

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
A Einleitung	5
1. Die Entwicklung der laparoskopischen Chirurgie.....	5
2. Stand der klinischen laparoskopischen Leberchirurgie.....	9
3. Partielle Hepatektomie und Leberregeneration.....	11
4. Partielle Hepatektomie und Leberregeneration bei der Fettleber	13
5. Pneumoperitoneum und Ischämie/Reperfusionsschädigung	15
6. Ischämie/Reperfusionsschaden bei der Fettleber.....	17
7. Pneumoperitoneum und Leberregeneration	18
B Fragestellung	19
C Material und Methoden	20
1. Versuchstiere und Tierhaltung	20
2. Induktion der Fettleber	20
3. Versuchsplanung.....	21
3.1. Vorversuch	21
3.2. Hauptversuch.....	22
4. Narkose und Operation	25
5. Tötung der Tiere und Probeentnahme.....	30
5.1. Bestimmung der regenerierten Lebermasse.....	30
5.2. Biochemische und histologische Analysen.....	30
5.2.1. Leberenzyme	30
5.2.2. Histologische Färbungen	31
5.2.3. Immunhistochemie	32
5.3. Western Blot (Caspase 3, Cyclin D1).....	36
5.4. Malondialdehyd (MDA)-Konzentration im Lebergewebe	39
5.5. Myeloperoxidase (MPO)-Konzentration im Lebergewebe.....	41
5.6. Reverse Transkription und DNase-Verdau (VEGF, HGF, TGF- β , IL-1 β)	42
5.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	48
6. Statistische Auswertung	50
D Ergebnisse	51
1. Vorversuch.....	51
1.1. Induktion der Fettleber	51
1.2. Pneumoperitoneum und Leberzellschädigung bei der gesunden und bei der Fettleber	52
2. Hauptversuch	54
2.1. Leberzellschädigung	54
2.2. Oxidativer Stress (Malondialdehyd im Lebergewebe)	58
2.3. Interleukin-6	59
2.4. Sequestration von neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe (Myeloperoxidase)	61
2.5. Lebergewichtszunahme	62
2.6. Mitose.....	62
2.6. Ki-67.....	67
2.7. Cyclin D1.....	71
2.8. HGF (Hepatocyte growth factor).....	72
2.9. VEGF (Vascular endothelial growth factor).....	73

2.10. TGF- β (Transforming growth factor- β)	75
2.11. IL-1 β (Interleukin-1 β).....	77
2.12. Caspase 3	79
2.13 Tunel.....	80
E Diskussion.....	81
1. Pneumoperitoneum und hepatozelluläre Schädigung	81
2. Zytokine	89
3. Pneumoperitoneum und Leberregeneration bei der gesunden und bei der Fettleber.....	93
F Zusammenfassung.....	101
Literaturverzeichnis.....	103
Danksagung.....	119
Eidesstattliche Erklärung.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vom Desormeaux Endoskop zum modernen OP-Saal.....	5
Abbildung 2 Mechanismus der Hepatozytenregeneration	12
Abbildung 3 Anlage des CO ₂ -Pneumoperitoneums.....	26
Abbildung 4 Schemazeichnung der Rattenleberanatomie vor (A) und nach (B) Leberteilresektion.....	27
Abbildung 5 Endoskopische Polypektomieschlinge (Storz, Tuttlingen, D).....	28
Abbildung 6 Vorbereitung der partiellen Hepatektomie.....	28
Abbildung 7 Durchführen der Resektion mit der Schlinge unter Stromapplikation.....	29
Abbildung 8 Mittlerer und linkslateraler Leberlappen mit planen Resektionsflächen.....	29
Abbildung 9 HE-Färbung Fettleber, Vergrößerung x 40.....	51
Abbildung 10 Hepatozelluläre Schädigung (AST) ohne Resektion mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum bei gesunder (A)- und Fettleber (B).....	53
Abbildung 11 Hepatozelluläre Schädigung (ALT) mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum.....	53
Abbildung 12 Hepatozelluläre Schädigung (AST) mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion.....	56
Abbildung 13 Hepatozelluläre Schädigung (ALT) mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion.....	56
Abbildung 14 Hepatozelluläre Schädigung (GLDH) mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion.....	57
Abbildung 15 Hepatozelluläre Schädigung (LDH) mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion.....	57
Abbildung 16 Oxidativer Stress (MDA) mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum bei gesunder- (A) und Fettleber (B) nach Leberteilresektion.....	58
Abbildung 17 Interleukin 6 nach Leberteilresektion mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B).	60
Abbildung 18 MPO nach Leberteilresektion mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B).....	61
Abbildung 19 Zunahme des Lebergewichts nach Leberteilresektion mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B).....	62
Abbildung 20 Leberregeneration anhand der Mitoserate nach Leberteilresektion mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B).....	64
Abbildung 21 HE Färbung gesunde Leber (Mitosen).....	65
Abbildung 22 HE Färbung Fettleber (Mitosen).....	66
Abbildung 23 Ki-67 Expression im Lebergewebe nach Leberteilresektion mit und ohne CO ₂ -Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B).....	68
Abbildung 24 HE Färbung gesunde Leber (Ki-67).....	69
Abbildung 25 HE Färbung Fettleber (Ki-67).....	70
Abbildung 26 Expression von Cyclin D1 im Westernblot	71
Abbildung 27 Darstellung der mRNA Expression von β -Actin	72
Abbildung 28 Darstellung der mRNA Expression des Wachstumsfaktors HGF	72
Abbildung 29 Darstellung der mRNA Expression des Wachstumsfaktors VEGF	74
Abbildung 30 Darstellung der mRNA Expression des Regenerationsinhibitors TGF- β	76
Abbildung 31 Darstellung der mRNA Expression des Regenerationsinhibitors IL-1 β	77
Abbildung 32 Darstellung der mRNA Expression von Caspase 3.....	79

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Geschichte der laparoskopischen Chirurgie</i>	8
<i>Tabelle 2 Literaturübersicht laparoskopische Leberteilresektion</i>	10
<i>Tabelle 3 Einfluss des Pneumoperitoneums auf die Leberperfusion</i>	15
<i>Tabelle 4 Zusammensetzung der Diät zur Induktion der Fettleber</i>	21
<i>Tabelle 5 Gesunde Tiere, 60 Minuten Narkose</i>	21
<i>Tabelle 6 Tiere mit induzierter Fettleber, 60 Minuten Narkose</i>	22
<i>Tabelle 7 Gesunde Ratten, Narkose und 60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum</i>	22
<i>Tabelle 8 Tiere mit induzierter Fettleber, Narkose und 60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum</i>	22
<i>Tabelle 9 Gesunde Tiere, 60 Minuten Narkose und 70%iger Leberteilresektion</i>	23
<i>Tabelle 10 Gesunde Tiere, 60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum und 70%iger Leberteilresektion</i>	23
<i>Tabelle 11 Tiere mit induzierter Fettleber, 60 Minuten Narkose und 70%iger Leberteilresektion</i>	24
<i>Tabelle 12 Tiere mit induzierter Fettleber, 60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum</i>	24
<i>Tabelle 13 Materialien/Geräte/Instrumente/Reagenzien</i>	25
<i>Tabelle 14 HE-Färbung Materialien/Geräte</i>	32
<i>Tabelle 15 HE-Färbung Reagenzien</i>	32
<i>Tabelle 16 Immunhistochemie Materialien/Geräte</i>	33
<i>Tabelle 17 Immunhistochemie Reagenzien</i>	34
<i>Tabelle 18 Western Blot Materialien/Geräte</i>	37
<i>Tabelle 19 Western Blot Reagenzien</i>	38
<i>Tabelle 20 Malondialdehyd Materialien, Reagenzien</i>	40
<i>Tabelle 21 Myeloperoxidase Materialien, Reagenzien</i>	41
<i>Tabelle 22 PCR Materialien und Geräte</i>	44
<i>Tabelle 23 Interleukin 6 Materialien und Geräte</i>	48
<i>Tabelle 24 Einfluss des CO₂ Pneumoperitoneums auf die Transaminasen bei Tieren mit gesunder und Tieren mit Fettleber</i>	52
<i>Tabelle 25 Einfluss des CO₂ Pneumoperitoneums auf die Transaminasen bei Tieren mit gesunder und Tieren mit Fettleber nach Leberteilresektion</i>	55
<i>Tabelle 26 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf den oxidativen Stress</i>	58
<i>Tabelle 27 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf das proinflammatorische Interleukin 6 nach Leberteilresektion</i>	60
<i>Tabelle 28 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Aktivität von Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe nach Leberteilresektion</i>	61
<i>Tabelle 29 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Mitoserate im Lebergewebe nach Leberteilresektion</i>	64
<i>Tabelle 30 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Expression von Ki-67 im Lebergewebe nach Leberteilresektion</i>	67
<i>Tabelle 31 Semiquantitative Auszählung der Tunel Färbung bei gesunder Leber</i>	80
<i>Tabelle 32 Semiquantitative Auszählung der Tunel Färbung bei Fettleber</i>	80
<i>Tabelle 33 Verschiedene Tiermodelle zur Untersuchung der Leberregeneration bei der Fettleber nach partieller Hepatektomie</i>	95
<i>Tabelle 34 Postoperative Morbidität nach Leberteilresektion bei Patienten mit Fettleber</i>	99

A Einleitung

1. Die Entwicklung der laparoskopischen Chirurgie

Die Anfänge der endoskopischen Chirurgie sind bereits in der Antike beschrieben [Gorden 1993]. Die erste endoskopische Lichtquelle ist auf Gulio Cesare Aranzi zurückzuführen. Der Venezianer verwendete die camera obscura zur Besichtigung der Nasenhöhle (1587), indem er den Lichtstrahl bündelte [Gorden 1993]. 1805 entwickelte Phillipe Bozzini den nach ihm benannten Lichtleiter, mit dem er Harnblase und Rektum mittels einer extrakorporal durch Reflexion eingebrachten Lichtquelle untersuchen konnte [Berci 1994]. Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der endoskopischen Chirurgie stellte 1865 das von Antonin J. Desormeaux entwickelte Endoskop dar. Bei diesem Instrument wurde das Licht erstmals aus einem System von Linsen gebündelt und an den Ort des Geschehens gebracht [Desormeaux 1867] (Abb. 1). Desormeaux gilt damit als der „Vater der Endoskopie“.

Abbildung 1 Vom Desormeaux Endoskop zum modernen OP-Saal

Abbildung mit freundlicher Genehmigung vom Archiv der Österreichischen Gesellschaft für Urologie, Wien & Musée de l'Histoire de la Médecine, Université René Descartes, Paris sowie der Firma KarlStorz Endoskope, Tuttlingen GmbH, Deutschland



1901 führte der Dresdner Chirurg Georg Kelling als Erster eine diagnostische Laparoskopie [aus dem Griechischen Lapara <Weichteile des Körpers > und skopein <anschauen>], und zwar bei einem Hund durch [Kelling 1901] (Tab. 1). Eine Dekade später erfolgten durch den schwedischen Internisten Hans Christian Jacobaeus die ersten diagnostischen Endoskopien von Bauchhöhle und Thorax („Laparothorakoskopien“) beim Menschen, allerdings noch ohne Verwendung eines Pneumoperitoneums [Jacobaeus 1911]. Jacobaeus publizierte bereits 1911 über seine ersten 115 Fälle [Jacobaeus 1911]. Otto Goetze entwickelte 1918 die Insufflationsnadel und ein automatisches Insufflationsgerät [Goetze 1921]. Das Pneumoperitoneum wurde zunächst mit Luft durchgeführt bis der Schweizer Gynäkologe Richard Zollikofer 1924 erstmals Kohlendioxid verwendete [Zollikofer 1924]. Damit war auch die gefahrlose Anwendung von Hochfrequenzstrom ermöglicht worden. In Deutschland etablierte in der Folgezeit der Berliner Internist Heinz Kalk die Laparoskopie als festen Bestandteil der Diagnostik [Kalk 1951]. Er begründete die deutsche Schule der Laparoskopie. Einen Wendepunkt stellte 1933 die erste laparoskopische Bridenlösung durch den französischen Gynäkologen Carl Fervers dar [Fervers 1933]. Mit diesem Eingriff begann die Ära der operativen Laparoskopie. Von den Chirurgen zunächst abgelehnt, waren es aber zunächst die Gynäkologen, die die operativen Möglichkeiten der Laparoskopie erkannten und in der Folgezeit konsequent nutzten. So war es in den 70er und 80er Jahren der Kieler Gynäkologe Kurt Semm, der bedeutende technische Erneuerungen in der Laparoskopie einführte. Neben der Erfindung eines automatischen Insufflators mit Monitoring des Gasflusses und des intraabdominellen Druckes entwickelte er u.a. die bipolare Koagulationszange, das Elektrohäkchen sowie Instrumente für die Durchführung von intrakorporalen Knoten [Semm 1978]. Semm führte schließlich 1982 auch die erste laparoskopische Appendektomie durch [Semm 1983], was ihm zunächst schwere Anfeindungen seitens der deutschen chirurgischen Gesellschaft einbrachte. 1985 erfolgte

durch den deutschen Chirurgen Erich Mühe die erste laparoskopische Cholecystektomie [Mühe 1986].

Mit der Entwicklung der Computer-Chip gesteuerten Kamera kam es 1986 schließlich zum Durchbruch der laparoskopischen Chirurgie [Filipi 1991]. Philippe Mouret aus Lyon führte 1987 die erste video-assistierte laparoskopische Cholecystektomie durch [Mouret 1991]. Die laparoskopische Cholecystektomie wurde dann von den französischen Chirurgen Francois Dubois und Jacques Périssat standardisiert und perfektioniert [Cuschieri 1992]. Die erfolgreiche Durchführung der laparoskopischen Cholecystektomie stellte einen bedeutenden Stimulus für die Weiterentwicklung der laparoskopischen Chirurgie dar. Innerhalb kürzester Zeit wurden nun weltweit die verschiedensten Eingriffe laparoskopisch durchgeführt. Inzwischen gibt es aus technischer Sicht kaum noch Grenzen für das laparoskopische Operieren. Die laparoskopische Hernioplastik und Appendektomie gehören heute ebenso zu den Standardverfahren wie Eingriffe am Magen, Kolon und Rektum [Bruch 2005, Pugliese 2006, Bittner 2007].

Gelöscht: u.a.

Tabelle 1 Geschichte der laparoskopischen Chirurgie

Zeit	Person	Entwicklung
1587	Aranzi	Camera obscura als erste endoskopische Lichtquelle
1804	Bozzini	Lichtleiter von Bozzini „zur Erleuchtung innerer Höhlen“. Als Lichtquelle wird eine Kerze verwendet
1855	Desormeaux	„Vater der Endoskopie“ Bündelung der Lichtstrahlen durch Sammellinsen.
1876	Nitze	Erstes Endoskop (Zystoskop) mit integrierter Lichtquelle.
1901	Georg Kelling	Erstbeschreibung eines Insufflationsgerätes und Durchführung der ersten Laparoskopie mit Pneumoperitoneum
1901 1911	Jacobaeus	Laparoskopie ohne Luftinsufflation Laparothorakoskopie ohne Luftinsufflation
1911	Bernheim	Erste Laparoskopie in den USA. Diskussion der diagnostischen Laparoskopie statt Laparotomie bei Verdacht auf Metastasen
1918	Götze	Herstellung der Insufflationsnadel und des Insufflators
1924	Zollikofer	Verwendung von CO ₂
1933	Fervers	Laparoskopische Bridenlösung, Beginn der chirurgischen Laparoskopie
1913	Kalk	Begründer der deutschen Schule der Laparoskopie, Einführung der 45°/50° Optik, hepatobiliäre Laparoskopie, Bericht über 2000 Leberpunktionen
1936	Boesch	Laparoskopische Tubensterilisation
1952	Hopkins	Stablinsen Systems für die Optiken
1963	Semm	Begründer der Kieler Laparoskopie Schule, Entwicklung eines automatischen Insufflationsgerätes
1971	Semm	Laparoskopische Tubensterilisation mit bipolarem Strom, in der Folge Durchführung einer Vielzahl gynäkologischer Operationen
1978	Semm	Herstellung eines Endoloop-Systems, Perfektionierung laparoskopischer intra- und extrakorporaler Knotentechniken
1981	Semm	laparoskopische Appendektomie
1985	Mühe	laparoskopische Cholecystektomie mittels Rektoskop
Ab 1986		Entwicklung der Videolaparoskopie
1987	Mouret, Dubois	Laparoskopische Cholecystektomie mit mehreren Trokaren
1991	Dallemagne	Laparoskopische Fundoplikatio
1991	Delaitre	Laparoskopische Splenektomie
1991	Cooperman	Laparoskopische Kolonresektion
1992	Goh	Laparoskopische Magenteilresektion
1992	Gagner	Laparoskopische Leberteileresektion
1994	Gagner	Laparoskopische Duodenopankreatektomie

Die immer wieder auftretende Frage nach der Sinnhaftigkeit der laparoskopischen Operationen, insbesondere bei komplexen Oberbaucheingriffen, wie z.B. der Leberchirurgie, regt dabei zu wissenschaftlicher Evaluierung an. So wurde mit Beginn der 90er Jahre folgerichtig die laparoskopische Chirurgie in zunehmender Intensivität experimentell begleitet [Allendorf 1999, Gutt 2001, 2003, Leister 2004, Junghans 2006]. In einer Vielzahl von Studien wurde der Einfluss des Pneumoperitoneums auf das kardiovaskuläre und respiratorische System ebenso wie die Auswirkungen der laparoskopischen Chirurgie auf das Immunsystem und das Tumorstadium untersucht [Müller 1999, Jacobi 2001, 2002, Carter 2001, Sylla 2005, Kuhry 2004].

Gelöscht: Die laparoskopische Chirurgie wurde ab

Gelöscht: wissenschaftlich

Gelöscht: Einfluss auf

2. Stand der klinischen laparoskopischen Leberchirurgie

Die Leberchirurgie stellte für lange Zeit eine der letzten Barrieren für die laparoskopische Chirurgie dar. Dies lag einerseits an der chirurgisch technischen Herausforderung, andererseits bestanden auch generelle Zweifel an der onkologischen Sicherheit bei der laparoskopischen Resektion maligner Tumoren, die den Großteil der Indikation zur Leberresektion ausmachen [Gutt 2001, Zmora 2001, Curet 2004]. Bereits 1991 wurde die erste komplexere Leberteilresektion bei einer 6 cm großen fokal nodulären Hyperplasie durchgeführt [Gagner 1992]. Die erste laparoskopische anatomische linkslaterale Leberteilresektion (Segmente II, III) erfolgte jedoch erst 1996 bei einem Patienten mit einem benignem Adenom [Azagra 1996]. In der Folgezeit wurden über 700 laparoskopische Leberteilresektionen publiziert, darunter auch anatomische Hemihepatektomien und Trisektorektomien [Gagner 2004, Gumbs 2008] (Tab. 2). Etwa 30% der laparoskopischen Lebereingriffe erfolgen heute bei malignen Tumoren [Gagner 2004]. Aufgrund des geringeren Gewebetraumas wird die laparoskopische Methode auch bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion (z.B. Leberzirrhose oder Fettleber) als therapeutische Option diskutiert [Abdel-Atty 1999, Belli 2004, 2007]. 2002 wurde schließlich die erste laparoskopische

Donorhepatektomie im Rahmen einer Leberlebendspende Transplantation durchgeführt
[Cherqui 2002].

