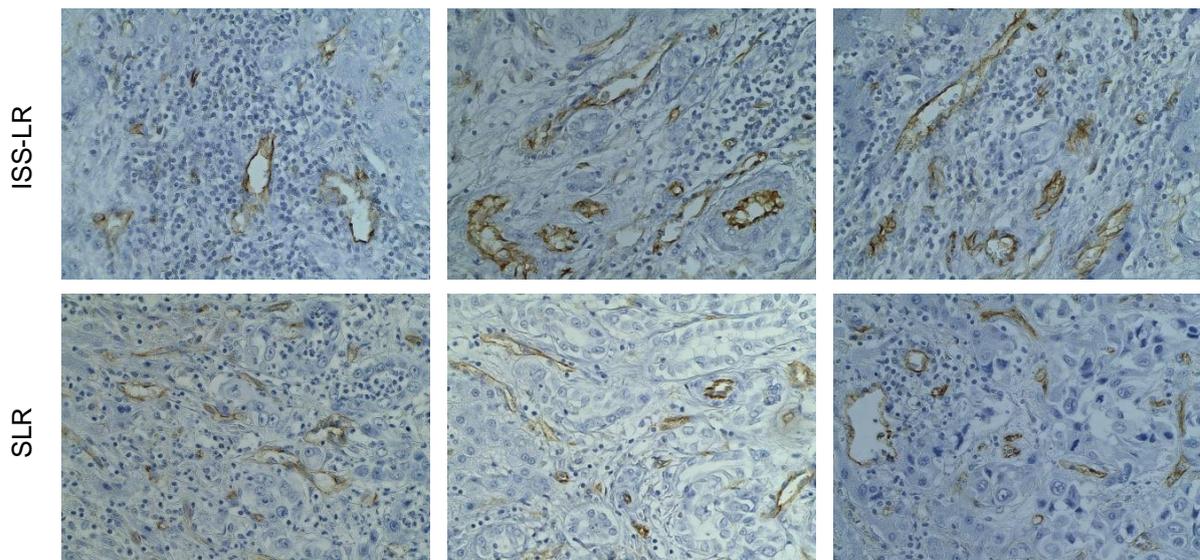


Abb. 4-13. Repräsentative Färbungen der CD31-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

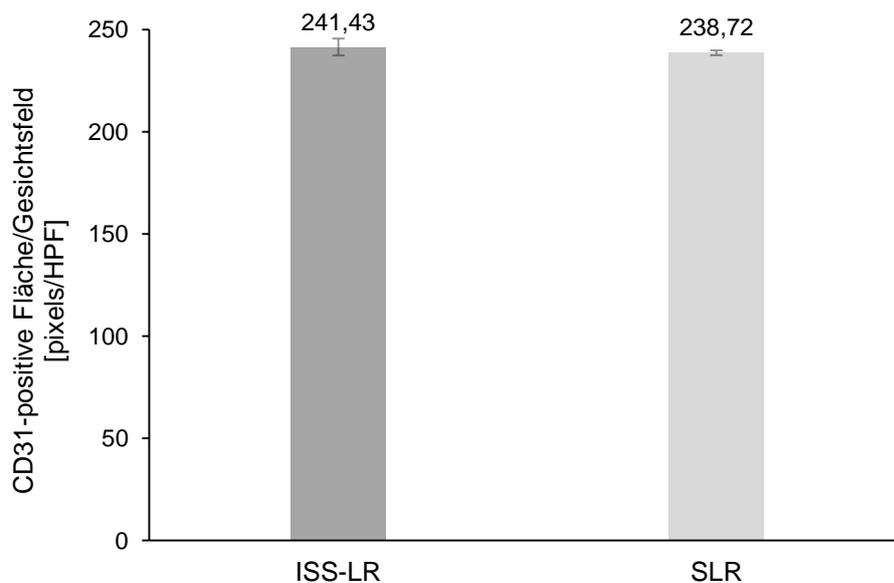


Abb. 4-14. CD31-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,401$

## 4 Ergebnisse

## 4.3.2 Apoptose

## 4.3.2.1 Caspase-3

Hinsichtlich der Caspase-3-Positivität waren in der Gruppe nach ISS-LR im Mittel 2,5 ( $\pm 0,35$ ) Zellen/Gesichtsfeld nachweisbar. In der Gruppe nach SLR waren dies im Mittel 6,11 Zellen/Gesichtsfeld ( $\pm 2,67$ ). Es bestand mit  $p=0,131$  kein statistisch signifikanter Unterschied (ISS-LR vs. SLR 2,5 vs. 6,11 Caspase-3-positive Zellen/Gesichtsfeld;  $p=0,131$ ; Abb. 4-15.; Abb. 4-16.).

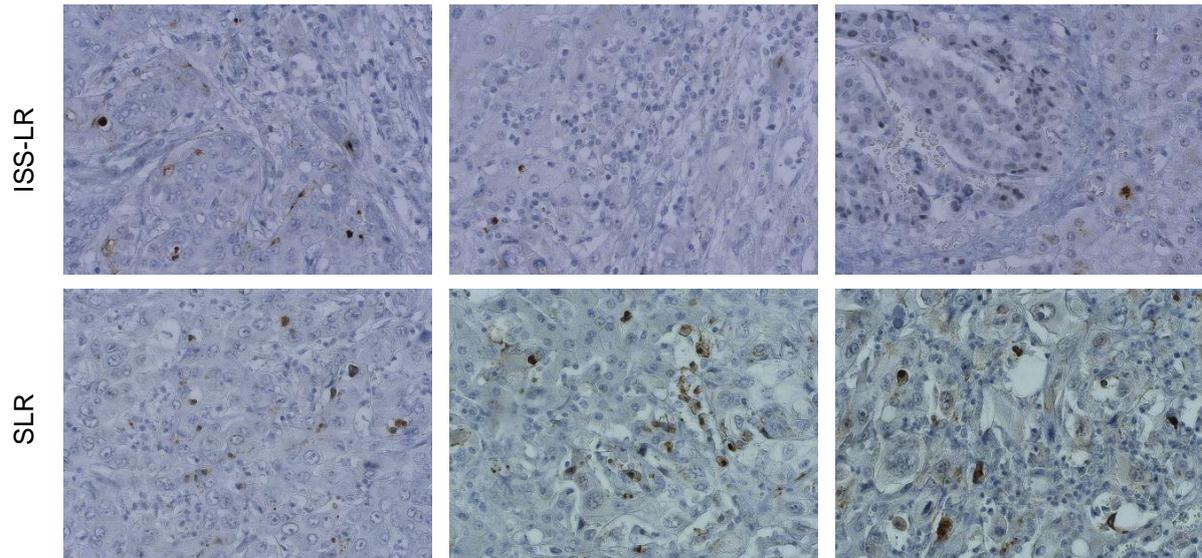


Abb. 4-15. Repräsentative Färbungen der Caspase-3-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

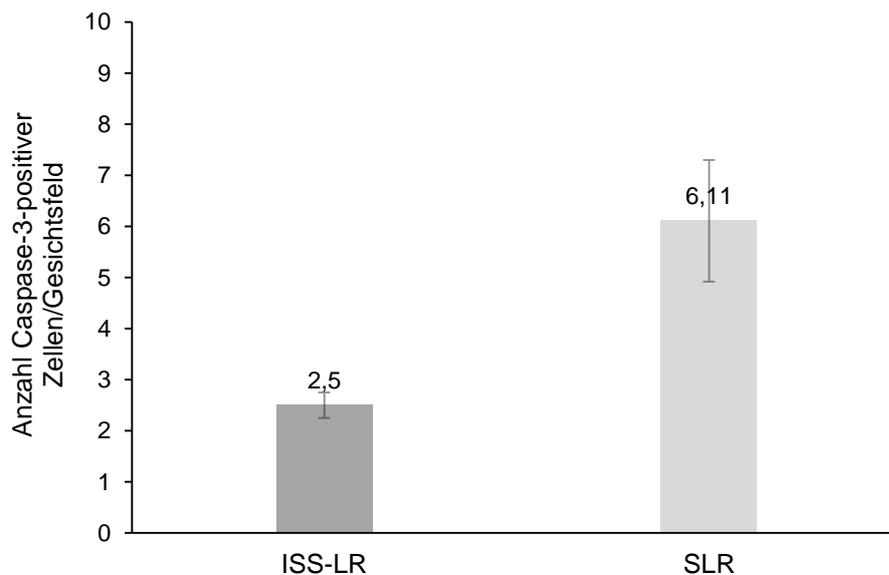


Abb. 4-16. Caspase-3-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,131$

## 4 Ergebnisse

## 4.3.2.2 TUNEL

In der Gruppe nach ISS-LR zeigten sich im Mittel 2,33 ( $\pm 0,94$ ) TUNEL-positive Zellkerne/Gesichtsfeld. Diese lagen in der Gruppe nach SLR bei im Mittel 4,6 ( $\pm 4,84$ ). Mit  $p=0,562$  ergab sich hieraus kein statistisch signifikanter Unterschied (ISS-LR vs. SLR 2,33 vs. 4,6 TUNEL-positive Zellkerne/Gesichtsfeld;  $p=0,562$ ; Abb. 4-17.; Abb. 4-18.).

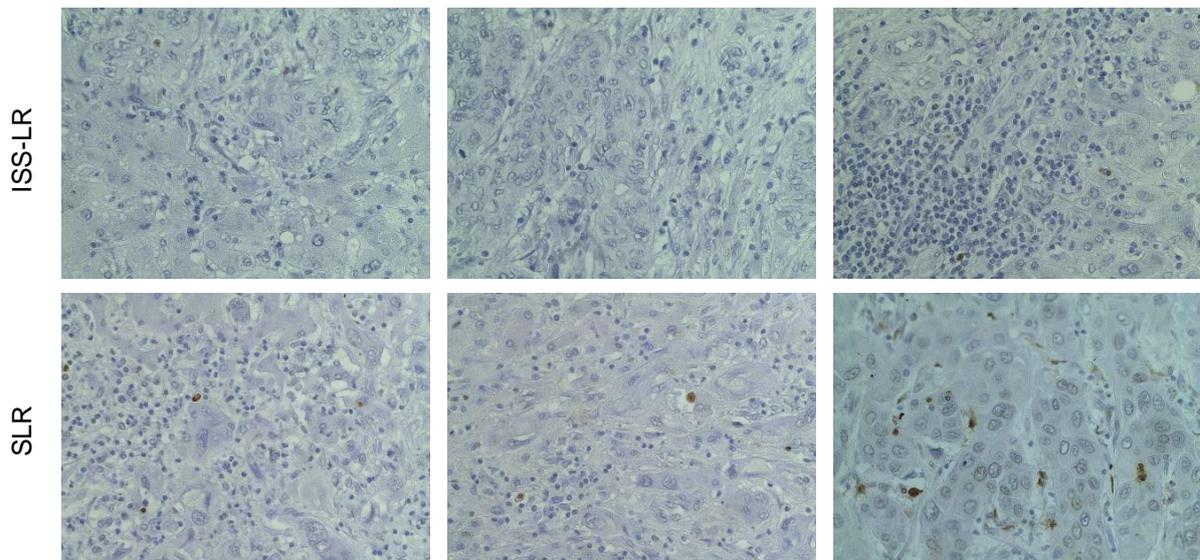


Abb. 4-17. Repräsentative Färbungen der TUNEL-Methode in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

