

Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf  
Aus dem Institut für Diagnostische Radiologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Mödler

**Portalvenen Embolisation and Applikation  
von  
Autologen CD133+ Knochenmarks  
Stammzellen  
zur Unterstützung der Leberregeneration**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von**

**Britta Wecker**

**2010**

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan**

**Referent: Prof. Dr. Fürst  
Korreferent: Prof. Dr. Kubitz**

**Ich danke meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit unterstütz  
haben, und meinem Doktorvater für die gute Betreuung.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	3
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	4
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>1. Einleitung</b> .....	8
<b>2. Allgemeiner Teil</b> .....	10
2.1. Anatomie der Leber und des Portalvenensystems .....	10
2.2. Lebertumoren .....	14
2.2.1 <i>Hepatozelluläres Karzinom</i> .....	14
2.2.2 <i>Cholangiozelluläres Karzinom</i> .....	15
2.2.3 <i>Lebermetastasen</i> .....	16
2.3. Chirurgische Techniken der Leberresektion .....	17
2.3.1 <i>Hemihepatektomie rechts und erweiterte Hemihepatektomie</i> .....	17
2.3.2 <i>Hemihepatektomie links und erweiterte Hemihepatektomie</i> .....	17
2.3.3 <i>Subtotale Leberresektion links oder Bisegmentektomie II u. III</i> .....	17
2.3.4 <i>Segmentektomie</i> .....	17
2.3.5 <i>Mittellappenresektion</i> .....	18
2.4. Hintergründe der portalvenösen Embolisation .....	19
2.4.1 <i>Stimulation der Regeneration</i> .....	19
2.4.2 <i>Techniken</i> .....	20
2.4.3 <i>Tierexperimentelle Grundlagen:</i> .....	21
2.5. Leberstammzellen .....	25
<b>3. Methoden und Material (spezieller Teil)</b> .....	31
3.1. Patientenkollektiv (Ein-/Ausschlusskriterien) .....	31
3.2. Gruppe I .....	31
3.3. Gruppe II .....	33
3.4. Monitoring: Lebervolumetrie (und ihre Zuverlässigkeit) .....	34
3.5. PVE- Technik .....	36
3.6. Vorbereitung und Charakterisierung der CD 133+ Knochenmarkstammzellen .....	37
3.7. Applikation der CD133+ Stammzellen bei der Gruppe I .....	38
3.8. Zielgrößen .....	40
3.9. Laborparameter .....	41
<b>4. Ergebnisse</b> .....	43
4.1. BMSC Charakteristika .....	43
4.2. Volumetrie .....	43
4.3. Periinterventionelle Komplikationen .....	48
4.4. Ergebnisse der Labordaten .....	48
4.4.1 <i>Bilirubinwerte (Referenz Wertebereich: 0,2- 1,3mg/dl)</i> .....	48
4.4.2 <i>INR- Werte (Referenzbereich um 1)</i> .....	49
4.4.3 <i>GOT- Werte (Referenz- Wertebereich: &lt;35 U/l)</i> .....	50
4.4.4 <i>GPT- Werte (Referenz- Wertebereich: &lt;45 U/l)</i> .....	50
4.5. Chirurgische Behandlung und Morbidität während des Krankenhausaufenthaltes .....	51
<b>5. Diskussion</b> .....	53
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	61
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	63

## Tabellenverzeichnis

Tab.1	Übersichtstabelle Stammzell- Gruppe (I).....	32
Tab.2	Übersichtstabelle Referenz- Gruppe (II).....	34
Tab.3	Charakteristika der aufbereiteten BM- Zellen.....	43
Tab.4	Übersicht der Ergebnisse der Lebervolumetrie %FLR- prä, %FLR- day21, %FLR- gain, time to surgery von Gruppe I und Gruppe II.....	44

# Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Sementklassifikation nach Couinaud von 1957 Pathophysiologie der Leber; Prof. M. Heim, Abt. f. Gastroenterologie und Hepatologie, Universitätsspital Basel, Vorlesung 4. Jahreskurs (gastro.unibas.ch/vorlesungen/4JK_Pathophysiologie-Leber- HA.pdf).....	11
Abb.2	Rechter und linker Leberlappen a) Sicht von ventral b) Sicht von dorsal Pathophysiologie der Leber; Prof. M. Heim, Abt. f. Gastroenterologie und Hepatologie, Universitätsspital Basel, Vorlesung 4. Jahreskurs (gastro.unibas.ch/vorlesungen/4JK_Pathophysiologie-Leber- HA.pdf).....	12
Abb.3	Schematische Illustration des normalen Portalvenenastverlaufs von anteriorer und von inferiorer Perspektive; Madoff et al, Radiographics 2002;.....	13
Abb.4	Leberresektionen a.) Hemihepatektomie rechts, b.) erweiterte Hemihepatektomie, c.) Subtotale Leberresektion links oder Bisegmentektomie II u. III, d.) Hemihepatektomie links, e.) Segmentektomie, f.) Mittellappenresektion Chirurgische Operationslehre; Herausgeber Durst und Rohen; März 1996 Auflage 2; S.510.....	18
Abb.5	Untersuchung von Tieren nach Gabe Bromodeoxyuridine (125fache Vergrößerung); Duncan et al. Radiology 1999.....	22
Abb.6	Leberregeneration im Zeitverlauf nach PVE; Duncan et al. Radiology 1999.....	23
Abb.7	Überblick über die histologischen Ergebnisse: Gefärbt mit der richrome Methode (50fache Vergrößerung) Duncan et al. Radiology 1999.....	24
Abb.8	Lichtmikroskopische Aufnahme der Hepatozyten Duncan et al., Radiology 1999.....	25

Abb.9	Entwicklungsschema der Leberzellen Maggie et al. Stem Cells 2006.....	27
Abb.10	Präinterventionelle CT- Volumetrie des TLV, des Tumorumens und des FLRV;.....	35
Abb.11	Angiographiebilder der PVE; Bsp. Patient 6.....	39
Abb.12	Angiographiebilder der BMSC- Applikation; Bsp. Patient 6.....	39
Abb.13	Prozentualer Zuwachs des FLRV; SC- Gruppe und Referenzgruppe im Vergleich.....	44
Abb.14	Absoluter Zuwachs an Volumen des linken lateralen Leberlappens (Seg. II und III); beide Gruppen im Vergleich.....	45
Abb.15	Aufnahmen vor der PVE und BMSC- Applikation; Bsp. Patient 6.....	46
Abb.16	Aufnahmen 14 Tage nach der PVE und BMSC- Applikation; Bsp. Patient 6.....	47
Abb.17	Serum Bilirubin; beide Gruppen im Vergleich.....	49
Abb.18	INR-Werte; beide Gruppen im Vergleich.....	49
Abb.19	GOT- Werte; beide Gruppen im Vergleich.....	50
Abb.20	GPT- Werte; beide Gruppen im Vergleich.....	51

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria (lat.)
Aa.	Arteriae (lat.)
ALT	Alanin-Aminotransferase (=GPT)
AST	Aspartat- Aminotransferase (=GOT)
BMSC	bone marrow stem cell – Knochenmarksstammzellen
Ca	Karzinom
CCC	Cholangiozelluläres Carcinom
CD	cluster of differentiation
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
FISH	Fluorescence in situ Hybridisierung
FLRV	future liver remnant volume – zukünftiges Lebervolumen, das nach der OP zurückbleibt
FNH	Fokal noduläre Hyperplasie
GOT	Glutamat- Oxalazetat- Transaminase
GPT	Glutamat- Pyruvat- Transaminase
HBV	Hepatitis- B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Carcinom
HCV	Hepatitis- C-Virus
HGF	hapatocyt growth factor
LK	Lymphknoten
min.	Minuten
MMP	Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OP	Operation
P	Patient
PEI	Perkutane Ethanol Injektion
PVA	Polyvenyl- Alkohol
PVE	Portalvenenembolisation
PVL	Portalvenenligation

RFA	Radiofrequenzablation
SC	Stammzellen
SD	standard deviation= Standardabweichung
SDF	stomal derived factor
Std.	Stunden
TLV	total liver volume – Gesamtlebervolumen
Tu	Tumorvolumen
V.	Vena (lat.)
Vv.	Venae (lat.)



# 1. Einleitung

Die Therapie der 1. Wahl zur kurativen Behandlung von primären und sekundären hepatobiliären Neoplasien ist die totale Resektion des tumorösen Lebergewebes.

Bei Patienten mit einem vorab geschätzten überbleibenden Leberparenchymvolumen (FLRV) von unter 25% des Gesamtlebervolumens (TLV) steigt die Inzidenz der postoperativen Morbidität und Mortalität an [1- 4].

In 45% der Fälle ist zudem eine erweiterte Hepatektomie (>5 Segmente) indiziert, um sicherzustellen, dass im Gesunden reseziert wird.

Ein Teil dieser Patienten wird jedoch nach der präoperativen Diagnostik als nicht resezierbar eingestuft, da bei ausgedehnten Resektionen ein Verlust an suffizientem Lebergewebe als zu groß angenommen wird. Daraus ergibt sich ein erhöhtes Risiko, eine Leberinsuffizienz herbeizuführen.

Die transhepatische perkutane Portalvenenembolisation (PVE) hat sich als sicheres Konzept etabliert, präoperativ die Proliferation des Leberparenchyms anzuregen und damit das präoperative FLRV zu vergrößern.

Abhängig davon, wie lange man auf die Expansion des FLRV wartet, liegt die Regenerationsrate bei 6-21ml/d, wenn keine Zirrhose oder Diabetes als Komorbiditäten vorliegen, welche das regenerative Wachstum senken [5- 11]. Des Weiteren ist die Proliferationsrate signifikant geringer, wenn nur die Segmente II und III nicht- embolisiert bleiben. Ursache ist das kleinere Ausgangsvolumen, wodurch auch das relative Wachstum rechnerisch geringer ausfällt. Aussagekräftig ist die Wachstumsrate also nur im Zusammenhang mit dem Embolisationsumfang der Segmente und dem Zeitraum, über welchen die Proliferationsrate beobachtet wird.

Verschiedene Studien lassen darauf schließen, dass hämatopoetische Stammzellen wahrscheinlich an der komplexen hepatischen Regeneration beteiligt sind [12- 15] und die Proliferationsrate vergrößern. Bereits bekannt ist, dass die Leber ein Stammzellpotential besitzt, das endogener Herkunft (Hepatozyten oder Oval-Zellen) oder exogenen Ursprungs (Knochenmarks-

Zellen) sein kann.

Zudem konnte gezeigt werden, dass Knochenmarks- Zellen als Quelle für Leber-Stammzellen fungieren und nach akuten oder auch chronischen Leberzellschäden die Fähigkeit besitzen sich in dieser anzusammeln und die Regeneration zu begünstigen [16, 17].

Experimentell konnte nach Leberresektion – größerer Leberzellverlust – eine 10fach erhöhte Mobilisierung von hämatopoetischen CD34+ Zellen beobachtet werden, als im Vergleich zu abdominal- chirurgischen Eingriffen mit geringen Lebergewebsverlusten [18, 19].

Nach unseren Kenntnissen wurden CD133+ Stammzellen therapeutisch noch nicht angewandt zur Stimulation der Leberregeneration. Hingegen wurden Knochenmarksstammzellen (BMSCs), welche angereichert an CD133+ waren, in unserem [20] und weiteren anderen [21, 22] Zentren bereits zur Anregung der Regeneration in infiziertes Myokard appliziert.

Wir untersuchten die Effektivität der Gabe von autologen CD 133+ BMSC in die mit PVE behandelte Leber im Vergleich zur alleinigen PVE Intervention. Die BMSC Applikation sollte die Leberregeneration bei Patienten, die an großen zentralen Lebertumoren leiden, unterstützen.

In der vorliegenden Arbeit sollte prospektiv untersucht werden, ob der kombinierte Einsatz von autologen BMSCs und PVE im Vergleich zur alleinigen PVE die Leberregeneration vor erweiterter Rechtshepatektomie verstärken und beschleunigen kann.

## 2. Allgemeiner Teil

### 2.1. Anatomie der Leber und des Portalvenensystems

Mit einem Gewicht von ca. 1500g füllt die Leber das rechte Hypogastrium weitgehend aus. Angewachsen mit ihrer Area nuda am Zwerchfell, ist sie atemverschieblich, wodurch sich die Leber mit ihrer kranialen Grenze zwischen der Knochen- Knorpel- Grenze der 4. Rippe bei maximaler Exspiration und 7.Rippe bei maximaler Inspiration bewegt.

Die Leberuntergrenze reicht von der 10.Rippe rechts bis zur 7.Rippe links. An der Facies visceralis lagern sich die Gallenblase und die V. cava inferior tief in das Gewebe ein, wodurch eine sagittal verlaufende, portale Fissur entsteht [23].

Nach der am häufigsten verwendeten Klassifikation für die anatomische Einteilung der Leber, die von Couinaud 1957 (Abb.1) veröffentlicht wurde, teilt diese portale Fissur die Leber funktionell und von der inneren Gliederung her in einen rechten und einen linken Leberlappen.

Der linke Leberlappen wird zudem von dem Ligamentum falciforme hepatis (Facies diaphragmatica) bzw. Lig. teres hepatis und dem obliterierten Ductus venosus Arantii (Lig. Venosum) durchzogen. Dadurch werden nochmals zwei Lappen abgegrenzt, der Lobus caudatus (hinten, oberhalb der Leberpforte) und der Lobus quadratus(vorne) (Abb.2).

In der Leberpforte treten sowohl die V. porta und zum anderen die A. hepatica, mit dem dazugehörigen, autonomen Nervenplexus ein. Des Weiteren gehen die intrahepatischen Gallenwege an der Leberpforte in den extrahepatischen Verlauf über und werden dabei von den portalen Lymphgefäßen begleitet.

Die Lebervenen münden im Bereich der Area nuda direkt in die V. cava inf. . Die Segmentgliederung der Leber beruht auf der Verzweigung der Äste von V. portae, A. hepatis und des Ductus hepaticus communis, sowie besonders der Vv.hepaticae. Dabei verlaufen die Venenstämme, zwischen den Segmenten und die Strukturen der sog. Trias hepatis, d.h. die Äste der V. portae und der A.hepatis, sowie die Gallengänge, im Zentrum der Segmente [23].

Es gibt insgesamt acht Segmente. Unter Berücksichtigung der funktionellen

Lappengliederung durch die Gallenblase und die V. cava inf. gehören die Segmente II und III zum linken Leberlappen, die Segmente I, IV, V, VI, VII und VIII zum Rechten.

Die einzelnen Segmente werden durch Fissuren getrennt, die aber nicht durch äußerliche Spalten erkennbar sind [24].

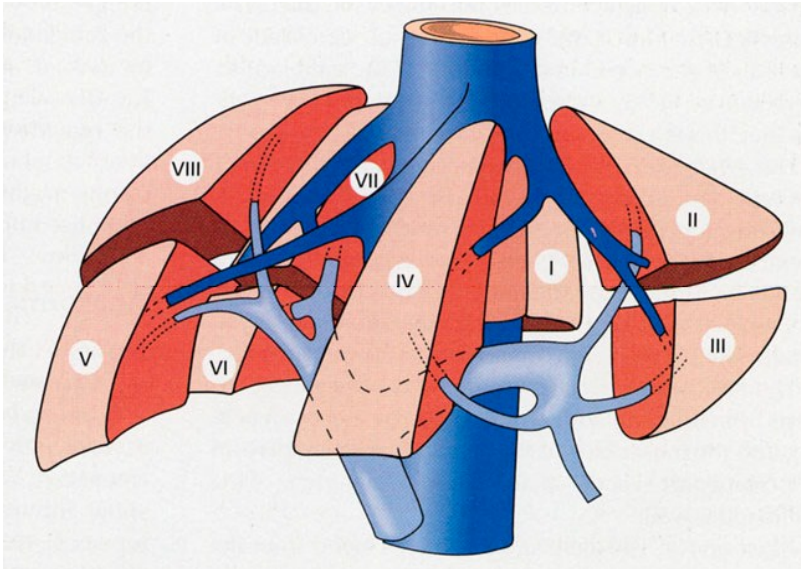


Abb.1 Segmentklassifikation nach Couinaud von 1957  
([gastro.unibas.ch/vorlesungen/4JK\\_Pathophysiologie-Leber-HA.pdf](http://gastro.unibas.ch/vorlesungen/4JK_Pathophysiologie-Leber-HA.pdf))

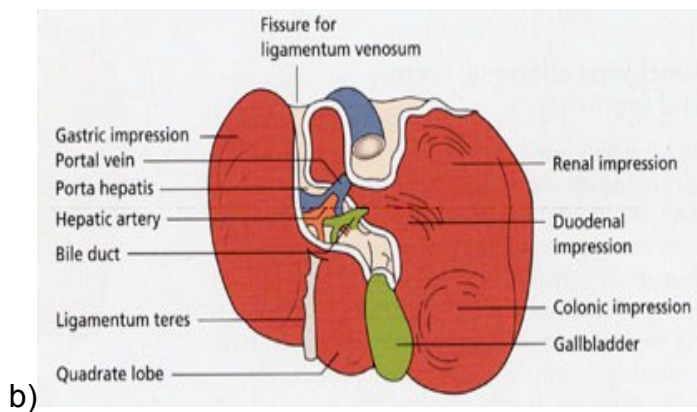
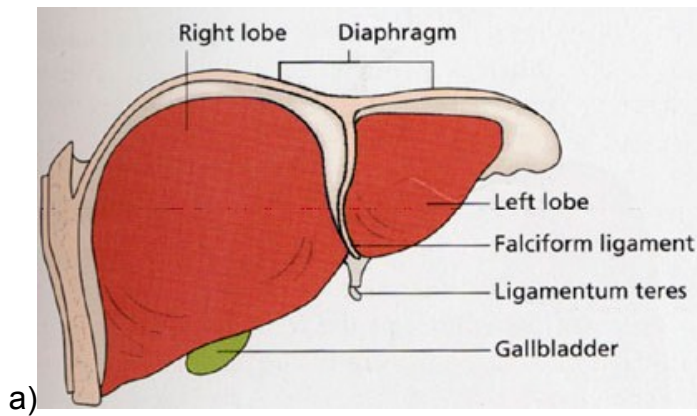


Abb.2 Rechter (Segmente I, IV, V, VI, VII und VIII) und linker **Leberlappen** (Segmente II, III)

a) Sicht von ventral b) Sicht von dorsal

([gastro.unibas.ch/vorlesungen/4JK\\_Pathophysiologie-Leber-HA.pdf](http://gastro.unibas.ch/vorlesungen/4JK_Pathophysiologie-Leber-HA.pdf))

Die Portalvene ist das Vas publicum und sammelt das Blut aus den unpaaren Bauchorganen. Sie entsteht im Retroperitonealraum hinter dem Pankreaskopf aus dem Zusammenfluss der V. mesenterica superior und der V. lienalis, in welche vorher bereits die V. mesenterica inferior mündet. Sie zieht hinter dem Pankreas und dem Bulbus duodeni im Ligamentum hepatoduodenale (welches zum Omentum minus gehört) nach kranial zur Leberforte. Die Portalvene teilt sich in einen Ramus dexter und eine Ramus sinister.