Tabelle 2 Literaturübersicht laparoskopische Leberteilresektion

Autor/ Jahr	n	Benigne/ Maligne	Op-Dauer (Min.)	BV (ml)	Mortalität (%)	KA (d)	Anteil LC (%)
Rau 1998	17	10/7	183	457	0	7,8	ND
Huscher 1998	38	6/32	189	380	2,6	10	ND
Cherqui 2000	30	12/18	214	300	0	9,6	26,7
Shimada 2001	17	0/17	325	400	0	12	100
Gigot 2002	37	0/37	k.A.	k.A.	k.A.	7	24,3
Farges 2002	21	0/21	177	218	0	5,1	0
Lesurtel 2003	18	12/6	202	236	0	5,2	27,8
Morino 2003	30	16/14	148	320	0	6,4	10
Descottes 2003	87	0/87	k.A.	k.A.	0	5	k.A.
Buell 2005	100	65/35	132	k.A.	1	3	k.A.
Mala 2005	53	7/46	187	700	0	3,5	k.A.
Kaneko 2005	30	0/30	182	350	0	14,9	100
Dulucq 2005	32	13/18	115	210	0	11	6,5
Borzellino 2006	16	11/5	120	150	0	4	0
Cherqui 2006	27	0/27	240	ND	0	15,2	100
Vibert 2006	89	24/75	360*/180**	-	0	k.A.	18
Dagher 2008	32	0/32	231	461	0	7,1	69
Koffron 2007	300	197/103	99	102	0	1,9	8,3
Lee 2007	25	0/27	220	100	0	4	100
Belli 2007	23	0/23	148	260	0		100
Cai 2007	29	29/0	k.A.	k.A.	0	8,8	100

BV: Blutverlust, k.A: keine Angaben, LC: Leberzirrhose

Zehn Jahre nach Durchführung der ersten laparoskopischen Leberteileresektion lässt sich heute konstatieren, dass die laparoskopische Leberchirurgie zumindest technisch chirurgisch sicher durchzuführen ist.

Der Einfluss des Pneumoperitoneums auf die hepatozelluläre Schädigung, die postoperative Leberfunktion und die Leberregeneration ist bis heute nicht ausreichend untersucht, so dass eine abschließende Bewertung des Verfahrens, gerade auch im Hinblick auf eine mögliche Ausweitung des Indikationsspektrums auf die Leberlebendspende, bislang noch nicht möglich ist.

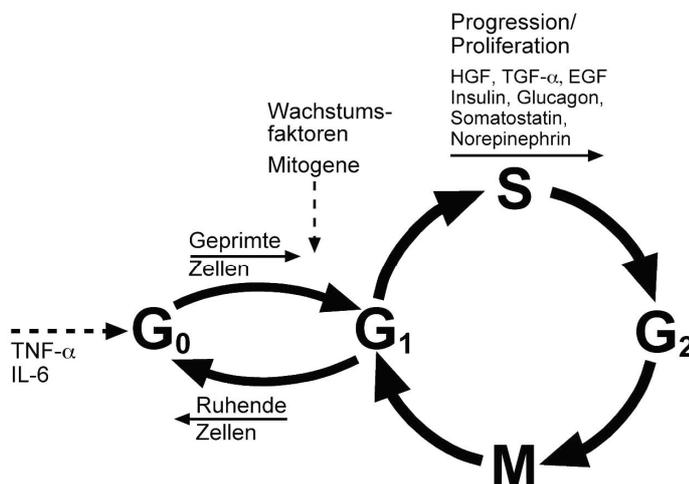
3. Partielle Hepatektomie und Leberregeneration

Die Leberteileresektion stellt die einzige potentiell kurative Therapie für viele primäre und metastasierte Tumore der Leber und des Gallengangsystems dar. Bei Patienten mit gesunder Restleber ist eine 75-80%ige Resektion des Leberparenchyms, ohne dass ein Leberversagen auftritt, möglich [Markus 2000]. Das liegt an der außerordentlich hohen Regenerationsfähigkeit der Leber, die bereits in der Sage des Prometheus in der griechischen Mythologie beschrieben wurde [Irmscher 1999]. Higgins und Anderson bewiesen im Rattenmodell als erste die Regenerationskapazität der Leber nach 70%iger Hepatektomie [Higgins & Anderson 1931]. Während beim Nagetier der Regenerationsprozess nach 7-10 Tagen abgeschlossen ist, dauert es beim Menschen etwa 6 Monate bis das ursprüngliche Lebervolumen wieder erreicht wird [Gove 1991, Nagasuse 1987]. Als Antwort auf eine Leberschädigung, wie sie zum Beispiel die partielle Hepatektomie darstellt, kommt es über eine Genaktivierung zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu einer kompensatorischen Zell-Hyperplasie von bereits existierenden Hepatozyten und Nichtparenchymzellen. Darüber hinaus wird bei Zuständen, in denen die Proliferationsantwort eingeschränkt ist (z.B. nach chemisch toxischer Leberzellschädigung durch Galactosamine, massiver Leberzellnekrose oder chronischen Lebererkrankungen wie der Primär Biliären

Zirrhose) ein weiteres Zellkompartiment („oval cell compartment“) aktiviert. Diese Zellen sind Vorläuferzellen und können sich in Hepatozyten oder Gallengangsepithelzellen ausdifferenzieren [Fausto 1990].

Hepatozyten teilen sich nur sehr selten. Die Zellen befinden sich im Normalzustand in der Ruhephase (G₀-Phase). Beim gesunden Erwachsenen befindet sich zu einem bestimmten Zeitpunkt nur eine von 1000 Zellen im Zustand der Mitose [Diehl 1996]. Nach einer Leberteilresektion treten 95% der Hepatozyten simultan von der G₀- in die G₁-Phase des Zellzyklus (Abb. 2).

Abbildung 2 Mechanismus der Hepatozytenregeneration



Für den Übertritt der ruhenden Hepatozyten in die präreplikative Phase sind sog. „Priming-Faktoren“ notwendig. Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) zählen zu den wichtigsten Initiatoren der Hepatozyten Proliferation [Cressman 1996, Greenbaum 1998]. Im Rahmen des Priming kommt es zu einer Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber verschiedenen Wachstumsfaktoren wie hepatocyte growth factor (HGF) , epidermal growth factor (EGF), TNF- α und transforming growth factor- α (TGF- α). Das Priming-Stadium ist

ein reversibler Prozess. Nur die weitere Stimulation der Hepatozyten durch Mitogene (Substanzen, die in vitro Hepatozyten zur DNA-Synthese stimulieren) und Co-Mitogene (Substanzen, welche in vitro die Mitogen induzierte Wirkung der DNA-Synthese verstärken) sorgt dafür, dass die Hepatozyten nicht wieder zurück in den Ruhezustand gelangen [Fausto 2000]. Über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kommt es zur Expression von Cyclin D1 und Cyclin E [Fausto 2001]. Ab diesem Zeitpunkt (sog. G1 restriction point) ist die Zelle in der Lage, unabhängig von Wachstumsfaktoren, die DNS Replikation (S-Phase) durchzuführen und den Zellzyklus mit Eintritt in die Mitose zu vollenden [Albrecht 1999]. Bei der Ratte erfolgt der Übertritt der Hepatozyten in die S-Phase etwa 12-15 h nach Leberteileresektion. Weitere 6 bis 8 h später erfolgt die Mitose [Kountouras 2001, Court 2002]. Im Tiermodell der Ratte verdoppelt sich das verbleibende Lebervolumen in etwa 48 h [Court 2002]. 7 bis 10 Tage nach einer 2/3-Resektion ist der Regenerationsprozess der Rattenleber abgeschlossen [Court 2002, Higgins & Anderson 1931]. Die Regenerationsprozesse verlaufen kontrolliert und stoppen, sobald das Leberausgangsvolumen $\pm 15\%$ erreicht ist. Die Kontrolle der sich regenerierenden Leberzellen wird dabei durch ein balanciertes Verhältnis von stimulierenden und inhibitorischen Faktoren gewährleistet. Zu den wichtigsten stimulierenden Faktoren gehören HGF, EGF, TGF- α , TNF- α sowie Insulin, Noradrenalin und Trijodthyronin [Courts 2002 Fausto 2001, Steer 1995]. Zu den inhibitorischen Faktoren gehören transforming growth factor- β (TGF- β), Interleukin-1 β (IL-1 β) sowie hepatic proliferation factor (HPI).

4. Partielle Hepatektomie und Leberregeneration bei der Fettleber

Die Steatosis hepatis (Fettleber) ist in der westlichen Welt ein weit verbreitetes Krankheitsbild mit einer Prävalenz zwischen 6% und 20% in der Normalbevölkerung [Clark 2006, Kowdley KV 2006]. Unter den Patienten, bei denen aus unterschiedlichsten Gründen

die Indikation zur Leberteilektomie gestellt wird, liegt die Prävalenz der Fettleber sogar bei 20-26% [Selzner 2001]. Bei adipösen Patienten mit einem Body mass index zwischen 30 kg/m² und 40 kg/m² wird die Prävalenz der Fettleber zwischen 60% und 74% und bei der morbidem Adipositas sogar über 90% angegeben [Sanyal 2002]. Neben Alkoholabusus sind Adipositas und Typ II Diabetes mellitus die Haupterkrankungen, bei denen es über eine Insulin-Resistenz und Lipase-Inhibition zur Akkumulation von freien Fettsäuren in der Leber kommt [Kooby 2003]. Das Risiko, dass sich aus einer Fettleber eine Leberfibrose entwickelt liegt zwischen 15% und 40%; bei 10% bis 30% der Patienten kommt es sogar zum Parenchyumbau bis hin zur Leberzirrhose [Neuschwander-Tetri 2001, Veteläinen 2007] mit dem Risiko der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms [Regimbeau 2004].

Patienten mit Steatosis hepatis haben ein erhöhtes Risiko, nach Leberteilektomie postoperative Infektionen (Wundabszeß, intraabdomineller Abszeß) zu entwickeln [Kooby 2003]. Postoperative Leberfunktionsstörungen bis hin zum Organversagen sind bei Patienten mit Fettleber deutlich erhöht [Behrns 1998]. In der Lebertransplantationschirurgie weisen Organe mit einem Fettgehalt von mehr als 30% eine erhöhte Inzidenz der initialen Nichtfunktion auf [Todo 1999, Selzner 2001]. Als Ursache der erhöhten Infektionsinzidenz wird die reduzierte Phagozytoseaktivität der Kupfferschen Sternzellen mit konsekutiver Beeinträchtigung der zellulären Immunabwehr diskutiert [Yang 1997, Diehl 2000]. Typischerweise tritt die Organdysfunktion nach initial unkomplizierten postoperativen Verlauf zwischen dem 3. und 7. postoperativen Tag auf [Selzner 2001]. Die verzögerte postoperative Organdysfunktion könnte ein Hinweis auf eine reduzierte Regenerationsfähigkeit der Fettleber sein [Selzner 2001]. Bei der Zucker Ratte konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Leberregeneration bei Tieren mit Fettleber im Gegensatz zu Tieren ohne Fettleber signifikant reduziert ist [Selzner 2000]. Selzner et al.

konnten nachweisen, dass die Regeneration bei verfetteten Hepatozyten auf einer Blockade vor und nach Eintritt in die G1-Phase basiert [Selzner 2000].

5. Pneumoperitoneum und Ischämie/Reperfusionsschädigung

Durch den erhöhten intraabdominellen Druck im Rahmen des Pneumoperitoneums kommt es zu einer signifikanten Beeinträchtigung der intestinalen, renalen und hepatischen Perfusion (Tab. 3).

Tabelle 3 Einfluß des Pneumoperitoneums auf die Leberperfusion

Autor/Jahr	Modell	Methode	IAP	Totale Leber-perfusion	Portale Perfusion
Rasmussen 1995	Schwein	US	k.A.	-34%	-34%
Junghans 1997	Schwein	US	8* 12* 16*	-8% -5% -6%	-6% -3% -4%
Jakimowicz 1998	Human	US	7 14	k.A.	-37% -53%
Klopfenstein 1998	Schwein	US	15*	=	=
Gutt 1999	Ratte	US	2 4 6 12	k.A.	-22,3% -35,3% -48,4% -84,4%
Richter 2001	Ratte	US	18	-51%	-50%
Tsuboi 2002	Ratte Zirrhose Gesund	Mikrosphären	8	-29% -8.1%	-40% -30%
Yokoyama 2002	Ratte	Mikrosphären	20	k.A	57,9%

* Horizontale Position, US: Ultraschall, IAP: intraabdomineller Druck, =: unverändert

Durch die daraus resultierende Ischämie sowie die nach Desufflation wieder einsetzende Reperfusion kommt es zu einer Ischämie/Reperfusionsschädigung mit Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen, Lipidperoxidation und Organfunktionsstörungen [Glantzounis 2001, Eleftheriadis 1998, Seven 1999]. Die Ischämie/Reperfusionsschädigung stellt ein komplexes und multifaktorielles Geschehen dar [Kim 2003, Teoh 2003, Bilzer 2000, Glanemann 2004].

Zunächst kommt es im Rahmen der Gewebehypoxie zu einem mitochondrialen ATP-Verlust mit konsekutivem Aktivitätsverlust der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, die wiederum einen intrazellulären Einstrom von Na^+ und Ca^{++} zur Folge hat, was zur Zellschwellung, Zerstörung des Zytoskeletts und - je nach Dauer der Ischämie - zum irreversiblen Zelltod führt [Lemasters 1983]. Darüber spielt die Partizipation von freien Sauerstoffradikalen eine entscheidende Rolle für die Zellschädigung. Während der Ischämie kommt es bereits durch den ATP Verlust zur Akkumulation von Hypoxanthin und Konvertierung der Xanthindehydrogenase in die Xanthinoxidase [Arii 2003]. Die Reperfusion führt über die direkte Schädigung der sinusoidalen Endothelzellen, die gesteigerte Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion am Endothel sowie die Leukozytensequestration zu einer Gewebeschädigung der Leber [Clavien 1998, Lentsch 2000]. Bei der Reperfusionsschädigung kommt der Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen in der Leber eine entscheidende Rolle zu. Die aktivierten Kupfferschen Sternzellen produzieren freie Sauerstoffradikale und induzieren die Ausschüttung von Zytokinen [Mueller 1996, Bilzer 2000]. Beides führt zur Akkumulation von sinusoidalen Granulozyten, Expression von Adhäsionsmolekülen und einer erhöhten Leukozytenadhärenz an vaskulären Endothelzellen [Lentsch 2000]. Durch die sinusoidale Akkumulation von Granulozyten werden weitere hepatotoxische Sauerstoffradikale freigesetzt [Lentsch 2000]. Durch direkte Schädigung der Endothelzellen und inflammatorisch bedingte Vasokonstriktion kommt es zur hepatischen Mikrozirkulationsstörung mit Ausbildung von ischämischen Infarktzone[n]en [Martinez-Mier 2000].

Die im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschädigung auftretende oxidative Schädigung ist besonders stark ausgeprägt bei Verwendung von CO_2 - dem in der laparoskopischen Chirurgie am häufigsten verwendeten Gas [Yilmaz 2004]. In verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die oxidativen Stress Effekte, wie

Lipidperoxidation, nach CO₂-Pneumoperitoneum nicht nur im Serum, sondern auch innerhalb der Darmmukosa, Leber, Milz, Peritoneum und Lunge nachzuweisen sind [Pross 2000, Eleftheriadis 1998, Cevrioglu 2004]. Die Beeinträchtigung der Leberperfusion durch das Pneumoperitoneum führt zu einer passageren Leberzellschädigung mit Beeinträchtigung der Leberfunktion einhergehend mit einem Anstieg der Transaminasen AST und ALT, einer Bilirubinerhöhung und einer verlängerten Prothrombinzeit [Tan 2003, Glantzounis 2001, Morino 1998]. In den klinischen Studien von Morino et al. und Tan et al., bei denen Patienten mit normaler Leberfunktion laparoskopisch operiert wurden, hatten die laborchemischen Alterationen keinen negativen Effekt auf den postoperativen Verlauf [Morino 1998, Tan 2003]. Die erhöhten Transaminasen normalisierten sich zwischen dem 4. und 7. postoperativen Tag. Schemmer et al. konnten im Rattenmodell nachweisen, dass auch die Mikrozirkulation der Leber unmittelbar nach dem Pneumoperitoneum im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant reduziert war [Schemmer 2005]. In weiteren Rattenmodellen konnte gezeigt werden, dass es durch den Ischämie/Reperfusionsschaden im Rahmen des Pneumoperitoneums zu einem Anstieg der inflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) im Lebergewebe kommt [Vittimberga 2000, Altindis 2004]. Bei Patienten mit normaler Leberfunktion und nicht vorgeschädigter Leber scheint ein vorübergehendes Pneumoperitoneum jedoch in der Regel gut toleriert zu werden. Unklar ist, ob das Pneumoperitoneum für Patienten mit vorgeschädigter Leber ein Risiko darstellt.

6. Ischämie/Reperfusionsschaden bei der Fettleber

Verfettete Hepatozyten haben eine reduzierte Toleranz gegenüber einer temporären Ischämie [Selzner 2000]. Zu den Ursachen der verminderten Ischämie Toleranz gehören u.a. eine Störung des Energiestoffwechsels der verfetteten Hepatozyten [Fukumori 1997], eine Mikrozirkulationsstörung, die durch Zellschwellung und erhöhte sinusoidale Leukozyten- und Thrombozytenadherenz hervorgerufen wird [Teramoto 1993, Selzner 2000, Sun 2001] sowie

eine Störung der Gluconeogenese und des Fettstoffwechsels [Teramoto 1993]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei Fettlebern im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschadens die Apoptose als Weg des Zelltodes zugunsten der Nekrose in den Hintergrund gedrängt wird [Selzner 2000].

7. Pneumoperitoneum und Leberregeneration

Die Ausweitung der laparoskopischen Technik auf die Leberchirurgie lässt die Frage aufkommen, ob neben den ungünstigen Wirkungen auf die Leberperfusion nicht auch die Leberregeneration durch das Pneumoperitoneum negativ beeinflusst wird. Hierüber gibt es derzeit nur zwei experimentelle Untersuchungen am Rattenmodell, die eine Hemmung der postoperativen Leberregeneration nach partieller Leberteilresektion mit vorangegangenem CO₂-Pneumoperitoneum feststellten [Kaya 2002, Yagmurdu 2004]. Die Leberresektion im Modell von Kaya et al. erfolgte nach 24 stündigem CO₂-Pneumoperitoneum mit einem intraabdominellen Druck von 12-14 mm Hg. Diese extrem lange Dauer des Pneumoperitoneums ist jedoch als Modell für die klinische Situation einer laparoskopischen Leberteilresektion ungeeignet. In der Studie von Yagmurdu et al. (60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum mit 15 mm Hg) wurde eine Suppression der auf die Leberregeneration am postoperativen Tag 5 festgestellt. Da das Maximum an mitotischer Aktivität aber bereits 22 h-24 h nach einer Leberschädigung auftritt, sind frühere Messzeitpunkte notwendig, um die Auswirkung des Pneumoperitoneums auf den Zellzyklus zu untersuchen.