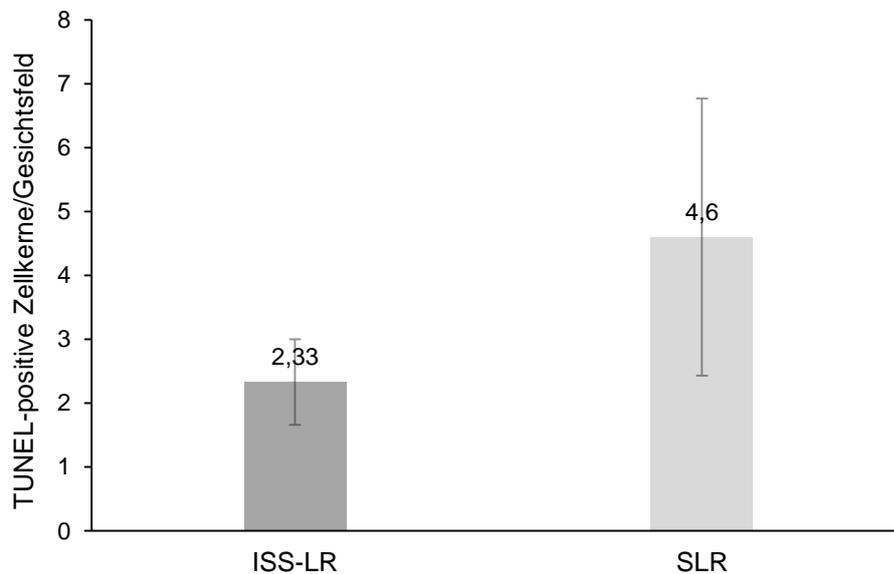


Abb. 4-18. TUNEL-Methode in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,562$

## 4 Ergebnisse

**4.3.3 Tumorproliferation (MIB-1-Expression)**

Hinsichtlich der Tumorproliferation ergab sich zwischen den Gruppen nach ISS-LR und SLR mit  $p=0,613$  kein statistisch signifikanter Unterschied. In der Gruppe nach ISS-LR waren im Mittel  $17,63 (\pm 16,44)$  MIB-1-positive Zellen/Gesichtsfeld nachweisbar, in der Vergleichsgruppe nach SLR waren es im Mittel  $22,44 (\pm 6,88)$  (ISS-LR vs. SLR  $17,63$  vs.  $22,44$  MIB-1-positive Zellen/Gesichtsfeld;  $p=0,613$ ; Abb. 4-19.; Abb. 4-20.).

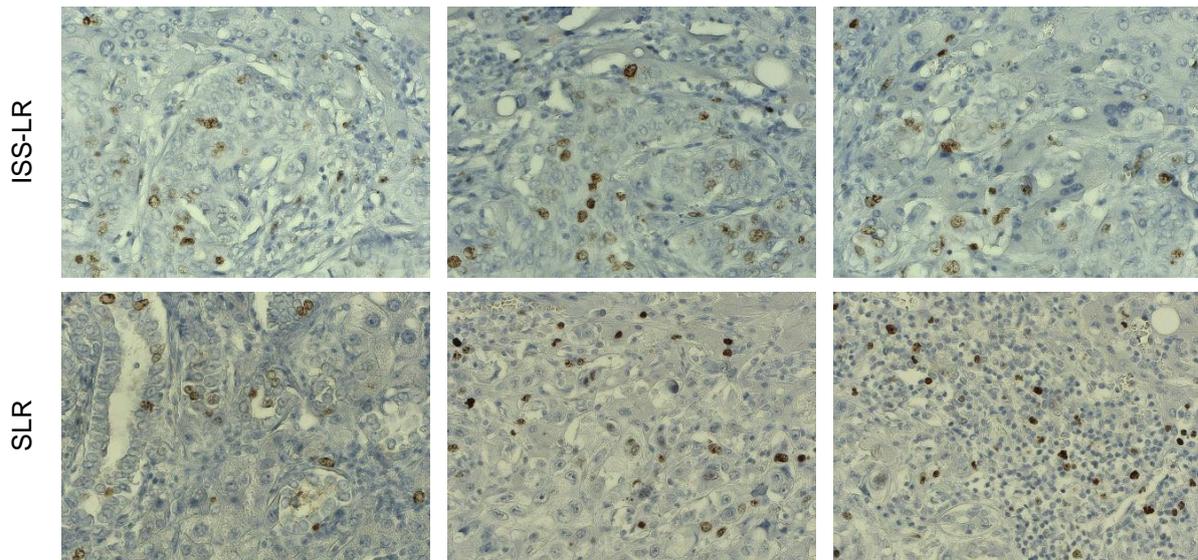


Abb. 4-19. Repräsentative Färbungen der MIB-1-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

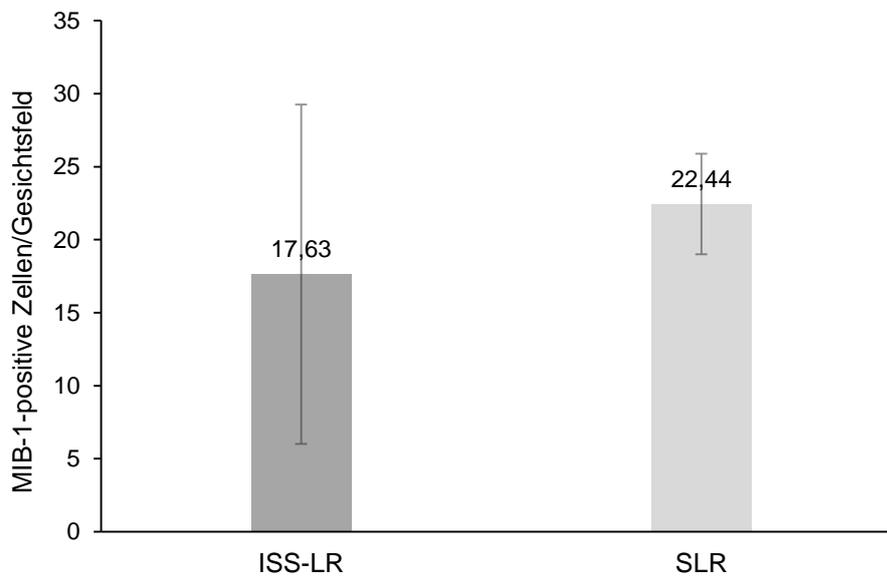


Abb. 4-20. MIB-1-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,613$

## 4 Ergebnisse

4.3.4 „Alpha-smooth muscle actin“ ( $\alpha$ SMA-Expression)

Die  $\alpha$ SMA-positive Fläche/Gesichtsfeld lag in den Proben der Gruppe nach ISS-LR bei im Mittel 21,39 ( $\pm 2,39$ ) pixels/HPF, in der Vergleichsgruppe nach SLR bei im Mittel 32,34 ( $\pm 3,87$ ) pixels/HPF. Der Unterschied war mit  $p=0,015$  statistisch signifikant (ISS-LR vs. SLR 21,39 vs. 32,34 pixels/HPF  $\alpha$ SMA-positive Fläche/Gesichtsfeld;  $p=0,015$ ; Abb. 4-21.; Abb. 4-22.).

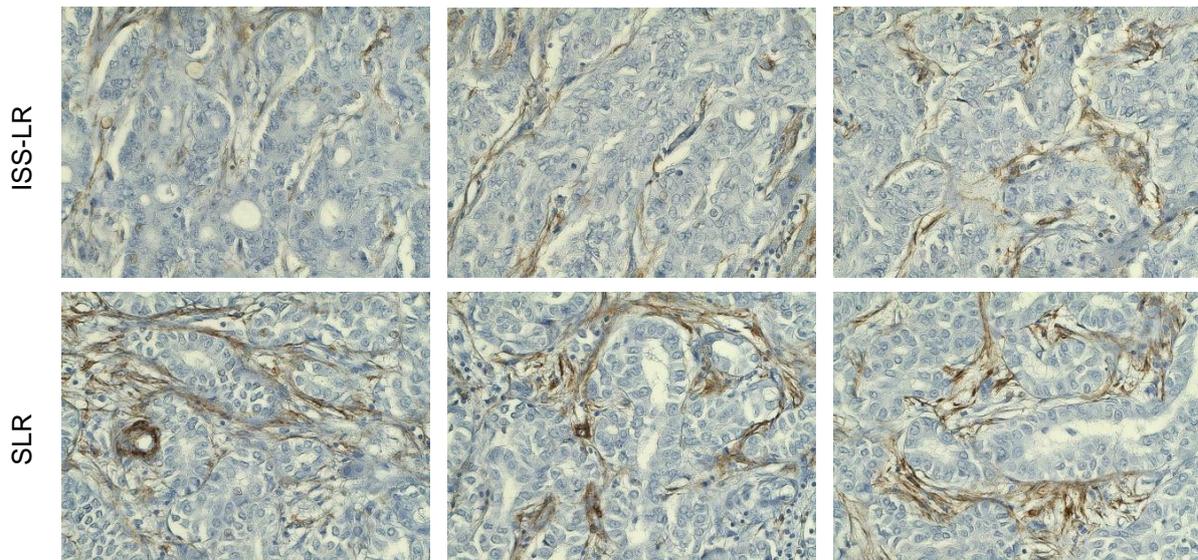


Abb. 4-21. Repräsentative Färbungen der  $\alpha$ SMA-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung

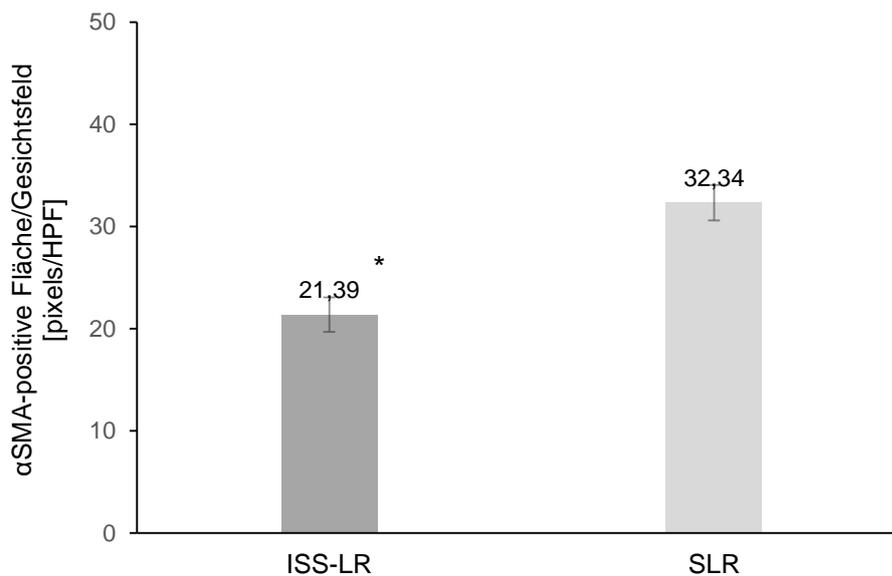


Abb. 4-22.  $\alpha$ SMA-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR; \* $p=0,015$

## 4 Ergebnisse

## 4.3.5 Nekrotische Areale

Die nekrotischen Areale nahmen in der Gruppe nach ISS-LR einen prozentualen Anteil von 0,07% ( $\pm 0,04\%$ ) zur gesamten Tumorfläche an. In der Gruppe nach SLR machte dieser Anteil 4,21% ( $\pm 7,92\%$ ) aus. Der Unterschied war mit  $p=0,524$  statistisch nicht signifikant (ISS-LR vs. SLR 0,07% vs. 4,21% prozentualer Anteil nekrotischer Fläche zur gesamten Tumorfläche;  $p=0,524$ ; Abb. 4-23.; Abb. 4-24.).