Die Portalbifurkation kann extrahepatisch (in 48% der Fälle), intrahepatisch (in 26% der Fälle) oder direkt an der Eintrittspforte der Portalvene in die Leber (in 26% der Fälle), lokalisiert sein [25].

Die häufigste Portalvenenanatomie, die Aufzweigung in die verschiedenen Segmentvenen ist folgende:

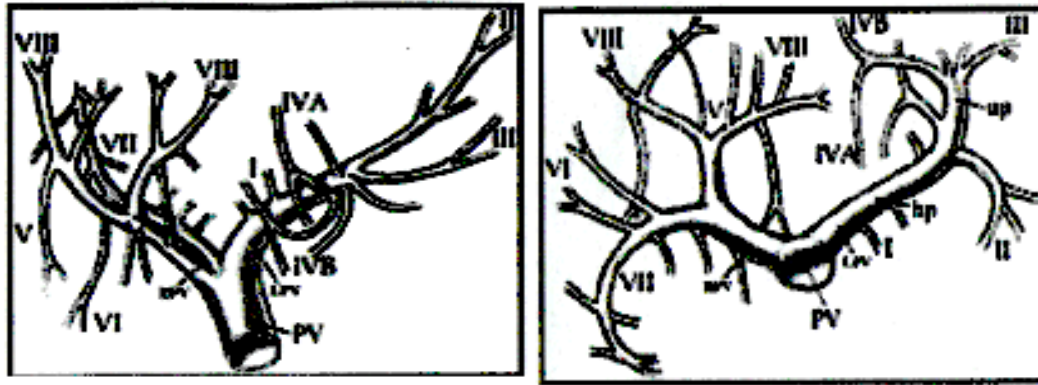


Abb. 3 Schematische Illustration des normalen Portalvenenastverlaufs von anteriorer (links) und von inferiorer Perspektive (rechts); Madoff et al, Radiographics 2002;

Der Ramus dexter teilt sich in einen Ramus segmentalis anterior und einen Ramus segmentalis posterior. Der Ramus sinister besteht aus zwei Anteilen dem extrahepatischen Pars horizontalis und dem intrahepatischen Pars umbilicalis (vertikaler Teil).

Die Segmente II, VI und VII, und seltener auch Segment III, werden von jeweils einem Segmentast versorgt. Die Segmente IV, V, VIII werden häufig von mehr als nur einem Segmentast versorgt [23, 25].

Die Segmentvenen spalten sich in Subsegmentvenen auf, welche sich des Weiteren in noch kleinere Venen aufteilen, die dann über die Vv. interlobulares die Kapillarnetze des Leberparenchyms speisen [23].

## 2.2. Lebertumoren

Die primären Lebertumoren werden nach ihrer Dignität und Herkunft in epitheliale Tumoren (hepatozelluläre und cholangiozelluläre Tumore) und mesenchymale Tumoren eingeteilt [26].

Zu den gutartigen Tumoren der Leber gehören das Leberhämangiom, das Leberzelladenom, die fokale noduläre Hyperplasie (FNH), das Gallengangsadenom, das intrahepatische Gallengangszystadenom und die intrahepatische Gallengangspapillomatose.

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC), das embryonale Hepatoblastom, das Angiosarkom und Metastasen der Leber, sowie das cholangiozelluläre Karzinom der Gallengänge, zählen zu den bösartigen Tumoren.

Die Inzidenzraten für Leberkarzinome betragen in Europa und den USA 1- 3% aller Neoplasien. In Afrika und Südostasien liegt die Rate bei 25- 50% [27].

Zudem ist die Leber auch ein bevorzugtes Ziel von Metastasen [26].

### 2.2.1. Hepatozelluläres Karzinom

Hepatozelluläre Karzinome machen ca.90% aller primären Leberkarzinome aus, wobei sie in den westlichen Industrieländern seltener sind und in Afrika und Südostasien zu den häufigsten malignen Tumoren gehören [26].

In Europa und den USA liegt die Inzidenz bei ca. 5 Fällen / 100 000/ Jahr von insgesamt 300 000 Fällen /Jahr weltweit. Zudem sind Männer häufiger betroffen als Frauen (m:w=3:1).

Zu den ätiologischen Risikofaktoren zählt die Leberzirrhose jeder Genese, v.a. die auf dem Boden einer chronischen Hepatitis B oder C oder Hämochromatose. Ein hohes Risiko haben auch Patienten mit einer neonatalen HBV- Infektion. Weitere Faktoren sind Aflatoxin (Pilzgift aus dem Schimmelpilz *Aspergillus flavus*), Alkohol, Steroide (Langzeittherapie mit Androgen) und andere Stoffwechselerkrankungen (alfa<sub>2</sub>- Antitrypsin-Mangel, Glykogenspeicherkrankheit Typ I, hereditäre Tyrosinämie).

In den westlichen Industrieländern liegt der Altersgipfel der Patienten meist

zwischen dem 5.- 6.Lebensjahrzent.

Der Tumor kann solitär, multizentrisch oder diffus infiltrierend wachsen.

Ein HCC metastasiert frühzeitig intra- und extrahepatisch, v.a. über die Blutgefäße, aber auch lymphogen in die Leberhilus- Lymphknoten [26, 27].

Im Sinne einer kurativen Therapieform werden vereinzelte, resektable Herde durch eine Leberteilektomie behandelt. In Einzelfällen, bei diffuser Lebermetastasierung, wird eine Hepatektomie mit Lebertransplantation notwendig.

Alle übrigen Befunde werden palliativ behandelt, z.B. mit lokalen Therapieformen, wie Radiofrequenzablation (RFA), perkutane Ethanolinjektion (PEI) und weitere [27].

Die Prognose der Patienten ist schlecht. Nach Diagnosestellung haben sie eine mittlere Überlebenszeit von 6 Monaten.

### *2.2.2. Cholangiozelluläres Karzinom*

Das cholangiozelluläres Karzinom ist seltener als das hepatozelluläre Karzinom (1:10) [28]. Dieser maligne Tumor geht vom Gallengangsepithel aus.

Risikokonstellationen sind die primär- sklerosierende Cholangitis bei Colitis ulcerosa sowie kongenitale Veränderungen der Gallengänge. Des Weiteren zählen Choledochuszysten, Choledochussteine und parasitäre Erkrankungen der Gallenwege (Trematoden, Leberegel) zu den Risikoerkrankungen [27].

Der Tumor kommt als große, noduläre oder diffuse Form vor und entwickelt sich üblicherweise in der 6. Lebensdekade.

Klinisch zeigen sich abhängig vom Sitz des Tumors unspezifische Beschwerden, wie Übelkeit, Abdominalschmerz, Ikterus. Zudem kann es zum Gallengangsverschluß (Cholestase) und Infektionen (eitriges Cholangitis) kommen.

Die Metastasierung erfolgt vornehmlich in die Hilus- LK und zeigt eine schlechte Prognose mit Überlebenszeiten von 1-2 Jahren [26, 28].

Meist ist nur eine palliative OP möglich (90% der Fälle), indem man eine Resektion und eine biliodigestive Anastomose (Hepaticojejunostomie nach Roux-Y) durchführt. Bei Inoperabilität kann interventionell eine perkutane transhepatische Gallengangsdrainage eingelegt werden, um den Gallenabfluss



sicher zu stellen. Des Weiteren wird eine symptomatische Therapie des Ikterus durchgeführt [28].

### Sonderform: Klatskin- Tumor

Dieser Tumor hat seine spezifische Lokalisation in der Hepatikusgabel [27]. Histologisch handelt es sich meist um ein hochdifferenziertes Adenokarzinom (langsames Wachstum, späte Metastasierung). Wegen der ungünstigen Lokalisation gestaltet sich die chirurgische Exzision jedoch schwierig [28]. Die Therapie ist abhängig vom klinischen Verlauf und Zustand des Patienten. Es bieten sich therapeutisch zum einen eine Hepatikusgabelresektion, eine Leberteileresektion mit biliodigestiver Anastomose, eine perkutane transhepatische Drainagenanlage, oder eine Lebertransplantation an. Bei fehlender Resektabilität wird palliativ eine Drainage gelegt, um den Gallenabfluss zu sichern [28].

Prognostisch haben Gallengangskarzinome eine mittlere Überlebenszeit von nur 2- 3Jahren nach radikaler OP. Bei palliativen Eingriffen oder Inoperabilität ist sie nur 2- 6 Monate.

Die ungünstigste Prognose haben die oben beschriebenen Klatskin- Tumoren.

### *2.2.3. Lebermetastasen*

Sie sind die häufigsten malignen Lebertumoren und treten v.a. als Metastasen bei Magendarmtrakt-, Brustdrüsen-, Lungen- Ösophagus-, Pankreas-Karzinomen und bei malignen Melanomen auf.

Sie kommen in Form von singulären oder multiplen Knoten vor, welche normalerweise scharf begrenzt sind und eine zentrale Nekrose (infolge mangelnder Durchblutung) aufweisen.

Klinische Manifestation und Prognose hängen weitgehend von Lokalisation und Malignitätsgrad des Primärtumors ab [26].

Durchschnittlich überleben die Patienten nach Diagnosestellung der Metastase ein Jahr, wobei Dickdarmkarzinome noch die beste Prognose aufweisen.

Bei Metastasen ist eine Resektion möglich, wobei diese von der Anzahl und Verteilung abhängig ist.

## 2.3. Chirurgische Techniken der Leberresektion

Bei den Tumoren bietet sich als einzige Chance der kurativen Behandlung die Leberteileresektion oder bei entsprechender Tumorausdehnung, die Hepatektomie mit Lebertransplantation an [23].

Entsprechend der Lokalisation und der Tumorgröße gibt es folgende, sich an der Couinaud- Klassifikation, also der Segmentanatomie orientierende, Resektionstechniken:

### *2.3.1. Hemihepatektomie rechts und erweiterte Hemihepatektomie rechts*

Die Segmente V, VI, VII, VIII und die Gallenblase werden reseziert. Bei der erweiterten Hemihepatektomie rechts werden zusätzlich die Segmente I, IVa und IVb entnommen (Abb.4a, b)

### *2.3.2. Hemihepatektomie links und erweiterte Hemihepatektomie links*

Hier wird der funktionelle linke Leberlappen bestehend aus den Segmenten I, II, III, IVa und IVb und die Gallenbase entnommen (Abb.4d). Bei der erweiterten Hemihepatektomie links werden zudem Segmente V und VIII mit entfernt.

### *2.3.3. Subtotale Leberresektion links oder Bisegmentektomie II u.III*

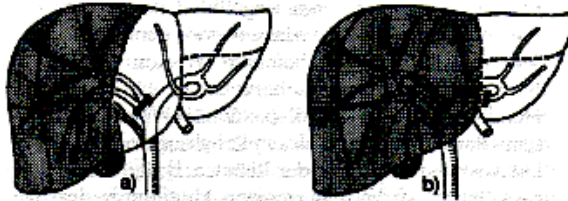
In diesem Fall werden zwei Segmente II und III bei Tumorbefall exzidiert (Abb.4c)

### *2.3.4. Segmentektomie*

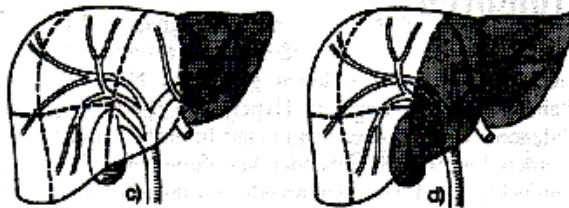
Bei dieser Technik wird ein Segment reseziert, wenn der Tumor, bzw. die Metastase scharf begrenzt in einem Segment liegt und im Gesunden operiert werden kann (Abb.4e).

### 2.3.5. Mittellappenresektion

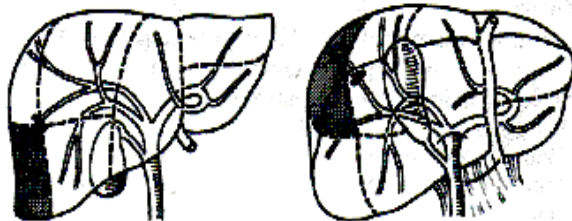
Es werden die Segmente V, VIII, I, IVa, b und die Gallenblase entnommen (Abb.4f).



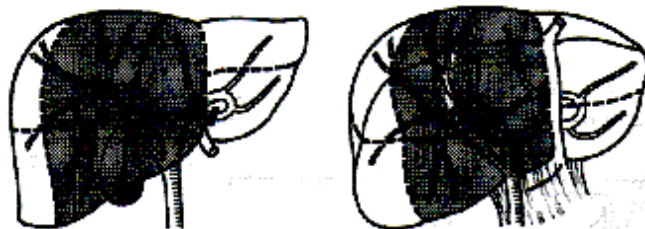
... Leberresektionen.  
a) Hemihepatektomie rechts.  
b) Trisegmentektomie oder erweiterte Hemihepatektomie rechts.



c) Subtotale Leberresektion links oder Bisegmentektomie II u. III.  
d) Hemihepatektomie links.



e) Segmentektomie VI.



f) Mittellappenresektion oder Segmentektomie IV, V, VIII.

Abb.4 Leberresektionen

## 2.4 Hintergründe der portalvenösen Embolisation

### 2.4.1 *Stimulation der Regeneration*

Ziel der PVE ist die Stimulation der Leberregeneration durch die Embolisation von Lebersegmenten.

Dafür sorgen verschiedene Mechanismen: Zum einen die Hepatozyten selbst, denen die Fähigkeit zur Dedifferenzierung und zur klonalen Expansion mit Hypertrophie und Hyperplasie zugeschrieben wird. Zudem wirken intra- und extrahepatische Faktoren wachstumsinduzierend und –kontrollierend. Dazu gehören als intrahepatischer, wirksamster Faktor der HGF (hepatocytic growth factor). Andere mitogen wirkende Faktoren sind der epidermal growth factor (EGF), transforming growth Faktor (TGF)- $\alpha$  und des weiteren bewirken bestimmte Zytokine, wie tumor necrosis factor-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6) [25], eine Geninduktion und Leberregeneration. Insulin wirkt synergistisch zum HGF. Der Mangel an Insulin beim nicht substituierten Diabetes mellitus Typ I reduziert somit die Regenerationskapazität.

Die Leberregeneration zeigt ihren maximal Wert in den ersten 2 Wochen nach der PVE.

Wie später noch beschrieben wird, liegt die max. Regenerationsrate bei Schweinen in den ersten 7 Tagen, wobei sich 14% der Hepatozyten replizieren. Die Regenerationsraten für Menschen sind mit denen bei Tieren vergleichbar. So zeigt sich in nicht zirrhotischen Lebern die schnellste Regeneration mit 12 – 21cm<sup>3</sup> /d in den ersten beiden Wochen nach der PVE. Bis vier Wochen nach PVE beträgt der Zuwachs noch 11cm<sup>3</sup>/d und sinkt auf 6cm<sup>3</sup>/d nach 32 Tagen. Bei Patienten, die zudem an Diabetes mellitus oder Leberzirrhose leiden, beträgt der tägliche Zuwachs nur ca. 9cm<sup>3</sup>/d innerhalb der ersten zwei Wochen [25].

## 2.4.2 Techniken

Die Portalvenenembolisation (PVE) wurde erstmalig 1984 durchgeführt, aber erst 1990 als Intervention zur Induktion einer selektiven Leberhypertrophie vor Durchführung einer erweiterten Hepatektomie von Makuuchi beschrieben [29]. Die Techniken der PVE variieren abhängig vom geplanten Resektionsumfang [25].

Es gibt zwei Zugangsmöglichkeiten: Zum Einen perkutan transhepatisch durch eine Punktion der linken oder der rechten Portalvene. Zum Anderen kann der Zugang über die V. ileocolica erfolgen, in welche durch eine Minilaperotomie eine 5-F Schleuse eingelegt wird.