B Fragestellung

Um den Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die postoperative Leberregeneration zu untersuchen, verwendeten wir in modifizierter Form das etablierte Modell der 70%igen Leberteilesektion nach Higgins und Anderson [Higgins & Anderson 1931]. Die Untersuchungen wurden sowohl bei Ratten mit gesunder als auch bei Ratten mit induzierter Fettleber durchgeführt. In einem Vorversuch sollte zunächst geklärt werden, ob das alleinige CO₂-Pneumoperitoneum bei der gesunden und bei der Fettleber zu einer Leberzellschädigung führt. Sollte dies der Fall sein, sollten im Hauptversuch folgende Fragestellungen weiter untersucht werden:

Gelöscht: n

1. Weist die Fettleber nach Leberteilesektion im Vergleich zur gesunden Leber ein verändertes postoperatives Regenerationsverhalten auf?

2. Hat das CO₂-Pneumoperitoneum auf die postoperative Leberregeneration der gesunden Leber einen Einfluss?

3. Hat das CO₂-Pneumoperitoneum auf die postoperative Leberregeneration der induzierten Fettleber einen Einfluss?

C Material und Methoden

1. Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuche wurden durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin unter der Nummer G0127/05 genehmigt. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Charité Campus Virchow Klinikum, Universitätsmedizin Berlin. Nach einer Akklimatisierungsphase von einer Woche mit einer Tag-Nacht Zeitschaltung von 12 Stunden wurden für den Versuch männliche Wistar-Ratten bzw. Lewis-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 220g und 250g verwendet. Die Wistar-Ratten hatten freien Zugang zu Standardfutter, den Lewis-Ratten wurde freier Zugang zu ihrer spezifischen Diät ermöglicht. Beide Stämme erhielten Trinkwasser ad libitum.

2. Induktion der Fettleber

Die Tiere erhielten zur Induktion einer Fettleber über 5 Tage ad libitum ausschließlich eine „Choline Deficient and Iron Supplemented L-Amino Acid Defined Rat Diet“ (Dyets Number 518753, Lot Number 5125-12, Dyets inc., Bethlem, PA, USA) in Puderform (mit freiem Zugang zu Wasser), die als gängige Diät zur Induktion einer Fettleber beschrieben wird [Caraceni 2004]. Nach 5 Tagen entwickelten die Tiere eine ca. 60-70%ige Hepatosteatois.

Tabelle 4 Zusammensetzung der Diät zur Induktion der Fettleber

Inhaltsstoffe	g/kg	Inhaltsstoffe	g/kg
L-Arginine	12.70	L-Alanine	5.10
L-Histidine	3.40	L-Aspartic Acid	15.80
L-Lysine HCl	9.10	L-Serine	7.20
L-Tyrosine	5.70	Total L-Amino Acid	143.70
L-Tryptophan	1.80	Cornstarch	100.00
L-Phenylalanine	7.30	Dextrin	100.00
L-Methionine	1.70	Cellulose (microcrystalline)	50.00
L-Cystine	3.70	Sucrose	406.67
L-Threonine	4.60	Sodium Bicarbonate	4.30
L-Leucine	10.50	Corn Oil	50.00
L-Isoleucine	6.10	Primex	100.00
L-Valine	6.30	Salt Mix (no Iron added)	35.00
Glycine	6.20	Vitamin Mix	10.00
L-Proline	7.60	Ferric Citrate, U.S.P.	0.33
L-Glutamic Acid	28.90		

3. Versuchsplanung

3.1. Vorversuch

Im Vorversuch wurden Tiere mit gesunder und Tiere mit Fettleber einer 60 minütigen alleinigen Inhalationsnarkose bzw. einer 60 minütigen Inhalationsnarkose mit Anlage eines CO₂-Pneumoperitoneums unterzogen. Die Tiere, die der Inhalationsnarkose unterzogen wurden, erhielten eine kleine Stichinzision, um ein analoges Bauchdeckentrauma hervorzurufen.

Tabelle 5 Gesunde Tiere, 60 Minuten Narkose

Gruppe	-d5	-d4	-d3	-d2	-d1	OP	Tötungszeitpunkt	n
1.1.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose	6h	6
1.2.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose	12h	6
1.3.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose	24h	6

Tabelle 6 Tiere mit induzierter Fettleber, 60 Minuten Narkose

Gruppe	-d5	-d4	-d3	-d2	-d1	OP	Tötungszeitpunkt	n
2.1.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose	6h	6
2.2.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose	12h	6
2.3.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose	24h	6

Tabelle 7 Gesunde Ratten, Narkose und 60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum

Gruppe	-d5	-d4	-d3	-d2	-d1	OP	Tötungszeitpunkt	n
3.1.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mmHg	6h	6
3.2.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mmHg	12h	6
3.3.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mmHg	24h	6

Tabelle 8 Tiere mit induzierter Fettleber, Narkose und 60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum

Gruppe	-d5	-d4	-d3	-d2	-d1	OP	Tötungszeitpunkt	n
4.1	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60. min. Narkose +PCO ₂ 8 mmHg	6h	6
4.2.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mmHg	12h	6
4.3.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mmHg	24h	6

3.2. Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden Tiere mit gesunder und Tiere mit induzierter Fettleber einer 60 minütigen alleinigen Inhalationsnarkose bzw. einer 60 minütigen Inhalationsnarkose mit Anlage eines CO₂-Pneumoperitoneums unterzogen. Im Anschluss erfolgte bei allen Tieren eine konventionelle 70%ige Leberteilesektion.

Tabelle 9 Gesunde Tiere, 60 Minuten Narkose und 70%iger Leberteileresektion

Gruppe	-d5	-d4	-d3	-d2	-d1	OP	Tötungszeitpunkt	n
5.1.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	12h	6
5.2.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	1d	6
5.3.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	2d	6
5.4.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	4d	6
5.5.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	7d	6

Tabelle 10 Gesunde Tiere, 60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum und 70%iger Leberteileresektion

Gruppe	-d5	-d4	-d3	-d2	-d1	OP	Tötungszeitpunkt	n
6.1.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg 70% Leberteileresektion	12h	6
6.2.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	1d	6
6.3.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	2d	6
6.4.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	4d	6
6.5.	-	-	-	-	-	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	7d	6

Tabelle 11 Tiere mit induzierter Fettleber, 60 Minuten Narkose und 70%iger Leberteileresektion

Gruppe	-d5	-d4	-d3	-d2	-d1	OP	Tötungszeitpunkt	n
7.1.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	12h	6
7.2.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	1d	6
7.3.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	2d	6
7.4.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	4d	6
7.5.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +70% Leberteileresektion	7d	6

Tabelle 12 Tiere mit induzierter Fettleber, 60 Minuten CO₂-Pneumoperitoneum

Gruppe	-d5	-d4	-d3	-d2	-d1	OP	Tötungszeitpunkt	n
8.1.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	12h	6
8.2.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	1d	6
8.3.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	2d	6
8.4.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	4d	6
8.5.	Diät	Diät	Diät	Diät	Diät	60 min. Narkose +PCO ₂ 8 mm Hg +70% Leberteileresektion	7d	6

4. Narkose und Operation

Operationsvorbereitung

Tabelle 13 Materialien/Geräte/Instrumente/Reagenzien

Narkosegerät	
Mikrochirurgische Operationsinstrumente	Aeskulap, Storz, Tuttlingen, D
Veress Nadel	Ethicon, Hamburg, D
Endoskopische Polypektomieschlinge	Storz, Tuttlingen, D
CO ₂ -Insufflator	Storz, Tuttlingen, D
HF-Strom-Generator	Storz, Tuttlingen, D
Neutralelektrode	Storz, Tuttlingen, D
Isofluran	Abbott GmbH, Wiesbaden, D
Vicryl 3-0	Ethicon, Norderstedt, D

Narkose und Operation

Die Narkoseeinleitung der Versuchstiere erfolgte in einem rundwandigen Gefäß mit einem Isofluran/Lachgas/Sauerstoff Gemisch. Anschließend wurden die Tiere gewogen. Das Fell wurde im Bereich des Mittelbauches geschoren. Die Tiere wurden für den operativen Eingriff in Rückenlagerung auf einem Korkbrett fixiert. Für die spätere Verwendung der Diathermieschlinge wurden die Tiere auf einer Neutralelektrode gelagert (Abb. 3).

Die Eingriffe wurden unter Inhalationsnarkose mit einem Isofluran/Lachgas/Sauerstoff Gemisch (1,5%-3% Isofluran, 0,5 l/min Sauerstoff) durchgeführt. Die Narkosetiefe wurde durch den Chirurgen anhand der Atemtiefe und -frequenz überwacht und reguliert.

Anlage des CO₂-Pneumoperitoneums

In der Linea alba wurde in der Mitte zwischen Xyphoid und Os pubis nach Inzision der Haut eine Veress-Nadel in das Abdomen eingebracht. Über diese erfolgte die Anlage des CO₂-Pneumoperitoneums mit einem intraabdominellen CO₂-Druck von 9 mmHg. Das

Pneumoperitoneum wurde mit einem speziellen automatisch gesteuerten Insufflator hergestellt und über 60 Minuten aufrecht erhalten. Unmittelbar nach dem Eingriff wurde den Tieren das Analgetikum Pentazocin (2-10 mg/kg KG) subcutan appliziert.

Abbildung 3 Anlage des CO₂-Pneumoperitoneums

Veress-Kanüle, Elektronischer CO₂-Insufflator, Hochfrequenz Chirurgiegerät, Neutralelektrode



Anatomie der Rattenleber

Die Rattenleber ist in 4 Lappen unterteilt [Waynforth 1980] (Abb.4). Dem medianen und links lateralen Lappen entsprechen etwa 70% des Gesamtlebergewebes. Der rechtslaterale Leberlappen (etwa 22%) liegt partiell über dem medianen Leberlappen (etwa 38%). Der Lobus caudatus (etwa 8%) ist zweigeteilt und umgibt den abdominalen Ösophagusanteil (Abb. 4A)

Technik der Leberteileresektion

Nach 60 minütiger Narkose bzw. direkt nach Desufflation des Pneumoperitoneums erfolgte eine mediane Laparotomie mit Durchtrennung der Haltebänder der Leber. Anschließend wurde die 70%ige Resektion Leberteileresektion in Anlehnung an die Methode von Higgins und Anderson durchgeführt (Abb. 4B) [Anderson & Higgins 1931]. Hierbei wurden der linkslaterale und der mediane Lappen reseziert. Anstelle der Ligatur der nahe dem den entsprechenden Leberlappen versorgenden Gefäß wurde eine Diathermieschlinge um den zu resezierenden Leberlappen platziert (Abb. 5-7). Die Leberteileresektion unter Belassung eines minimalen Parenchymrestes erfolgte durch das Zusammenziehen der Schlinge unter Anwendung von Strom [Krähenbühl 1998], so dass eine plane Resektionsfläche entstand (Abb. 8). Durch die Diathermie wurde unmittelbar die Blutstillung erreicht. Nach Kontrolle auf Bluttrockenheit wurde das Abdomen zweischichtig mit einer mit einer resorbierbaren, fortlaufenden Naht (Vycryl 3-0) verschlossen. Die postoperative Analgesie erfolgte wie unter 3.4.3. beschrieben. Unmittelbar postoperativ wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt. Nach dem Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere in Einzelkäfige gelegt, erhielten Futter ad libitum und hatten ungehinderten Zugang zu Wasser.

Abbildung 4 Schemazeichnung der Rattenleberanatomie vor (A) und nach (B) Leberteileresektion

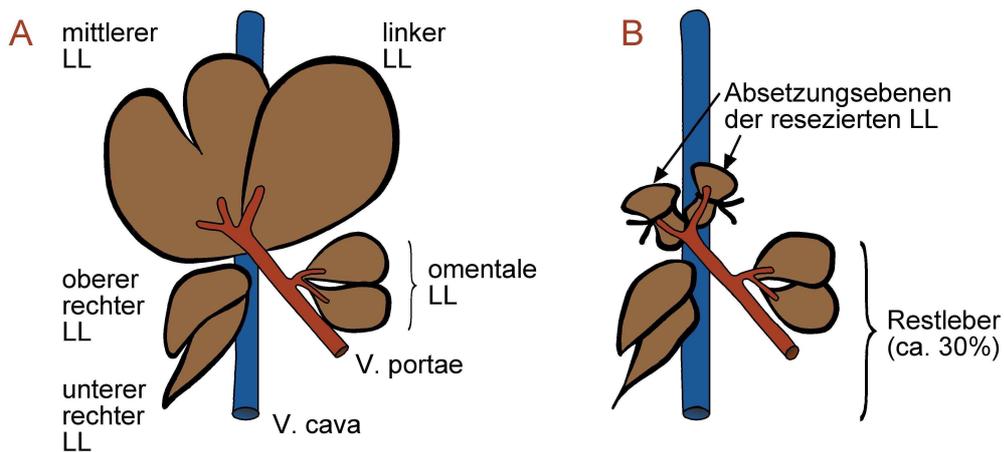


Abbildung 5 Endoskopische Polypektomieschlinge (Storz, Tuttlingen, D)



Abbildung 6 Vorbereitung der partiellen Hepatektomie
Die Schlinge wird um den linkslateralen Leberlappen gelegt.

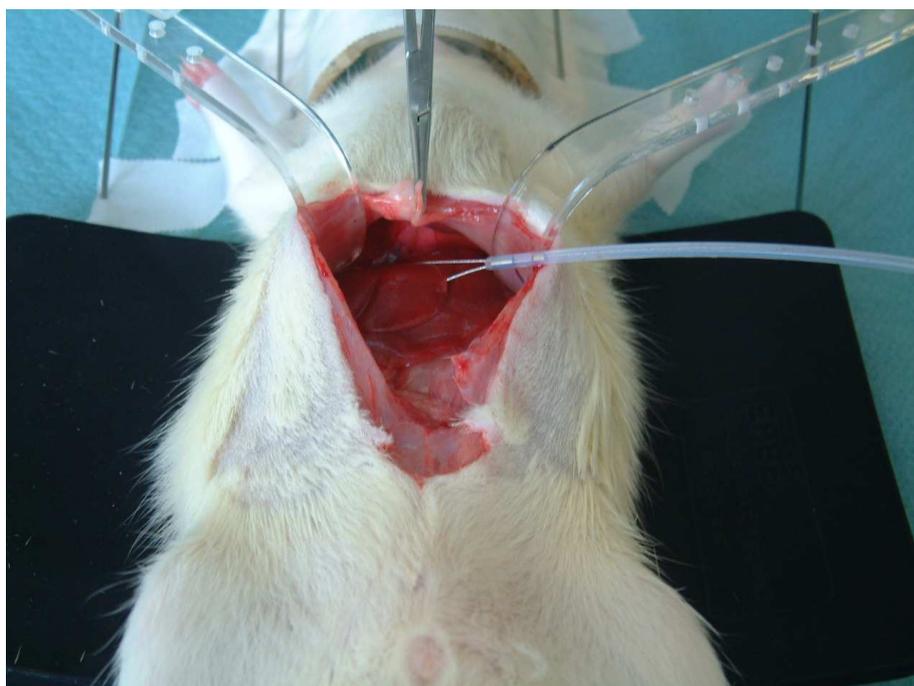


Abbildung 7 Durchführen der Resektion mit der Schlinge unter Stromapplikation

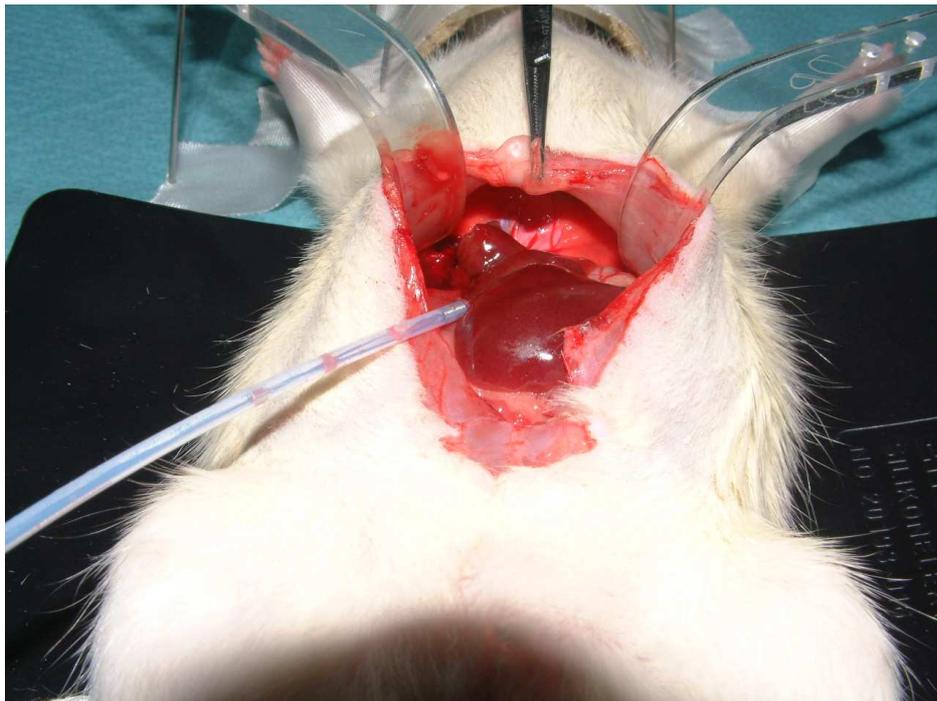
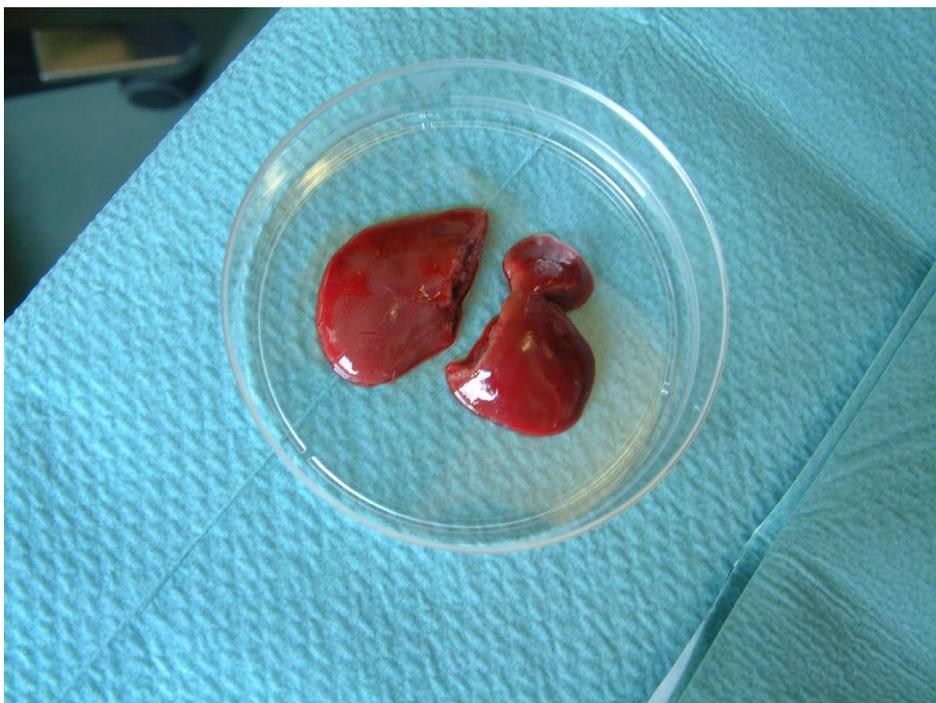


Abbildung 8 Mittlerer und linkslateraler Leberlappen mit planen Resektionsflächen



5. Tötung der Tiere und Probeentnahme

Zu den vorgesehenen Tötungszeitpunkten wurden die Tiere in Narkose durch Blutentzug mittels einer 24G Kanüle aus der infrarenalen Aorta getötet. Das hierbei gewonnene Blut wurde jeweils in ein Serum- und ein Heparinröhrchen überführt. Das Serum wurde unmittelbar nach der Blutentnahme für 10 Minuten mit 1500 Umdrehungen/Minute bei 4° C zentrifugiert, abpipettiert und bei -80°C bis zur weiteren Auswertung gelagert. Das Heparinröhrchen wurde zur sofortigen Bestimmung der Leberenzyme in das Zentrallabor gebracht.