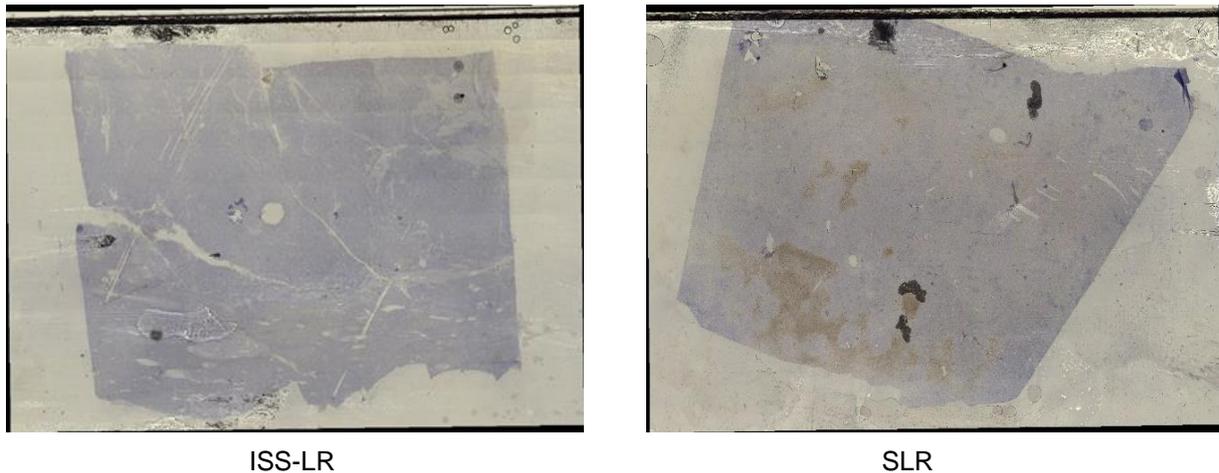


Abb. 4-23. Repräsentative Färbungen nekrotischer Areale in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in der Übersichtsaufnahme

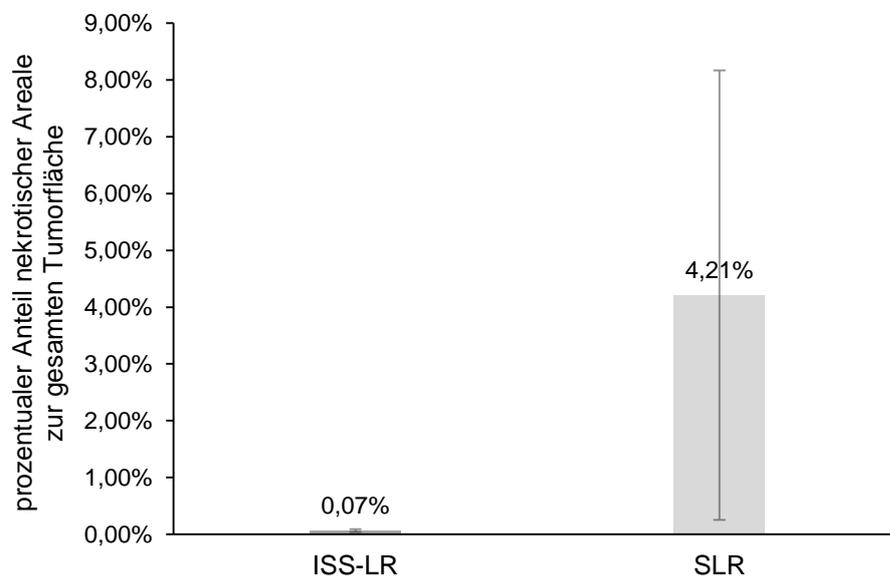


Abb. 4-24. Anteil nekrotischer Areale prozentual zur gesamten Tumorfläche in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR;  $p=0,524$

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Frage nachgegangen, ob durch die Strategie der ISS-LR das lokale Tumorwachstum stimuliert wird. Es wurden sowohl sekundäre Lebermalignome (kolorektale Lebermetastasen) als auch primäre Lebermalignome (cholangiozelluläre Karzinome, CCC) untersucht. Die Ergebnisse zeigten für kolorektale Lebermetastasen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen ISS-LR und SLR hinsichtlich Vaskularisation (CD31  $p=0,149$ ), Proliferation (MIB-1  $p=0,244$ ) und  $\alpha$ SMA-Expression ( $p=0,205$ ), obwohl ein Trend hin zu weniger Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression in der Gruppe nach ISS-LR beobachtet werden konnte. Im Hinblick auf die Apoptose waren für kolorektale Lebermetastasen in der Caspase-3-Färbung signifikant weniger apoptotische Zellen in der Gruppe nach ISS-LR nachweisbar ( $p<0,0001$ ), was jedoch mittels der TUNEL-Färbung nicht bestätigt werden konnte ( $p=0,734$ ). Ebenso konnte die TUNEL-Färbung bezüglich nekrotischer Areale keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zeigen ( $p=0,373$ ). Für die cholangiozellulären Karzinome ließ sich hinsichtlich Vaskularisation (CD31  $p=0,401$ ), Proliferation (MIB-1  $p=0,613$ ), Apoptose (Caspase-3  $p=0,131$ ; TUNEL  $p=0,562$ ) und Nekrose (TUNEL  $p=0,524$ ) kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisen. Im Vergleich von ISS-LR und SLR war die  $\alpha$ SMA-positive Fläche in der Gruppe nach ISS-LR signifikant vermindert ( $p=0,015$ ). Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte in unserer Analyse kein eindeutiger Effekt auf das Tumorwachstum nachgewiesen werden.

Die ISS-LR ist eine neue zweizeitige Strategie, durch die primär irresektable Lebermalignome mittels Hypertrophieinduktion in einen resektablen Zustand überführt werden können. Damit kann der schwerwiegenden Gefahr des postoperativen Leberversagens, bedingt durch ein zu geringes, postoperatives Leberrestvolumen (FLR), begegnet werden (72, 78). Dies ist von besonderer Bedeutung, da bereits zum Diagnosezeitpunkt 80% der Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen als irresektabel gelten (113) und ein wichtiger Grund hierfür ein zu geringes FLR ist (114). Technisch wird bei der ISS-LR im ersten operativen Schritt zunächst die Pfortader nach rechts abgesetzt und anschließend eine Parenchydissektion entlang des *Lig. falciforme* bis zur *Vena cava inferior* durchgeführt (78). In der Komplettierungsoperation erfolgt dann die Resektion des portalvenös abgesetzten Leberlappens (78). Diese Strategie führt zu einem Größenwachstum des

## 5 Diskussion

verbleibenden links-lateralen Leberlappens nach 6 bis 13 Tagen (72–74, 79, 80, 83) von 74% bis 87% (72, 74, 83–85). Verglichen mit etablierten Verfahren zur Hypertrophieinduktion wie dem klassischen zweizeitigen Vorgehen oder der PVE gilt das mittels ISS-LR erreichte, schnelle Wachstum des FLR als bemerkenswert hoch. So wird im Rahmen der PVE innerhalb eines Zeitraums von 4-8 Wochen nach Intervention im Mittel eine Zunahme des FLR von  $37,9 \pm 0,1\%$  (20,5–69,4%) beobachtet (58, 62, 63). Die TSH zeigt Wachstumsraten des FLR von 28% (68), sodass die Komplettierungsoperation  $8 \pm 4$  Wochen nach erster Resektion durchgeführt werden kann (51). Als weiterer positiver Aspekt der ISS-LR ist die hohe Machbarkeit zu nennen. Demnach kann bei nahezu 100% (95-100%) der Patienten die Komplettierungsoperation erfolgreich durchgeführt werden (115). Dies resultiert aus den hohen Hypertrophieraten und dem kurzen Zeitintervall bis zur zweiten Operation, in welchem eine relevante Tumorprogression nur sehr selten zu beobachten ist (115). Verglichen hierzu wird für die TSH eine Machbarkeitsrate von nur 77% beschrieben (56). Hinsichtlich der PVE gelten 80-85% der Patienten als resektabel (58, 63). Die technische Erfolgsrate für diese Intervention liegt bei 97-99% (58, 61). Demgegenüber werden die erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten nach ISS-LR immer wieder als Kritikpunkt des Verfahrens angeführt. Laut einer Metaanalyse von Schadde *et al.* traten Komplikationen Grad IIIa und höher bei 44% (38-50%) der Fälle auf, die 90-Tage-Mortalität betrug 11% (8-16%) (77). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der auch die in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten Patienten mit einfließen. Komplikationen Grad IIIb und höher waren bei 31,3% der Patienten zu verzeichnen, die frühe postoperative Mortalität lag bei 12,5% (116). Dem ist eine Mortalität zwischen 3,3% und 6% bei Resektion nach vorangegangener PVE/PVL bzw. 0,5% und 3% nach dem ersten bzw. zweiten Schritt im Rahmen der TSH entgegenzustellen (56, 58, 117). Insbesondere die hohen Mortalitätsraten nach ISS-LR spiegeln jedoch möglicherweise die Neuheit des Verfahrens wider, sodass mit zunehmender Erfahrung von einer Abnahme der Mortalität und Morbidität ausgegangen werden kann (116). Entsprechend wurden bereits verschiedene Richtlinien zur Patientenselektion postuliert. Beispielsweise wurde eine zurückhaltende Indikationsstellung bei Patienten mit primären Lebertumoren sowie bei Patienten über 70 Jahren empfohlen (117). Aufgrund der eingeschränkten Datenlage sind diese Richtlinien jedoch eher als Empfehlungen zu verstehen.

## 5 Diskussion

Ein bislang ungeklärter Punkt bezüglich der ISS-LR ist das Risiko einer mit der Hypertrophie einhergehenden Tumorprogression. In der Vergangenheit wurden bereits intensive Untersuchungen mit Bezug auf die PVE in diese Richtung unternommen (64–66, 88–92). Verschiedene Mechanismen werden derzeit als begünstigende Faktoren der Tumorprogression diskutiert, u.a. werden eine veränderte Wachstumsfaktoren- und Zytokinausschüttung sowie die entsprechende lokale Zellantwort vermutet (98). Zudem wird der veränderte Blutfluss zur Leber nach portalvenöser Okklusion mit Zunahme der arteriellen Perfusion im verschlossenen Leberlappen als möglicher Faktor für das Tumorwachstum angesehen (98). Dies ist als „hepatic arterial buffer response“ (HABR) im Sinne einer Kompensation bei reduziertem portalvenösem Fluss beschrieben (118). Dass diese Mechanismen auch für die ISS-LR zutreffen könnten, ist aufgrund der dabei erzielten ausgeprägten und sehr schnellen Hypertrophie zu erwarten. Entsprechend könnten diese Mechanismen auch zu einer Beschleunigung des lokalen Tumorwachstums nach ISS-LR führen (79). Dem entgegen steht die Vermutung, dass eine relevante Tumorprogression durch das kurze Zeitintervall zwischen den beiden Operationen nicht zu erwarten ist (72) sowie durch die Parenchydissektion eine Tumordinfiltration in den nicht verschlossenen Leberlappen vermieden werden kann (75). Allerdings existieren für die ISS-LR bisher kaum Daten hinsichtlich der o.a. Mechanismen.