Wichtig für die Wahl des Zugangs sind die Tumorgröße, die Tumorlokalisation, der Zustand des jeweiligen Patienten und das weitere chirurgische Vorgehen.

Es gibt verschiedene Embolisate, die verwendet werden: Zyanoacrylat und jodiertes Öl (Lipiodol), absorbierbare Gelatine (Gelfoam; Pharmacia und Upjohn, Kalamazoo, MI), Thrombin, Spiralen, Polyvinyl Alkohol Partikel (PVA), Mikrosphären und absoluter Alkohol [6].

Substanzabhängig weisen die Embolisate verschiedene Eigenschaften, bzw. Begleitreaktion auf. In der Hypertrophierate wurden bis lang keine Unterschiede gefunden, die statistisch signifikant waren [30].

Eine Kombination aus absorbierbarer Gelatine und Thrombin neigt zu Rekanalisationen der Gefäße [31].

De Baere et al [7] beschreibt, dass es bei der Embolisation mit Zyanoacrylat zu einer Lebergrößenzunahme von 90% in 30 Tagen kommt, hingegen bei der Verwendung einer Gelatine- Thrombin Mischung nur ein Größenwachstum von 53% in 43 Tagen zu verzeichnen ist (nicht signifikant). Jedoch kann es zu einem inflammatorischen Prozess, wie peribiläre Fibrose unter Mitbeteiligung der Portalvene, kommen, der die darauf folgende OP erschweren kann [7].

Das ideale Agens ist laut Madoff et al [6] eines, was eine dauerhafte Embolisation ohne Rekanalisation der Gefäße sicherstellt, gut von den Patienten vertragen wird und einfach zu verabreichen ist. Somit propagiert er die Verwendung von PVA Partikeln in Kombination mit Koils, die nur eine

minimale periportale Reaktion hervorrufen und für einen anhaltenden Verschluss der Portalvenen sorgen.

Letztlich kann aber festgehalten werden, dass jedes verwendbare Agenz Vor- und Nachteile hat.

Neben der PVE gibt es auch die Möglichkeit der Portalvenenligation (PVL), bei der die segmentversorgenden Portalvenenäste intraoperativ ligiert werden.

PVE und Portalvenenligation sind sichere Methoden, um das funktionelle FLRV zu erhöhen und so die Mortalität und Morbidität nach erweiterter Hepatektomie zu senken.

Die PVE zeigt jedoch eine signifikant größere Regenerationsrate und einen kürzeren postoperativen Krankenhausaufenthalt als die PVL [5].

#### *2.4.3 Tierexperimentelle Grundlagen:*

Im Folgenden geht es um die experimentelle Studie von Duncan et al [32], die sich mit der Induktion der Hepatozytenreplikation durch PVE in Schweinen beschäftigt hat.

Die Embolisation wurde mit einer Kombination von Spiralen und Polyvinyl-Alkohol- Partikeln durchgeführt und durch Portographie dokumentiert.

Zum Nachweis der Replikation wurde nach Embolisation Bromdeoxyuridin verabreicht. Im Falle von DNA- Neusynthese dieses in den Zellen eingebaut und damit im Nucleus angereichert wird. Es wurden Leberbiopsien der Versuchstiere genommen. Nach Anfertigung der Gewebeschnitte wird mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung (Antikörper und Diaminobenzidin) diese Anreicherung als Braunfärbung unterm Lichtmikroskop sichtbar und konnte quantitativ bestimmt werden.

In den Ergebnissen zeigt sich entsprechend der Anreicherung von Bromdeoxyuridin im nicht- embolisierten Leberlappen am Tag 7 (Abb.5A). Dies indiziert eine entsprechende DNA- Neusynthese und Leberzellreplikation. Diese fand sich v.a. in der periportalen Region der einzelnen Leberlobuli. Als Kontrolle wurde bei einem Versuchstier direkt nach Bromodeoxyuridin- Injektion und vor PVE eine Probe genommen. In dieser zeigte sich keine Bromodeoxyuridin-

Inkorporation. Folglich fand keine Replikation statt (Abb.5C). Dies stimmte auch mit Ergebnissen anderer Studien überein, wo eine Hepatozytenreplikationsrate von kleiner 0,1% unter Normalbedingungen beschrieben wurde [33- 35].

Um den Anteil der sich replizierten Hepatozyten an der Gesamtheptozyten-Zahl vergleichsweise darzustellen und zu berechnen, wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin angefertigt: Einmal vor der Embolisation (Abb.5D) und nach sieben Tagen (Abb.5B).

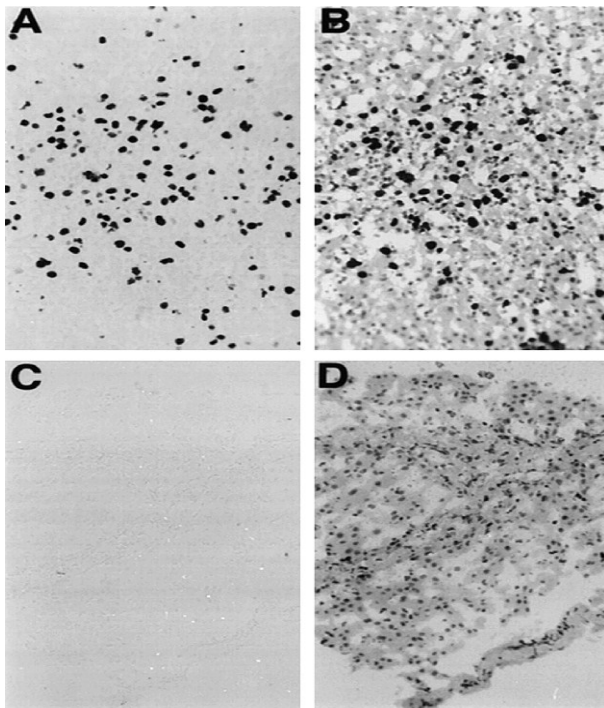


Abb. 5 Untersuchung von Tieren, nach Gabe Bromodeoxyuridine (125fache Vergrößerung);  
A und B) 7 Tage nach Embolisation  
C und D) Direkt nach Embolisation  
A und C) ohne Gegenfärbung mit Hämatoxylin  
B und D) mit Gegenfärbung mit Hämatoxylin  
Duncan et al. Radiology 1999

Die Regerationsrate war mit 14% sieben Tage nach der PVE maximal. Zu früheren und späteren Zeitpunkten waren die Regenerationsraten geringer. Zwar zeigt sich auch eine Replikation im linken, embolisierten Leberlappen, aber von wesentlich geringerem Ausmaß (Abb.6).

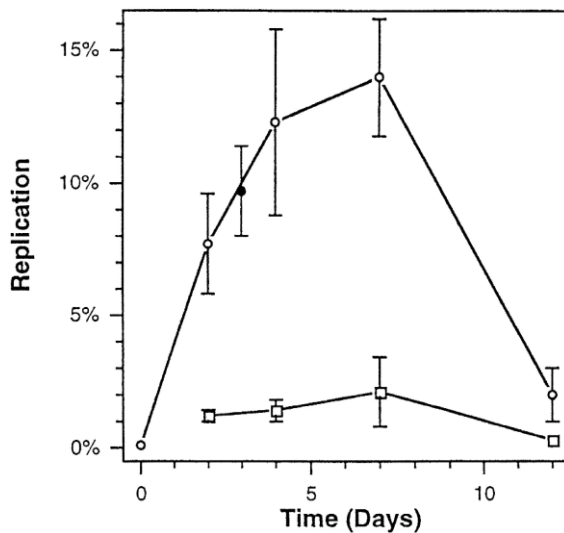


Abb.6 Leberregeneration im Zeitverlauf nach PVE;

●= Replikation im rechten, nicht- embolisierten Leberlappen bei Hausschweinen

○= Replikation im rechten, nicht- embolisierten Leberlappen bei Mischschweinen

□= Replikation im linken, embolisierten Leberlappen

Duncan et al. Radiology 1999

Des Weiteren wurden folgende histologische Beobachtungen gemacht:

Der linke, embolisierte Leberlappen zeigte eine Atrophie, welche auf der Größenabnahme der einzelnen Läppchen resultiert. Zudem zeigten sich zu einem späteren Zeitpunkt fibrotische Gewebsumbauten, welche als Reaktion auf die Embolisation entstanden sein könnten (Abb.7D).

Im rechten, nicht- embolisierten Lappen kam es nur zu einer geringen Größenzunahme der Leberläppchen (Abb.7C). Da es aber insgesamt zu einer Volumenzunahme des rechten Leberlappens kam, wird angenommen, dass bei der Replikation neue Läppchen entstanden sind.



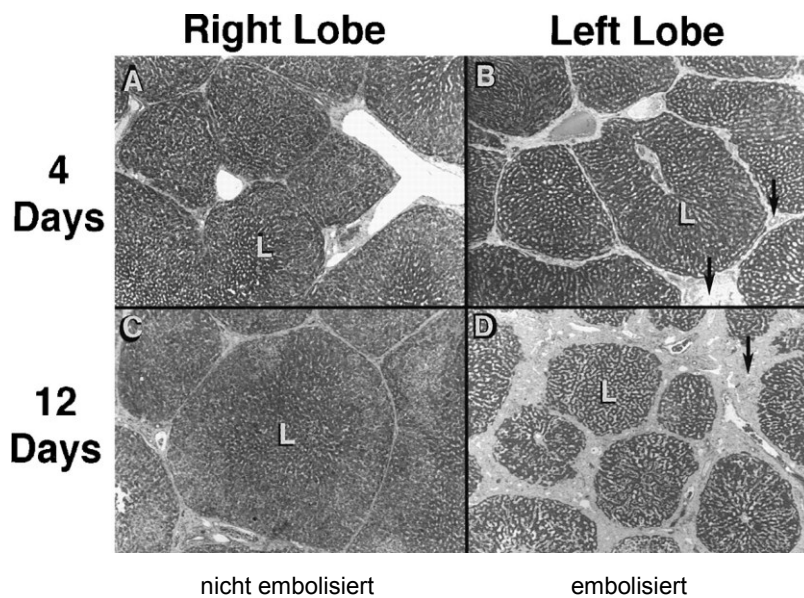


Abb.7 Überblick über die histologischen Ergebnisse:  
 Gefärbt mit der Masson trichrome Methode (50fache Vergrößerung);  
 Duncan JR et al. Radiology 1999

Lichtmikroskopisch zeigten sich in einigen Hepatozyten azidophile Körperchen und kondensiertes Zellkernmaterial, welche auf die Apoptose dieser Zellen hinweist (Abb.8).

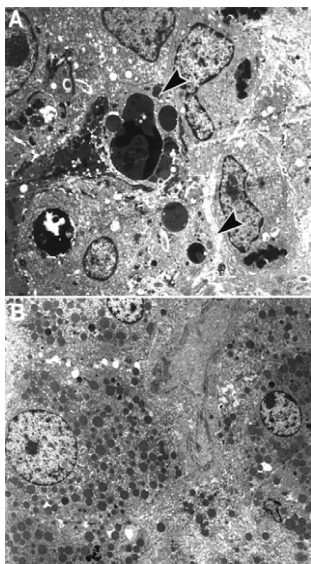


Abb.8 Duncan JR et al., Radiology 1999  
 Lichtmikroskopische Aufnahme der Hepatozyten A.) azidophile Körperchen und kondensiertes Zellmaterial B.) Normalbild

Im nicht- embolisierten Lappen zeigte sich eine normale Architektur des Leberparenchyms.

Kleinere Koagulationsnekrosen wurden mit Traumata an intrahepatischen Arterien, verursacht durch den Katheter, in Verbindung gebracht.

Die Laborwerte zeigten einen geringen AST und ALT Anstieg, was auf keine bedeutende Leberfunktionsstörung (durch Nekrose verursacht) hinweist.

Ergebnis der Studie an Schweinen war die Stimulation der Hepatozyten-replikation in den nicht- embolisierten Segmenten nach PVE, wobei wesentliche Nebenwirkungen ausblieben.

Die max. Regerationsrate lag bei 14% am Tag 7 nach Embolisation. Dabei waren 60 – 70% der gesamten Portalvenenäste okkludiert, eben die, welche die Segmente des rechten Leberlappens versorgen. Dabei stieg der portalvenöse Druck nur gering an. Ausgedehnte hepatozelluläre Nekrosen (nur geringer AST - und ALT Anstieg) oder Leberinsuffizienzzeichen konnten nicht nachgewiesen werden.

Die embolisierten Segmente reagierten mit Atrophie und es zeigte sich eine geringe Apoptose und dezente, wahrscheinlich über Verletzungen mit den Katheter hervorgerufene Nekrosen [32].

Francaville et al [36] verwandten die Plasma- Konzentration von Thymidin-Kinase, um nach Rechts- Hepatektomie in Menschen die Leberregeneration abzuschätzen. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration am 4- 5 Tag anstieg, was für eine erhöhte Regeration zu diesem Zeitpunkt spricht.

Deshalb vermutet man, dass sich auch bei Menschen im Vergleich zu Schweinen ein ähnlicher zeitlicher Verlauf der Regerationsraten zeigt.

## 2.5 Leberstammzellen

Stammzellen sind Zellen, aus denen sich im Laufe der Entwicklung des Organismus spezialisierte Zellen bilden, wie Epithelien und spezielle Organzellen.

In der postnatalen Phase dienen die Stammzellen dazu Gewebe zu ersetzen, das durch Schädigung und physiologischen Zerfall, Nekrose und Apoptose zu Grunde gegangen ist.

Embryonale Stammzellen können aus der inneren Zellmasse der embryonalen Blastozyste gewonnen werden.

Adulte Stammzellen findet man in reifem Gewebe, wie dem Knochenmark. Die Plastizität der adulten Stammzellen besteht wahrscheinlich in der Generierung von Zelllinien, die sich von ihrem Ursprungsorgan unterscheiden.

Diese Annahme wurde in verschiedenen Studien durch Mausmodelle bewiesen, in denen gezeigt wurde, dass sich aus adulten Knochenmark- Stammzellen (bone marrow stem cells= BMSCs) Gewebe aller drei Keimblätter, Endoderm, Mesoderm und Ektoderm, bilden können. Dazu gehören Skelettmuskeln [37], Neuralgewebe [38, 39], Gefäßendothel [40, 41], Epithel der Haut, andere verschiedene Organe [42] und auch Hepatozyten [43, 44].

In der Entwicklung der Leber ist es wichtig, dass diese in der Fetalperiode zu den hämatopoetischen Organen gehört, wobei sich dort bis ungefähr eine Woche nach der Geburt auch hämatopoetische Stammzellen (HSCs) finden. Hämatopoetische Zellen senden Signale aus, die die Leberzellen anregen zu wachsen und zu differenzieren. Später wird die Funktion der Hämatopoese von der Leber in das Knochenmark verlagert. Dabei bleiben in der Leber Stammzellen zurück, welche sodann wahrscheinlich das hepatische Stammzell-Kompartiment bilden.

Dazu gehören die Leber- Progenitor- Zellen, die Oval- Zellen und die fetal erworbenen Leberstammzellen. Die Ersteren haben Zelloberflächen- Marker, die sich auch bei hämatopoetischen Stammzellen finden (CD 34, Thy-1, c-kit). Zu Beginn befinden sich in der Leber Hepatoblasten, die als Vorläuferzellen für Hepatozyten und Cholangiozyten fungieren.

Man findet als Marker die Expression von Albumin,  $\alpha$ -Fetoprotein, Zytokeratin 17 (CK17) und 19 (CK19) bei Hepatoblasten. Nach Differenzierung lassen sich bei Hepatozyten als Marker Albumin und  $\alpha$ -Fetoprotein nachweisen und bei Cholangiozyten Zytokeratin. Zudem gibt es einen Zelltyp, der beide Marker weiterhin besitzt und sich in beide Zellreihen entwickeln kann. Dieser kann als

bipotente Population bezeichnet werden. Es wird angenommen, dass dieser Zelltyp die fetal erworbenen Leber- Progenitor- Zellen darstellen.

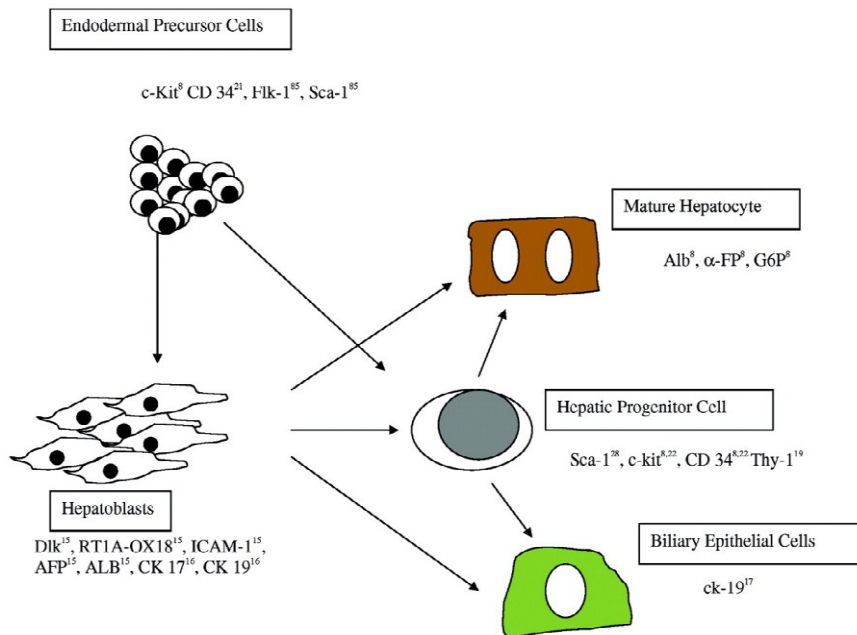


Abb.9 Entwicklungsschema der Leberzellen  
Maggie et al. Stem Cells 2006

In der adulten Leber gibt es drei Zelltypen, die auf den Verlust von Hepatozyten reagieren können:

1. Hepatozyten, die bei geringer Leberzellschädigung proliferieren. Sie sind vielzählig, unipotent, liegen verteilt in der Leber und reagieren schnell auf Leberzelluntergang.
2. Oval- Zellen, welche aktiviert werden und proliferieren, wenn extensive und chronische Leberzellschädigungen vorliegen, oder die Proliferation der Hepatozyten (siehe 1) inhibiert wird.