Die Leber wurde nach ihrer Entnahme gewogen. Anschließend erfolgte die Fraktionierung des Lebergewebes. Das Gewebematerial für die Histologie wurde in 4%iger Formalin-Lösung gelagert. Für weitere Untersuchungen wurde das übrige Lebergewebe zunächst in Nalgeneröhrchen mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Auswertung bei -80°C gelagert.

5.1. Bestimmung der regenerierten Lebermasse

Die prozentuale Zunahme der regenerierten Lebermasse relativ zur Gesamtlebermasse vor der Resektion wurde für die postoperativen Tage 2 und 4 wie folgt errechnet [Selzner 2000]:

$\% = [C - (A - B)] / A * 100$. A = Lebergewicht zum Zeitpunkt der partiellen Hepatektomie, B = Gewicht des Leberresektats, C = Gewicht der regenerierten Leber zum Tötungszeitpunkt.

5.2. Biochemische und histologische Analysen

5.2.1. Leberenzyme

Um das Ausmaß der Leberzellschädigung zu messen, erfolgte im heparinisierten Serum der Versuchstiere die Bestimmung der Transaminasen Aspartat-Amino-Transferase (AST) und Alanin-Amino-Transferase (ALT) sowie der Enzyme Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) und Laktat-Dehydrogenase (LDH). Den Aminotransferasen ALT und AST kommt eine zentrale

Funktion im Aminosäurestoffwechsel zu, indem sie den Transfer von α -Aminogruppen der Aminosäuren Aspartat und Alanin auf α -Ketosäuren katalysieren [Giannini 2005]. Die ALT ist zu 70% im Zytosol lokalisiert während die AST dagegen zu 30% im Zytosol und zu 70% intramitochondrial lokalisiert ist. Die AST gilt als leberspezifisches Enzym und reagiert sensibler auf eine Leberzellschädigung. Die GLDH katalysiert die oxidative Desaminierung von Glutamat und befindet sich überwiegend in den Mitochondrien der Leberzellen. Die GLDH gilt als leberspezifisches Enzym. Die LDH ist ubiquitär im Zytosol lokalisiert und ist ein Marker für eine ischämische Schädigung. Die Untersuchungen wurden im Zentrallabor der Charité, Campus Virchow Klinikum, Universitätsmedizin Berlin mit den handelsüblichen Kits durchgeführt.

5.2.2. Histologische Färbungen

Hämatoxylin-Eosin (HE)- Färbung (Hepatozelluläre Schädigung, Mitose Index)

Die histomorphologische Beurteilung des Lebergewebes erfolgte durch die Hämatoxylin-Eosin- (HE-Färbung). Durch diese Übersichtsfärbung ist es möglich, das Ausmass der hepatozellulären Schädigung zu quantifizieren. Darüber hinaus kann mit der HE-Färbung sowohl die Anzahl der mitotischen Hepatozyten ausgezählt als auch die Intensität des inflammatorischen Infiltrates ermittelt werden.

Das Prinzip der HE-Färbung basiert auf der Oxidation des Hämatoxylins zu dem Farbstoff Hämatin, der im sauren Milieu mit Aluminiumionen einen positiv geladenen Komplex bildet. Die Metall-Hämatein-Komplexe binden an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren des Zellkerns, der dadurch im Präparat blau erscheint. Die Zytoplasmafärbung erfolgt mit dem sauren Farbstoff Eosin, der überwiegend an Proteine gebunden wird und das Zytoplasma rosa färbt.

Tabelle 14 HE-Färbung Materialien/Geräte

Kryostat Microtom HM 500 OM	Microm-Laborgeräte, Walldorf, D
Objektträger SuperFrost	R.Langensbrinck, Emmendingen, D
Microtom	Leica Microsystem, Nussloch, D
Schüttler	Heidolph, Kelheim, D

Tabelle 15 HE-Färbung Reagenzien

Aceton	J.T.Baker, 8002, Deventer, NL
Hematoxylin	Sigma, HHS-32, HT 110232, Stainheim, D
Eosin, wässrig (0,3%)	Sigma, HT-110-2-80, Deisenhofen, D
Ethanol	Herbeta 200-578-5
Essigsäure (99,8%)	Riedel de Haen, 33209, Seelze, D
Vitro-Clud Eindeckmedium	R.Langensbrinck, Emmendingen, D
Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems 020108926 Nussloch, D

5.2.3. Immunhistochemie

Durch immunhistochemische Färbungen können apoptotische (TUNEL Färbung) und proliferative Prozesse (Ki-67 Färbung) nachgewiesen und quantifiziert werden [Clavien 2000, Gerlach 1997]. Hierbei werden Antigene durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion und anschließende Farbstoffreaktion sichtbar gemacht. Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten nach der Labeled Streptavidin/Biotin (LSAB)- und nach der Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode. Die LSAB-Methode basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin zur Kopplung enzymmarkierten Avidins/Streptavidins an biotinylierte Sekundärantikörper. Bei der Durchführung der LSAB-Methode wird ein Primärantikörper, ein biotinylierter Brückenantikörper und das Peroxidase-konjugierte Streptavidin verwendet. Zur Sichtbarmachung benötigt man eine Substrat-Chromogenlösung.

An der Stelle des gesuchten Antigens entsteht ein Präzipitat. Die APAAP-Methode basiert auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das nachzuweisende Protein. An den spezifischen Antikörper bindet über einen sekundären Antikörper ein Komplex aus Alkalischer Phosphatase und Antikörper. Die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase wird über eine Farbreaktion nachgewiesen.

Tabelle 16 Immunhistochemie Materialien/Geräte

Kryostat Microtom HM 500 OM	Microm-Laborgeräte, Walldorf, D
Objektträger	Langenbrinck, 041300, Emmendingen, D
Mikrotom	Leica Microsystem, Nussloch, D

Tabelle 17 Immunhistochemie Reagenzien

Protein K Solution	30 µl
10x TdT Labeling Buffer	100 ml
10x TdT Stop Buffer	100 ml
TdT dNTP Mix	30 µl
TdT Enzyme	30 µl
Streptavidin-HRP	30 µl
DAB Solution	3,75 ml
Methyl Green Stain (0,1%)	50 ml
50x Co ²⁺ , 50x Mg ²⁺ , 50x Mn ²⁺	jeweils 30 µl
TACS- Nuclease	15 µl
TACS- Nuclease Buffer	1,5 ml
Aceton	J.T.Baker,8002, Deventer, NL
DAKO Pen	DAKO, S2002, Glostrup, Denmark
Biotin Blocking System	DAKO, X0590, Carpintiera, CA, USA
Peroxidase Blocking Reagent	DAKO, S2001, Carpintiera, CA, USA
Protein Block Serum-Free	DAKO, X909, Carpintiera, CA, USA
Liquid Dab + Substrate-Chromogen Solution	DAKO, K3467, Carpintiera, CA, USA
Peroxidase-Conjugated Streptavidin	DAKO, P0397, Carpintiera, CA, USA
Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen	DAKO, M7248, Carpintiera, CA, USA
Monoclonal Anti-Cyclin D1	C7464 Sigma Aldrich, Missouri, USA
Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin	DAKO, E0464, Carpintiera, CA, USA
M -30 Cyto Death	DAKO, 2140322, Carpintiera, CA, USA
Apoptosis Detection Kit/TACS TdT Kit	R&D, Minneapolis, MN USA
37%ige Formaldehyd-Lösung, DNase free water	
Proteinase K	
Methanol	JT Baker, 8045
H ₂ O ₂	Merck, 1.07209.0250
1 x PBS	PAA, H 15-002
Methylgrün-Lösung	4800-30-18
Ethanol 70%, 90%, 100%	Herbata, 200-578-5

Tunel (Apoptose)

Um die bei der Apoptose entstehenden Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA, die durch die Aktivität der Nukleasen entstehen, nachzuweisen, wurde der TUNEL (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) durchgeführt.

Für die Färbung wurden 5µm dicke Kryoschnitte verwendet. Die Apoptose Detektion erfolgte mit dem Apoptosis Detection Kit/TACS TdT Kit (Fa., R&D, Minneapolis, MN USA).

Die Kryoschnitte wurden mit 37%iger Formaldehydlösung fixiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung mittels Proteinase K-Verdau. Es folgte die Blockade der endogenen Peroxidase (Quenching). Dann erfolgte die Pufferung der Schnitte für 5 Minuten mit TdT Labeling Buffer mit anschließendem Labeling für 1 Stunde bei 37°C. Nach Zugabe von TdT Stop Buffer erfolgte die Detektion mit Strept-HRP-Detect. Solution. Die Färbung wurde mit DAB-Working-Solution durchgeführt. Nach Gegenfärbung mit Methylgrünlösung wurden die Auswertung der Ergebnisse semiquantitativ durchgeführt: (-), -, +, +++ für keine, wenig, mittel und viel Farbinsensität an verschiedenen intrazellulären Strukturen.

Ki-67

Ki-67, ein Zellkernprotein, wurde Anfang der 80er Jahre von Gerdes et al. entdeckt und definiert [Gerdes 1983]. Es kann während der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus nachgewiesen werden [Endl 2000]. Da das Ki-67 in der Ruhephase des Zellzyklus nicht exprimiert wird, gilt es als Marker für den Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation. Die Expression von Ki-67 beginnt in der Mitte der G1-Phase, der Spiegel steigt im Laufe der Synthese- und G2- Phasen an und erreicht das Maximum in der Mitose-Phase [Gerdes 1983]. Nach der Mitose-Phase wird das Ki-67 rasch abgebaut. Die Halbwertszeit beträgt weniger als eine Stunde [Bruno 1992].

Verwendet wurden 4µm dicke Paraffinschnitte, die in absteigender Alkoholreihe zunächst entparaffiniert wurden. Bei Raumtemperatur wurde Peroxidase Blocking Reagenz hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers. Nach 30 Minuten erfolgte das Waschen mit TBS, dann wurde der biotinylierte sekundär Antikörper hinzugegeben. Nach Waschen mit TBS wurde Streptavidin-AP hinzugegeben. Die Färbung erfolgte mit DAB, die Gegenfärbung mit Härris Hämatoxylin. Ausgezählt wurden 1000 Zellen/Gesichtsfeld.

5.3. Western Blot (Caspase 3, Cyclin D1)

Die Analyse von Proteinen aus dem Lebergewebe erfolgte mit der Methode des Western Blot. Zur Beurteilung der Apoptose wurde Caspase 3 untersucht. Zur Beurteilung der Proliferationsaktivität in der verbleibenden Restleber wurde Cyclin D1 untersucht. Die Western Blot Analyse basiert auf dem Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus dem verdünnten Leberhomogenisat mittels SDS/ Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Entsprechend ihres Molekulargewichtes wandern die Proteine durch eine Gelmatrix und werden getrennt nach ihrem Gewicht anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran mittels Wet-Transfer-Methode geblottet. Die spezifische Proteinbande wird nach Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper und der Behandlung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper mittels Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Prinzipiell reagiert hierbei der spezifische Primärantikörper mit dem zu untersuchenden Protein, welches an der Nitrocellulose-Membran gebunden ist, während der sekundäre Antikörper wiederum mit dem Fc-Fragment des primären Antikörpers reagiert. Da der Sekundärantikörper mit einer Peroxidase modifiziert ist (peroxidase-labeled), oxidiert dieser das in der ECL-Detection-Reagenz enthaltene Luminol. Dies führt sodann zu einer Lichtemission mit einer maximalen Wellenlänge von 428 nm, welche in einer

Dunkelkammer mit Hilfe von Entwicklergerät und Film die spezifischen Banden sichtbar werden lässt [Luss 1994].

Tabelle 18 Western Blot Materialien/Geräte

Blockthermostat BT100	Kleinfeld-Labortechnik, Gehrden, D
Mini Protean 3 Electrophoresis-Cell-Set	Bio-Rad, 165-3301, München, D
Mini Trans-Blot Cell-Set	Bio-Rad, 170-3930, München, D
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad, 162-0112, München, D
Gel-Blotting-Papier	Schleicher&Schuell,10426694, Dassel, D
Kodak Film	Kodak, 636 03 5, Rochester, NY, USA

Tabelle 19 Western Blot Reagenzien

NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	Merck, 1.06345.1000, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	Merck, 1.06580.1000, Darmstadt, D
Glycin	Serva, 23390, Heidelberg, D
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck, 8.17034.1000, Hohenbrunn, D
Tris Base	Sigma, T-1503, Steinheim, D
Tris HCl	Sigma, T-3253, Steinheim, D
Acrylamid 30%	Roth, 3029.1, Karlsruhe, D
6-Aminohexansäure	Merck, 8.00145.0250, Hohenbrunn, D
Ammonium Persulfat	Sigma, A-9164, Steinheim, D
Methanol	J.T.Baker, 8045, Deventer, NL
Tetramethylethylenediamine	Sigma, T-9281, Steinheim, D
Tween20	Aldrich, 27.434-8, Steinheim, D
Mercaptoethanol	Calbiochem, 444203, Darmstadt, D
Bromphenol Blue	Sigma, B-6896, St.Louis, MO, USA
Glycerol	Sigma, G-7757, Steinheim, D
DTT	Sigma, D-0623, Deisenhofen, D
TES	Sigma, T-0772, St.Louis, MO, USA
Blot-Quick-Blocker (Milchpulver)	Chemicon, 2078E, Temecula, CA, USA
ECL Western blotting detection reagents	Amersham, RPN2106, Freiburg, D
Rainbow protein molecular weight marker	Amersham, RPN756, Freiburg, D
Igepal CA 630	Sigma I- 3021, Deisenhofen, D
Mercaptoethanol	Calbiochem 444203
Anti-Cyclin D1	Pharmingen, 100 µg, 556470
Anti Caspase 3,	New England Biolabs 9662, USA
Sekundäre Antikörper	
Anti-mouse IgG/ECL, HPR-linked	NA 931, Fa. Amersham, Freiburg, D
Anti-rabbit IgG/ECL, HPR-linked	NA 934, Fa. Amersham, Freiburg, D

Caspasen zählen zu den Hauptmediatoren der Apoptose. Die Aktivierung von Caspasen führt zur Proteolyse von wichtigen intrazellulären Substraten und schließlich zum Zelltod. Es handelt sich bei den Caspasen um Cystein Proteinasen, die spezifisch Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten [Cohen 1997]. Caspase 3 stellt einen etablierten Marker für apoptotische Zellen dar [Cohen 1997].

Cyclin D1

Cyclin D1 ist ein nucleäres Protein und ist an der Regulation der Zellzyklusprogression der in die Regeneration eintretenden Hepatozyten beteiligt. Im Komplex mit den sog. zyclinabhängigen Kinasen(cdk) steuern die Zykline den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus. Die Expression von Cyclin D1 während der präreplikativen Phase (G0-Phase) ist entscheidend für die weitere Progression des Zellzyklus, denn von diesem Zeitpunkt an sind die Zellen in der Lage, unabhängig von Wachstumsfaktoren in die Mitose einzutreten [Fausto 2000, Court 2002]. Dieser Zeitpunkt wird auch als „G1-restriction point“ bezeichnet [Fausto 2000]. Durch die Analyse des Cyclin D1 im Westernblot kann die proliferative Aktivität der verbleibenden Restleber nach partieller Hepatektomie bestimmt werden.

5.4. Malondialdehyd (MDA)-Konzentration im Lebergewebe

Malondialdehyd ist ein Produkt der Lipidperoxidation, die wiederum durch Reaktion von freien Sauerstoffradikalen mit ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran in Gang gebracht wird [Esterbauer 1991]. Die Bestimmung des MDA ist ein Maß für die oxidative Schädigung des Gewebes. Die quantitative Messung der MDA-Konzentration im Lebergewebe wurde nach der Methode nach Ohkawa durchgeführt [Ohkawa 1979]. Genutzt wurde die Eigenschaft von Malondialdehyd, mit Thiobarbitursäure in saurer Lösung (pH 3,5) zu einem roten

Farbkomplex (thiobarbitursäurereaktive Substanzen, TBARS) zu reagieren, welcher spektrophotometrisch bei 532 nm gemessen werden kann.

Tabelle 20 Malondialdehyd Materialien, Reagenzien

Natriumdodecylsulfat (SDS) 8,1%	Pharmacia 80-1128-74
1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TBA) 0,6%	Sigma T-5500
n-Butanol	Sigma BT-105
Pyridin	Sigma P-3776
2-Thiobarbitursäure 0,8 % 0,049 mol/l	Sigma T-5500
Acetatpuffer (20 %-ig mit NaOH auf ph 3,5 titriert)	Acet acid, Merck 100063250
1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TTOP)	Sigma T-9889

Das Reaktionsgemisch wurde für 60 Minuten bei 90°C inkubiert. Nach Abkühlung im Eisbad wurden 0,2 ml dest. H₂O und 1,0 ml Butanol/Pyridin (Verhältnis 15:1) zugegeben. Nach 20 minütigem Schütteln und folgender Zentrifugation (10 min bei 1000 U/min) wurde die Lipidkonzentration nach Überführung der Butanolphase in die Meßküvette fluorometrisch auf Lab-Quant Shimadzu RF-5001 PC bei 515 nm Extinction/553 nm Emission gemessen. Die Konzentration der TBARS wird nach Subtraktion des Leerwertes auf der Basis der Eichkurve bestimmt. Als Standard diente Tetraethoxypropan.

5.5. Myeloperoxidase (MPO)-Konzentration im Lebergewebe

MPO wird aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt. Zur Beurteilung des Ausmaßes der postoperativen Gewebeeinflammation wurde die MPO Konzentration in der Leber gemessen.