Die klinischen Beobachtungen mit Blick auf die Tumorprogression nach ISS-LR sind derzeit uneinheitlich bei allerdings sehr eingeschränkter Datenlage. Oldhafer *et al.* (80) berichteten, dass bei sechs von sieben Patienten im Rahmen des Follow-ups nach ISS-LR ein Lokalrezidiv kolorektaler Lebermetastasen auffiel. Die mediane rezidivfreie Zeit lag bei 8 Monaten. Daneben wurden bei drei der sieben Patienten Lungenmetastasen diagnostiziert, welche in zwei der drei Fälle bereits vor den Rezidiven der Leber auftraten. Ebenso beschrieben Andriani *et al.* (119) Rezidive nach ISS-LR kolorektaler Lebermetastasen bei beiden der angeführten Patienten. In beiden Fällen wurden Lungenmetastasen detektiert, einer der beiden Patienten fiel mit einer zusätzlichen Lebermetastase 4 Monate nach ISS-LR auf. Demgegenüber stehen die Beobachtungen des eigenen Patientenkollektivs, wo ein krankheitsfreies Überleben nach Resektion kolorektaler Lebermetastasen von 18,7 Monaten bzw. 14 Monaten nach nicht-kolorektalen Lebermalignomen beobachtet wurde (116). Im ALPPS-Register lag das rezidivfreie Überleben nach 1 bzw. 2 Jahren bei 59% bzw. 41%, das

## 5 Diskussion

mittlere rezidivfreie Überleben belief sich auf 14 Monate (87). Ob ein frühes Tumorrezidiv in diesem Zusammenhang als direkte Konsequenz einer schnellen Hypertrophieinduktion im Rahmen der portalvenösen Okklusion gesehen werden muss, ist noch nicht geklärt (116). Hinsichtlich des Gesamtüberlebens nach ISS-LR belaufen sich die 1-, 2- und 3-Jahresraten auf 76%, 62% (87) und 56,4% bzw. bei mit einbezogener Mortalität auf 48,9% (116). Die mittlere Gesamtüberlebensrate beträgt 41,7 Monate (116). Im Gegensatz zur ISS-LR existiert für die PVE diesbezüglich eine bessere, wenngleich ebenfalls uneinheitliche Datenlage. Im Vergleich von Patienten mit und ohne PVE konnten Hoekstra *et al.* (65) eine höhere Rezidivrate kolorektaler Lebermetastasen im FLR in der Gruppe nach PVE nachweisen (42% vs. 4%). Zudem zeigten 25% der Patienten der PVE Gruppe bereits 3 Wochen postinterventionell neue Tumormanifestationen im FLR. Ähnliche Ergebnisse erzielten Simoneau *et al.* (120), in deren Studie 12,1% der Patienten ebenfalls 3-4 Wochen nach PVE neue kontralaterale kolorektale Lebermetastasen entwickelten. Allerdings konnten die Autoren nicht nachvollziehen, ob diese neuen Tumormanifestationen wirklich neue Tumore oder Mikrometastasen waren, welche zwar bereits vorhanden, aber mittels der präinterventionellen Bildgebung nicht detektierbar waren (65). Gegenteilige Daten wurden von Oussoultzoglou *et al.* (121) beschrieben, in deren Studie sich die intrahepatische Rezidivrate nach PVE für unilobäre kolorektale Lebermetastasen im Vergleich zur Patientengruppe ohne PVE signifikant vermindert zeigte. Dabei scheint eine mögliche Tumorprogression jedoch nicht das Gesamtüberleben zu beeinflussen, wie Simoneau *et al.* (120) beim Vergleich von Patienten mit und ohne Tumorwachstum nach PVE zeigten. Das Gesamtüberleben nach 3 Jahren lag in der Studie von Hoekstra *et al.* (65) bei 26% für Patienten mit PVE verglichen zu 77% für Patienten ohne PVE. Im Gegensatz dazu belief sich diese Rate in Untersuchungen von Shindoh *et al.* (61) auf 72,8% nach PVE. Ardito *et al.* (122) verglichen ebenfalls Patienten mit und ohne PVE und stellten hinsichtlich leberspezifischen Rezidivraten, rezidivfreiem und Gesamtüberleben keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen fest. Die Frage, ob eine Hypertrophieinduktion entweder mittels PVE oder ISS-LR zu einer klinischen Akzeleration der Tumorprogression führt, kann daher nach derzeitiger Datenlage nicht abschließend beurteilt werden.

Inwieweit die ISS-LR auch Auswirkungen auf das lokale Tumorwachstum zeigt, wurde bisher nicht untersucht. Jedoch existieren einige Daten hinsichtlich der PVE/PVL. Im

## 5 Diskussion

Rahmen einer retrospektiven Untersuchung zu den Auswirkungen der PVE auf Regeneration, Resektabilität und Outcome konnten Ribero *et al.* (123) keine Zunahme hinsichtlich der gesamten Tumorgröße primärer und sekundärer Lebermalignome vor und nach PVE (im Mittel 5,3 vs. 5,4 cm) verzeichnen. Diese wurde jeweils mittels CT vor und 2-8 Wochen nach PVE bestimmt. Demgegenüber zeigten in einer Studie von Elias *et al.* 4 von 5 Patienten mit Lebermetastasen im nicht-embolisierten Leberlappen eine Zunahme des Tumolvolumens (60 bis 970%) nach PVE (66). Dieses wurde ebenfalls CT-graphisch vor PVE und innerhalb 2 Tage vor Operation gemessen. Das Verhalten des Tumolvolumens im Vergleich kolorektaler Lebermetastasen mit und ohne PVE wurde auch von Hoekstra *et al.* (65) untersucht. Dabei wurde die Tumorwachstumsrate als Verhältnis des mittels CT-Volumetrie bestimmten Tumolvolumens zur Anzahl der zwischen diesen Untersuchungen liegenden Tage angegeben. Die Tumorwachstumsrate im embolisierten Leberlappen ließ sich für die PVE-Gruppe im Vergleich zur Gruppe ohne PVE als signifikant erhöht nachweisen. Auch innerhalb der PVE-Gruppe war ein signifikanter Anstieg der Tumorwachstumsrate vor und nach PVE von 0,15 ml/d auf 0,85 ml/d zu verzeichnen. Für primäre Lebertumore konnte ebenfalls eine signifikante Wachstumszunahme im embolisierten Leberlappen vor und nach PVE durch Hayashi *et al.* (91) gezeigt werden. Die Berechnung der Tumorwachstumsrate erfolgte hierbei über das CT-graphisch bestimmte Tumolvolumen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, vor und nach PVE sowie die Anzahl der zwischen diesen Untersuchungen liegenden Tage. Die Autoren erklären die Wachstumszunahme dadurch, dass primäre Lebertumore hauptsächlich arteriell versorgt werden und der arterielle Blutfluss im Sinne des „hepatic arterial buffer response“ nach portalvenöser Okklusion kompensatorisch erhöht ist. Der Frage einer möglichen Tumorprogression durch Verfahren zur Hypertrophieinduktion wurde auch in einigen Tierstudien nachgegangen. Im Vergleich von Leberteilresektion und PVL konnte durch Heinrich *et al.* (92) eine unterschiedliche Auswirkung der beiden Verfahren auf das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen im Mausmodell gezeigt werden. Das Tumorwachstum – immunhistochemisch bestimmt als prozentualer Anteil der Metastasen am normalen Leberparenchym in der HE-Färbung – verdoppelte sich nach PVL und nahm nach Leberteilresektion verglichen zu scheinoperierten Mäusen sogar ab, sodass sich hinsichtlich dessen für die Gruppen nach PVL und Leberteilresektion ein signifikanter Unterschied ergab. Ob auch ein Unterschied zwischen PVL und PVE in Bezug auf das Wachstum kolorektaler

## 5 Diskussion

Lebermetastasen besteht, untersuchten Maggiori *et al.* (93) im Rattenmodell. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass nach PVL das Tumolvolumen sowohl im ligierten als auch im nicht-ligierten Leberlappen im Vergleich zur Kontrollgruppe scheinoperierter Ratten signifikant vergrößert war. Dies galt ebenfalls für das Tumolvolumen im nicht-okkludierten Leberlappen nach PVE. Im Gegensatz dazu zeigte sich das Tumolvolumen nach PVE im embolisierten Leberlappen verglichen zur Gruppe scheinoperierter Ratten signifikant vermindert. Mögliche Auswirkungen der PVE auf das Tumorstadium wurden ebenfalls von Hoekstra *et al.* (124) im Tiermodell untersucht. Hierzu wurde die Tumorstadiumsrate mittels CT-Volumetrie vor und nach PVE bzw. alleiniger Lebermobilisation bestimmt und ließ sich innerhalb 14 Tage nach Intervention in der PVE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PVE als signifikant erhöht nachweisen.

Einen Ausdruck lokaler Tumorstadiumprogression kann die Tumorstadiumzellproliferation darstellen. In der vorliegenden Studie konnten wir in der MIB-1-Färbung keinen signifikanten Unterschied nach ISS-LR im Vergleich zur Gruppe nach SLR zeigen. Dieses Ergebnis ergab sich sowohl für die kolorektalen Lebermetastasen als auch für die cholangiozellulären Karzinome. Gleichwohl war ein Trend hin zu weniger proliferierenden Zellen auszumachen. Obwohl eine andere Vergleichsgruppe gewählt wurde, gehen unsere Ergebnisse diesbezüglich mit denen einer kürzlich veröffentlichten Studie von Tanaka *et al.* (96) einher. Hierbei wurden 11 Patienten nach ISS-LR mit 54 Patienten nach klassischem zweizeitigem Vorgehen mit PVE/PVL hinsichtlich der Ki-67-Expression nach den jeweiligen Operationsschritten verglichen. Nach der ersten Operation war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachzuweisen, jedoch zeigte die Gruppe klassisch zweizeitig resezierter Patienten nach der Komplettierungsoperation eine signifikant erhöhte Proliferationsrate. Bezüglich einer möglichen Tumorstadiumprogression nach ISS-LR stellten Fukami *et al.* (97) im Gegensatz dazu eine Zunahme des Ki-67-Indexes zwischen erstem und zweitem Schritt dieses Vorgehens fest. Dabei handelt es sich um einen Einzelfallbericht einer Patientin mit kolorektalen Lebermetastasen, bei der im Rahmen beider Operationen jeweils eine Biopsie aus der gleichen Metastase entnommen und hinsichtlich Ki-67-Expression untersucht worden war. Es zeigte sich ein Proliferationsindex von 60% nach dem ersten Schritt, welcher auf 80% nach der Komplettierungsoperation anstieg. Ein Vergleich mit den diesbezüglich vorliegenden Daten zur PVE zeigt ebenfalls ein

## 5 Diskussion

uneinheitliches Bild. Kokudo *et al.* (64) untersuchten in ihrer Studie ebenfalls den Ki-67-Index als Proliferationsmarker. Dabei wurde in der Gruppe kolorektaler Lebermetastasen mit PVE ein signifikant erhöhter Unterschied verglichen zu den Patienten ohne PVE festgestellt. Die erhöhte Proliferationsrate spiegelte sich in einem signifikanten, CT-graphisch bestimmten Volumenzuwachs der Metastasen innerhalb drei Wochen vor und nach PVE von 20,8% wider. Ähnliche Ergebnisse konnten Pamecha *et al.* (94) zeigen. Im Vergleich von 22 Patienten mit PVE zu 20 Patienten ohne PVE war ein statistisch signifikant erhöhter Ki-67-Index für die Gruppe nach PVE nachweisbar. Dies schlug sich in einer signifikant schnelleren Tumorstadiumsrate nieder, welche definiert wurde als Änderung des Tumorstadiums zwischen Diagnosestellung und Resektion. In einer weiteren Untergruppen-Analyse waren die aufgeführten Unterschiede für Tumorstadiumsrate und Tumorstadiumsrate nur für synchron aufgetretene kolorektale Lebermetastasen nachweisbar. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Tanaka *et al.* (95). In deren Studie wurde der Einfluss des zweizeitigen Vorgehens (mit PVE) und perioperativer Chemotherapie auf die Induktion des Tumorstadiums kolorektaler Lebermetastasen untersucht. Bei 86% der Patienten wurde eine PVE durchgeführt. Zwischen der ersten und der zweiten Resektion ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Ki-67-Positivität der Metastasen. Ferner war auch kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Tumorstadiumsgröße zwischen beiden Operationsschritten zu detektieren. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass ein zweizeitiges Vorgehen das Tumorstadiums von kolorektalen Lebermetastasen nicht induziert und somit auch im onkologischen Sinne als akzeptabel gilt. Die kontroversen Ergebnisse der dargelegten Studien zur PVE zeigen jedoch, dass selbst der Einfluss dieses etablierten Verfahrens auf die lokale Tumorstadiumsproliferation nicht abschließend geklärt ist. Der in der vorliegenden Studie gezeigte, fehlende Unterschied zwischen ISS-LR und SLR hinsichtlich der Tumorstadiumsproliferation muss daher sicherlich in weiteren Untersuchungen validiert werden.