Nach Leberschäden stammt möglicherweise ein kleiner Teil von ihnen von BMSC ab [45].

Sie liegen in oder direkt benachbart zu den Hering- Kanälen, sind weniger zahlreich, bipotent und zeigen eine längere, aber dennoch limitierte Proliferationsreaktion. In ihrer Erscheinung zeigen sie eine hohe Kern zu Zytoplasma Relation. Exprimiert werden zum einen unreife Marker, wie α-Fetoprotein, als auch reife hepatische Marker, wie Albumin und reife biliäre

Marker, wie Zytokeratin 19.

3. Exogene Leberstammzellen, welche wahrscheinlich von hämatopoetischen Stammzellen abstammen und die Leber erreichen. Sie reagieren auf Leberschäden, die durch Ethyl- Alkohol oder Hepatokarzinogene verursacht sind. Sie sind multipotent, selten, zeigen dafür aber ein sehr langes Proliferationsverhalten [46].

Die Frage, ob sich BMSC in Leberzellen umwandeln und sich in der Leber absiedeln, um diese zu regenerieren ist bereits in folgenden Experimenten adressiert worden.

Theise et al [12] machten dazu Versuche an Mäusen. Eine Kohorte weiblicher Mäuse bekam nach Myeloablation Knochenmark von männlichen Spendermäusen. Durch die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) konnten in den Lebern der weiblichen Mäuse Y-Chromosom- positive Hepatozyten nachgewiesen werden. Auch konnte in diesen zusätzlich mRNA (messenger RNA) für Albumin identifiziert werden, was für ausdifferenzierte, funktionstüchtige Hepatozyten spricht.

Letztlich zeigt das Experiment, dass nach Transplantation von Knochenmarksstammzellen von einem männlichen Spender zu einem passenden Empfänger sich diese in reife Hepatozyten differenzieren, welche das Y-Chromosom tragen.

Man geht hier von einer Transdifferenzierung aus. Wie oben schon beschrieben wird dabei angenommen, dass aus Stammzellen funktionsfähige Hepatozyten entstehen. Die Balance zwischen Zellzerfall und Zellerneuerung wird aufrechterhalten.

Ein weiteres Experiment von Oi- Lin et al [47] zum Chimärismus in transplantierten Lebern zeigte folgendes: Mit Chimärismus wird die Wanderung von Zellen aus dem Empfänger in die ihm gespendete, transplantierte Leber bezeichnet. Da es sich um geschlechtlich nicht passende Spender handelt, können auch hier per FISH die Zellen identifiziert werden.

Man kam zu dem Ergebnis, dass der Großteil der in die Leber gewanderten Zellen Kupffer'sche Sternzellen/ Makrophagen (64-75%) sind und ein geringer

Teil sich zu Hepatozyten (ca. 1,6%) differenzierte.

In einer Arbeit von Kollet et al [15] wurde ein Zusammenhang mit dem stromal cell- derived- factor-1 (SDF-1) und dem CXCR4 beschrieben. Das Chemokin SDF-1, welcher im Gallengangsepithel der Leber exprimiert wird, wirkt über die Kopplung an den CXC-Rezeptor anlockend auf menschliche und Maus-Vorläuferzellen. So fand sich bei Neutralisation des SDF-1 Rezeptors CXC-Rezeptor- 4 kein Homing von Vorläuferzellen in die Leber. Wurde hingegen SDF-1 lokal injiziert, reichert sich CD34+ Vorläuferzellen in Clustern um die Gallengänge herum an, ganz in der Nähe der SDF-1 exprimierenden Epithelien und differenzierten sich zu Albumin- produzierenden Zellen.

Nach Bestrahlung oder Entzündung der Leber hat sich das SDF-1 Level erhöht. Zudem fand sich eine Aktivitätssteigerung der MMP-9 (Metalloproteinase-9).

Beide Faktoren sorgten dafür, dass es sowohl zu einer erhöhten CXC-Rezeptor- 4 Expression, als auch zu einer SDF-1 vermittelten Rekrutierung von hämopoetischen Progenitorzellen (Vorläuferzellen) in die Leber kommt.

Auch der human-growth-factor (HCG), welcher nach Leberschädigung an der Regeneration beteiligt ist, führte zu einer CXCR4- Upregulation und einer SDF-1 vermittelten direkten Migration von humanen CD34+ Vorläuferzellen.

Letztlich induzieren Stresssignale, wie Leberentzündung, -Bestrahlung und andere Arten von Zelluntergang eine erhöhte Expression von SDF-1 und dessen Rezeptor CXCR-4, sowie MMP-9 und HCG. Diese wirke auf menschliche CD34+-Vorläuferzellen, wodurch sie vermehrt in die Leber rekrutiert werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die hämopoetischen CD34+/CXCR4+ Zellen das Potential haben, auf Stress- induzierte Signale von geschädigten Organen zu antworten, als ein Mechanismus zur Gewebserneuerung und -reparation.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass abhängig vom Resektionsausmaß die Mobilisierung von peripheren hämatopoetischen autologen Klustern von CD 34+ differenzierten Stammzellen zunimmt. Dies unterstützt die Annahme, dass Stammzellen die Leberregeneration beeinflussen [48, 49]. CD 133+ Zellen besitzen die Fähigkeit sich in vitro in hepatische Zelllinien zu differenzieren [50]. CD133 (ein 5- Transmembran- Glykoprotein) ist auf hämatopoetischen

Stammzellen exprimiert, wobei die Funktion noch ungeklärt ist. Jedoch wurde vor kurzem berichtet, dass CD133 ein Marker für frühe Progenitorzellen [46] ist. Therapeutisch wurden CD133+ reiche BMSCs zur Unterstützung der Regeneration von Myokardgewebe nach Infarkt [51, 52, 20] eingesetzt.

### **3. Methoden und Material (spezieller Teil)**

#### **3.1. Patientenkollektiv (Ein-/Ausschlusskriterien)**

Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Universität gebilligt. Alle Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, wurden über ihre Zuteilung zu einer der Gruppen in Kenntnis gesetzt und mussten ihr schriftliches Einverständnis geben.

Im Zeitraum September 2003 und Juni 2005 waren siebzehn Patienten für eine erweiterte Hepatektomie (Segmente I und IV-VIII) rechts vorgesehen. Vierzehn von ihnen erfüllten folgende Kriterien:

- FLRV kleiner als 25% des TLV abzüglich des Tumolvolumen
- technische Möglichkeit für die Durchführung einer Trisegmentektomie und kein Tumorgewebe im linken-lateralen Leberlappen (Segmente II und III)
- keine präoperative Leberfunktionsstörung (Child- Pugh Score A) oder Quick-Werte unter 75%
- offene rechte Portalvene und Gallengänge
- Gesamtbilirubin kleiner 3 mg/dl.

#### **3.2. Gruppe I**

7 der 14 Patienten, 3 weibliche und 4 männliche Patienten, wurden mit PVE plus Stammzellapplikation behandelt, da die alleinige PVE zur Induktion einer adäquaten Proliferation des linken lateralen Leberlappens in einer angemessenen Zeitspanne fraglich ausreichend war.

Das Durchschnittsalter der Gruppe beträgt 62 (SD  $\pm$  12,1) Jahre, wobei der jüngste Patient 46 und der Ältteste 78 war.

4 Patienten litten an einem primären Lebertumor (3x HCC und 1x CCC). An sekundären Tumoren waren 3 Patienten erkrankt. 2 hatten Lebermetastasen nach kolorektalem Karzinom und ein weiterer nach primärem neuroendokrinen Karzinom des Appendix vermiformis.



Alle diese Patienten hatten eine große zentral lokalisierte Leberneoplasie und ein FLRV kleiner 25% des gesamten Lebervolumens (Tu, 174,6 ±165,5 ml; Mittelwert ± SD).

Zudem hatten 2 Patienten (P1, P4) eine vorgeschädigte Leber, welche das Regenerationspotential negativ beeinflusst, 2 weitere Patienten (P2, P5) zeigten ungewöhnlich geringes Ausgangsvolumen der Seg. II und III und 1 Patient (P3) hat ein schnell wachsenden Tumor- Tumorverdopplung in 3 Monaten.

Weiter Charakteristika können Tab. 1 entnommen werden.

	SCT Patient 1	SCT Patient 2	SCT Patient 3	SCT Patient 4	SCT Patient 5	SCT Patient 6	SCT Patient 7
<b>Patienten Charakteristika</b>							
Alter /Geschlecht	46/m	72/w	53/w	78/m	51/m	66/w	69/m
Diagnose der Lebererkrankung	HCC	Neuroendokrine Metastasen	Kolorektale Metastasen	Kolorektale Metastasen	OCC	HCC	HCC
Komorbidität	Chron.HCV, Leberfibrose, keine Zirrhose	Primärer neuroendokriner Appendix vermiformis Tumor	Z.n.Sigmaresektion und Chemotherapie, Kompensierte Niereninsuffizienz, Anorexia	Z.n.Sigma-resektion, Steatose, art.Hypertonie	Z.n.Myokadionfakt, Hypercholesterinämie, keine Leberfibrose/ Leberzirrhose	arterielle Hypertonie, Hyperthyreose	Leberzirrhose
<b>Volumetrie</b>							
TLV vor PVE [ml]	2378	1601	1360	1242	1675	1317	1790
FLRV vor PVE [ml]	427	193	260	222	117	217	297
Absoluter Zuwachs des FLRV [ml]	261	235	111	108	129	223	263
Relativer Zuwachs des FLRV [%]	61.1	121.8	42.7	48.6	110	103	88.5
FLR/TLV-Tu [%] vor PVE + BMSC	18.4	16.2	20	17.9	6.9	19	20.5
FLR/TLV-Tu [%] nach PVE + BMSC	29.6	35.8	28.6	26.6	14.3	38.6	38.6
Täglicher Zuwachs des FLRV [ml/day]	11.9	11.1	7.9	4.2	6.1	15.9	18.8
Time to surgery	22	21	14	26	51	20	37

**Abkürzungen:** SCT, Stammzell- Therapie- Gruppe; PVE, Portalvenenembolisation; HCC, hepatocelluläres Carcinom; CCC, cholangiocelluläres Carcinom; TLV, totales Lebervolumen; Tu, Tumolvolumen; BMSC, bone marrow stem cell= Knochenmarkstammzellen; FLRV, future liver remnant volume= nach Resektion übrigbleibendes Lebervolumen; FLRV/TLV-Tumolvolumen [%]= rel. Volumen des linken lateralen Leberlappens (hier der Seg.II und III)

Tab. 1 Patienten und Behandlungscharakteristika der Gruppe I  
Veränderungen des Lebervolumens in Verbindung mit der PVE und der BMSC- Applikation auf 21 Tage bezogen

### 3.3. Gruppe II

7 der 14 Patienten, 3 Frauen und 4 Männer, wurden mit einer PVE ohne eine anschließende Applikation von Stammzellen behandelt, da hier die alleinige PVE als angemessene Proliferationsinduktion für den linken Leberlappen angesehen wurden. Dieses Patientenkollektiv diente somit als nicht- randomisierte Kontrollgruppe.

Das Durchschnittsalter beträgt 68,9 Jahre (SD  $\pm$  5,3); der jüngste Patient ist 63 und der Älteste 75 Jahre alt. 4 Patienten wiesen einen primären Lebertumor auf, 2 mit CCC, 2 mit HCC. 3 der Patienten hatten Lebermetastasen (2x nach Kolon- Karzinom, 1x nach Rektum- Karzinom).

Auch die Patienten dieser Gruppe litten an einem großen zentral lokalisierten Lebertumor (Tu,  $150,6 \pm 121,1$  ml) und einem FLRV von kleiner 25% des TLV. Keiner der Patienten hatte eine vorgeschädigte Leber, ein geringes Ausgangsvolumen der Seg. II und III, oder schnell wachsende Leberläsionen. Weitere Charakteristika der Patienten sind der Tab. 2 zu entnehmen.

	CTR Patient 1	CTR Patient 2	CTR Patient 3	CTR Patient 4	CTR Patient 5	CTR Patient 6	CTR Patient 7
<b>Patienten Charakteristika</b>							
Alter /Geschlecht	65/ w	75/ m	67/ m	63/ w	75/ m	64/ w	73/ m
Diagnose der Lebererkrankung	CCC	Kolorectale Metastasen	HCC	CCC	Kolorectale Metastasen	Kolorectale Metastasen	HCC
Komorbidität	keine	chronische Gastritis	Art. Hypertonie, Hypercholesterin- ämie, keine Leberfibrose/ Leberzirrhose	keine	keine	keine	Z.n. Myokard- infarkt, art. Hypertonie, Hyper- cholesterinämie
<b>Volumetrie</b>							
TLV vor PVE [ml]	2086	1370	1563	1180	1857	1361	1623
FLRV vor PVE [ml]	438	330	276	208	264	229	259
Absoluter Zuwachs des FLRV [ml]	102	150	125	57	50	181	102
Relativer Zuwachs des FLRV [%]	23.3	45.5	45.3	27.4	18.9	79	34.6
FLRV/TLV-Tu [%] vor PVE	22.6	24.9	19.1	17.6	17.5	16.9	18.4
FLRV/TLV-Tu [%] nach PVE	27.9	37.6	27.7	22.5	20.8	30.2	24.7
Täglicher Zuwachs des FLRV [ml/day]	4.3	6.3	4.3	1.7	2.1	6.5	3.5
Time to surgery	23	no (Tu in Seg II)	37	81	38	32	58

**Abkürzungen:** CTR, Kontrolle- Gruppe; PVE, Portalvenenembolisation;

TLV, totales Lebervolumen; Tu, Tumolvolumen;

FLRV, future liver remnant volume= nach Resektion übrigbleibendes Lebervolumen;

FLRV/TLV-Tumolvolumen [%]= rel. Volumen des linken lateralen Leberlappens (hier Seg.II und III)

Tab. 2 Patienten und Behandlungscharakteristika der Gruppe II  
Veränderungen des Lebervolumens in Verbindung mit der PVE auf 21 Tage bezogen

### 3.4. Monitoring: Lebervolumetrie (und ihre Zuverlässigkeit)

Zur Quantifizierung wurde bei allen Patienten eine Spiral-  
Computertomographie (CT) vor der PVE und zur Kontrolle 2-3 Wochen danach  
durchgeführt. So wurden das Lebervolumen, der Zuwachs und die  
Proliferationsrate bestimmt. Zeigte sich im Kontroll- CT eine zu geringe  
Proliferation (FLRV  $\leq$  25% des TLV- Tu) wurden im 1 bis 2 Wochen Intervall  
weitere Kontroll- CTs durchgeführt, bis das FLRV die adäquate Größe für die

erweiterte Leberresektion erreicht hatte.

Alle CT Untersuchungen wurden mit einem Multislice- CT mit 6 aktiven Detektoren (Somatom Emotion 6 Scanner; Siemens, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Parameter verwendet: 6 x 2 mm Kollimation, 3 mm Schichtdicke, 3 mm Rekonstruktionsintervall, 350/50 Fensterung, Weichteilkern. Nach Kontrastmittelgabe wurden die transversalen Schichten in der portalvenösen Phase durchgeführt, um das TLV, das FLRV und das Tumervolumen zu bestimmen. Die Volumetrie wurde unter Berücksichtigung der Segmentaufteilung nach der Couinaud Klassifikation (siehe 2.1.) durchgeführt, wobei sie von zwei unabhängigen, erfahrenen Radiologen (17 Jahre und 8 Jahre CT- Erfahrung) ausgewertet wurden. Die Radiologen kannten weder die Identität der Patienten noch das Ergebnis des zweiten auswertenden Radiologen. Die Reliabilität wurde in Bezug auf die beiden Ergebnisse berechnet. Für die Evaluation der Volumetrie wurde die Messung des ersten Radiologen (17 Jahre CT Erfahrung) verwendet.