Tabelle 21 Myeloperoxidase Materialien, Reagenzien

K ₂ HPO ₄	Merck, 1.05104.1000, Darmstadt, D
K ₂ EDTA	Fluka, 03662, Neu-Ulm, D
KH ₂ PO ₄	Merck, 4873.1000, Darmstadt, D
HTAB	Sigma, H-9151, Deisenhofen, D
TMB	Sigma, T-2885, Deisenhofen, D
DMSO	Fluka, 41640, Neu-Ulm, D
H ₂ O ₂ (30% stabilisiert)	Merck, 822287, Hohenbrunn, D
H ₂ SO ₄ 2N	Merck, 731.100150, Darmstadt, D
BCA Reagenz	Sigma, B-9643, Deisenhofen, D
Aceton	Riedel de Haen, 32201
Natronlauge	Baker, 7097
CuSO ₄	Merck, 1.02790, Darmstadt, D
HClO ₄	Merck, 1.00514.1000, Darmstadt, D
MPO (für Standards)	Sigma, M-6908, Deisenhofen, D

Um die MPO Konzentration in der Leber zu bestimmen, wurden 100 mg kryokonserviertes Gewebe in 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphat Puffer und 0,5%igem Hexasecyltrimethylammoniumbromid (HTAB) dismembriert. Anschließend erfolgte die Probenlagerung auf Eis. Aus den neutrophilen Granulozyten wird durch das HTAB MPO freigesetzt. Nach Inkubation von jeweils 1 ml der Überstände erfolgte die Zentrifugation mit 1500 x g für 2 Minuten. 25µl der Proben wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. In die Mikrotiterplatte wurden anschließend 190 µl eines H₂O₂/ KH₂ PO₄ (1:18.000) und 25µl DMSO (0,1%) gegeben. Um die kinetische Reaktion zu unterbrechen, erfolgte nach einer 5 minütigen Inkubationszeit bei 37°C die Zugabe von 50 µl einer 2 M H₂SO₄-Lösung. Die

Messung der MPO Konzentration erfolgte über die Extinktion bei 450 nm im Fluostar und wurde über eine Standardkurve berechnet.

5.6. Reverse Transkription und DNase-Verdau (VEGF, HGF, TGF- β , IL-1 β)

Mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (reverse transkriptase-polymerase chain reaktion; rt-PCR) wurden Interleukin 1- β , sowie die Wachstumsfaktoren HGF und VEGF sowie die Inhibitoren der Regeneration IL-1 β und TGF- β aus dem Lebergewebe bestimmt. HGF ist der bekannteste und wichtigste Wachsumfaktor der Leberzellen. Bei Ratten steigt das HGF ca. 1 h nach partieller Hepatektomie um das 20-fache an und fällt nach 72 h wieder auf Normalwerte [Markus 2000]. TGF induziert DNA Synthese in kultivierten Hepatozyten [Court 2002]. TNF- α gehört zu den Priming Faktoren der Leberregeneration und triggert, wie auch das IL-6, den Eintritt der Zellen von der G0- in die G1-Phase [Court 2002]. Darüber hinaus zählt IL-1 β zu den proinflammatorischen Mediatoren, die entscheidend an der Initiierung des Ischämie/Reperfusionsschadens beteiligt sind [Suzuki 1994]. Zu den Inhibitoren der Leberregeneration gehören die Zytokine TGF- β und IL-1 β . Die TGF- β -Konzentration im Gewebe/Serum ist etwa 4 h nach partieller Leberteilektomie erhöht und erreicht ihren Maximalwert nach etwa 72 h.

Die isolierte Gesamt RNA wurde zunächst - um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern - mit Desoxyribonuclease I behandelt. Pro Ansatz erfolgte bei Raumtemperatur die Inkubation von 1mg RNA 1 μ l 10x DNase I Reaction Buffer und 1 U DNase I in 7 μ l Aqua bidest für 15 min. Die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 25 mM EDTA gestoppt. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit Desoxyribonuclease I behandelt (einem einzel- und doppelsträngigen DNA abbauenden Enzym). Hierbei wurde pro Ansatz 1 μ g RNA mit 1 μ l 10x DNase I Reaction Buffer und 1 U DNase I in 7 μ l Aqua bidest für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gestoppt wurde die

Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 25 mM EDTA. Die semiquantitative Untersuchung der mRNA-Expression erfolgt durch Synthese des komplementären DNA-Strangs aus der isolierten Gesamt-RNA von jedem vorhandenen mRNA-Molekül mit Hilfe des Retroviren-Enzyms Reverse Transkriptase. Im nächsten Schritt wird an der komplementären DNA (cDNA) die Polymerase-Kettenreaktion (s.u.) durchgeführt. Hierzu wurde in einem Gesamtansatz von 10 μ l einer 0,1 μ g/ μ l konzentrierten RNALösung verwendet. Es folgte die Hinzugabe von 2 μ l 10-fach PCR-Puffer, 1 μ l Random Hexamer Oligonukleotide (0,1 mM), 0,5 mM Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs), Aqua bidest, 1,1 μ l Dithiothreitol (100 mM), 0,5 μ l Rnasin (40 U/ μ l) und anschließende Inkubation in einem PCR-Thermocycler (Biometra) bei 21°C für 10 min, gefolgt von 37°C für 1 h und 95°C für 5 min. Zur Identifizierung von DNA-Kontamination bzw. falsch positiven Banden wurden Kontrollreaktionen durchgeführt, indem Proben ohne Reverse Transkriptase bzw. Aqua bidest bei der RT-PCR eingesetzt wurden.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Tabelle 22 PCR Materialien und Geräte

Total RNA- Isolationsset	Nucleo Spin RNA II
Feinwaagen	Sartorius type 1518, Sartorius AC 1215
Homogenisierer	Ultra- Turrax T25; Janke & Kunkel; IKA Labortechnik
PCR- Entwickler	GENE FLASH, Syngene Bio Imagine
pH- Meter	pH- Meter CG 840
Thermocycler	PTC 100TM ; Programmable Thermal Controller Bio Rad DNA Engine Gradient Cycler MJ Research PTC- 200 Peltier Thermal Cycler
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R
Agarose	Eurogentec Lot. GC 53022J
Basenpaarleiter	Amersham 100 Base
dNTP	Gibco BRL
Ethidiumbromid	Sigma E- 8751, Deisenhofen, D
MgCl	
Oligo (dT)Primer	Invitrogen
Taq Polymerase	Gibco BRL
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, D-5758, Deisenhofen, D
Guanidiniumthiocyanat	Sigma, G-7028, Deisenhofen, D
Ethanol	Merck, 1.00986, Darmstadt, D
Natriumcitrat	Merck, 6586, Darmstadt, D
N-Lauryl-Sarcosin	Sigma, L-9150, Deisenhofen, D
β -Mercaptoethanol	Sigma, M-6250, Deisenhofen, D
Natriumacetat	Sigma, S-2889, Deisenhofen, D
Isopropanol	Sigma, 405-7, Deisenhofen, D
Phenol	Sigma, P-4682, Deisenhofen, D
Oligo(dt) 12-18	Gibco, 18418-012, Karlsruhe, D
Rnasin	Promega, N2111, Mannheim, D
10x PCR-Puffer	Gibco, Y02028, Karlsruhe, D
MgCl ₂	Gibco, Y02016, Karlsruhe, D
DNTP	Gibco, 10297018, Karlsruhe, D
DEPC	Sigma, D-5758, Deisenhofen, D
DTT	Gibco, Y0014, Karlsruhe, D
Super Script 2	Gibco, 10297018, Karlsruhe, D
Taq Polymerase	Fa. Interactiva, Ulm, D
Bromphenolblau	Sigma, B-6896, Deisenhofen, D
Borsäure	Sigma, E-5134, Deisenhofen, D
Glycerol	Sigma, G-5516, Deisenhofen, D
Tris HCL	Sigma, T-3253, Deisenhofen, D
Xylencyano	Sigma, X-4126, Deisenhofen, D

Durch die PCR ist es möglich, kleinste Mengen von spezifischen DNA-Abschnitten durch gezielte exponentielle Vervielfältigung dieser DNA-Fragmente zu bestimmen. Das Prinzip der PCR besteht in der zyklischen Wiederholung (25-40x) der folgenden drei Einzelschritte:

1. Denaturierung:

Die DNA-Doppelstränge zerfallen bei 95°C in die beiden komplementären Einzelstränge.

2. Ankopplung („Annealing“):

cDNA-spezifische Oligonukleotide („Primer“) lagern sich an die komplementäre cDNA an.

3. Verlängerung ("Elongation"):

Verlängerung des Primer/cDNA-Hybrids vom 3'-Ende her durch eine DNAPolymerase.

Durch die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* ("Taq-Polymerase") wird die automatisierte Wiederholung dieser drei Einzelschritte in einem Thermocycler ermöglicht, ohne dass nach dem Denaturieren wieder neues Enzym zugesetzt werden muss. Mit jedem Durchlauf dieser drei Schritte verdoppelt sich theoretisch die Anzahl der Genfragmente, wenn die Reaktionseffizienz der PCR bei eins läge. Die Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wird an Hand der publizierten Sequenzen des Zielgens ausgewählt. Aufgrund der größeren Anzahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen ist ein hoher Prozentsatz an GC-Basenpaarung zwischen Primer und dem komplementären cDNA-Fragment günstig. Zur Beurteilung der PCR wurde als interner Standard β -Actin mitgeführt, um den Einsatz gleichmäßiger DNA Mengen in den untersuchten Proben zu kontrollieren.

Oligonukleotide (Primer)

Die Sequenzen und Länge der amplifizierten PCR Produkte betragen:

beta Actin	Interactiva, Ulm
sense:	5` ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3`
antisense:	5` CGG AAC CGC TCA TTG CC 3`

VEGF	Interactiva, Ulm
sense:	5` GGT GTG GTG GTG ACA TGG TTA ATC3`
antisense:	5` CCA GCA CAT AGG AGA GAT GAG CTT C3`

HGF	Eurofins MWG GmbH, Bad- Homburg
Sense:	5` GCT GCC TCC TTT ACC AAT GA 3`
Antisense:	5` CCC CTA TGC AGA AGG ACA GA 3`

TGF beta	Interactiva, Ulm
sense:	5` CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC3`
antisense:	5` CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC3`

IL- 1 beta	Interactiva, Ulm
sense:	5` AAG AAG GTG CTT GGG TCC TCA TCG3`
antisense:	5` CTT CCT TGT GCA AGT GTC TGA AGC3`

Das β -Actin Primer-Paar überspannt ein Intron und müsste daher in der Lage sein, Kontaminationen mit der DNA aufzudecken. Tatsächlich kommt es auf Grund von mRNA komplementären Abschnitten in der genomischen DNA („Pseudogenen“) zur Amplifikation von Amplifikaten identischer Größe, die mit der Messung der mRNA konkurrieren und damit das Ergebnis nach unten verfälschen. Um Kontamination der (-)-RT Probe mit genomischer DNA entgegenzutreten, wurde die oben erwähnte Behandlung der präparierten RNA mit Desoxyribonuclease I etabliert.

Durchführung der PCR

Die PCR wurde in Reaktionsansätzen von 50µl durchgeführt. Darin enthalten war 5µl PCR Puffer, 3 µl MgCl (25mM), 0,3 µl dNTP (jeweils 25mM) 1,5 µl des Primer I (sense), 1,5 µl des Primer II (antisense) und 34,7 µl steriles Wasser. Diese Bestandteile wurden für die Gesamtanzahl der untersuchten Proben in ein 5 ml großes Reaktionsgefäß (Master-Mix) pipettiert, geschüttelt und auf die einzelnen Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese im Ethidiumbromid-gefärbtem, 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden nach Anregung im UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Geldokumentationssystem 5000, Geldokumentationssystem mit Diana Software, Firma Raytest). Als molekularer Massenstandard wurden 100 bp-DNA-Größenmarker verwendet. 10µl Aliquots jeder cDNAProbe wurden so verdünnt, dass die Bandenstärke der β-Actin-PCR in allen Proben gleich war. In den durchgeführten Validierungsexperimenten durch den Einsatz von Proben mit definierter RNA-Konzentration erwies sich die angewandte semiquantitative RT-PCR als geeignete Methode, große und mittlere Unterschiede in einer mRNA-Konzentration eines Zielgenes reproduzierbar zu bestimmen. Die Methode ließ sich unkompliziert auf ein neues Primer-Paar übertragen. Die graphische Darstellung der Genexpression wurde mit Hilfe des Software Programms UN-SCAN-IT Version 6.0 durchgeführt.

5.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die ELISA Technik basiert auf der Bindung von zwei Antikörpern an das nachzuweisende Antigen. Zunächst wird ein spezifischer Antikörper an eine Mikrotiter Platte gebunden. Anschließend wird die Probe mit dem nachzuweisenden Antikörper mit dem Primärantikörper inkubiert. In dieser Zeit bindet der Primär-Antikörper an das Antigen. Durch das nachfolgende Waschen werden die ungebundenen Anteile der Probe entfernt. Nach Hinzugabe eines zweiten, sog. Detektions-Antikörpers, an dessen Ende ein Enzym (Alkalische Phosphatase) gebunden ist entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nach Zugabe eines Chromogens entsteht durch die alkalische Phosphatase eine Farbreaktion, die photometrisch gemessen werden kann. Hierbei ist die Farbtintensität proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Antigens.

Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin und wirkt auf verschiedene Zellen. Das IL-6 wird u.a. in Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten und Hepatozyten gebildet [Streetz 2000]. Freigesetzt wird das IL-6 als Antwort auf eine ischämische oder traumatische Gewebeschädigung oder akute Infektion bzw. Endotoxinämie [Streetz 2000]. Durch direkte Wirkung auf den Zellzyklus wird dem IL-6 eine Schlüsselfunktion bei der Induktion der Hepatozyten Proliferation zugeschrieben [Cressman 1996]. Zur Messung der IL-6-Konzentrationen im Plasma wurden Immunoassays der Firma R&D eingesetzt (Quantikine, human IL-6, R&D Systems Europe, Abington, United Kingdom).

Tabelle 23 Interleukin 6 Materialien und Geräte

Quantikine, Rat IL- 6 Immunoassay	R& D Systems R6000B, Abington, UK
96- Well- Platte	
Galxy Fluostar bMG	

Alle Reagenzien und Proben werden vor der Benutzung bei Raumtemperatur gelagert.

In eine 96 Wellplatte werden pro Vertiefung 50µl Assay Diluent RD1- 54 vorgelegt, anschließend werden 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe pro Well pipettiert, die Platte wird für eine Minute leicht geschwenkt, mit Folie abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Jede Vertiefung wird dann fünfmal geleert und gewaschen, dafür wird jedes Well mit 400 µl Waschpuffer gefüllt und anschließend für gute Ergebnisse restlos geleert. Nach dem letzten Waschen wird der Waschpuffer restlos entfernt und durch das Schlagen auf Papiertücher getrocknet. In einem weiteren Schritt werden 100 µl Ratten IL- 6 Konjugat in jedes Well gegeben, mit Folie abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Platte erneut fünfmal gewaschen, wie oben beschrieben. Nachfolgend werden 100 µl Substratlösung, bestehend aus gleichen Teilen A und B Reagenz in jedes Well gegeben. Nach halbstündiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur werden 100 µl Stoplösung hinzugegeben und die Platte leicht gemischt. Zum Schluss wird die optische Dichte mittels des Fluostar Galaxy bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

6. Statistische Auswertung

Für die Variablen AST, ALT, LDH, GLDH, IL-6, KI-67, Mitosen, MPO und MDA wurde in allen Gruppen Mittelwerte, Standardabweichungen und die Quartile berechnet. Zusätzlich wurden die Variablen in Boxplots dargestellt. Um Normalverteilung zu erreichen, gingen in die konfirmatorische Analyse die logarithmierten Werte der Variablen ein. Auch in den Diagrammen wird eine logarithmische Skala verwendet. Die Auswertung erfolgte dann mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren Zeit, Krankheitsstatus (gesunde versus Fettleber) und CO₂. Unterschiede zwischen verschiedenen Zeitpunkten wurden mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0.05$ gesetzt. Eine Korrektur für multiples Testen wurde nicht durchgeführt, da davon ausgegangen werden kann, dass die untersuchten Variablen eine hohe positive Korrelation aufweisen. Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS 15.0 durchgeführt.

D Ergebnisse

1. Vorversuch

Im Vorversuch wurde untersucht, ob das CO₂-Pneumoperitoneum die Leberzellen schädigt.

Hier wurden sowohl die gesunden als auch die Tiere mit einer Fettleber untersucht.

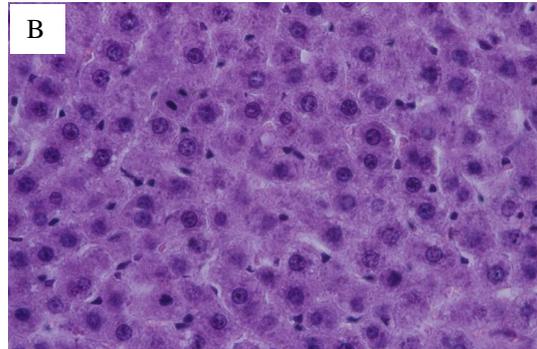
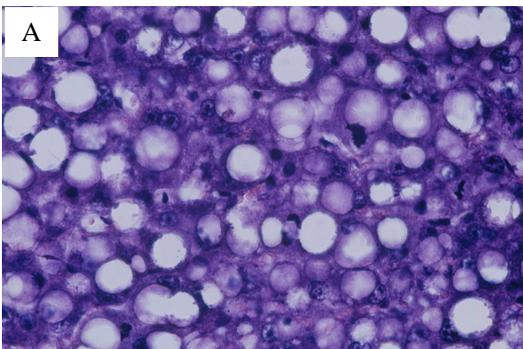
1.1. Induktion der Fettleber

Die Induktion der Fettleber war nach 5 Tagen abgeschlossen. Histologisch zeigte sich das Bild einer mikro- und makrovaskulären Steatosis mit den morphologischen Zeichen einer begleitenden Steatohepatitis (Abb. 9).

Abbildung 9 HE-Färbung Fettleber, Vergrößerung x 40.

Die Abbildung 9A zeigt einen histologischen Schnitt einer 60-70%igen, grobtropfig diffus verfetteten Leber mit leichter Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen und vereinzelt Leberzellnekrosen.

In den Periportalfeldern sind leichte Lymphozyteninfiltrationen zu erkennen. Auf der Abbildung 9B ist eine gesunde Rattenleber zu sehen.



1.2. Pneumoperitoneum und Leberzellschädigung bei der gesunden und bei der Fettleber

Im Vergleich zu den Tieren ohne CO₂-Pneumoperitoneum, zeigten sich bei den Tieren nach CO₂-Pneumoperitoneum sowohl bei den gesunden als auch bei den Tieren mit Steatosis hepatis signifikant erhöhte Serumwerte für AST (p<0,001), ALT (p<0,001), GLDH (p=0,019) und LDH (p=0,009) (ANOVA-Analyse). Die Tiere mit Steatosis hepatis wiesen auch ohne CO₂-Pneumoperitoneum einen signifikant ausgeprägteren hepatozellulären Schaden als die gesunden Tiere auf (AST p<0,001; ALT p<0,001; GLDH p=0,002) (ANOVA-Analyse).