Das Tumorstadiums wird daneben vom Verhältnis proliferierender zu apoptotischer Zellen bestimmt (125, 126). Bezüglich der Apoptose zeigte die Caspase-3-Färbung in unserer Studie für kolorektale Lebermetastasen signifikant weniger apoptotische Zellen nach ISS-LR im Vergleich zur Gruppe nach SLR. Im TUNEL-Assay konnte dies nicht bestätigt, d.h. kein signifikanter Unterschied für die beiden Gruppen

## 5 Diskussion

nachvollzogen werden. Ebenso ließ sich für die cholangiozellulären Karzinome sowohl in der Caspase-3-Färbung als auch mittels der TUNEL-Methode kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen. Hieraus lässt sich kein eindeutiger Schluss hinsichtlich der Auswirkungen auf die Apoptose nach ISS-LR ziehen. Der gleichen Fragestellung gingen Pamecha *et al.* (94) für die PVE nach. Im Vergleich kolorektaler Lebermetastasen mit und ohne PVE zeigte sich für die PVE-Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Ausmaßes apoptotischer Zellen. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich nekrotischer Areale zwischen den beiden Gruppen ausgemacht werden. Dies geht einher mit unseren Ergebnissen des TUNEL-Assays, der gleichzeitig der Darstellung von Nekrose im Tumor diene. Im Gegensatz zur Apoptose ist die Tumorzellnekrose Ausdruck unzureichender Blutversorgung bei meist schnellem Wachstum und findet sich deshalb häufig v.a. im Zentrum größerer Tumore (127, 128). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Pamecha *et al.* (94) zeigte sich für das Ausmaß an Nekrose nach ISS-LR für beide Tumorentitäten kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur SLR. Entsprechend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass durch ISS-LR keine Apoptose bzw. Nekrose des Tumors induziert wird.

Für das Tumor- bzw. Metastasenwachstum spielt zudem der Prozess der Angiogenese eine wichtige Rolle (129). Die Analyse der Gefäßdichte mithilfe des Endothelzellmarkers CD31 ergab in der vorliegenden Studie für beide Tumorentitäten im Vergleich von ISS-LR zu SLR keinen statistisch signifikanten Unterschied. Vergleichbare Studien, welche das Tumorwachstum im Rahmen hypertrophieinduzierender Verfahren untersuchten, berücksichtigten diesen Punkt unseres Wissens nach nicht. Eine neue Studie von Schadde *et al.* (130) beschäftigte sich jedoch mit den Auswirkungen der Hypoxie auf die Regeneration des FLR nach ISS-LR im Vergleich zur alleinigen PVL im Rattenmodell. Hierfür war eine lokale Zunahme nachzuweisen. Damit einher ging die konsekutiv signifikant erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Expression („hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ “) im FLR verglichen zur PVL. HIF-1 $\alpha$  nimmt eine wichtige Stellung hinsichtlich Tumorinvasion und Metastasierung ein (131). Zudem stellt HIF-1 $\alpha$  den wichtigsten Induktor der VEGF-A-Sekretion („vascular endothelial growth factor-A“) aus Tumorzellen dar, VEGF-A wiederum ist der wichtigste Faktor der Tumorangiogenese (132–134). Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Expression auch einen Effekt auf die Vaskularisation

## 5 Diskussion

hat. In der Arbeit von Schadde *et al.* (130) wurde die HIF-1 $\alpha$ -Überexpression allerdings nach ISS-LR nur in tumorfreiem Lebergewebe untersucht. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen sicherlich in Zukunft sinnvoll.

Eine weitere wichtige Komponente für das Tumorwachstum stellt das Tumorstroma dar (135). Dessen Hauptbestandteil sind über Wachstumsfaktoren aktivierte Fibroblasten, welche als Cancer-assoziierte Fibroblasten (CAFs) bezeichnet werden (111, 136–138). CAFs produzieren wiederum Wachstumsfaktoren, Zytokine und Bestandteile der Extrazellulärmatrix, wodurch sie einen direkten Einfluss auf Tumorinitiation, -invasion, -progression und Metastasierung nehmen (111). Daneben wirken sie auf einige das Tumorwachstum fördernde Prozesse wie Angiogenese, Remodeling der Extrazellulärmatrix und tumorbezogene Entzündungsreaktionen ein (139). Über die Expression großer Mengen an „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ ( $\alpha$ SMA) (111) können sie detektiert werden. Die  $\alpha$ SMA-Expression zeigte sich nach ISS-LR sowohl für die kolorektalen Lebermetastasen als auch für die cholangiozellulären Karzinome im Vergleich zur SLR vermindert. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte dabei nur für die cholangiozellulären Karzinome nachgewiesen werden. Weitere Studien, die die Auswirkungen hypertrophieinduzierender Verfahren auf das Tumorstroma untersuchten, wurden bislang nicht durchgeführt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen diesbezüglich noch keinen Schluss zu, sodass auch hier weitere Untersuchungen notwendig sind.

Unsere Studie unterliegt allerdings einigen Limitierungen. Zum einen ist die Anzahl an Patienten sehr gering. Dies gilt vor allem für die Patienten mit cholangiozellulären Karzinomen, sodass deren Daten nicht besonders aussagekräftig sind. Die geringe Patientenanzahl ist natürlich auch darauf zurückzuführen, dass die ISS-LR eine recht neue Strategie darstellt, mit der bisher nur wenige Patienten behandelt wurden. Zum anderen ist die gewählte Kontrollgruppe sehr heterogen, da die Tumorlast der Patienten, welche primär resektabel sind, sich im Allgemeinen als geringer, weniger diffus und aggressiv darstellt. Um mögliche Effekte der ISS-LR auf die Tumorzellen nachweisen zu können, wäre sicherlich die Biopsieentnahme aus den Metastasen bzw. primären Lebertumoren im Rahmen der ersten Operation eine bessere Alternative hinsichtlich der Kontrollgruppe gewesen. Da sich dies aber nachteilig auf die Patienten im Sinne einer Tumorzellverschleppung durch die Biopsie auswirken kann, wurde dieses Vorgehen jedoch vermieden. Desweiteren konnten wir in unserer

## 5 Diskussion

Studie nicht auf rezidivfreies und Gesamtüberleben unserer Patienten eingehen. Ein Patient aus der Gruppe nach ISS-LR verstarb in der frühen postoperativen Phase, sodass in diesem Sinne onkologische Überlebensanalysen nicht als sinnvoll gelten. Dies wiederum zeigt, dass die ISS-LR mit einer nicht zu vernachlässigenden Morbidität und Mortalität einhergeht und deshalb nur für Patienten mit ausgeprägtem Tumorbefall, welche anderenfalls nicht resektabel wären, als Therapieoption gewählt werden sollte. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass im Rahmen der ISS-LR nicht von einer relevanten Tumorprogression ausgegangen werden muss und dieses Verfahren damit sicherlich ausgewählten Patienten eine gute Chance auf Kuration bieten kann.

Zusammenfassend gilt die ISS-LR jedoch als diejenige Methode, welche innerhalb kürzester Zeit die effektivste Hypertrophieinduktion des FLR, verbunden mit den höchsten Machbarkeitsraten, gewährleistet.

## 6 Zusammenfassung

Die ISS-LR ist eine neue, zweizeitige Strategie, die in nur wenigen Tagen zu ausgeprägtem Wachstum des FLR führt. Damit kann der drohenden Gefahr eines postoperativen Leberversagens aufgrund eines zu geringen FLR begegnet werden. Gleichzeitig können Patienten mit primär irresektablen Lebermalignomen in einen resektablen Zustand überführt werden. Jedoch sind die Auswirkungen dieses Verfahrens auf eine mögliche Tumorprogression bisher nicht klar. Wir untersuchten in dieser retrospektiven Studie, inwieweit die ISS-LR Einfluss auf Tumorphiliferation, Apoptose und Angiogenese nimmt. Für 6 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen und 2 Patienten mit cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR wurden anhand eines 1:2- bzw. 1:3-„Matchings“ passende Patienten nach SLR ausgewählt. Die jeweils größte resezierte Metastase bzw. der primäre Lebertumor wurde immunhistochemisch auf Vaskularisation (CD31), Proliferation (MIB-1), Apoptose (Caspase-3, TUNEL), Nekrose (TUNEL) und  $\alpha$ SMA-Expression untersucht. Hinsichtlich Vaskularisation (CD31  $p=0,149$ ), Proliferation (MIB-1  $p=0,244$ ) und  $\alpha$ SMA-Expression ( $p=0,205$ ) zeigte sich für die kolorektalen Lebermetastasen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nach ISS-LR und SLR. In der Caspase-3-Färbung waren in der Gruppe nach ISS-LR signifikant weniger ( $p<0,0001$ ) apoptotische Zellen nachweisbar als in der Vergleichsgruppe nach SLR. Dieser Unterschied konnte anhand der TUNEL-Methode jedoch nicht bestätigt werden ( $p=0,734$ ). Ebenso konnte die TUNEL-Färbung bezüglich nekrotischer Areale keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zeigen ( $p=0,373$ ). Für die cholangiozellulären Karzinome war hinsichtlich Vaskularisation (CD31  $p=0,401$ ), Proliferation (MIB-1  $p=0,613$ ), Apoptose (Caspase-3  $p=0,131$ , TUNEL  $p=0,562$ ) und Nekrose (TUNEL  $p=0,524$ ) kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisbar. Im Vergleich von ISS-LR und SLR war die  $\alpha$ SMA-positive Fläche in der Gruppe nach ISS-LR signifikant vermindert ( $p=0,015$ ). Aufgrund dieser Ergebnisse muss im Rahmen der ISS-LR nicht von einer relevanten lokalen Tumorprogression im Vergleich zur SLR ausgegangen werden. Obwohl die geringe Patientenzahl und die mögliche Heterogenität zwischen den Vergleichsgruppen beachtet werden müssen, deutet diese Studie nicht auf eine Stimulation des Tumorwachstums durch die ISS-LR hin.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Zur Immunhistochemie verwendete Primärantikörper .....	18
Tab. 2. Patientenkollektiv mit kolorektalen Lebermetastasen .....	22
Tab. 3. Patientenkollektiv mit cholangiozellulären Karzinomen .....	23
Tab. 4. Resektionsausmaß.....	23