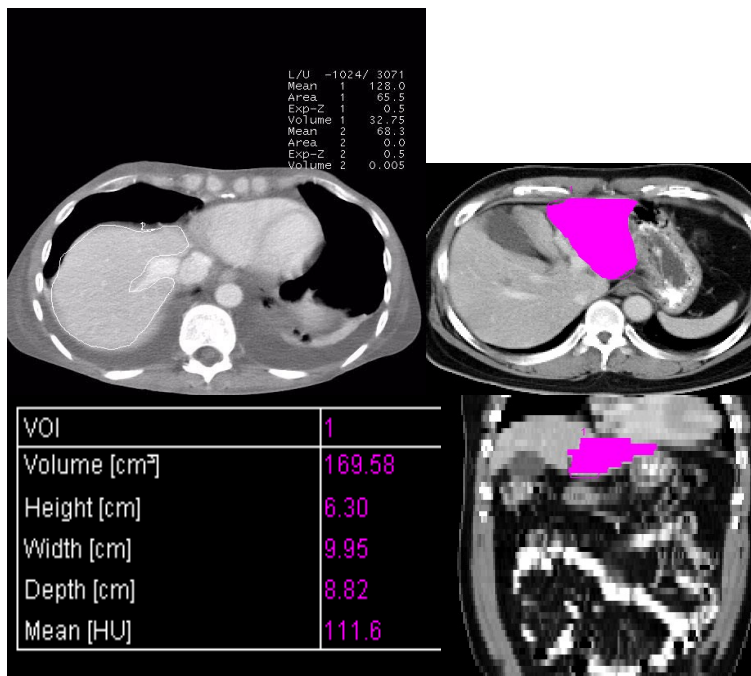


Abb.10 Präinterventionelle CT- Volumetrie des TLV, des Tumervolumens und des FLRV; Multislice- CT (Emotion 6), Kollimation; 6x2mm, ST 3mm, RI 3mm, 350/50 Window, Weichteilkern, i.v. KM (Portosystemische Phase)

### 3.5. PVE- Technik

Die Embolisation wurde von zwei Radiologen (dieselben, wie in 3.4.) durchgeführt, die langjährige Erfahrung (15 und 5 Jahre) mit komplexen Embolisationen haben. Die PVE wurde mittels analoger DSA (digitalen Subtraktions-Angiographie) (Multidiagnost 4; Philips, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Bei allen Stammzellpatienten und drei Patienten der Kontroll- Gruppe wurde ein ileokolischer Zugang unter Vollnarkose gewählt. Dazu wurde eine Minilaparotomie vorgenommen, eine 5-F Schleuse (Terumo, Leuven, Belgien) in die V. ileocolica eingelegt und mit anschließendem Wundverschluß versorgt. Der ileokolische Zugang wurde in der Gruppe I gewählt, um die korrekte Lage des Katheters zu sichern und somit die Stammzellen präzise zu applizieren. So wurde den Patienten eine mehrfache transkutane Punktion in Lokalanästhesie erspart.

In der Gruppe II wurde in 3 Fällen ein ileokolischer Zugang gewählt, um den Weg durch das ausgedehnte Tumorgewebe im rechten Leberlappen zu vermeiden oder das FLRV durch den Eingriff nicht zu verletzen. Bei den anderen 4 Patienten wurde zweimal der Zugang über die rechte Portalvene und zweimal über die Linke gewählt.

Unter fluoroskopischer oder ultrasonographischer Kontrolle wurde hierzu eine 6-F Schleuse (Terumo, Leuven, Belgien) eingebracht.

Die Angiographien des Portalvenensystems wurden in anterior –posterior (ap.), links anterior oblique (LAO; links vorne schräg), rechts anterior oblique (RAO; rechts vorne schräg) und in von kranial nach kaudal gerichteter Projektion angefertigt, um die genaue individuelle Segmentanatomie des Portalvenensystems abzubilden.

Ein 5-F Kobra oder Simmons- /Sidewinder Katheter (Terumo, Leuven, Belgien) wurde währenddessen nacheinander in die Segmente V-VIII eingelegt und die Embolisation durchgeführt (Abb.11, 12).

Da bei allen Patienten eine erweiterte Hemihepatektomie vorgesehen war, wurden zudem die Segmente I und IV embolisiert. Ziel war alle vom Tumor befallenen Lebersegmente zu embolisieren und das FLRV, die Proliferation der

Segmente II und III, zu maximieren.

Für diese Segmente wurde ein Mikrokatheter (Tracker, Target Therapeutics, Freemont, Californien, USA) koaxial durch einen 5-F selektiven angiographischen Katheter platziert.

Für die Segmente I und IV wurden Polyvinylalkohol (PVA) Partikel mit einer Größe von 300 – 500 µm (Contour, Boston Scientific/Target Vascular, Freemont, Californien, USA) und Mikrospiralen (Platinum Microcoils, Target Therapeutics) verwendet. Für die Segmente V-VIII wurden kleine PVA Partikel verwendet, um zuerst die kleineren distalen Portalvenenäste zu verschließen. Zusätzlich wurde eine 1:2 Mischung von Zyanoakrylat/ iodiertes Öl (Lipiodol) (Braun, Tuttlingen, Deutschland and Guerbet, Roissy, Frankreich) in die Segmente V-VIII appliziert, um einen vollständigen Verschluss zu erzielen. Es wurde solange embolisiert, bis eine Stase erreicht war. Die erfolgreiche Embolisation wird durch eine abschließende Angiographie festgehalten. Zudem wurden peri- und postinterventionelle Komplikationen dokumentiert.

### 3.6. Vorbereitung und Charakterisierung der CD 133+ Knochenmarkstammzellen

Im Einvernehmen mit den ethischen Richtlinien und den aufgeklärten und daraufhin einverständenen Patienten wurde das folgende Verfahren durchgeführt:

Von der Stammzellentnahme bis zur Wiedereinbringung selektierter Zellen in den Patienten, wurde die Prozedur in einem geschlossenen System durchgeführt.

Nach eingeleiteter Anästhesie, kurz vor der Mini- Laparotomie zur Platzierung des Portalvenenkatheters, wurde autologes Knochenmark aus dem hinteren Beckenkamm entnommen.

Simultan zur Durchführung der PVE wurden die Stammzellen aufbereitet.

Die entnommene Zellsuspension wurde gefiltert, um enthaltende Knochenfragmente zu entfernen. Anschließend wurden mit Hilfe eines GMP-grade Zell Selektionssystems (CliniMACS, Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach,

Deutschland) CD 133+ Stammzellen angereichert. Diese Methode wurde schon in vorangegangenen Studien beschrieben [19].

Vor der Injektion wurde die Knochenmarksmenge, die Zellzahl und die Reinheit im Hinblick auf den Anteil von CD 133+ Zellen in der Suspension durch die Zytofluorometrie [19- 20] bestimmt (Tab.3).

Anschließend wurden die Zellen mit 80 ml PBS-Lösung (Phosphat gepufferte Salzlösung) suspensiert und waren hiermit fertig für die Applikation.

Die Menge an CD 133+ BMSC wurde mit dem absoluten, relativen und täglichen Zuwachs des linken lateralen Leberlappenvolumens nach PVE korreliert.

### 3.7. Applikation der CD133+ Stammzellen bei der Gruppe I

Nach erfolgter Embolisation wurden die CD133+ Stammzellen in die nicht okkludierten Portalvenenäste der Segmente II und III in durchschnittlich 8 min. appliziert. Dazu wurde ein 5-F Kobra Katheter (Terumo, Leuven, Belgien) verwendet, der unter fluoroskopischer Kontrolle (Exposcop 8000, Ziehm, Germany) in die Segmentäste II und III eingebracht wurde.

Nach intrahepatischer Applikation der Zellen wurden der Katheter und die Schleuse wieder entfernt.

Die gesamte Intervention dauerte zwischen 3,5 und 5,5 Std.

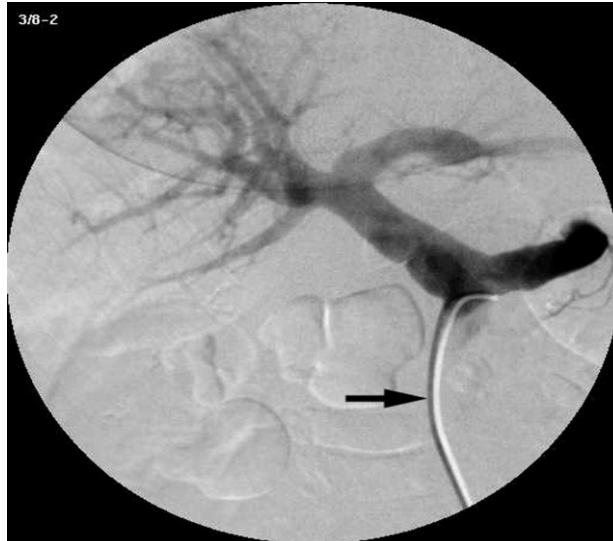


Abb.11 Angiographiebilder vor PVE; Patient 6 mit einem HCC im rechten Leberlappen, vorgesehen für eine erweiterte rechtsseitige Hemihepatektomie; Platzierung eines 5-F Kobra Katheters (schwarzer Pfeil) durch eine 5-F Schleuse, die in die V. ileocolica eingelegt wurde, und Darstellung der V. porta vor Embolisation

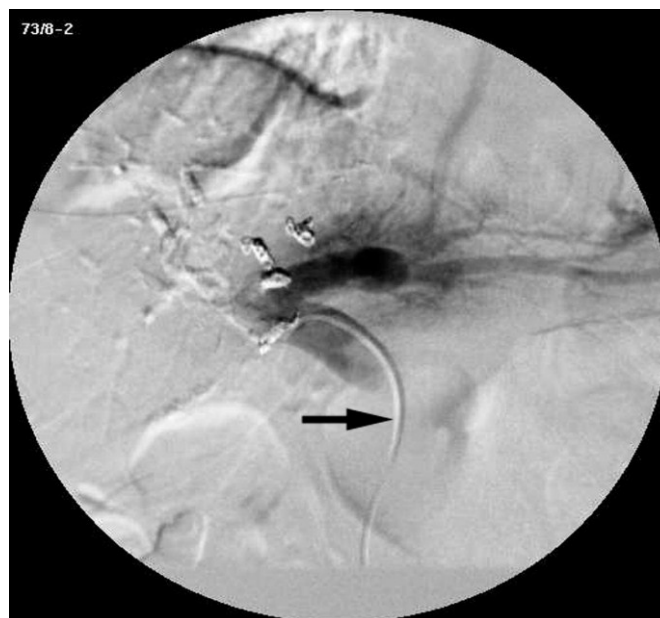


Abb.12 Angiographiebilder nach PVE; Patient 6; Seg. I und IV bis VIII sind erfolgreich verschlossen worden. Die Stammzellen sind 3 Std. nach der PVE über den 5-F Kobra-Katheter in die linke Portalvene appliziert worden.



### 3.8. Zielgrößen

Der Effekt der PVE und BMSC Gabe wurde anhand folgender Zielgrößen mit den Ergebnissen der Referenzgruppe verglichen

- die *tägliche Zuwachsrate*, „*daily gain*“, gemessen in ml/Tag
- der prozentuale Anteil der Segmente II und III am Lebervolumen vor der Intervention, „% *FLRV- prä*“
- prozentuale Anteil der Segmente II und III am Lebervolumen nach 21 Tagen, „%*FLR (day21)*“
- der relative Zuwachs „*rel. FLRV- gain*“ entsprechend dem Quotienten von %*FLRV- prä* / %*FLR(day21)*,
- die Zeit bis zur OP, „*time to surgery*“, Anzahl der Tage von Tag 1 nach der PVE bis einschließlich des Tages der erweiterten rechten Hemihepatektomie
- die Kinetik von Serum Bilirubin, GOT, GPT und INR nach PVE
- die Mortalität und Morbidität im Krankenhaus.

Diese und alle hieraus berechneten Variablen wurden für die beiden Gruppen im Hinblick auf ihre erwarteten Werte verglichen. Da alle Werte nicht negativ waren, wurde zur Ermittlung der Signifikanz der t-Test verwendet, wenn der Varianzkoeffizient (Verhältnis der Standardabweichung im Durchschnitt) niedriger als 1/3 des Mittelwertes war. Andernfalls wurde der Wilcoxon Test verwendet.

Zur Berechnung der Vergleichbarkeit der beiden Gruppen verwendeten wir zweiseitige Tests. Zum Vergleichen der Zuwächse (relativer/ absoluter/ täglicher) an Lebervolumen nach der Behandlung wurden einseitige Tests benutzt.

Ein p- Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Für die Analyse der Zeit bis zur Chirurgie benutzten wir den nicht-parametrischen log- rank- Test (Überlebensanalyse) und den Wilcoxon- Test. Zur Ermittlung der Interobserver- Validität bei der Abschätzung des Lebervolumens wurde die Regressionsanalyse benutzt und der quadratische Korrelationskoeffizient  $r^2$  berechnet.

Die lineare Regressionsanalyse wurde ebenfalls benutzt zur Korrelation der Zahl applizierter Knochenmarks- Stammzellen mit den Zuwächsen an FLRV post- PVE.

Die gesamte Statistik wurde an einem SRS 9,2005 durchgeführt.

### 3.9. Laborparameter

Als Laborparameter wurden Gesamt- Bilirubin, INR (intern. normalized ratio) bzw. Quick- Wert, Glutamat- Oxalacetat- Transaminase (GOT) und Glutamat- Pyruvat- Transaminase (GPT) verwendet.

Diese wurden zum einen vor der PVE bestimmt. Dann folgen drei Kontrollen innerhalb der ersten Woche nach Intervention: am Tag 1, Tag 2 oder 3 und Tag 4 oder 5 nach PVE.

Sie dienen als Marker für den Lebermetabolismus, das Gerinnungssystem und Leberzellschäden.

Ein Anstieg des Gesamt- Bilirubin (Referenzwert: 0,2- 1,3 mg/dl) kann verschiedene Ursachen haben. Dieser kann hepatozellulären Ursprungs in Folge von Leberzellschäden sein, wodurch nicht genügend Bilirubin in der Leber glucuronidiert werden kann. Intrahepatisch kann er durch eine progressive Destruktion der Gallenabflusswege mit Cholestase entstehen, was beim fortschreitenden CCC und Klatskin- Tumor der Fall sein kann.

Auch kann dieser Gallenstau posthepatisch durch eine Kompression des wachsenden Tumors hervorgerufen werden, durch ein HCC oder Metastase.

In unserem Falle diente das Gesamt Bilirubin zum Ausschluss einer Funktionsstörung der Leber infolge der PVE und/ oder der SCs- Applikation. Vor der PVE musste das Bilirubin niedrig sein, um schwere Obstruktionen auszuschließen, die die Regenerationsfähigkeit der Leber beeinträchtigen könnte (siehe Diskussion). Patienten, deren Bilirubin präinterventionell über 3 mg/dl lag, wurden ausgeschlossen.

Der INR oder der Quick- Wert dienen als Parameter für die Syntheseleistung der Leber (Referenzwert- Quick: 70-130%, -INR: um 1). So wurde kontrolliert,

ob nach der PVE die Syntheseleistung der Leber aufrechterhalten wird.

GOT ist sowohl im Zytoplasma als auch in großen Mengen in den Mitochondrien lokalisiert. Es ist nicht leberspezifisch und ist demnach auch beim Herzinfarkt oder Muskeltrauma erhöht.

GPT kommt nur im Zytoplasma vor und ist leberspezifisch.

Die Höhe des Enzymanstiegs des GOT- und des GPT- Werts korrelieren mit dem Umfang einer Zellschädigung. Leichte Leberzellschäden führen zu einem Anstieg der membrangebundenen gamma- GT und der zytoplasmatischen Enzyme, GPT und teils GOT. Dabei ist der De- Ritis- Quotient GOT/GPT <1. Schwere Leberzellschäden führen u.a. zu einem Anstieg der GOT, durch Freisetzung aus den Mitochondrien, wodurch sich der De- Ritis- Quotient zugunsten der GOT verschiebt [20]. Zudem wird das leberspezifische mitochondriale GLDH (Glutamat- Dehydrogenase) freigesetzt, welcher in Relation zum GPT + GOT ein großes Ausmaß an Zellnekrose anzeigen kann. Für den GOT- Wert liegt der Referenzwert bei <35 U/l und für den GPT bei <45 U/l.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. BMSC Charakteristika

In Tabelle 3 sind die Gesamtmenge an aspiriertem Knochenmark, die CD133+ Reinheit der Zellen für die Applikation und die absolute Anzahl der applizierten CD133+ Zellen aufgeführt.

	SCT Patient 1	SCT Patient 2	SCT Patient 3	SCT Patient 4	SCT Patient 5	SCT Patient 6	SCT Patient 7
totales aspiriertes BM- Volumen (ml)	220	60	280	420	440	310	220
CD133+ Reinheit der Zellen für die Applikation (%)	91	11,9	69,7	89	94,4	79,5	86
Absolute Anzahl der applizierten CD133+ Zellen (x 10Mil.)	12,3	2,4	7,3	7,5	9,6	8,3	8,8

Tab.3 Charakteristika der aufbereiteten BM- Zellen – nach der Zytofluorimetrischen Analyse

### 4.2. Volumetrie

Die Volumetrieergebnisse beider Untersucher stimmten sehr gut überein ( $r^2=0,989$  für die SC- Gruppe und  $0,959$  für die Kontroll- Gruppe).

Das Tumolvolumen der SC- Gruppe ( $148,9\pm 143,5$  ml) war mit  $p=0,751$  nicht signifikant größer, als das der Referenzgruppe ( $118,6\pm 143,5$  ml).