(Tab. 24, Abb. 10, 11).

Tabelle 24 Einfluß des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Transaminasen bei Tieren mit gesunder- und Tieren mit Fettleber

Angegeben sind Medianwert sowie das 1. und 3. Quartil. *p<0,05 Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO₂ versus ohne CO₂ (Mann-Whitney-Test).

**p CO₂ versus ohne CO₂ (unabhängig vom Gesundheitsstatus), +p Fettleber versus gesunde Leber (unabhängig vom CO₂) (beides ANOVA-Test).

TZ: Tötungszeitpunkt

Parameter	TZ	Gesunde Leber		Fettleber	
		CO ₂	ohne CO ₂	CO ₂	ohne CO ₂
AST (U/l) ** p<0,001 + p<0,001	6 h	74,0* (73,25; 137,3)	62,0 (55,3; 70,3)	99,0 (72,0; 134,0)	77,0 (61,0; 77,0)
	12 h	85,5* (81,0; 94,5)	48,0 (41,5; 53,5)	159,0 (72,0; 134,0)	74,0 (62,0; 94,0)
	24 h	63,5* (62,8; 68,0)	28 (21; 32)	138,0 (58,0; 157,0)	62,0 (60,0; 63,0)
ALT (U/l) ** p<0,001 + p<0,001	6 h	33,0* (27,0; 39, 3)	11,5 (11,5; 28,0)	44,0 (49,0; 66,0)	30,0 (51,0; 53,0)
	12 h	53,5* (48,2; 56,2)	13,0 (11,5; 28,0)	55,0 (45,0; 66,0)	49,0 (27,0; 51,0)
	24 h	40,0* (37,0; 41,3)	13 (12; 17)	78,0 (30,0; 83,0)	55,0 (43,0; 56,0)
GLDH (U/l) ** p=0,019 +p= 0,002	6 h	12,0* (9,6; 15,6)	6,9 (5,0; 9,8)	10,3 (9,1; 10,7)	10,7 (8,4; 17,9)
	12 h	6,1 (3,5; 8,7)	6,8 (5,0; 9,4)	11,2 (10,0; 13,5)	7,8 (6,7; 7,0)
	24 h	5,9 (5,4; 7,9)	150 (132; 162)	39,0 (6,1; 40,4)	6,4 (6,1; 7,0)
LDH (U/l) ** p=0,009 + p=0,054	6 h	398,5* (239,0; 431,8)	247,0 (233,5; 292,0)	267,0 (207,0; 356,0)	340 (230,0; 428,0)
	12 h	297,5* (239,0; 431,8)	200,0 (192,0; 209,0)	398,5 (333,3; 669,0)	532,0 (313,0; 685,0)
	24 h	295 (274,5; 348,0)	5 (4; 8)	364,0 (343,0; 292,0)	203,0 (137,0; 230,0)

Abbildung 10 Hepatozelluläre Schädigung (AST) ohne Resektion mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum bei gesunder (A)- und Fettleber (B)

Mann-Whitney Test: *p<0,05.

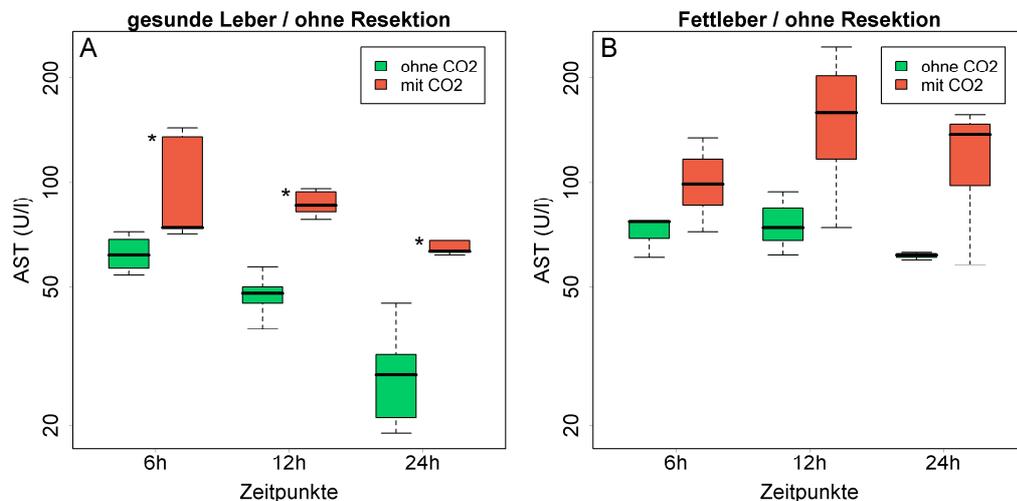
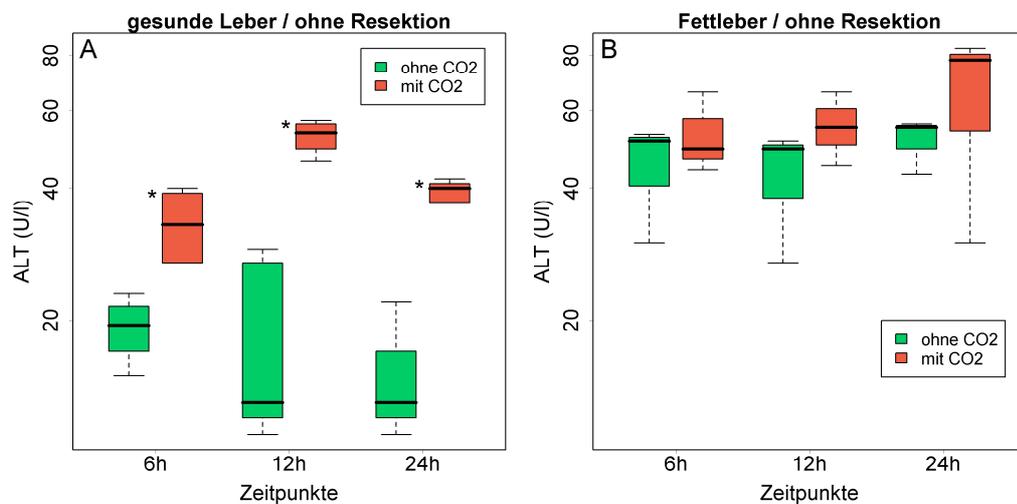


Abbildung 11 Hepatozelluläre Schädigung (ALT) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum

Mann-Whitney Test: *p<0,05.



2. Hauptversuch

Im Hauptversuch wurde der Einfluss des CO₂ Pneumoperitoneums nach 70%iger Leberteileresektion untersucht.

2.1. Leberzellschädigung

Die Leberzellschädigung war bei den gesunden und Fettlebertieren nach vorausgegangenem CO₂-Pneumoperitoneum signifikant höher als ohne CO₂-Pneumoperitoneum (AST, $p < 0,001$; ALT, $p < 0,001$; LDH, $p < 0,001$; GLDH, $p = 0,001$). Durch die Steatosis hepatis wurde unabhängig vom CO₂-Pneumoperitoneum der hepatozelluläre Schaden verstärkt (AST $p < 0,001$; ALT $p < 0,001$; LDH $p = 0,032$; GLDH $p < 0,001$). Besonders deutlich waren die Unterschiede der hepatozellulären Schädigung innerhalb der ersten 48 h zu sehen. Nach 4 bzw. 7 Tagen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum zu messen. Auch der Unterschied zwischen den Tieren mit Fettleber und den gesunden Tieren war am 4. und 7. postoperativen Tag nicht mehr signifikant (Tab. 25, Abb. 12-15).

Tabelle 25 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Transaminasen bei Tieren mit gesunder und Tieren mit Fettleber nach Leberteileresektion

Angegeben sind die Medianwerte sowie das 1. und 3. Quartil. *p<0,05 Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO₂ versus ohne CO₂ (Mann-Whitney-Test). **p CO₂ versus ohne CO₂ (unabhängig vom Gesundheitsstatus), +p Fettleber versus gesunde Leber (unabhängig vom CO₂) (beides ANOVA-Test). TZ: Tötungszeitpunkt

Parameter	TZ	Gesunde Leber		Fettleber	
		CO ₂	ohne CO ₂	CO ₂	ohne CO ₂
AST (U/l) ** p<0,001 + p<0,001	12 h	3358,0* (3188,8; 3500,0)	701,0 (640,0; 870,0)	5670,0* (3470,5; 8923,0)	3287,5 (2145,0; 4699,75)
	24 h	1667,0* (1057,8; 2273,5)	570,0 (540,0; 645,0)	1513,5 (1229,8; 2569,5)	2257,5 (1820,3; 2574,0)
	2 d	780,0* (663,5; 918,8)	395,5 (378,8; 429,3)	966,5* (741,75; 1199,2)	619,0 (536,0; 782,5)
	4 d	117,0 (97,0; 388,5)	105,5 (94,3; 112,8)	105,5 (84,0; 173,3)	116,5 (76,5; 157,3)
	7 d	95,5 (85,8; 103,0)	86,0 (68,8; 105,3)	94,0 (86,2; 97,3)	73,5 (60,0; 88,8)
ALT (U/l) ** p<0,001 + p<0,001	12 h	1722,5* (1448,8; 1873,8)	492,0 (475,0; 492,0)	3149,0 (2116,0; 4135,5)	893,5 (822,0; 1817,5)
	24 h	656,0 (531,3; 919,5)	714,0 (665,0; 770,0)	868,5 (760,0; 1204,8)	1423,5 (1185,7; 1565,5)
	2 d	388,0* (314,8; 448,3)	184,5 (166,3; 211,5)	493,0 (393,8; 539,5)	297,5 (236,3; 540,0)
	4 d	48,5 (33,8; 125,8)	44,5 (39,5; 55,5)	45,0 (32,8; 75,5)	42,0 (23,8; 59,8)
	7 d	46,0 (39,8; 52,3)	33,5 (26,8; 46,3)	39,5 (33,8; 44,5)	30,5 (25,0; 36,8)
LDH (U/l) ** p<0,001 + p=0,032	12 h	6300,0* (5460,0; 7040,0)	3200,0 (2913,0; 3426,0)	17480,0 (3078,0; 22525,0)	11660,0 (6570; 16595,0)
	24 h	1248,5* (1072,0; 1589,8)	752,0 (546,0; 913,0)	939,5 (497,3; 1463,3)	1185,5 (1053,7; 1408,2)
	2 d	777,5* (601,5; 964,5)	204,5 (179,3; 224,5)	401,5 (239,0; 939,8)	204,5 (160,3; 343,3)
	4 d	282,5* (212,8; 301,3)	105,0 (85,5; 151,8)	175,5 (162,0; 232,5)	157,5 (136,3; 189,0)
	7 d	475,5* (340,3; 707,5)	70,5 (54,5; 114,3)	278,0* (240,3; 339,8)	224,5 (193,0; 238,5)
GLDH (U/l) ** p=0,001 + p<0,001	12 h	2527,5* (1947,3; 2936,3)	1772, (1640,0; 1941,0)	3737,0 (2791,5; 5222,0)	2104,0 (1631,0 (3303,0)
	24 h	1772,5 (1314,0; 1968,0)	2490,0 (2430,0; 2624,0)	2158,5 (1539,8; 5282,5)	5235,0 (4985,5; 6813,0)
	2 d	1210,0* (1014,8; 1670,5)	711,0 (671,3; 742,3) 40,0	2097,5 (1905,3; 2548,0)	1210,0 (917; 1900,0)
	4 d	143,5 (39,8; 336,3)	(22,5; 52,3) 11,5	76,6 (54,4; 172,4)	65,5 (48,0; 120,75)
	7 d	14,0 (11,8; 18,0)	(7,8; 18,0)	18,4 (18,2 (22,9)	13,3 (10,3; 20,5)

Abbildung 12 Hepatozelluläre Schädigung (AST) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion

Mann-Whitney Test: *p<0,05.

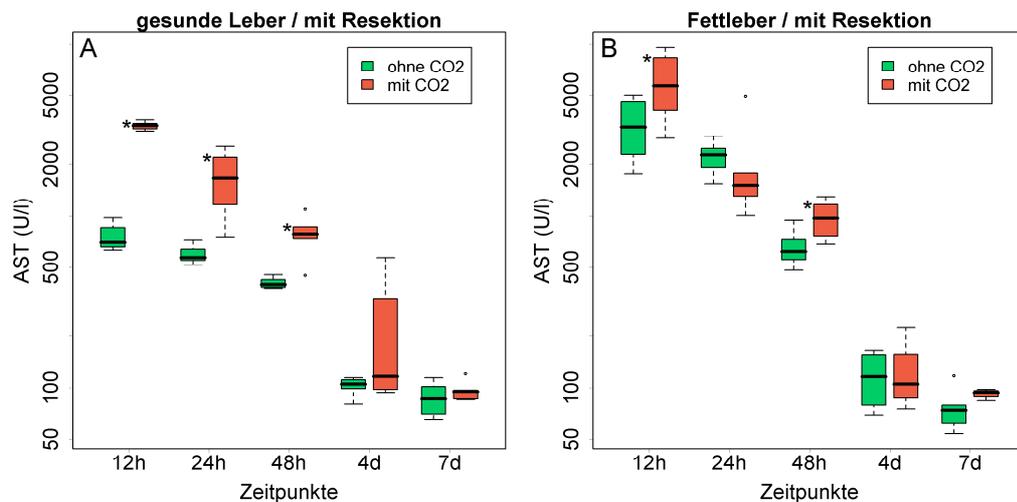


Abbildung 13 Hepatozelluläre Schädigung (ALT) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion

Mann-Whitney Test: *p<0,05.

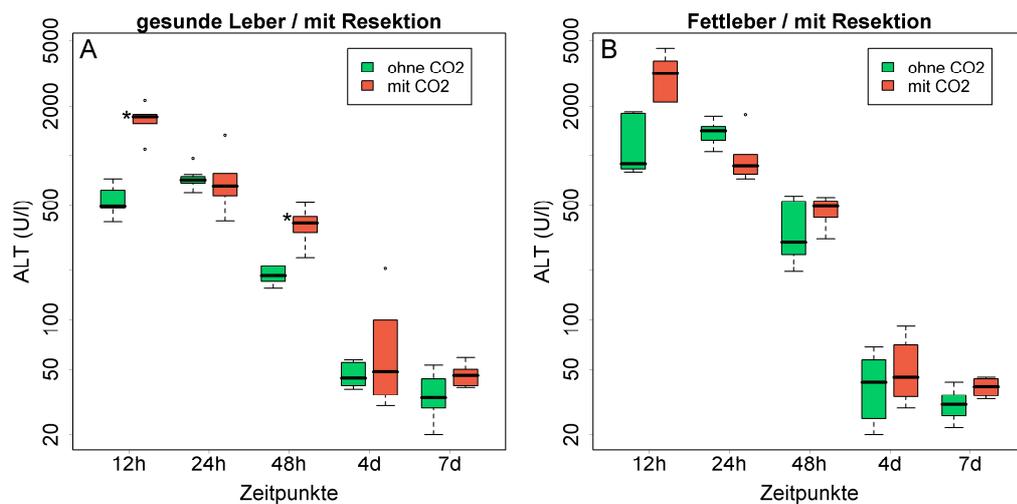


Abbildung 14 Hepatozelluläre Schädigung (GLDH) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum nach Leberteileresektion

Mann-Whitney Test: *p<0,05.

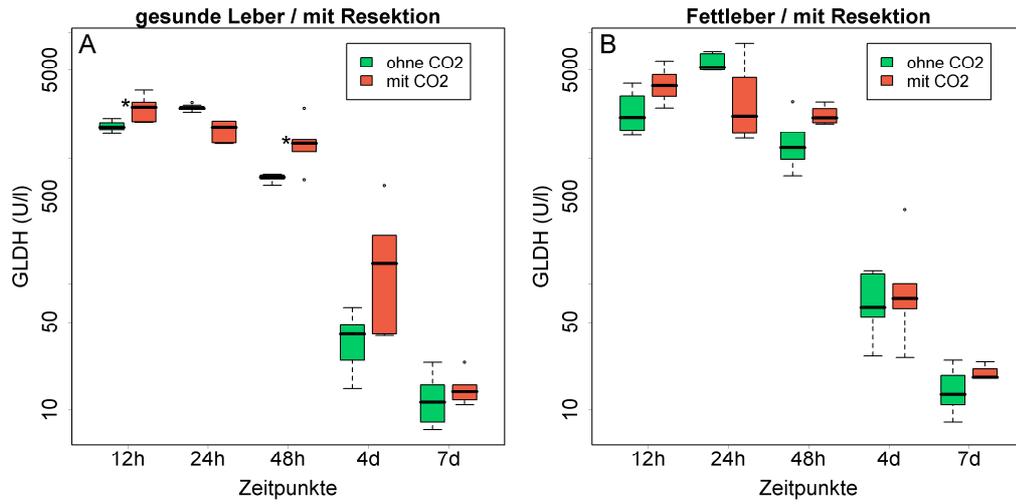
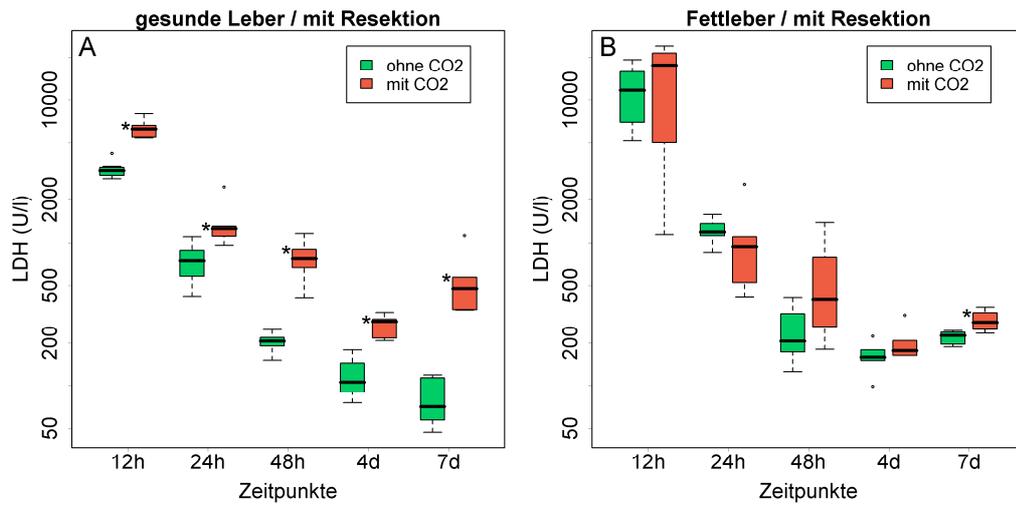


Abbildung 15 Hepatozelluläre Schädigung (LDH) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum nach Leberteileresektion

Mann-Whitney Test: *p<0,05.