### 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4-1. Repräsentative Färbungen der CD31-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung.....	24
Abb. 4-2. CD31-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR; $p=0,149$ .....	24
Abb. 4-3. Repräsentative Färbungen der Caspase-3-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR.....	25
Abb. 4-4. Caspase-3-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR; $*p<0,0001$ .....	25
Abb. 4-5. Repräsentative Färbungen der TUNEL-Methode in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung.....	26
Abb. 4-6. TUNEL-Methode in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR; $p=0,734$ .....	26
Abb. 4-7. Repräsentative Färbungen der MIB-1-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung.....	27
Abb. 4-8. MIB-1-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR; $p=0,244$ .....	27
Abb. 4-9. Repräsentative Färbungen der $\alpha$ SMA-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung.....	28
Abb. 4-10. $\alpha$ SMA-Expression in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR; $p=0,205$ .....	28
Abb. 4-11. Repräsentative Färbungen nekrotischer Areale kolorektaler Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR in der Übersichtsaufnahme .....	29
Abb. 4-12. Anteil nekrotischer Areale prozentual zur gesamten Tumorfläche in kolorektalen Lebermetastasen nach ISS-LR und SLR; $p=0,373$ .....	29

## 7 Anhang

Abb. 4-13. Repräsentative Färbungen der CD31-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung .....	30
Abb. 4-14. CD31-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR; p=0,401 .....	30
Abb. 4-15. Repräsentative Färbungen der Caspase-3-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung	31
Abb. 4-16. Caspase-3-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR; p=0,131.....	31
Abb. 4-17. Repräsentative Färbungen der TUNEL-Methode in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung .....	32
Abb. 4-18. TUNEL-Methode in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR; p=0,562 .....	32
Abb. 4-19. Repräsentative Färbungen der MIB-1-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung .....	33
Abb. 4-20. MIB-1-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR; p=0,613 .....	33
Abb. 4-21. Repräsentative Färbungen der $\alpha$ SMA-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in 40-facher Vergrößerung .....	34
Abb. 4-22. $\alpha$ SMA-Expression in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR; *p=0,015 .....	34
Abb. 4-23. Repräsentative Färbungen nekrotischer Areale in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR in der Übersichtsaufnahme.....	35
Abb. 4-24. Anteil nekrotischer Areale prozentual zur gesamten Tumorfläche in cholangiozellulären Karzinomen nach ISS-LR und SLR; p=0,524.....	35

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ SMA	„ $\alpha$ -smooth muscle actin“
Abb.	Abbildung
ALPPS	„Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy“
bp	Basenpaar
CAFs	Cancer-assoziierte Fibroblasten
CALI	„chemotherapy-associated liver injury“
Caspase	„Cystein-dependent aspartate-specific Protease“

## 7 Anhang

CC	„Cell Conditioner“
CCC	cholangiozelluläres Karzinom
CD	„Cluster of Differentiation“
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
dUTP	Desoxyuridin Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FLR	„future liver remnant“
HABR	„hepatic arterial buffer response“
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 $\alpha$	„hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ “
HPF	„high-power field“
HRP	„horseradish peroxidase“
ICG	Indocyaningrün
ISS	„in-situ Split“
ISS-LR	„in-situ Split“-Leberresektion
LCS	„Liquid Coverslip“
Lig.	<i>Ligamentum</i>
LiMAX	„maximum liver function capacity“
mAB	monoklonaler Antikörper
MRT	Magnetresonanztomographie
pAB	polyklonaler Antikörper
PBS	„phosphate buffered saline“
PECAM-1	„platelet endothelium cell adhesion molecule-1“
PHLF	„post-hepatectomy liver failure“
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PTPE	perkutan transhepatische Pfortaderembolisation
PVE	portalvenöse Embolisation
PVL	portalvenöse Ligatur
Seg.	Segment
SLR	Standard-Leberresektion
SPECT	„Single-Photon Emission Computerized Tomography“
SSC	citratgepufferte Salzlösung

## 7 Anhang

Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TSH	„two-stage hepatectomy“
TUNEL	„TdT-mediated dUTP nick end labelling“
VEGF-A	„vascular endothelial growth factor-A“

## 8 Literaturverzeichnis

1. Scheele J. Anatomical and atypical liver resections. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2001; 72(2):113–24.
2. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer* 2010; 127(12):2893–917.
3. Rahbari NN, Mehrabi A, Mollberg NM, Muller SA, Koch M, Buchler MW et al. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future. *Annals of Surgery* 2011; 253(3):453–69.
4. Ghouri YA, Mian I, Blechacz B. Cancer review: Cholangiocarcinoma. *Journal of carcinogenesis* 2015; 14:1.
5. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Annals of Surgery* 2007; 245(5):755–62.
6. Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S et al. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Annals of Surgery* 1996; 224(4):463-73; discussion 473-5.
7. Liu R, Cox K, Guthery SL, Book L, Witt B, Chadwick B et al. Cholangiocarcinoma and high-grade dysplasia in young patients with primary sclerosing cholangitis. *Digestive diseases and sciences* 2014; 59(9):2320–4.
8. Loss M, Jung EM, Scherer MN, Farkas SA, Schlitt HJ. Chirurgische Therapie von Lebermetastasen. *Chirurg* 2010; 81(6):533–41.
9. Agrawal S, Belghiti J. Oncologic resection for malignant tumors of the liver. *Annals of Surgery* 2011; 253(4):656–65.
10. Couinaud C. *Le foie: études anatomiques et chirurgicales*. Paris: Masson et Cie; 1957.
11. Kanzler S, Teufel A, Galle PR. Liver function test to predict hepatic failure after liver resection--expensive and without clinical relevance? *Zentralbl Chir* 2007; 132(4):267–73.
12. Cady B, Jenkins RL, Steele, G D Jr, Lewis WD, Stone MD, McDermott WV et al. Surgical margin in hepatic resection for colorectal metastasis: a critical and improvable determinant of outcome. *Ann Surg* 1998; 227(4):566–71.

## 8 Literaturverzeichnis

13. Shirabe K, Takenaka K, Gion T, Fujiwara Y, Shimada M, Yanaga K et al. Analysis of prognostic risk factors in hepatic resection for metastatic colorectal carcinoma with special reference to the surgical margin. *Br J Surg* 1997; 84(8):1077–80.
14. Shi M, Zhang C, Zhang Y, Liang X, Li J. Micrometastases of solitary hepatocellular carcinoma and appropriate resection margin. *World journal of surgery* 2004; 28(4):376–81.
15. Cho SY, Park S, Kim SH, Han S, Kim Y, Lee K et al. Survival analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma after resection. *Annals of surgical oncology* 2010; 17(7):1823–30.
16. de Haas, Robbert J, Wicherts DA, Flores E, Azoulay D, Castaing D, Adam R. R1 resection by necessity for colorectal liver metastases: is it still a contraindication to surgery? *Ann Surg* 2008; 248(4):626–37.
17. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, Abdalla EK, Andres A, Eng C et al. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2005; 241(5):715-22, discussion 722-4.
18. Lise M, Bacchetti S, Da Pian P, et al. Prognostic factors affecting long term outcome after liver resection for hepatocellular carcinoma: results in a series of 100 Italian patients. *Cancer* 1998; (82):1028–36.
19. Ikai I, Arii S, Kojiro M, et al. Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer*; 2004(101):796–802.
20. Matsui Y, Terakawa N, Satoi S, et al. Postoperative outcomes in patients with hepatocellular carcinomas resected with exposure of the tumor surface: clinical role of the no-margin resection. *Arch Surg.*; 2007(142):596–602.
21. Poon RT, Fan ST, Ng IO, et al. Significance of resection margin in hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a critical reappraisal. *Ann Surg.*; 2000(231):544–51.
22. Shi M, Guo RP, Lin XJ, et al. Partial hepatectomy with wide versus narrow resection margin for solitary hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. *Ann Surg.*; 2007(245):36–43.
23. ShimadaK, SakamotoY, Esaki M, et al. Role of the width of the surgical margin in a hepatectomy for small hepatocellular carcinomas eligible for percutaneous local ablative therapy. *Am J Surg*; 2008(195):775–81.
24. Cho SY, Park SJ, Kim SH, et al. Survival analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma after resection. *Ann Surg Oncol*; 2010:1823–30.

## 8 Literaturverzeichnis

25. Tamandl D, Herberger B, Gruenberger B, et al. Influence of hepatic resection margin on recurrence and survival in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*; 2008(15):2787–94.
26. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, Raab H, Lordick F, Hartmann JT et al. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(1):38–47.
27. van den Broek, Maartje A J, Olde Damink, Steven W M, Dejong, Cornelis H C, Lang H, Malago M, Jalan R et al. Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2008; 28(6):767–80.
28. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, Dematteo RP, Ben-Porat L, Little S et al. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Annals of Surgery* 2002; 236(4):397-406; discussion 406-7.
29. Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, Maema A, Sugawara Y, Sano K et al. One thousand fifty-six hepatectomies without mortality in 8 years. *Archives of surgery (Chicago, Ill.: 1960)* 2003; 138(11):1198-206; discussion 1206.
30. Balzan S, Belghiti J, Farges O, Ogata S, Sauvanet A, Delefosse D et al. The "50-50 criteria" on postoperative day 5: an accurate predictor of liver failure and death after hepatectomy. *Ann Surg* 2005; 242(6):824-8, discussion 828-9.
31. Detroz B, Sugarbaker PH, Knol JA, Petrelli N, Hughes KS. Causes of death in patients undergoing liver surgery. *Cancer treatment and research* 1994; 69:241–57.
32. Bolder U, Brune A, Schmidt S, Tacke J, Jauch KW, Lohlein D. Preoperative assessment of mortality risk in hepatic resection by clinical variables: a multivariate analysis. *Liver transplantation and surgery: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 1999; 5(3):227–37.
33. Simmonds PC, Primrose JN, Colquitt JL, Garden OJ, Poston GJ, Rees M. Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *British journal of cancer* 2006; 94(7):982–99.
34. Guglielmi A, Ruzzenente A, Conci S, Valdegamberi A, Iacono C. How much remnant is enough in liver resection? *Dig Surg* 2012; 29(1):6–17.