Die weiteren Ergebnisse der Volumenberechnung sind in Tabelle 4 zusammen gefasst:

	% FLR- prä	% FLR post	FLR- gain [ml]	% FLR- gain	Tägl. Zuwachs	time to surgery
<b>Gr. I</b>	16,9 (SD: 4,6)	30,3 (SD: 8,6)	190,1* (SD: 70,9)	85,8* (SD: 32,9)	11,5* (SD: 5,1)	27,33 (SD: 11,0)
<b>Gr. II</b>	19,6 (SD: 2,9)	29,0 (SD: 5,6)	109,6 (SD:47,3)	39,1 (SD: 20,4)	4,1 (SD: 1,9)	44,8 (SD: 21,1)

Tab.4 Übersicht der Ergebnisse der Lebervolumetrie, %FLR- prä, %FLR- day21, %FLR- gain, time to surgery von Gruppe I und Gruppe II  
\*Signifikant größer

In der SC- Gruppe lag das % FLR- prä – das prozentuale Ausgangsvolumen der Segmente II und III – bei durchschnittlich 16,9% (SD  $\pm$ 4,6), in der Kontroll- Gruppe (ohne SC) nicht signifikant höher bei 19,6% (SD  $\pm$ 2,9) (p=0,182) . Die tägliche Volumen- Zuwachsrate betrug 11,5 ml/Tag (SD  $\pm$  5,1) (SC- Gr.) und 4,1 ml/Tag (SD  $\pm$ 1,9) (Kontroll-Gr.) (p=0,011). Daraus ergab sich auch ein signifikant höherer durchschnittlicher relativer Zuwachs an Volumen des linken lateralen Leberlappens mit 85,8 % (SD  $\pm$  32,9) in der SC- Gruppe im Vergleich zu 39,1% (SD  $\pm$  20,4) in der Kontroll- Gruppe (p=0,025). Nach 21 Tagen lag das % FLRV in beiden Gruppen über der 25% Grenze. Es betrug 30,3% (SD  $\pm$ 8,6) in der SC- Gruppe und 29% in der Kontroll- Gruppe (SD  $\pm$ 5,6). Ausnahme ist P5 der SC- Gruppe, welcher vor der PVE ein FLRV von 6,9% hatte und danach von 14,3% (rel. Zuwachs von 110%).

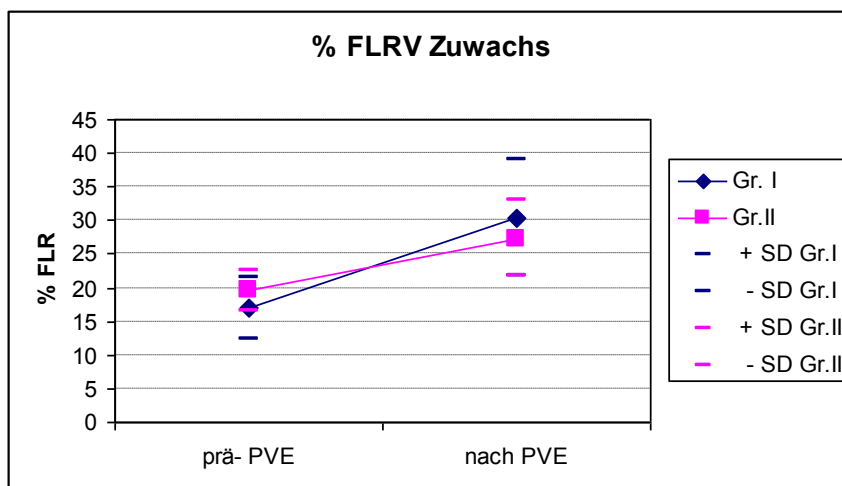


Abb.13 Prozentualer Zuwachs des FLRV; SC- Gruppe und Referenzgruppe im Vergleich

In der SC- Gruppe stieg der absolute Zuwachs mit einer Zunahme um 190,1 ml (SD  $\pm$ 70,9) von 285,5 ml (SD  $\pm$ 187,9) auf 475,5 ml (SD  $\pm$ 232,2). In Gruppe II hatte das Volumen von 286,3 ml (SD  $\pm$ 77,1) um 109,6 ml (SD  $\pm$ 47,3) auf 395,9 ml (SD  $\pm$ 94,1) zugenommen. Die absolute Volumenzunahme war in der SC- Gruppe signifikant höher ( $p=0,049$ ).

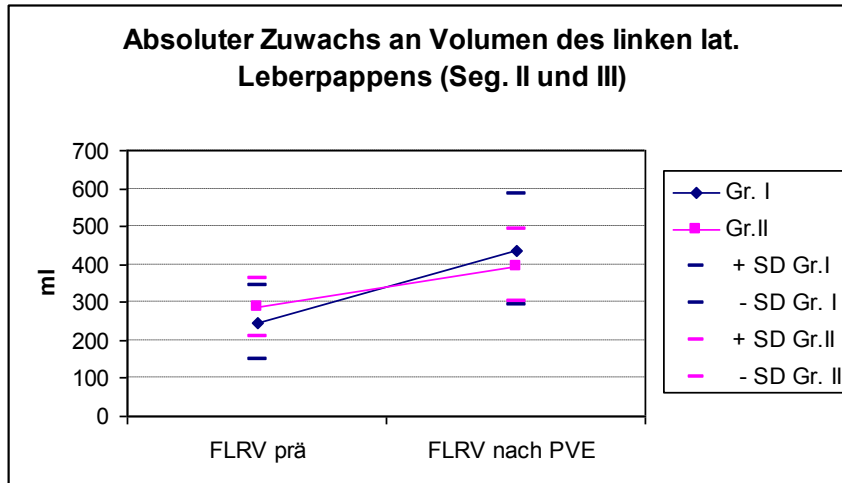


Abb.14 Absoluter Zuwachs an Volumen des linken lateralen Leberlappens (Seg. II und III); beide Gruppen im Vergleich

Zwischen der Menge an applizierten BMSCs und der absoluten, der relativen und der täglichen Zuwachsrate bestand keine Korrelation.

In der SC- Gruppe wurden die volumetrischen Messungen und Berechnungen nach 21 Tagen durchgeführt, in denen sich bereits ein deutliches Wachstum zeigte.



Abb.15 CT Aufnahmen vor PVE und BMSC- Applikation; Patient 6:  
Aus der nach Spiral- CT durchgeführten Volumetrie errechnete sich ein TLV von 1317ml, ein Tu- Vol von 177ml (schwarze Pfeile) und ein FLRV von 217ml (weiße Pfeile). Daraus ergab sich eine FLRV/TLV-Tu- Vol. Relation von 19%.

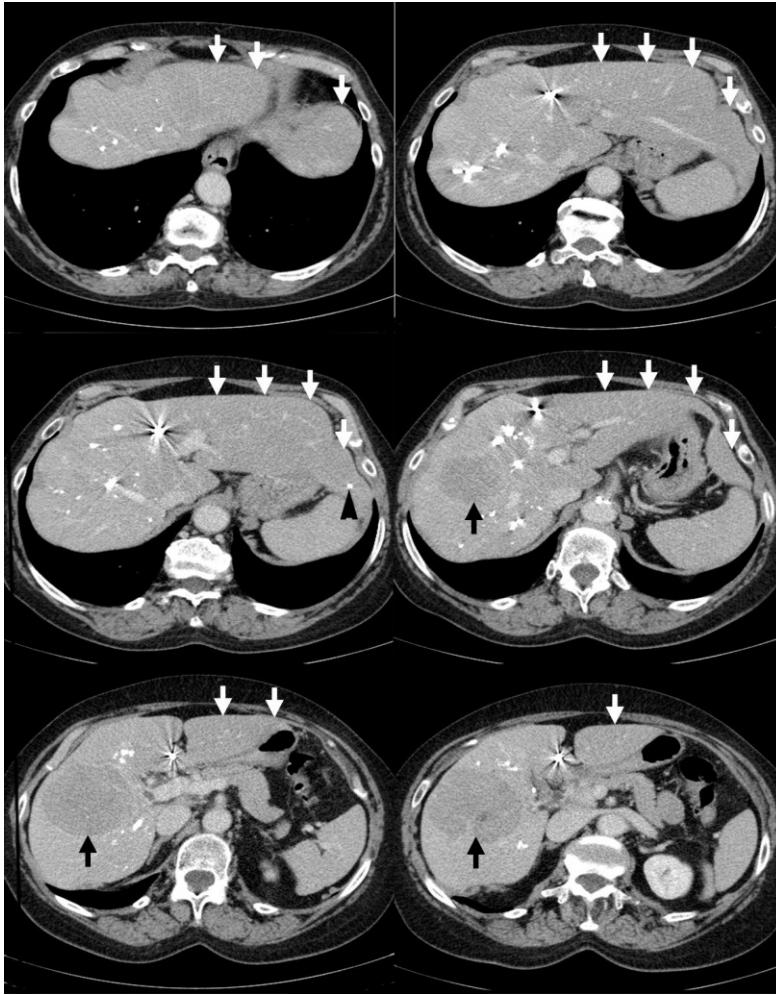


Abb.16 Aufnahmen 14 Tage nach PVE und BMSC- Applikation; Patient 6: Das Spiral- CT zeigte eine Hypertrophie der Segmente II und III (weiße Pfeile). Das FLRV war auf 440ml, die FLRV/TLV- Tu- Vol. Relation war auf 39% angestiegen. Das relative Wachstum lag damit bei 103% und die tägliche Zuwachsrage bei 15,9ml/Tag. Am Tag 21 nach PVE plus BMSC- Applikation konnte kein weiteres Leberwachstum verzeichnet werden. Der schwarze Pfeilkopf markiert ein disloziertes Cyanoacrylat/ iodiertes- Öl- Partikel im Segment II.



### 4.3. Periinterventionelle Komplikationen

Bei 2 Patienten (je ein Patient in Gruppe I und Gruppe II) fanden sich nach der PVE minimale Mengen dislozierten Embolisats (Cyanoacrylat/ jodiertes –Öl) in den Segmenten II und III (Abb.16).

Zwei Patienten der Gruppe II (P1, P2) bekamen einen Wundinfekt. Ein Patient entwickelte 5 Tage nach PVE Fieber, dass aber durch die sofortige Gabe von Antibiotika innerhalb 40 Std. verschwand.

Ansonsten wurden keine weiteren Komplikationen infolge der Stammzellgewinnung aus dem Beckenkamm, der PVE, oder der Stammzell-Applikation beobachtet.

### 4.4. Ergebnisse der Labordaten

#### 4.4.1. Bilirubinwerte (Referenz Wertebereich: 0,2- 1,3mg/dl)

Präinterventionell betrug der mittlere Bilirubinwert in der Gruppe I 0,48 mg/dl (SD  $\pm$ 0,20), in der ersten Kontrolle stieg er auf 0,64 mg/dl (SD  $\pm$ 0,36), fiel zur zweiten Kontrolle auf 0,53 mg/dl (SD  $\pm$ 0,24) und betrug bei der Letzten (4/5 Tag nach PVE) 0,61 mg/dl (SD  $\pm$ 0,40).

In der Kontroll- Gruppe lag der Bilirubinwert vor der PVE bei 0,95 mg/dl (SD  $\pm$ 0,51). Bis zur ersten Kontrolle stieg er auf 1,00 mg/dl (SD  $\pm$ 0,41), bis zur Zweiten auf 1,30 mg/dl (SD  $\pm$ 1,13) und fiel zur Letzten auf 0,73 mg/dl (SD  $\pm$ 0,26) ab (Abb.17).

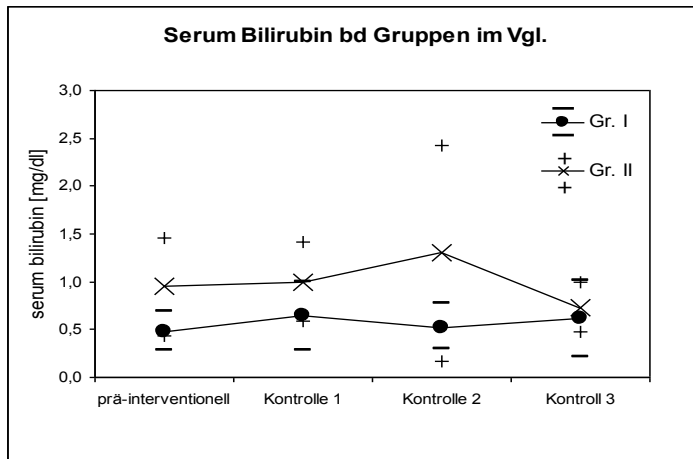


Abb.17 Serum Bilirubin; beide Gruppen im Vergleich Standardabweichung ist mit horizontalen Strichen (Gr.I) und mit Kreuzen (Gr.II) ober- und unterhalb angegeben.

#### 4.4.2. INR- Werte (Referenzbereich um 1)

In der Gruppe I lag der mittlere präinterventionelle INR- Wert bei 1,10 (SD  $\pm 0,12$ ), bei der ersten Kontrolle bei 1,16 (SD  $\pm 0,1$ ) bei der Zweiten bei 1,20 (SD  $\pm 0,26$ ) und schließlich bei der Letzten bei 1,22 (SD  $\pm 0,1$ ).

In Gruppe II war der mittlere präinterventionelle INR- Wert 1,00 (SD  $\pm 0,12$ ), in der ersten Laborkontrolle 1,10 (SD  $\pm 0,14$ ), in der Zweiten 1,00 (SD  $\pm 0$ ) und in der Letzteren 1,1 (SD  $\pm 0,14$ ) (Abb.18).

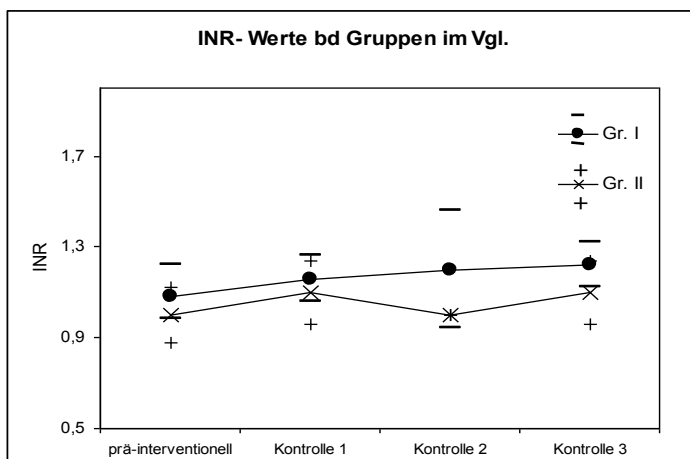


Abb.18 INR-Werte; beide Gruppen im Vergleich Standardabweichung ist mit horizontalen Strichen (Gr.I) und mit Kreuzen (Gr.II) ober- und unterhalb angegeben.

#### 4.4.3. GOT- Werte (Referenz- Wertebereich: <35 U/l)

In Gruppe I betrug der mittlere GOT- Wert vor der Intervention im Mittel bei 42 U/l (SD  $\pm 20,0$ ), erhöhte sich auf 120,7 U/l (SD  $\pm 83,2$ ) in der ersten Kontrolluntersuchung. In der zweiten Kontrolle fiel er auf 76,3 U/l (SD  $\pm 45,7$ ), und weiter auf 38,4 U/l (SD  $\pm 10,2$ ) in der letzten Untersuchung.

In Gruppe II lag der mittlere GOT in der Voruntersuchung bei 98,7 U/l (SD  $\pm 136,8$ ), in der ersten Kontrolle nach PVE bei 90,0 U/l (SD  $\pm 54,7$ ). In Kontrolle zwei sank er auf 85,6 U/l (SD  $\pm 61,0$ ) und letztlich auf 47,6 U/l (SD  $\pm 38,4$ ) ab.

(Abb. 19)

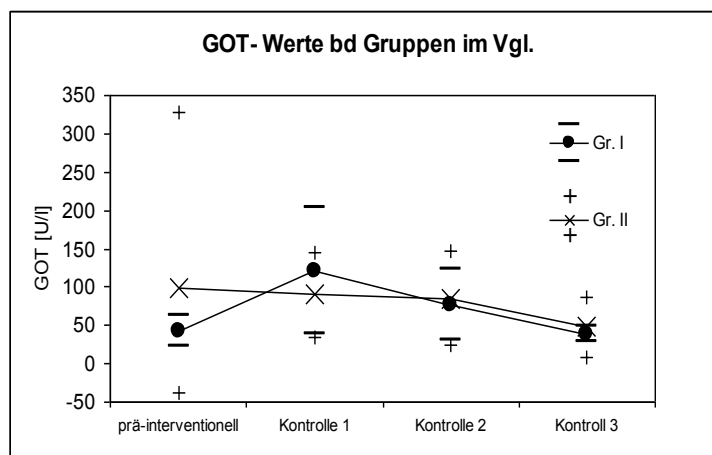


Abb.19 GOT- Werte; beide Gruppen im Vergleich  
Standardabweichung plus/ minus ist mit horizontalen Strichen ober und unterhalb (Gr.I) und mit Kreuzen (Gr.II) angegeben.

#### 4.4.4. GPT- Werte (Referenz- Wertebereich: <45 U/l)

In der SC- Gruppe lag zu Beginn ein durchschnittlicher GPT- Wert von 50,8 U/l (SD  $\pm 23,64$ ) vor, welcher in der ersten Kontrolle auf 129,57 U/l (SD  $\pm 74,37$ ) – 2,8fach größer als der Referenzwert – anstieg. Zur zweiten Kontrolle erhöhte er sich noch einmal leicht auf 136,25 U/l (SD  $\pm 103,29$ ). Letztlich fiel er auf 55,24 U/l (SD  $\pm 14,93$ ) ab.

In der Kontroll- Gruppe lag der GPT- Wert präinterventionell durchschnittlich bei 93,33 U/l (SD  $\pm 124,18$ ), stieg auf 124,0 U/l (SD  $\pm 91,53$ ) und weiter auf 134,60 U/l (SD  $\pm 75,46$ ) in der zweiten Kontrolle. Bei der letzten Kontrolle hatte sich der GPT- Wert mit 49,6 U/l (SD  $\pm 25,91$ ) wieder normalisiert.