2.2. Oxidativer Stress (Malondialdehyd im Lebergewebe)

Das Malondialdehyd im Lebergewebe war bei den gesunden wie auch bei den Tieren mit Fettleber nach Leberteilresektion und vorausgegangenem CO₂-Pneumoperitoneum signifikant höher als in den Vergleichsgruppen ohne vorheriges CO₂-Pneumoperitoneum (p=0,009) (Tab. 26, Abb. 16). Bei den Tieren mit Fettleber war darüber hinaus mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum signifikant mehr Malondialdehyd im Lebergewebe nachzuweisen als bei den gesunden Tieren (p=0,02). Das Maximum an Malondialdehyd war bei den gesunden Tieren nach 12 h und bei den Tieren mit Fettleber nach 24 h nachweisbar.

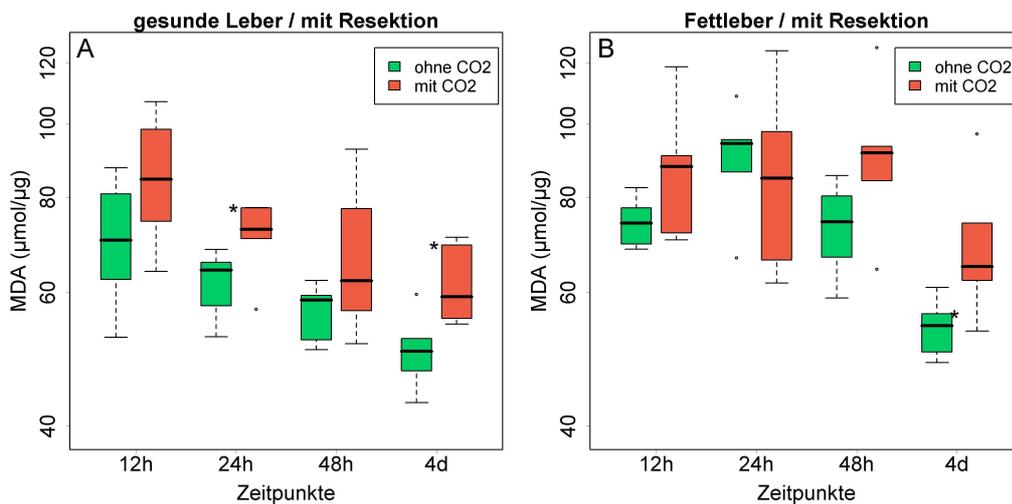
Tabelle 26 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf den oxidativen Stress

Malondialdehyd (MDA) im Lebergewebe. *p<0,05 Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO₂ versus ohne CO₂ (Mann-Whitney-Test) . **p CO₂ versus ohne CO₂ (unabhängig vom Gesundheitsstatus), +p Fettleber versus gesunde Leber (unabhängig vom CO₂) (beides ANOVA-Test), TZ: Tötungszeitpunkt

Parameter	Gesunde Leber			Fettleber	
	TZ	mit CO ₂	ohne CO ₂	mit CO ₂	ohne CO ₂
MDA [μmol/μg] ** p=0,009 + p=0,02	12 h	84,5 (71,7; 100,4)	70,2 (62,4; 80,8)	87,8 (71,4; 97,7)	74,0 (69,2; 78,7)
	24 h	72,6* (67,2; 77,5)	64,2 (58,7; 65,5)	84,7 (65,0; 104,3)	94,1 (76,4; 101,9)
	2 d	62,13 (51,4; 92,5)	58,6 (53,5; 59,4)	91,4 (79,1; 101,4)	74,2 (64,8; 81,6)
	4 d	59,2* (55,2; 69,6)	50,2 (47,7; 51,9)	64,9* (57,8; 85,4)	54,2 (49,7; 57,4)

Abbildung 16 Oxidativer Stress (MDA) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum bei gesunder- (A) und Fettleber (B) nach Leberteilresektion

Mann-Whitney Test: *p<0,05.



2.3. Interleukin-6

Das proinflammatorische IL-6 im Serum war in der Gruppe der gesunden und kranken Tiere insgesamt über alle Zeitpunkte nach Leberteilresektion mit vorherigem CO₂-Pneumoperitoneum signifikant höher als ohne Pneumoperitoneum ($p < 0,001$) (Tab. 27, Abb. 17). Bei den kranken Tieren war die IL-6 Konzentration unabhängig vom CO₂-Pneumoperitoneum signifikant niedriger als bei den gesunden Tieren ($p < 0,001$). In der Gruppe der kranken Tiere mit Pneumoperitoneum ist die IL-6 Ausschüttung über alle Zeitpunkte höher als in der Vergleichsgruppe ohne CO₂-Pneumoperitoneum, wobei der Unterschied hier nicht signifikant ist ($p = 0,831$). Bei den gesunden und Fettlebertieren war mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum die IL-6 Konzentration nach 12 h postoperativ am höchsten.

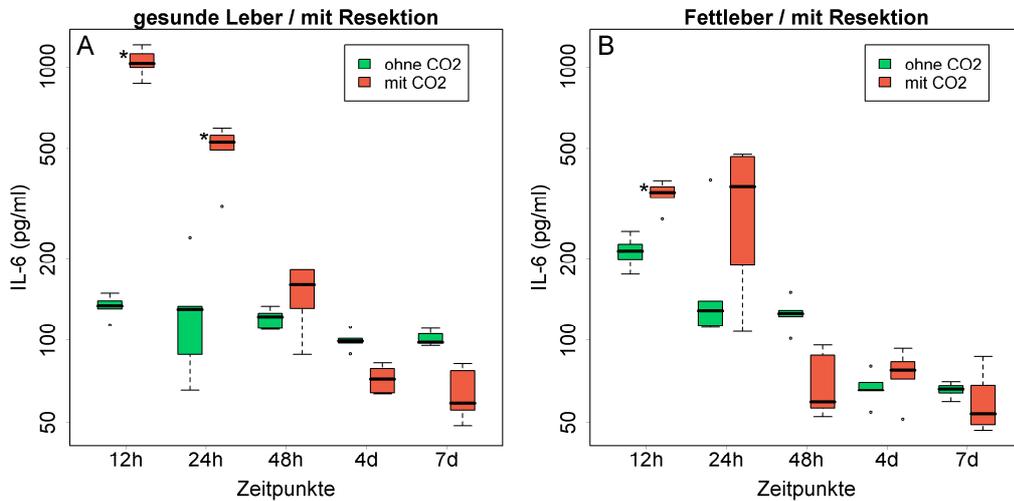
Tabelle 27 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf das proinflammatorische Interleukin 6 nach Leberteilresektion

*p<0,05 Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO₂ versus ohne CO₂ (Mann-Whitney-Test). **p CO₂ versus ohne CO₂ (unabhängig vom Gesundheitsstatus), +p Fettleber versus gesunde Leber (unabhängig vom CO₂) (beides ANOVA-Test), TZ: Tötungszeitpunkt

Parameter	Gesunde Leber			Fettleber	
	TZ	mit CO ₂	ohne CO ₂	mit CO ₂	ohne CO ₂
IL-6 [pg/ml]	12 h	1030,9* (965,7; 1139,9)	133,7 (126,1; 141,9)	347,6* (317,9; 369,3)	212,9 (200,8; 223,4)
** p<0,001 + p= p<0,001	24 h	527,4* (447,1; 567,2)	129,7 (83,2; 159,4)	365,4* (168,3; 470,3)	128,4 (112,8; 200,6)
	2 d	160,0 (120,5; 181,1)	121,8 (110,0; 127,5)	59,4 (54,5; 92,1)	125,3 (116,9; 134,0)
	4 d	72,4 (64,0; 80,0)	99,3 (95,4; 103,8)	78,0 (67,2; 86,0)	65,8 (62,6; 72,9)
	7 d	58,8 (53,8; 78,7)	98,1 (96,9; 106,6)	53,8 (48,0; 78,0)	66,7 (63,0; 69,1)

Abbildung 17 Interleukin 6 nach Leberteilresektion mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B).

Mann-Whitney Test: *p<0,05.



2.4. Sequestration von neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe (Myeloperoxidase)

Die Myeloperoxidase (MPO) Aktivität der neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe war bei den gesunden wie auch bei den Tieren mit Fettleber nach Pneumoperitoneum im Vergleich zu den Gruppen ohne Pneumoperitoneum signifikant erhöht ($p=0,001$) (Tab. 28, Abb. 18). Bei den Tieren mit Fettleber war die Myeloperoxidase insgesamt stärker nachweisbar als bei den gesunden Tieren ($p=0,017$).

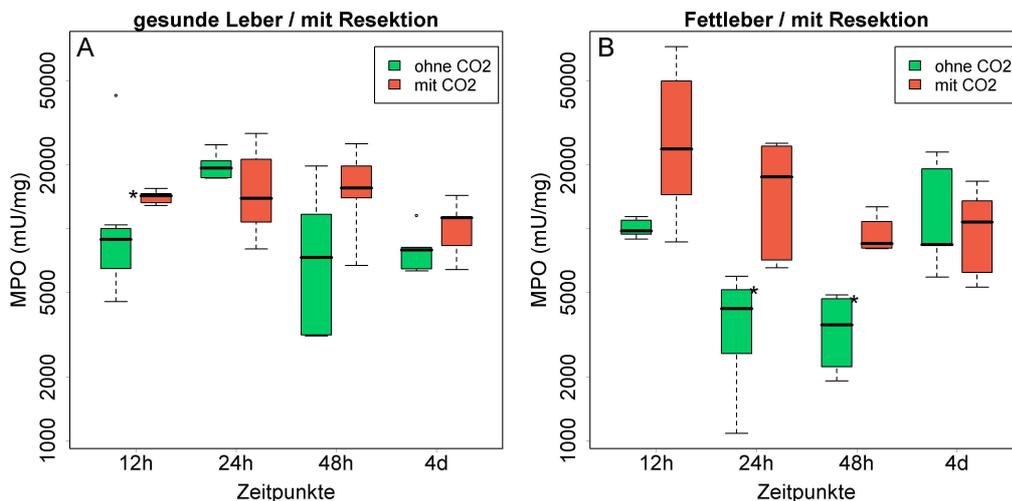
Tabelle 28 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Aktivität von Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe nach Leberteilresektion

* $p<0,05$ Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO₂ versus ohne CO₂ (Mann-Whitney-Test). ** p CO₂ versus ohne CO₂ (unabhängig vom Gesundheitsstatus), + p Fettleber versus gesunde Leber (unabhängig vom CO₂) (beides ANOVA-Test), TZ: Tötungszeitpunkt

Parameter	Gesunde Leber			Fettleber	
	TZ	mit CO ₂	ohne CO ₂	mit CO ₂	ohne CO ₂
MPO [$\mu\text{mol}/\mu\text{g}$]	12 h	14304,2* (13160,6; 14849,8)	8923,5 (5750,3; 10425,1)	23805,5 (11565,1; 60884,5)	9764,1 (9189,0; 11177,2)
** $p=0,001$ + $p=0,017$	24 h	13926,5 (9402,5; 24668,6)	19325,4 (17345,7; 21456,8)	17544,5* (6831,2; 24901,4)	4207,0 (1834,8; 5561,0)
	2 d	15565,0 (7379,2; 12839,1)	7319,4 (3152,6; 13725,2)	8516,8* (8076,4; 11751,6)	3520,8 (2079,6; 4778,3)
	4 d	11290,3 (7379,2; 12839,2)	7934,2 (6407,9; 9846,8)	10764,7 (5764,9; 15143,7)	8429,1 (7176,5; 21080,2)

Abbildung 18 MPO nach Leberteilresektion mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B)

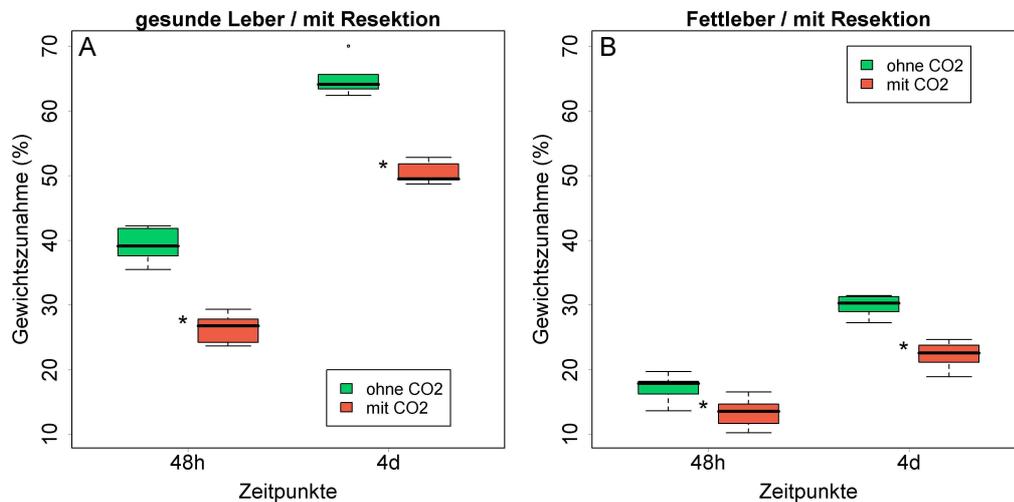
Mann-Whitney Test: * $p<0,05$.



2.5. Lebergewichtszunahme

Abbildung 19 Zunahme des Lebergewichts nach Leberteilresektion mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B).

Mann-Whitney Test: *p<0,05.



Insgesamt war bei den Tieren mit Fettleber der prozentuale Regenerationszuwachs signifikant niedriger als bei den gesunden Tieren ($p < 0,001$) (Abb. 19). Bei den gesunden Tieren mit CO₂-Pneumo-peritoneum war die Zunahme des Lebergewichts an beiden Tagen signifikant niedriger. In dieser Gruppe betrug der mediane Gewichtszuwachs ohne Pneumoperitoneum nach 48 h 38,9% und nach 4 d 64,1% während in der Vergleichsgruppe der Gewichtszuwachs 26,7 % ($p = 0,002$) bzw. 49,5% ($p = 0,002$) betrug. Bei den Tieren mit Fettleber war die Regenerationsrate durch das Pneumoperitoneum ebenfalls signifikant erniedrigt (17,9% versus 13,5% nach 48 h, $p = 0,015$; 30,3% versus 22,6%, $p = 0,002$).

2.6. Mitose

Bei den gesunden Tieren war die Mitoserate nach Leberteilresektion mit CO₂-Pneumoperitoneum signifikant schwächer als bei den Vergleichstieren ohne CO₂-Pneumoperitoneum ($p < 0,001$) (Tab. 29, Abb. 20-22). In der Gruppe der gesunden Tiere war die Mitoserate nach 48 h sowohl mit als auch ohne CO₂-Pneumoperitoneum im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten außer Tag 7 signifikant erhöht (48 h versus 12 h, $p = 0,001$; 48 h

versus 24 h, $p=0,010$; 48 h versus 4 d, $p=0,046$, 48 h versus 7 d, $p=0,065$). In der Gruppe der Fettlebertiere ohne CO₂-Pneumoperitoneum war die Mitoserate bereits nach 24 h am stärksten ausgeprägt. Bei den Tieren mit CO₂-Pneumoperitoneum waren nach 48 h die meisten Mitosen zu verzeichnen. Insgesamt war die Anzahl der Mitosen in der Gruppe der Fettlebertiere signifikant geringer als bei den gesunden Tieren ($p<0,001$). Bei den Fettlebertieren mit CO₂-Pneumoperitoneum waren über alle Zeitpunkte weniger Mitosen nachzuweisen, allerdings war der Unterschied hierbei nicht signifikant ($p=0,083$).

Tabelle 29 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Mitoserate im Lebergewebe nach Leberteilresektion

*p<0,05 Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO₂ versus ohne CO₂ (Mann-Whitney-Test). **p CO₂ versus ohne CO₂ (unabhängig vom Gesundheitsstatus), +p Fettleber versus gesunde Leber (unabhängig vom CO₂) (beides ANOVA-Test), TZ: Tötungszeitpunkt

Parameter	TZ	Gesunde Leber		Fettleber	
		mit CO ₂	ohne CO ₂	mit CO ₂	ohne CO ₂
Mitosen (%)	12 h	0,20* (0,17; 0,28)	1,31 (0,79; 1,49)	0,10 (0,00; 0,32)	0,18 (0,09; 0,31)
** p<0,001 + p<0,001	24 h	0,31* (0,10; 0,54)	1,53 (0,45; 3,10)	0,27 (0,39; 0,40)	2,09 (0,66; 3,23)
	2 d	1,82* (1,41; 2,11)	3,51 (2,90; 5,06)	0,76* (0,61; 1,02)	1,36 (0,89; 1,81)
	4 d	0,31* (0,07; 0,49)	1,56 (1,46; 2,38)	0,44 (0,29; 0,55)	0,11 (0,05; 0,23)
	7 d	0,10* (0,04; 0,23)	0,12 (0,09; 0,23)	0,10 (0,08; 0,16)	0,12 (0,16; 0,09)

Abbildung 20 Leberregeneration anhand der Mitoserate nach Leberteilresektion mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B).

Mann-Whitney Test: *p<0,05.

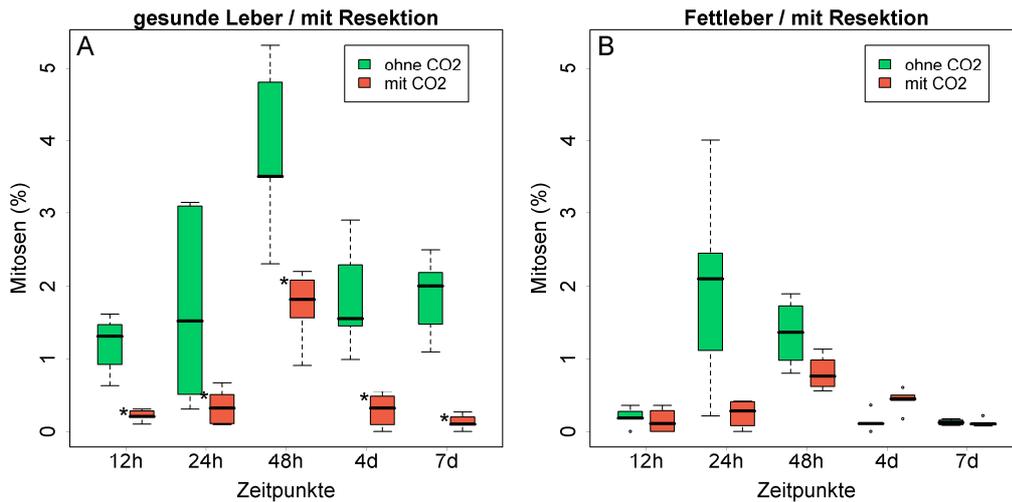


Abbildung 21 HE Färbung gesunde Leber (Mitosen)

Vergrößerung x 40. 2. postoperativer Tag nach 70%iger Leberteileresektion ohne (A) und mit (B) CO₂-Pneumoperitoneum. Deutlich mehr Mitosen sind in der Leber ohne Pneumoperitoneum zu sehen.