## 8 Literaturverzeichnis

35. Yigitler C, Farges O, Kianmanesh R, Regimbeau J, Abdalla EK, Belghiti J. The small remnant liver after major liver resection: how common and how relevant? *Liver Transpl* 2003; 9(9):S18-25.
36. Abdalla EK, Barnett CC, Doherty D, Curley SA, Vauthey J. Extended hepatectomy in patients with hepatobiliary malignancies with and without preoperative portal vein embolization. *Arch Surg* 2002; 137(6):675-80; discussion 680-1.
37. Vauthey JN, Baer HU, Guastella T, Blumgart LH. Comparison of outcome between extended and nonextended liver resections for neoplasms. *Surgery* 1993; 114(5):968–75.
38. Shoup M, Gonen M, D'Angelica M, Jarnagin WR, Dematteo RP, Schwartz LH et al. Volumetric analysis predicts hepatic dysfunction in patients undergoing major liver resection. *J Gastrointest Surg* 2003; 7(3):325–30.
39. Suda K, Ohtsuka M, Ambiru S, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H et al. Risk factors of liver dysfunction after extended hepatic resection in biliary tract malignancies. *Am J Surg* 2009; 197(6):752–8.
40. Ferrero A, Vigano L, Polastri R, Muratore A, Eminefendic H, Regge D et al. Postoperative liver dysfunction and future remnant liver: where is the limit? Results of a prospective study. *World J Surg* 2007; 31(8):1643–51.
41. Vauthey JN, Chaoui A, Do KA, Bilimoria MM, Fenstermacher MJ, Charnsangavej C et al. Standardized measurement of the future liver remnant prior to extended liver resection: methodology and clinical associations. *Surgery* 2000; 127(5):512–9.
42. Truant S, Oberlin O, Sergent G, Lebuffe G, Gambiez L, Ernst O et al. Remnant liver volume to body weight ratio or  $\geq 0.5\%$ : A new cut-off to estimate postoperative risks after extended resection in noncirrhotic liver. *J Am Coll Surg* 2007; 204(1):22–33.
43. Primrose JN. Surgery for colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 2010; 102(9):1313–8.
44. Michels NA. Newer anatomy of the liver and its variant blood supply and collateral circulation. *American journal of surgery* 1966; 112(3):337–47.
45. Deshpande RR, Heaton ND, Rela M. Surgical anatomy of segmental liver transplantation. *The British journal of surgery* 2002; 89(9):1078–88.
46. Torzilli G, Nagino M, Tzeng CD, Kingham TP, Alatise OI, Ayandipo OO et al. SSAT State-of-the-Art Conference: New Frontiers in Liver Surgery. *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2016 Aug 1:1–11.

## 8 Literaturverzeichnis

47. Yang AD, Brouquet A, Vauthey JN. Extending limits of resection for metastatic colorectal cancer: risk benefit ratio. *Journal of surgical oncology* 2010; 102(8):996–1001.
48. Seehofer D, Neuhaus P. Current status of multimodal therapy for colorectal liver metastases. *Zentralbl Chir* 2011; 136(4):343–51.
49. Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two-stage hepatectomy: A planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Ann Surg* 2000; 232(6):777–85.
50. Heinrich S, Lang H. Liver metastases from colorectal cancer: technique of liver resection. *Journal of surgical oncology* 2013; 107(6):579–84.
51. Brouquet A, Abdalla EK, Kopetz S, Garrett CR, Overman MJ, Eng C et al. High survival rate after two-stage resection of advanced colorectal liver metastases: response-based selection and complete resection define outcome. *J Clin Oncol* 2011; 29(8):1083–90.
52. Tsai S, Marques HP, de Jong, Mechteld C, Mira P, Ribeiro V, Choti MA et al. Two-stage strategy for patients with extensive bilateral colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)* 2010; 12(4):262–9.
53. Bismuth H, Adam R, Levi F, Farabos C, Waechter F, Castaing D et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 1996; 224(4):509-20; discussion 520-2.
54. Jaeck D, Oussoultzoglou E, Rosso E, Greget M, Weber J, Bachellier P. A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 240(6):1037-49; discussion 1049-51.
55. Wicherts DA, Miller R, de Haas, Robbert J, Bitsakou G, Vibert E, Veilhan L et al. Long-term results of two-stage hepatectomy for irresectable colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg* 2008; 248(6):994–1005.
56. Lam, Vincent W T, Laurence JM, Johnston E, Hollands MJ, Pleass, Henry C C, Richardson AJ. A systematic review of two-stage hepatectomy in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)* 2013; 15(7):483–91.
57. Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K, Igawa S, Yamasaki O, Kubo S. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 1986; 10(5):803–8.

## 8 Literaturverzeichnis

58. van Lienden, K P, van den Esschert, J W, Graaf W de, Bipat S, Lameris JS, van Gulik, T M et al. Portal vein embolization before liver resection: a systematic review. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2013; 36(1):25–34.
59. Madoff DC, Hicks ME, Abdalla EK, Morris JS, Vauthey J. Portal vein embolization with polyvinyl alcohol particles and coils in preparation for major liver resection for hepatobiliary malignancy: safety and effectiveness-study in 26 patients. *Radiology* 2003; 227(1):251–60.
60. Madoff DC, Abdalla EK, Gupta S, Wu T, Morris JS, Denys A et al. Transhepatic ipsilateral right portal vein embolization extended to segment IV: improving hypertrophy and resection outcomes with spherical particles and coils. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16(2 Pt 1):215–25.
61. Shindoh J, Vauthey J, Zimmitti G, Curley SA, Huang SY, Mahvash A et al. Analysis of the efficacy of portal vein embolization for patients with extensive liver malignancy and very low future liver remnant volume, including a comparison with the associating liver partition with portal vein ligation for staged hepatectomy approach. *J Am Coll Surg* 2013; 217(1):126-33; discussion 133-4.
62. Wicherts DA, de Haas, R J, Andreani P, Sotirov D, Salloum C, Castaing D et al. Impact of portal vein embolization on long-term survival of patients with primarily unresectable colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2010; 97(2):240–50.
63. Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J et al. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg* 2008; 247(1):49–57.
64. Kokudo N, Tada K, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M et al. Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology* 2001; 34(2):267–72.
65. Hoekstra LT, van Lienden, Krijn P, Doets A, Busch, Olivier R C, Gouma DJ, van Gulik, Thomas M. Tumor progression after preoperative portal vein embolization. *Ann Surg* 2012; 256(5):812-7; discussion 817-8.
66. Elias D, Baere T de, Roche A, Mducreux, Leclere J, Lasser P. During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br J Surg* 1999; 86(6):784–8.
67. Azoulay D, Castaing D, Smail A, Adam R, Cailliez V, Laurent A et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg* 2000; 231(4):480–6.

## 8 Literaturverzeichnis

68. Tanaka K, Shimada H, Matsuo K, Ueda M, Endo I, Togo S. Remnant liver regeneration after two-stage hepatectomy for multiple bilobar colorectal metastases. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33(3):329–35.
69. Honjo I, Suzuki T, Ozawa K, Takasan H, Kitamura O. Ligation of a branch of the portal vein for carcinoma of the liver. *Am J Surg* 1975; 130(3):296–302.
70. Aussilhou B, Lesurtel M, Sauvanet A, Farges O, Dokmak S, Goasguen N et al. Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(2):297–303.
71. Capussotti L, Muratore A, Baracchi F, Lelong B, Ferrero A, Regge D et al. Portal vein ligation as an efficient method of increasing the future liver remnant volume in the surgical treatment of colorectal metastases. *Arch Surg* 2008; 143(10):978-82; discussion 982.
72. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA et al. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg* 2012; 255(3):405–14.
73. Santibanes E de, Alvarez FA, Ardiles V. How to avoid postoperative liver failure: a novel method. *World J Surg* 2012; 36(1):125–8.
74. Alvarez FA, Ardiles V, Sanchez Claria R, Pekolj J, Santibanes E de. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): tips and tricks. *J Gastrointest Surg* 2013; 17(4):814–21.
75. Knoefel WT, Gabor I, Rehders A, Alexander A, Krausch M, Schulte am Esch, J et al. In situ liver transection with portal vein ligation for rapid growth of the future liver remnant in two-stage liver resection. *Br J Surg* 2013; 100(3):388–94.
76. Santibanes E de, Clavien P. Playing Play-Doh to prevent postoperative liver failure: the "ALPPS" approach. *Ann Surg* 2012; 255(3):415–7.
77. Schadde E, Schnitzbauer AA, Tschuor C, Raptis DA, Bechstein WO, Clavien P. Systematic Review and Meta-Analysis of Feasibility, Safety, and Efficacy of a Novel Procedure: Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2015; 22(9):3109–20.
78. Lang S, Loss M, Schlitt H. „In-situ-Split“- (ISS) Leberresektion: Neue Aspekte zu Technik und Indikation. *Zentralbl Chir* 2014; 139(02):212–9.

## 8 Literaturverzeichnis

79. Donati M, Stavrou GA, Oldhafer KJ. Current position of ALPPS in the surgical landscape of CRLM treatment proposals. *World J Gastroenterol* 2013; 19(39):6548–54.
80. Oldhafer KJ, Donati M, Jenner RM, Stang A, Stavrou GA. ALPPS for Patients with Colorectal Liver Metastases: Effective Liver Hypertrophy, but Early Tumor Recurrence. *World J Surg* 2014; 38(6):1504–9.
81. Wilms C, Mueller L, Lenk C, Wittkugel O, Helmke K, Krupski-Berdien G et al. Comparative study of portal vein embolization versus portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant using a mini-pig model. *Ann Surg* 2008; 247(5):825–34.
82. van Lienden, K P, Hoekstra LT, Bennink RJ, van Gulik, T M. Intrahepatic left to right portoportal venous collateral vascular formation in patients undergoing right portal vein ligation. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2013; 36(6):1572–9.
83. Li J, Girotti P, Konigsrainer I, Ladurner R, Konigsrainer A, Nadalin S. ALPPS in right trisectionectomy: a safe procedure to avoid postoperative liver failure? *J Gastrointest Surg* 2013; 17(5):956–61.
84. Sala S, Ardiles V, Ulla M, Alvarez F, Pekolj J, Santibanes E de. Our initial experience with ALPPS technique: encouraging results. *Updates Surg* 2012; 64(3):167–72.
85. Donati M, Stavrou GA, Basile F, Gruttadauria S, Niehaus KJ, Oldhafer KJ. Combination of in situ split and portal ligation: lights and shadows of a new surgical procedure. *Ann Surg* 2012; 256(3):e11-2; author reply e16-9.
86. Dindo D, Demartines N, Clavien P. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004; 240(2):205–13.
87. Schadde E, Ardiles V, Robles-Campos R, Malago M, Machado M, Hernandez-Alejandro R et al. Early Survival and Safety of ALPPS: First Report of the International ALPPS Registry. *Ann Surg* 2014; 260(5):829–38.
88. Barbaro B, Di Stasi C, Nuzzo G, Vellone M, Giuliani F, Marano P. Preoperative right portal vein embolization in patients with metastatic liver disease. Metastatic liver volumes after RPVE. *Acta Radiol* 2003; 44(1):98–102.
89. Bretagnol F, Maggiori L, Zappa M, Sibert A, Vilgrain V, Panis Y. Selective portal vein embolization and colorectal liver metastases in rat: a new experimental model for tumor growth study. *J Surg Res* 2011; 171(2):669–74.