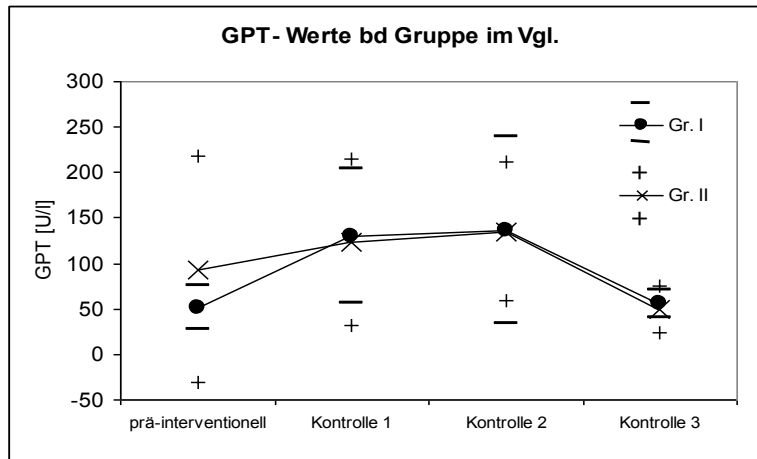


Abb.20 GPT- Werte; beide Gruppen im Vergleich  
Standardabweichung ist mit horizontalen Strichen (Gr.I) und mit Kreuzen (Gr.II) ober- und unterhalb angegeben.

#### 4.5. Chirurgische Behandlung und Morbidität während des Krankenhausaufenthaltes

Die Zeit bis zur Durchführung der OP (time to surgery) lag in der Gruppe I zwischen 21 und 51 Tagen (Mittelwert: 27,3 Tagen; SD  $\pm$  11,0) und in der Gruppe II zwischen 23 und 81 Tagen (Mittelwert: 44,8 Tagen; SD:  $\pm$  21,1). Die durchschnittliche Differenz der Dauer bis zum operativen Eingriff zwischen den beiden Gruppen betrug entsprechend 17,5 Tage. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p= 0,057$ , log- Rangtest;  $p= 0,03$ , adaptierter Wilcoxon Test für Überlebensanalysen).

Die erweiterte Rechts- Hemihepatektomie (Seg. I und IV bis VIII; siehe 2.3) wurde bei allen SC- Patienten durchgeführt, nachdem eine ausreichende Proliferation durch CT dokumentiert war.

Bei vier Patienten (P1, P2, P4, P5) wurde eine Roux- en- Y- und eine Gallengangs- Rekonstruktion durchgeführt. Zusätzlich wurde bei Patient 4 die Portalvene rekonstruiert, um eine R0- Resektion (kein Tumor-Rest) zu erreichen.

Bei Patient 2, der intraoperativ einen neuroendokrinen Tumor des Appendix aufwies, wurde zusätzlich eine ileokolische Resektion durchgeführt. Zudem

hatte dieser Patient eine kleine Tumorkläsion im Seg. II von 1,0 x 0,5 cm GröÙe, die nicht-anatomisch reseziert wurde. Postoperativ trat beim selben Patient ein Chylo- Aszitis auf, der sich aber nach der Umstellung auf komplette parenterale Ernährung spontan zurükbildete.

Patient 1 erlitt eine Anastomoseninsuffizienz des Gallengangs und wurde revidiert.

In der Gruppe II wurde Patient 2 nicht operiert, da der Tumor bereits in die benachbarten Seg. II und III infiltriert war. Alle anderen sechs Patienten wurden mit erweiterter Hemihepatektomie behandelt. Bei 4 Patienten (P1, P3, P4, P7) wurde eine Roux- en- Y- und eine Gallengangsrekonstruktion durchgeführt.

Auch in dieser Gruppe entwickelte ein Patient (P7) eine Anastomoseninsuffizienz des Gallengangs, die durch eine Revision behoben wurde. Bei Patient 4 wurde über die erweiterte Rechts- Hemihepartekomie hinaus eine Pankreatiko- Duodenektomie durchgeführt, um auch hier eine tumorfreie Resektion (R0) zu erzielen. Dieser Patient brauchte aufgrund der schlechten respiratorischen Situation im Anschluss an die OP eine PEEP- Beatmung (positive- end- expiratory- pressure).

Eine möglicherweise durch die PEEP- Beatmung mitverursachte Pfortaderthrombose wurde operativ behandelt. Der Patient verstarb 10 Tage nach der Resektion an Multiorganversagen.

## 5. Diskussion

Die Portalvenenembolisation wurde als radiologisch interventionelles Verfahren 1984 eingeführt. 1990 wurde sie erstmalig vor erweiterter Rechts-Hemihepatektomie eingesetzt [29].

Auch im Universitätsklinikum Düsseldorf wird das Verfahren genutzt, um bei Patienten mit primären und sekundären Tumoren in der Leber eine Hypertrophie der links- lateralen Segmente zu induzieren.

Vor erweiterter Rechts- Hemihepatektomie ist die PVE als alleinige Methode, die Leberregeneration zu stimulieren, häufig unzureichend. Dies gilt besonders für Patienten mit extrem kleinen links- lateralen Segmenten sowie bei kompromittierter Leberparenchymqualität (z.B. Leberzirrhose etc.). Bei solchen Patienten kann die Regeneration der Leber und damit die Wartezeit bis zur OP lang sein (bis zu 150 Tagen). Deshalb haben wir diesen Patienten zusätzlich nach der PVE, autologe CD133+ Stammzellen intraportal verabreicht.

Grundlage hierfür war die Hypothese, dass die Stammzellen durch molekulare Interaktion den Prozess der Leberregeneration unterstützen sollten [13].

Das Minimum an Lebervolumen, das notwendig ist, um postoperativ die Leberfunktion aufrecht zu erhalten, ist bis heute nicht klar definiert. Man geht aber davon aus, dass die Grenze bei 25% des TLV liegt [53- 55], solange das vorhandene Lebergewebe voll funktionstüchtig ist. Bei einer erweiterter Hemihepatektomie werden ca. 81% des Lebervolumens reseziert, wodurch das zukünftige Lebervolumen – FLRV – nur 19% beträgt [56].

Bestehen jedoch Komorbiditäten, wie Zirrhose, Fibrose, Steatose, Diabetes mellitus und Z.n. hepatotoxischer Chemotherapie, liegt das minimale benötigte Rest- Lebervolumen höher ( $\geq 40\%$ ) [57, 58]. Diesbezüglich konnten Lee et al [59] zeigen, dass eine präoperative PVE, auch bei Patienten mit HCC und gleichzeitiger Leberzirrhose, eine Resektion möglich macht.

Insbesondere Patienten mit chronischen Lebererkrankungen profitieren von einer PVE vor erweiterter Leberresektion [8].

Wie bereits ausgeführt, können verschiedene Substanzen für die PVE verwendet werden, wobei sich nach Abdalla et al [30] keine signifikanten

Unterschiede in der Hypertrophierate zeigten.

Trotzdem haben die einzelnen oder kombinierten Substanzen Vor- und Nachteile.

Die Kombination von Polyvinyl Alkohol Partikel (PVA) mit Spiralen wird verwendet, da diese zu einer dauerhaften Okklusion führen und nur eine geringe periportale Lokalreaktion hervorrufen [25].

Verwendet man hingegen eine Kombination aus absorbierbarer Gelatine und Thrombin kann sich im Laufe der Zeit eine Rekanalisation der Gefäße zeigen [31]. Die Verwendung von Fibrinkleber dagegen führt zu einer lang anhaltenden Embolisation. Im Vergleich ist Cyanoacrylat als Embolisat noch effektiver, was die anhaltend okkludierende Wirkung betrifft [31].

Cyanoacrylat führt zu einer besseren, größeren und schnelleren Lebergrößen-Zunahme, als bei der Verwendung Gelatine- Thrombin. Jedoch besteht die Gefahr, dass es zu einem inflammatorischen Prozess, wie peribiliärer Fibrose unter Mitbeteiligung der Portalvene, kommen kann, der die darauf folgende OP komplizieren kann [7].

Des Weiteren wird absoluter Alkohol als Embolisat bei der Behandlung von hepatozellulären Karzinomen als geeignet beschrieben. Nachteilig sind hierbei jedoch größere Veränderungen der Leberfunktionswerte, als bei der Verwendung anderer Substanzen [60].

Die Wirkungen der verschiedenen Substanzen wurden an unterschiedlichen Tier- Spezies, wie z.B. Ratten, Kaninchen erforscht, weshalb sie in Bezug auf den Menschen kritisch bewertet werden sollten.

Wie oben beschrieben, verwenden wir für die PVE der Segmente V-VIII PVA-Partikel und eine Mischung aus Histoacryl®/ Lipiodol® (Zyanoacrylat/ iodiertes Öl) und Spiralen. Diese führten zu einem guten Embolisationsergebnis. Für die Okklusion der Segmente I und IV wurden nur PVA- Partikel und Spiralen benutzt. Diese beiden Segmente sind anatomisch variabel, schwerer aufzufinden und zudem eng benachbart zu den Segmenten II und III, welche unter keinen Umständen okkludiert werden sollten.

Wegen dieser engen anatomischen Nachbarschaft wurde Histoacryl®/ Lipiodol® nicht für die Seg. I und IV verwendet, da es schlecht steuerbar ist und ein höheres Risiko einer Fehlembolisation der Seg. II und III besteht.

Bei allen Patienten der SC- Gruppe und Kontroll- Gruppe wurde die PVE erfolgreich unter Angiographiekontrolle durchgeführt. Zur Beurteilung des Therapieverlaufes erfolgten die oben schon beschriebenen Volumetrien anhand von CT- Kontrollen zur Bestimmung der Lebersegmentvolumina und die Laborparameter zur Leberfunktionskontrolle.

Patienten der Gruppe I wiesen vor der PVE mit 16,9% (SD  $\pm$ 4,6) ein geringeres %FLRV, als Ausgangsvolumen der Segmente II und III, als die Gruppe II mit 19,6% (SD  $\pm$ 1,9) %FLRV, was aber nicht statistisch signifikant ist. In beiden Gruppen lag das %FLRV unter 25%.

Im Vergleich zum Ausgangsvolumen kam es nach 21 Tagen in Gruppe I zu einem Zuwachs von durchschnittlich 190,1 ml (SD  $\pm$ 70,9), was einem prozentualen Zuwachs von 85,8% (SD  $\pm$ 32,9) entsprach. In Gruppe II betrug dieser nur 109,6 ml (SD  $\pm$ 47,3) entsprechend 39,1% (SD  $\pm$ 20,4). Ähnlich war der absolute Zuwachs ( $p= 0,049$ ), als auch der relative Zuwachs ( $p=0,039$ ) signifikant größer in der Gruppe I.

Dieser Unterschied wurde auch in der täglichen Zuwachsrate deutlich. Mit 11,5 ml/Tag (SD  $\pm$ 5,1) lag diese in Gruppe I signifikant höher als in Gruppe II mit 4,1 ml/Tag (SD  $\pm$ 1,9).

Das tägliche Wachstum in der Referenzgruppe war mit dem in vorausgegangene Studien vergleichbar. Broering et al [5] beschreibt in seiner Studie einen täglichen Zuwachs von 3,89 ml/Tag bei Patienten, die eine PVE bekamen.

Die tägliche Zuwachsrate war damit in der mit BMSCs behandelten Gruppe mehr als doppelt so groß. Obwohl das Ausgangsvolumen geringer war, war auch der absolute und relative Zuwachs fast doppelt so groß.

Diese Ergebnisse lassen auf einen Effekt der BMSC- Applikation schließen. Die beobachteten Ergebnisse sind überraschend, da das Ausgangs- FLRV der SC- Gruppe kleiner als das der Gruppe II war. Ferner schloss die Gruppe I 7 Patienten mit verminderter Leberparenchymqualität ein.

Die Patienten der Gruppe II hatten keine Komorbiditäten, welche mit einem qualitativ schlechteren Leberparenchym einhergehen.



Zwar ist die Effizienz der PVE zur Induktion einer Hypertrophie und Unterstützung der Leberregeneration von Patient zu Patient unterschiedlich, dennoch zeigt sich ein deutlicher Effekt der BMSC- Applikation durch eine statistisch signifikant höhere absolute, relative und tägliche Zuwachsrate.

Madoff et al [6] fasst übergreifend die Ergebnisse von de Baere et al [9], Shimamura et al [10], Nagino et al [61] und den schon bereits erwähnten Studien von Abdalla et al [30] und Lee [59] zusammen. Sie verzeichneten einen täglichen Zuwachs von 12-21 ml/Tag in den ersten 14 Tagen nach PVE, ca. 11 ml/Tag nach 28 Tagen und 6 ml/Tag nach 32 Tagen. Hingegen zeigte sich bei Patienten mit einer Lebervorschädigung durch eine Zirrhose oder Diabetes mellitus eine langsamere Regenerationsrate von ungefähr 9 ml/Tag 2 Wochen nach PVE.

In Bezug auf unsere Ergebnisse liegen diese Werte weitaus höher.

Bei dieser einfachen Hemihepatektomie blieben jedoch die Seg. I und IV unembolisiert. Somit wurde ein größeres Volumen für den täglichen, relativen und absoluten Zuwachs belassen.

Bei unseren Patienten wurden über die Embolisation der Segmente V-VIII hinaus zusätzlich das Segment I und IV okkludiert.

Bezüglich der Effekte der PVE stellt sich die Frage, ob die embolisierten Segmente nekrotisieren und damit eine Entzündungsreaktion entsteht, oder ob sie der entzündungsfreien Apoptose unterliegen.

Duncan et al [32] fanden bei Schweinen weder licht- noch elektronenmikroskopisch Beweise für eine ausgeweitete Koagulationsnekrose der embolisierten Lebersegmente. Es zeigte sich ein atrophischer, embolisierter Leberlappen durch Apoptose von Hepatozyten. Im nicht-embolisierten Leberlappen fanden sie Leberläppchen, die in ihrer normalen Architektur erhalten waren. Zudem konnten durch inkorporiertes Bromdesoxyuridin neue Hepatozyten in diesen Läppchen nachgewiesen werden.

Zusammen mit der generellen Größenzunahme des Leberlappens geht man davon aus, dass es zu einem Läppchenzuwachs kommt. In der ersten Woche

nach Embolisation zeigt sich eine Replikationsrate von max.14% [32]. Es handelt sich also letztlich um eine hepatozytäre Replikation.

Mit den Laborparametern GOT, GPT wurden die hepatozelluläre Integrität erfasst. Ein Anstieg würde einen hepatozellulären Schaden anzeigen. Der INR diene als Synthesemarker und die Bilirubinkonzentration als Marker für den Lebermetabolismus.

Laut Studien [6, 7, 32, 41, 59] steigen GOT und GPT in den ersten 1-3 Tagen und liegen bei dem 2-3 fachen des Referenzwertes. 7- 10 Tage danach fallen sie aber wieder auf ihren Ausgangswert zurück.

Auch wir konnten einen ähnlichen Verlauf der Laborparameter beobachten. Sowohl der GOT, als auch der GPT stiegen am ersten Tagen nach PVE an und fielen dann wieder ab.

Ein leichter Anstieg des Bilirubins kann teilweise beobachtet werden, welcher aber innerhalb des Referenzbereichs liegt [6, 7, 9, 32, 59].

Als Grenzwert für den Einschluss in die Studie wurde ein Bilirubinwert von 3 mg/dl vorausgesetzt. Im Allgemeinen ist bekannt, dass höhere Bilirubinwerte Zeichen eines Gallenstaus sein können, welcher die Regenerationsfähigkeit der Leber vermindert. Das heißt letztlich, dass dann die Hypertrophie und damit auch die tägliche Zuwachsrate geringer ausfallen.

Auch wir hatten in unserer Studie drei Patienten, die im Nachhinein eine Cholestase entwickelten und mit einer Drainage oder einem Stent versorgt werden mussten. Sie wurden von der Studie ausgeschlossen.

Letztlich zeigen die Laborauswertungen und die Ergebnisse der Gewebshistologie, dass die PVE zu keinen ausgedehnten Gewebnekrosen oder Leberinsuffizienz führt. Die perkutane Embolisation führt zu einer Atrophie der embolisierten Segmente. Die histologischen und Serumenzym- Analysen lassen darauf schließen, dass die Atrophie auf Apoptose und nicht auf einer lytischen Nekrose, die einen extremeren Anstieg der Transaminasen bewirken würde, beruht.

Zudem zeigten sich auch bei uns ähnliche Verläufe der Laborparameter, die darauf schließen lassen, dass es zu keiner Nekrose kommt. Auch der Leberfunktionsparameter INR, welcher nach der PVE im Referenzbereich

bleibt, deutet darauf hin, dass die Embolisation und die teils zusätzliche Stammzellgabe gut von den Patienten bzw. deren Leber vertragen wird.

Vor kurzem erschienene Veröffentlichungen haben die breite entwicklungsbiologische Plastizität von Knochenmarksstammzellen herausgestellt. So können sich BMSC nicht nur in verschiedene Blutzell-Reihen differenzieren, sondern auch in Leberepithelien [12, 13, 62]. Über den Mechanismus, wie und unter welchen Bedingungen die Stammzellen sich gerade in der Leber anlagern und deren Regeneration begünstigen, ist nur wenig bekannt.