## 8 Literaturverzeichnis

90. de Jong, K P, Slooff MJ, de Vries, E G, Brouwers MA, Terpstra OT. Effect of partial liver resection on tumour growth. *J Hepatol* 1996; 25(1):109–21.
91. Hayashi S, Baba Y, Ueno K, Nakajo M, Kubo F, Ueno S et al. Acceleration of primary liver tumor growth rate in embolized hepatic lobe after portal vein embolization. *Acta Radiol* 2007; 48(7):721–7.
92. Heinrich S, Jochum W, Graf R, Clavien P. Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J Hepatol* 2006; 45(1):35–42.
93. Maggiori L, Bretagnol F, Sibert A, Paradis V, Vilgrain V, Panis Y. Selective portal vein ligation and embolization induce different tumoral responses in the rat liver. *Surgery* 2011; 149(4):496–503.
94. Pamecha V, Levene A, Grillo F, Woodward N, Dhillon A, Davidson BR. Effect of portal vein embolisation on the growth rate of colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 2009; 100(4):617–22.
95. Tanaka K, Hiroshima Y, Nakagawa K, Kumamoto T, Nojiri K, Takeda K et al. Two-stage hepatectomy with effective perioperative chemotherapy does not induce tumor growth or growth factor expression in liver metastases from colorectal cancer. *Surgery* 2013; 153(2):179–88.
96. Tanaka K, Matsuo K, Murakami T, Kawaguchi D, Hiroshima Y, Koda K et al. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): short-term outcome, functional changes in the future liver remnant, and tumor growth activity. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 2015; 41(4):506–12.
97. Fukami Y, Kurumiya Y, Kobayashi S. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): an analysis of tumor activity. *Updates in surgery* 2014; 66(3):223–5.
98. Graaf W de, van den Esschert, Jacomina W, van Lienden, Krijn P, van Gulik, Thomas M. Induction of tumor growth after preoperative portal vein embolization: is it a real problem? *Ann Surg Oncol* 2009; 16(2):423–30.
99. Dako Denmark A/S. Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell Clone JC70A Code M0823.
100. Folpe AL, Veikkola T, Valtola R, Weiss SW. Vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3): a marker of vascular tumors with presumed lymphatic

## 8 Literaturverzeichnis

differentiation, including Kaposi's sarcoma, kaposiform and Dabska-type hemangioendotheliomas, and a subset of angiosarcomas. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2000; 13(2):180–5.

101. Fanburg-Smith JC, Furlong MA, Childers, Esther L B. Oral and salivary gland angiosarcoma: a clinicopathologic study of 29 cases. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2003; 16(3):263–71.

102. Miettinen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens-evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1994; 7(1):82–90.

103. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Biochemie. 2., aktualisierte Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2008. (Duale Reihe).

104. Cell Signaling. Cleaved Caspase-3 (ASP175) Antibody.

105. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993; 170(1):1–8.

106. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 1992; 119(3):493–501.

107. Promega. DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Technical Bulletin, TB199.

108. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31(1):13–20.

109. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133(4):1710–5.

110. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168(4):357–63.

111. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(5):392–401.

## 8 Literaturverzeichnis

112. Chemicon. Mouse Anti-human Actin (alpha Smooth Muscle isoform), Monoclonal Antibody.
113. Adam R. Chemotherapy and surgery: new perspectives on the treatment of unresectable liver metastases. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2003; 14 Suppl 2:ii13-6.
114. Folprecht G, Grothey A, Alberts S, Raab H, Kohne C. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol* 2005; 16(8):1311–9.
115. Cai YL, Song PP, Tang W, Cheng NS. An updated systematic review of the evolution of ALPPS and evaluation of its advantages and disadvantages in accordance with current evidence. *Medicine* 2016; 95(24):e3941.
116. Lang SA, Loss M, Benseler V, Glockzin G, Schlitt HJ. Long-term results after in-situ split (ISS) liver resection. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie* 2015; 400(3):361–9.
117. Schadde E, Ardiles V, Slankamenac K, Tschuor C, Sergeant G, Amacker N et al. ALPPS offers a better chance of complete resection in patients with primarily unresectable liver tumors compared with conventional-staged hepatectomies: results of a multicenter analysis. *World J Surg* 2014; 38(6):1510–9.
118. Lauth WW. Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol* 1985; 249(5 Pt 1):G549-56.
119. Andriani OC. Long-term results with associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS). *Ann Surg* 2012; 256(3):e5; author reply e16-9.
120. Simoneau E, Hassanain M, Shaheen M, Aljiffry M, Molla N, Chaudhury P et al. Portal vein embolization and its effect on tumour progression for colorectal cancer liver metastases. *The British journal of surgery* 2015; 102(10):1240–9.
121. Oussoultzoglou E, Bachellier P, Rosso E, Scurtu R, Lucescu I, Greget M et al. Right portal vein embolization before right hepatectomy for unilobar colorectal liver metastases reduces the intrahepatic recurrence rate. *Annals of Surgery* 2006; 244(1):71–9.
122. Ardito F, Vellone M, Barbaro B, Grande G, Clemente G, Giovannini I et al. Right and extended-right hepatectomies for unilobar colorectal metastases: impact of portal vein embolization on long-term outcome and liver recurrence. *Surgery* 2013; 153(6):801–10.

## 8 Literaturverzeichnis

123. Ribero D, Abdalla EK, Madoff DC, Donadon M, Loyer EM, Vauthey J. Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg* 2007; 94(11):1386–94.
124. Hoekstra LT, van Lienden, Krijn P, Verheij J, van der Loos, Chris M, Heger M, van Gulik, Thomas M. Enhanced tumor growth after portal vein embolization in a rabbit tumor model. *The Journal of surgical research* 2013; 180(1):89–96.
125. Thompson HJ, Strange R, Schedin PJ. Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992; 1(7):597–602.
126. Santoni-Rugiu E, Jensen MR, Thorgeirsson SS. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c-myc and transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 1998; 58(1):123–34.
127. Karamitopoulou E, Cioccarri L, Jakob S, Vallan C, Schaffner T, Zimmermann A et al. Active caspase 3 and DNA fragmentation as markers for apoptotic cell death in primary and metastatic liver tumours. *Pathology* 2007; 39(6):558–64.
128. Aoki K, Takayasu K, Muramatsu Y, Moriyama N, Mizuguchi Y, Sakamoto M et al. Spontaneous massive hemorrhage within a malignant tumor of the liver: diagnostic features in sonography and CT. *Jpn J Clin Oncol* 1991; 21(5):366–71.
129. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(1):4–6.
130. Schadde E, Tsatsaris C, Swiderska-Syn M, Breitenstein S, Urner M, Schimmer R et al. Hypoxia of the growing liver accelerates regeneration. *Surgery* 2016.
131. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 2003; 3(10):721–32.
132. Shimomura M, Hinoi T, Kuroda S, Adachi T, Kawaguchi Y, Sasada T et al. Overexpression of hypoxia inducible factor-1 alpha is an independent risk factor for recurrence after curative resection of colorectal liver metastases. *Annals of surgical oncology* 2013; 20 Suppl 3:527–36.
133. Cesario, Jonas Magno Santos, Brito, Rodrigo Barbosa Oliveira, Malta CS, Silva CS, Matos, Yves Silva Teles, Kunz, Tania Cristina Macedo et al. A simple method to induce hypoxia-induced vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) expression in T24 human bladder cancer cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 2016.

## 8 Literaturverzeichnis

134. Koshikawa N, Iyozumi A, Gassmann M, Takenaga K. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene* 2003; 22(43):6717–24.
135. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):422–33.
136. Berdiel-Acer M, Sanz-Pamplona R, Calon A, Cuadras D, Berenguer A, Sanjuan X et al. Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol* 2014; 8(7):1290–305.
137. Bae JY, Kim EK, Yang DH, Zhang X, Park Y, Lee DY et al. Reciprocal interaction between carcinoma-associated fibroblasts and squamous carcinoma cells through interleukin-1alpha induces cancer progression. *Neoplasia* 2014; 16(11):928–38.
138. Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 2010; 316(17):2713–22.
139. Han Y, Zhang Y, Jia T, Sun Y. Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts. *Tumour Biol* 2015; 36(3):1385–94.

### 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. med. Sven A. Lang, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Freiburg, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, für die wertvollen Tipps, die zahlreichen Gespräche und Diskussionen sowie für die professionelle und zuverlässige Unterstützung bei der Realisierung dieses Projekts während der gesamten Zeit.

Herrn PD Dr. med. Christian Moser, Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Endokrine und Minimal-invasive Chirurgie des Klinikums Bogenhausen, für die ursprüngliche Betreuung dieser Doktorarbeit, die Unterstützung bei der Planung und Realisierung dieses Projekts sowie die freundliche Integration ins Team.

Frau PD Dr. med. Petra Ruummele, Pathologisches Institut des Universitätsklinikums Erlangen, für die Bereitstellung der Gewebeschnitte, sowie deren immunhistochemische Färbung.

Frau Christine Wagner, Frau Julia Redekopf und Herrn Marvin Anders für die professionelle Einweisung in die angewandten Arbeitsmethoden sowie für das freundliche Arbeitsklima.

Der Klinik und Poliklinik für Chirurgie (Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt) und dem Institut für Pathologie (Prof. Dr. med. Matthias Evert) des Universitätsklinikums Regensburg für die Bereitstellung der Tumorbiopsien und der klinischen Daten.

Meiner Familie, meinen Freunden und Bekannten für ihr Interesse, ihre Kritik und ihre hilfreiche Unterstützung.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

Name Jöchle Katharina  
Geburtsdaten 4. November 1990 in Memmingen  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand ledig

### Aktuelle Tätigkeit

---

ab 02/2017 Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein- und  
Viszeralchirurgie am Universitätsklinikum Freiburg

### Hochschulausbildung

---

10/2012 – 11/2016 Universität Regensburg  
Studium der Humanmedizin, Klinischer Abschnitt  
Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 11/2016,  
Gesamtnote „sehr gut“  
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 10/2015,  
Gesamtnote „gut“

10/2010 – 09/2012 Universität Regensburg  
Studium der Humanmedizin, Vorklinischer Abschnitt  
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 09/2012,  
Gesamtnote „gut“

### Promotion

---

ab 06/2013 „Einfluss der „in-situ Split“-Leberresektion vs. Standard-  
Leberresektion auf Proliferation, Apoptose und  
Angiogenese“  
Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum  
Regensburg  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Sven A. Lang

### Publikation

---

02/2017 Joechle K, Moser C, Ruemmele P, Schmidt KM, Werner  
JM, Geissler EK, Schlitt HJ, Lang SA  
„ALPPS (Associating Liver Partition and Portal vein  
Ligation for Staged hepatectomy) does not affect

## 10 Lebenslauf

proliferation, apoptosis or angiogenesis as compared to standard liver resection for colorectal liver metastases”

World Journal of Surgical Oncology

### Posterpräsentation

---

02/2016 Joechle K, Moser C, Schmidt KM, Geissler EK, Schlitt HJ, Lang SA  
„Comparing proliferation, apoptosis and angiogenesis in „one-stage liver resection” (OSLR) vs. „in-situ split” (ISS) in colorectal liver metastases (CRLM)“  
32. Deutscher Krebskongress

### Klinische Erfahrung

---

06/2016 – 10/2016 Chirurgie Tertian im Rahmen des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum Regensburg

03/2016 – 06/2016 Wahlterial Gynäkologie und Geburtshilfe im Rahmen des Praktischen Jahres am Kantonsspital Baden, Schweiz

11/2015 – 03/2016 Innere Medizin Tertian im Rahmen des Praktischen Jahres

- am Universitätsklinikum Regensburg, Innere Medizin I
- am Flinders Medical Centre in Adelaide, Australien, Kardiologie

08/2014 – 09/2014 Famulatur in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie am Helios Hanseklinikum Stralsund

02/2014 – 03/2014 Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Memmingen

08/2013 – 09/2013 Famulatur in der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin an der Klinik St. Hedwig in Regensburg

02/2013 – 03/2013 Famulatur in der Abteilung für Chirurgie mit Schwerpunkt Unfallchirurgie und Orthopädie an der St. Vinzenz Klinik in Pfronten

### Schulbildung

---

09/2001 – 06/2010 Marianum Buxheim, Gymnasium des Schulwerks der Diözese Augsburg  
Allgemeine Hochschulreife mit der Gesamtnote 1,2