Eine Möglichkeit ist, dass es zur Zell- Zell- Fusion von BMSC mit Leberzellen kommen kann [63, 64].

Des Weiteren wäre die Umwandlung zu Leberzellen durch Transdifferenzierung denkbar [43, 65, 66]. Zudem wird angenommen, dass Oval- Zellen die Fähigkeit besitzen sich als intrahepatische Stammzellen in Hepatozyten und Gallenganzellen umzuwandeln [46].

Die Umgebungsfaktoren, die die Mobilisierung und das Homing der adulten Stammzellen initiieren, sind bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert. Die verschiedenen, komplexen Liganden- Rezeptor Interaktionen, die die Zirkulation und die Adhäsion der Stammzellen bedingen sind Objekte der derzeitigen Forschung.

So konnte schon gezeigt werden, dass es nach Leberschädigung zu einer erhöhten Expression von Chemokinen und Chemotakten, wie z.B. dem stromal cell- derived- factor-1(SDF-1), kommt. Zudem ist, als Rezeptor für SDF-1, der CXCR4-Rezeptor- 4 beteiligt. Außerdem führte der hepatocyt- growth- factor (HGF), welcher nach Leberschädigung an der Regeneration beteiligt ist, zu einer CXCR4- Upregulation und einer SDF-1 vermittelten direkten Migration von humanen CD133+ Progenitorzellen [67].

Therapeutisch wurden bis jetzt schon CD133+ angereicherte BMSCs zur Unterstützung der Regeneration von Myokardgewebe nach Infarkt [51, 52, 20] eingesetzt.

In unserer Studie haben wir die PVE der Segmente I und IV bis VIII angewendet, um einen starken Stimulus für die Leberregeneration zu setzen.

Die direkte portale Applikation der hochkonzentrierten CD133+ Stammzellen in die nicht- embolisierten Lebersegmente II und III sollte das Anlocken und Homing der extrahepatischen Stammzellen erleichtern. Die Überlegung für diese Form der Applikation wird durch eine bereits erschienene Veröffentlichung unterstützt, die zeigte, dass es einen hohen first- pass Auslese- Effekt von BMSCs gibt, wenn diese direkt in die Portalvene appliziert werden [68].

In unserer Studie haben wir weder die Mechanismen der beobachteten Volumeneffekte, noch das Schicksal der injizierten, adulten Stammzellen untersucht. Die signifikanten absoluten, relativen und täglichen Volumenzuwächse sprechen jedoch für einen stammzell- induzierten Effekt. Einen tierexperimentellen Nachweis haben wir bis jetzt jedoch nicht erbracht. Eine andere Limitation bezüglich der Aussagefähigkeit unserer Studie entsteht durch die Verwendung der unterschiedlichen Auswahlkriterien zwischen Gruppe I und Gruppe II. Wir haben eine Kombination von Kriterien gewählt, die ein hohes Risiko für eine verminderte Regenerationskapazität und einen inadäquaten Volumenanstieg darstellten. Dazu gehörten ein FLRV unter 25%, verminderte Qualität des Leberparenchyms, aufgrund von hepatischer Fibrose/ Steatose, Z.n. hepatotoxischer Chemotherapie, erhöhte Tumorwachstumsrate und -volumen.

Wir können nicht ausschließen, dass diese inhomogenen Einschlusskriterien für Gruppe I und Gruppe II positive oder auch negative Einflüsse auf die unterschiedlichen Zuwachsraten der zwei Gruppen hatten.

Trotz der Unterschiede war das FLRV vor PVE statistisch nicht signifikant. Letztlich wurden die Patienten mit der geringern Aussicht auf einen adäquate Volumenantwort auf PVE der Stammzellgruppe zugeteilt.

Ein wesentlicher Vorteil war, dass die Patienten durch die Stammzellgabe schneller einer Operation zugeführt werden konnten. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da in der Wartezeit auch das Tumorgewebe weiter wächst und die gesunden Lebersegmente infiltrieren kann.

Der Zeitraum, ab welchem mit hoher Wahrscheinlichkeit der Tumor in die benachbarten tumorfreien Segmente wächst wird mit 4- 5 Wochen angegeben

[9].

Aus unserer Studie können keine Aussagen zum Tumorwachstum getroffen werden, da das Tumolvolumen in den Kontroll- CTs nicht mehr mitbestimmt wurde. In einem Fall fand sich jedoch nach 23 Tagen Tumorgewebe im Seg. II (P2 der Referenzgruppe), weshalb dieser im Anschluss nicht mehr operiert wurde.

Vorteilhafterweise konnte in Gruppe I die chirurgische Intervention, auf Grund der schnellen hepatischen Proliferation, früher durchgeführt werden. Somit wurden auch die CT- Volumetrie- Kontrollen bereits am Tag 7 und 14 durchgeführt.

## 6. Zusammenfassung

Ziel der Studie ist gewesen, die Effektivität einer Portalvenenembolisation in Kombination mit der Gabe von CD133+ Stammzellen im Vergleich zur alleinigen Portalvenenembolisation, für die Unterschätzung der Leberregeneration bei Patienten mit Lebertumoren, zu evaluieren.

Dazu bekamen 14 Patienten eine Portalvenenembolisation der Lebersegmente I und IV- VIII, um die Leberregeneration vor erweiterter rechtsseitiger Hemihepatektomie anzuregen. Bei 7 Patienten (3 Frauen, 4 Männer; Durchschnittsalter 62; von 46- 78 Jahre) mit einem zukünftigen Lebervolumen (FLRV) unter 25% und/ oder einer minderen Qualität des Leberparenchym, versprach die alleinige Portalvenenembolisation keine adäquate Proliferation. Diese Patienten bekamen zusätzlich Knochenmarksstammzellen in die Segmente II und III (SC- Gruppe) appliziert. Bei weiteren 7 Patienten (vier Frauen, drei Männer; Durchschnittsalter 69 Jahre; von 63- 75 Jahre) mit einem FLRV unter 25% wurde nur eine Portalvenenembolisation durchgeführt. Die Bestimmung des Lebervolumen und Tumorvolumen wurde mit Hilfe eines Spiral Computertomographen durch zwei Radiologen durchgeführt. Beide waren in Bezug auf die Identität der Patienten und die Messresultate des jeweiligen anderen Radiologen verblindet. Beide Gruppen wurden anhand des absoluten, des relativen und des täglichen Zuwachses an Lebervolumen, unter der Verwendung des t- Tests oder des Wilcoxon Tests, verglichen.

In den Ergebnissen zeigte sich zum einen ein statistisch signifikant höherer ( $p=0,049$ ) durchschnittlicher absoluter Zuwachs des FLRV in der Gruppe I von 285,5 ml (SD  $\pm$  187,9 ml) auf 475,5 ml (SD  $\pm$  232,2 ml) im Vergleich zur Gruppe II von 286,3 ml (SD  $\pm$  77,1 ml) auf 395,9 ml (SD  $\pm$  94,1 ml). Der relative Zuwachs des FLRV nach der Portalvenenembolisation war in der Gruppe I ebenfalls statistisch signifikant größer ( $p=0,039$ ) ( $85,8\% \pm 32,9\%$ ) als in der Gruppe II ( $39,1\% \pm 20,4\%$ ).

Die tägliche Zuwachsrate mit 11,5 ml/Tag (SD  $\pm$  5,1 ml/Tag) in der Gruppe I gegenüber der mit 4,1ml/Tag (SD  $\pm$  1,9 ml/Tag) in der Gruppe II ( $p= 0,011$ ). Die Zeit bis zur OP betrug für die Gruppe I 27 Tage  $\pm$ 11 und in der Gruppe II 45 Tage  $\pm$ 21 ( $p= 0,057$ ).

Zusammenfassend war die Leberregeneration signifikant vergrößert, wenn bei Patienten mit Lebertumoren die Kombination einer Portalvenenembolisation mit der Applikation von CD 133+ Knochenmarkstammzellen durchgeführt wurde im Vergleich zur alleinigen Portalvenenembolisation.

# Literaturverzeichnis

- 1 Brancatisano R, Isla A, Habib N. Is radical hepatic surgery safe? *Am J Surg.* 1998;175:161-163.
- 2 Bozetti F, Gennari L, Regalia E et al. Morbidity and mortality after surgical resection of liver tumors: analysis of 229 cases. *Hepatogastroenterology.* 1992;39:237-241.
- 3 Cunningham JD, Fong Y, Shriver C et al. One hundred consecutive hepatic resections: blood loss, transfusion, and operative technique. *Arch Surg.* 1994;129:1050-1056.
- 4 Hemming AW, Reed AI, Howard RJ et al. Preoperative portal embolization for extended hepatectomy. *An Surg.* 2003;237:686-691.
- 5 Dieter C. Broering, M.D.; Christian Hillert et al. Portal Vein Embolisation vs. Portal Vein Ligation for Induction of Hypertrophy of Future Liver Remnant; *Journal of Gastrointestinal Surgery.* 2002;6:905-913.
- 6 David C. Madoff, MD, Marshall E. Hicks, MD et al. Portal Vein Embolisation with Polyvinyl Alcohol Particles and Coils in Preparation for Major Liver Resection for Hepatobiliary Malignancy: Safety and Effectiveness- Study in 26 Patients. *Radiology.* 2003 Apr;227(1):251-260.
- 7 De Baere T, Roche A, Elias D, Lasser P, Lagrange C, Bousson V. Preoperative portal vein embolisation for extension of hepatectomy indications. *Hepatology.* 1996;24:1386-1391.
- 8 Farges, Oliver MD et al. Portal Vein Embolisation Before Right Hepatectomy: Prospective Clinical Trial; *Ann.Surg.* 2003 Feb;237(2):208-217.
- 9 De Baere T, Roche A, Vasseur D et al. Portal vein embolisation: utility for inducing left hepatic lobe hypertrophy before surgery. *Radiology.* 1993;188:73-77.
- 10 Shimamura T, Nakajima Y. et al. Efficacy and safety of preoperative percutaneous transhepatic portal embolisation with absolute ethanol: a clinical study. *Surgery.* 1997;121:135-141.
- 11 Lee KC, Kinoshita H, Hirohashi K, Kubo S, Iwasa R. Extension of surgical indications for hepatocellular carcinoma by portal vein embolization. *World J Surg.* 1993;17:109-115.
- 12 Theise ND et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 2000;31:235-240.
- 13 Petersen BE, Bowen WC, Patrene Kd et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 2000; 284:1168-1170.
- 14 Alison MR, Poulson R, Jeffery R et al. Hepatocytes from nonhepatic adult stem cells. *Nature.* 2000;406:257.
- 15 Kollet et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003;112:160-169.
- 16 Forbes SJ, Vig P, Poulson R et al. Bone marrow-derived stem cells: their therapeutic potential. *Gastroenterology.* 2002;123:654-655.
- 17 Theise ND. Liver stem cells: the fall and rise of tissue biology. *Hepatology.* 2003;38:804-806.
- 18 Fujii H, Hirose T, Oe S. et al. Contribution of bone marrow stem cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatology.* 2002;36:653-659.
- 19 De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, et al. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology.* 2004;51:805-810.
- 20 Klein HM, Ghodsizad A, Borowski A. et al. Intramyocardial application of bone marrow-derived stem cells in combination with transmyocardial laser revascularisation: report on two cases. *Heart Surg Forum* (in press).
- 21 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet.* 2003;361:45-46.
- 22 Pompilo G, Cannata A., Peccatori F, et al. Autologous peripheral blood stem cells transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg.* 2004 Nov; 78(5):1808-1812.
- 23 Durst und Rohen. *Chirurgische Operationslehre.* Schattauer. 1996;495- 496,450.
- 24 R.Putz und R.Pabst. *Atlas der Anatomie des Menschen.* Sobotta. 2000; 2/144.
- 25 David C. Madoff et al. Transhepatic Portal Vein Embolisation: Anatomy, Indications, and Technical Considerations, *Radiographics.* 2002;22:1063-1076.
- 26 Böcker und Denk. *Pathologie.* Urban & Fischer. 2004;790-794.
- 27 Gerd Herold und Mitarbeiter. *Innere Medizin.* Gerd Herold. 2005;437,478,479,487,488.
- 28 M.Müller. *Chirurgie.* Breisach. 2008/2009;237-242,250.
- 29 Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, et al. Preoperative portal vein embolisation to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery.*



- 1990;107:521-527.
- 30 Abdalla EK, Hicks ME, Vauthey JN. Portal Vein Embolisation: rationale, technique and future prospects. *Br J Surgery*. 2001;88:165-175.
  - 31 Matsuoka T. Experimental studies of intrahepatic portal vein embolisation and embolic materials. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi*. 1989;49:593-606.[Japanese]
  - 32 James R. Duncan, MD, PhD, Marshall E. Hicks, MD, Shi- Rong Cai, MD, Elisabeth M. Brunt, MD and Katherine P. Ponder, MD. Embolisation of Portal Vein Branches Induces Hepatocyte Replication in Swine: A potential Step in Hepatic Gene Therapy. *Radiology*. 1999 Feb;210(2):467-477.
  - 33 Kahn et al. Thymidine kinase: an in vivo index of liver regeneration in a large animal model. *Gastroenterology*. 1980; 79:907-911.
  - 34 Grisham; A morphological study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: autoradiography with thymidine- H3. *Cancer Res* 1962; 22:842-849.
  - 35 Siegel et al. Tritiated thymidine autoradiography in the regenerating liver of the dog. *J Surg Res*. 1965; 5:72-78.
  - 36 Francavilla A, Panella, Polimeno L, et al. Hormonal and Enzymatic parameter of hepatic regeneration in patients undergoing major liver resection. *Hepatology*. 1990; 12:1134-1138.
  - 37 Gussoni E, Soneoka Y, Stickland CD et al. Dystrophin expression in mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999;401:390-394.
  - 38 Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1775-1779.
  - 39 Mezey E, Chandross KJ, Harta G et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290:1779-1782.
  - 40 Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7:430-436.
  - 41 Grant BM, May WS, Caballero S et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002;8:607-612.
  - 42 Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105:369-377.
  - 43 Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M et al. Purified hematopoietic stem cell can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000;6:1229-1234.
  - 44 Donald Orlic, Jonathan M. Hill, Andrew E. Arai. *Stem Cells for Myocardial Regeneration*. <http://www.circresaha.org>
  - 45 Quintana-Bustamanta et al. Hematopoietic mobilisation in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*. 2006 Jan;43(1)108-116.
  - 46 Ying Zhang, Xue-Fan Bai, Chang-Xing Huang. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterology*. 2003;9(2):201-204.
  - 47 Irene Oi-Lin Ng et al. High Frequency of Chimerism in Transplanted Livers; *Hepatology*. 2003;38:989-998.
  - 48 De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, et al. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology*. 2004;51:805-810.
  - 49 Fujii H, Hirose T, Oe S, et al. Contribution of bone marrow stem cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatology*. 2002;36:653-659.
  - 50 Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, et al. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci*. 2003;996:141-151.
  - 51 Pompilo G, Cannata A, Peccatori F, et al. Autologous peripheral blood stem cells transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Proceedings of 10<sup>th</sup> Cardiothoracic Techniques & Technologies 2004*: A125.
  - 52 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361:45-46.
  - 53 Abdalla EK, Hicks ME, Vauthey JN. Portal vein embolization: rationale, technique and future prospects. *Br J Surgery*. 2001;88:165-175.
  - 54 Vauthey JN, Chaoui A, Do KA et al. Standardized measurement of the future liver remnant prior to extended liver resection: methodology and clinical associations. *Surgery*. 2000;127:512-519.
  - 55 Vauthey JN, Abdalla EK, Doherty D, et al. Body surface area and body weight predict total liver volume in Western adults. *Liver Transpl*. 2002;8:233-240.
  - 56 Gehling UM, Willems M, Schlagner K, et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a distinct population of progenitor cells in healthy liver donors. *J Hepatology*. 2005; 43:845-853.
  - 57 Azoulay D, Castaing D, Smail A, et al. Resection of nonresectable liver metastases from

- colorectal cancer after percutaneous portal embolization. *Ann Surg.* 2000;231:480-486.
- 58 Kubota K, Makuuchi M, Kusaka K, et al. Measurement of liver volume and hepatic functional reserve as a guide to decision-making in resectional surgery for hepatic tumors. *Hepatology.* 1997;26:1176-1181.
  - 59 Kang Choon Lee, M.D. et al. Extension of Surgical Indications for Hepatocellular Carcinoma by Portal Vein Embolisation *World J. Surg.* 1993;17:109-115.
  - 60 Yamakado K et al. Portal vein embolisation with steel coils and absolute ethanol: A comparative study with canine liver. *Hepatology.* 1995;22:1812-1818.
  - 61 Nagino M, Nimura Y et al. Changes in hepatic lobe volume in biliary tract cancer patients after portal vein embolisation. *Hepatology.* 1995;21:434-439.
  - 62 Alison MR, Poulson R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature.* 2000;406:257.
  - 63 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 2003;422:901-904.
  - 64 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone marrow-derived hepatocytes. *Nature.* 2003;422:897-901.
  - 65 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol.* 2004;6:532-539.
  - 66 Newsome PM, Johannessen I, Boyle S. et al. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology.* 2003;124:1891-1900.
  - 67 Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, et al. SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning stem cells.* 2002;4:339-351.
  - 68 Fan TX, Hisha H, Jin TN, et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation (BMT) by injection of bone marrow cells via portal vein: stromal cells as BMT-facilitating cells. *Stem Cells* 2001;19:144-150.