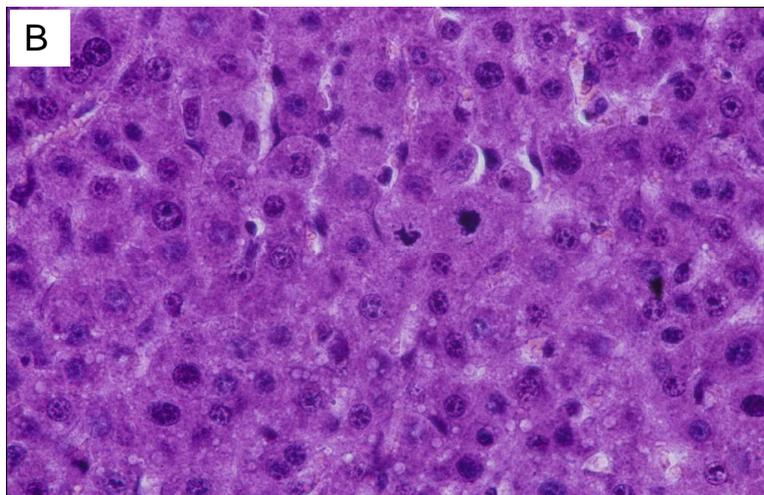
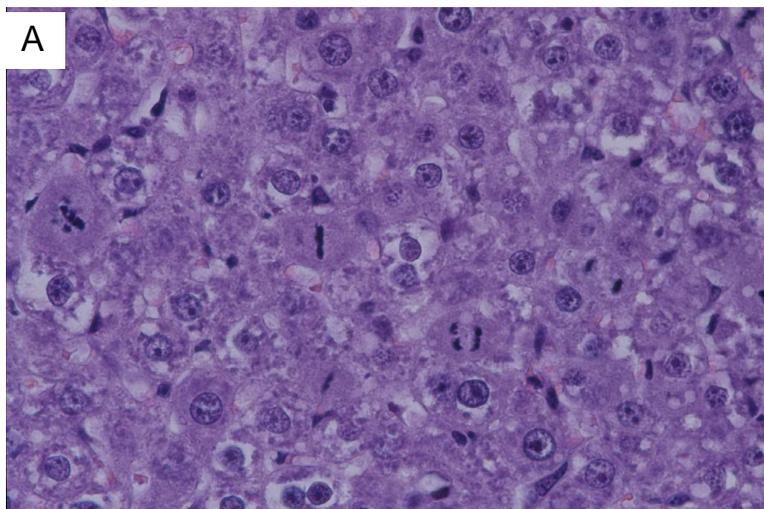
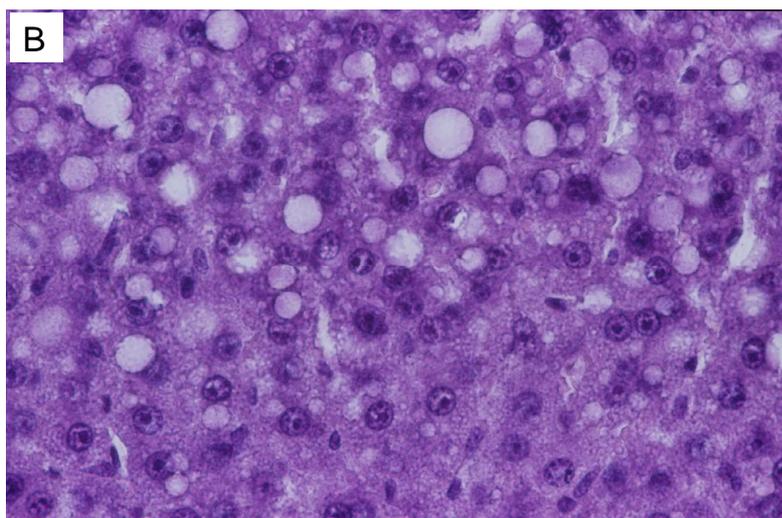
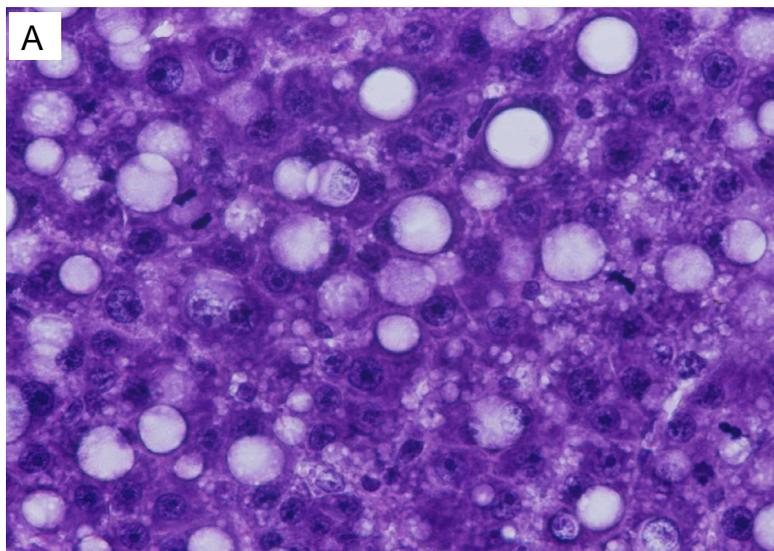


Abbildung 22 HE Färbung Fettleber (Mitosen)

Vergrößerung x 40. 2. postoperativer Tag nach 70%iger Leberteilektomie ohne (A) und mit (B) CO₂-Pneumoperitoneum. Deutlich mehr Mitosen sind in der Leber ohne Pneumoperitoneum zu sehen.



2.6. Ki-67

Die stärkste Expression von Ki-67 war bei den gesunden als auch bei den kranken Tieren nach 48 h vorhanden (Tab. 30, Abb. 23-25). Hier war - unabhängig vom CO₂-Pneumoperitoneum und dem Zustand der Tiere (fett/gesund) die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen signifikant stärker als zu den Zeitpunkten 12 h, 24 h und 4 Tage (p<0,001). Das CO₂-Pneumoperitoneum hatte ebenfalls auf beide Gruppen einen signifikanten Einfluß auf die Expression von Ki-67. Bei der Fettleber und auch bei der gesunden Leber war die Anzahl Ki-67 positiver Zellen in der CO₂-Pneumoperitoneumgruppe signifikant erniedrigt (p<0,001). Die Tiere mit Fettleber hatten eine signifikant niedrigere Expression von Ki-67 als die gesunden Tiere (p<0,001).

Tabelle 30 Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Expression von Ki-67 im Lebergewebe nach Leberteilresektion

*p<0,05 Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO₂ versus ohne CO₂ (Mann-Whitney-Test). **p CO₂ versus ohne CO₂ (unabhängig vom Gesundheitsstatus), +p Fettleber versus gesunde Leber (unabhängig vom CO₂) (beides ANOVA-Test), TZ: Tötungszeitpunkt

Parameter	TZ	Gesunde Leber		Fettleber	
		mit CO ₂	ohne CO ₂	mit CO ₂	ohne CO ₂
Ki-67 (%)	12 h	0,72 (0,32; 1,10)	1,67 (1,11; 1,73)	0,30 (0,18; 0,40)	0,42 (0,19; 0,71)
** p<0,001 + p<0,001	24 h	1,03 (0,76; 2,45)	12,6 (1,11; 16,40)	0,58 (0,34; 1,17)	2,07 (0,28; 5,85)
	2 d	19,04 (10,13; 20,79)	19,29 (17,33; 24,0)	5,27 (3,35; 7,88)	8,51 (7,57 (9,94)
	4 d	1,77* (0,77; 2,37)	3,26 (2,62; 7,20)	0,32 (0,30; 1,06)	1,18 (0,39; 4,25)

Abbildung 23 Ki-67 Expression im Lebergewebe nach Leberteilresektion mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum bei gesunder (A) und Fettleber (B)

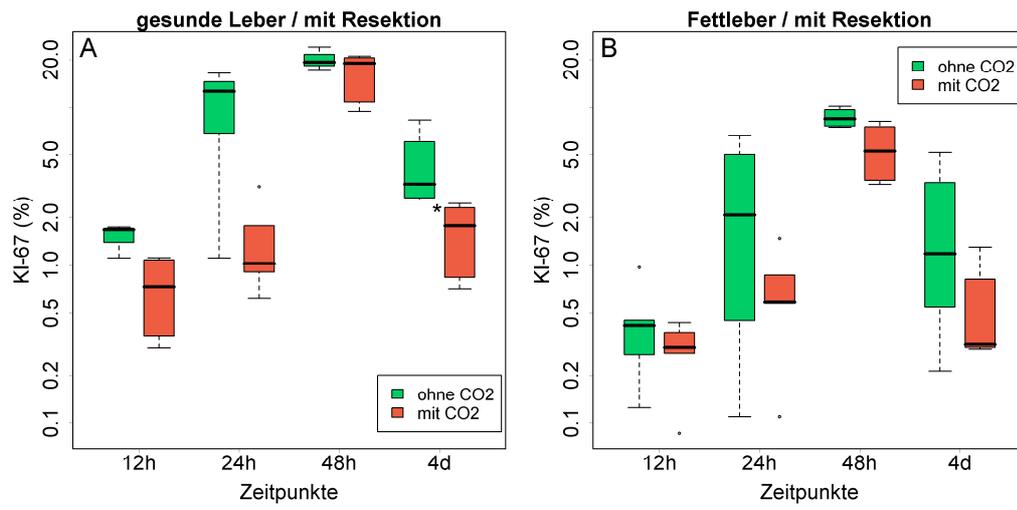


Abbildung 24 HE Färbung gesunde Leber (Ki-67)Vergrößerung x 40.

2. postoperativer Tag nach 70%iger Leberteileresektion. Die KI-67 Expression als Ausdruck der Proliferation ist ohne Pneumoperitoneum (A) stärker als mit Pneumoperitoneum (B).

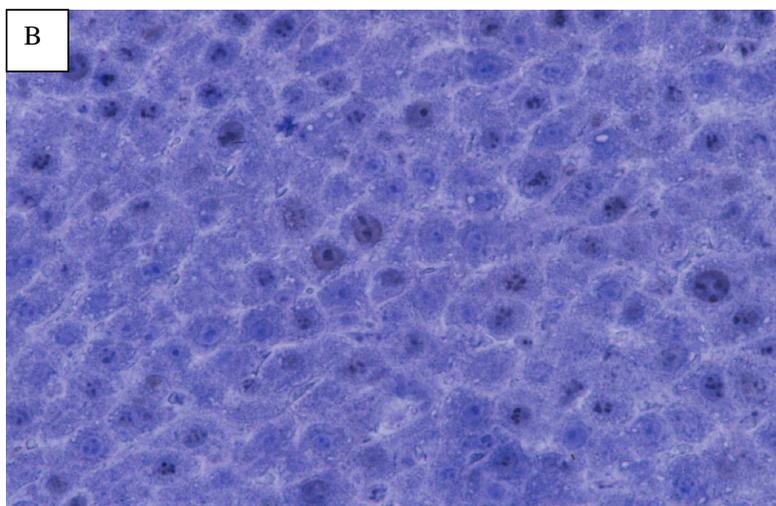
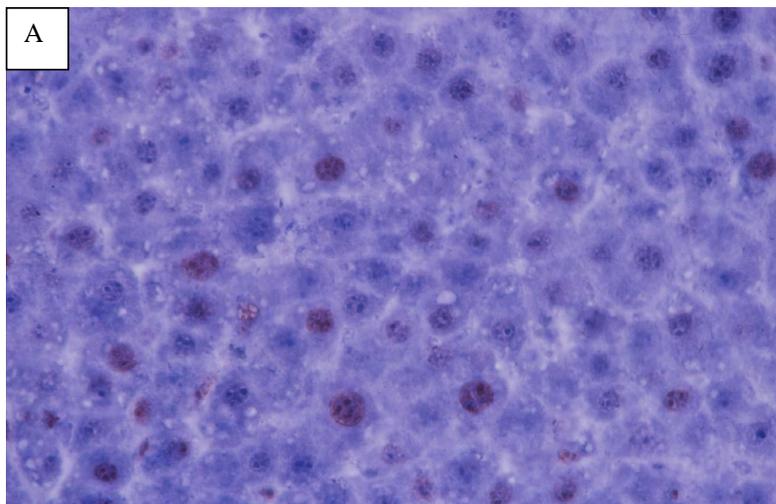
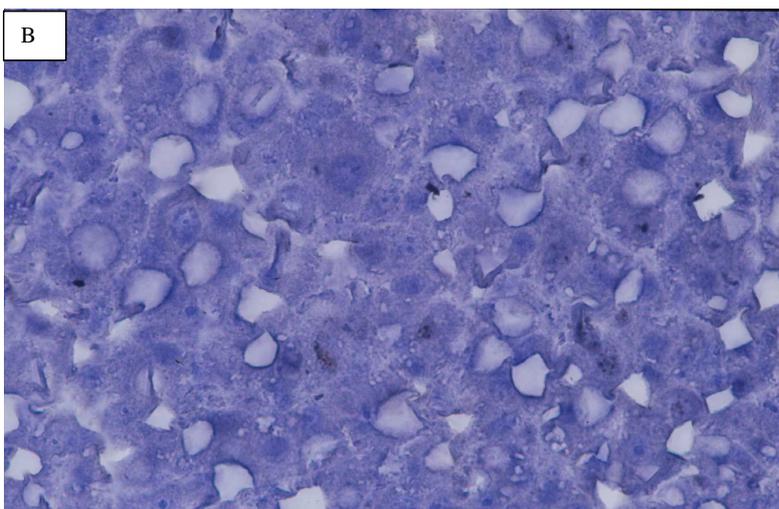
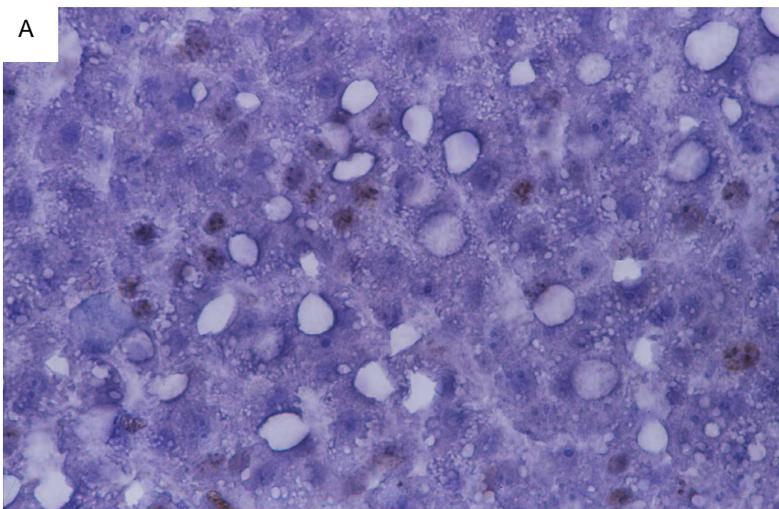


Abbildung 25 HE Färbung Fettleber (Ki-67)

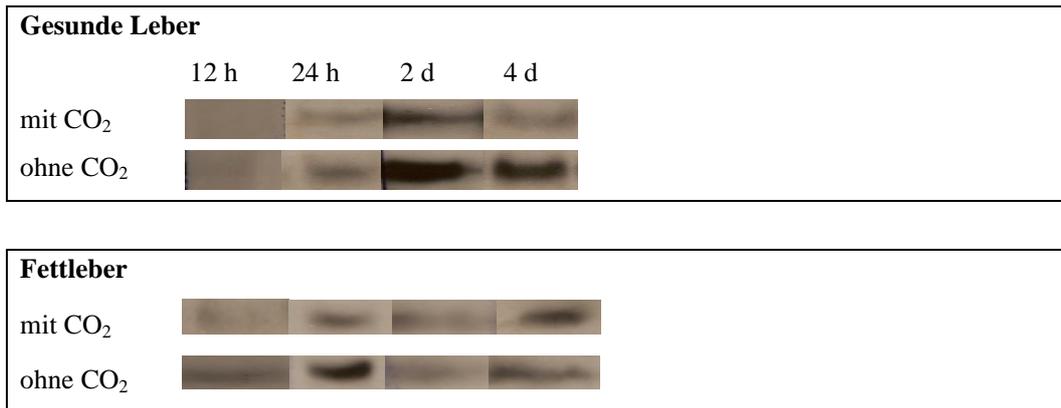
Vergrößerung x 40. 2. postoperativer Tag nach Leberteilresektion. Die KI-67 Expression ist ohne Pneumoperitoneum (A) stärker ausgeprägt als bei den Tieren mit Pneumoperitoneum (B).



2.7. Cyclin D1

Bestimmung der proliferativen Aktivität der Restleber durch die Analyse des Cyclin D1 im Westernblot (Abb. 26). Im Lebergewebe von Tieren mit CO₂-Pneumoperitoneum zeigt sich bei den gesunden und bei den Fettlebertieren eine schwächere Expression des Cyclin D1. Insgesamt zeigt sich bei den Tieren mit Fettleber eine schwächere Expression von Cyclin D1 als bei den gesunden Tieren.

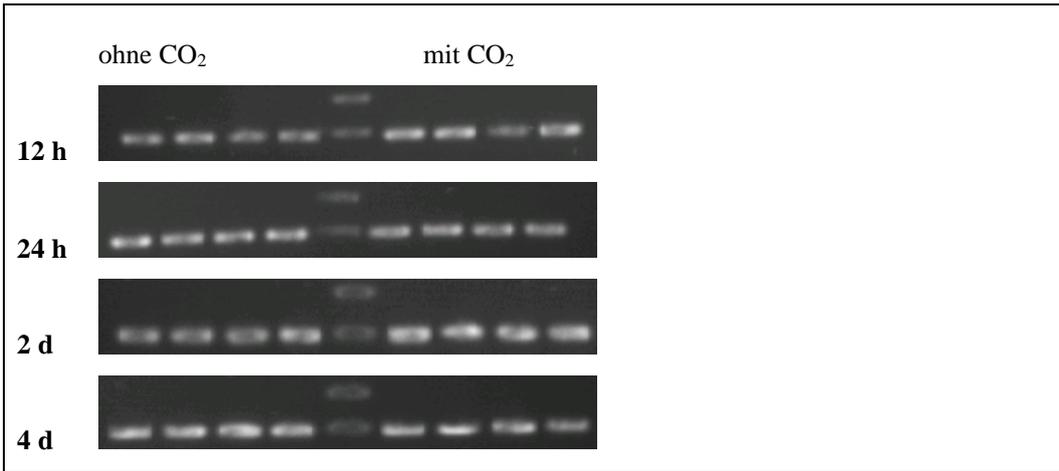
Abbildung 26 Expression von Cyclin D1 im Westernblot



Regenerationsstimulierende Wachstumsfaktoren HGF und VEGF (PCR)

Als Referenz der RNA Messungen wurde für jede Probe und jede Verdünnung eine eigene parallele β -Aktin-PCR im gleichen Lauf mitgeführt (Abb. 27). Die immer mitgelaufenen negativ- und positiv Proben sind nicht abgebildet.

Abbildung 27 Darstellung der mRNA Expression von β -Actin

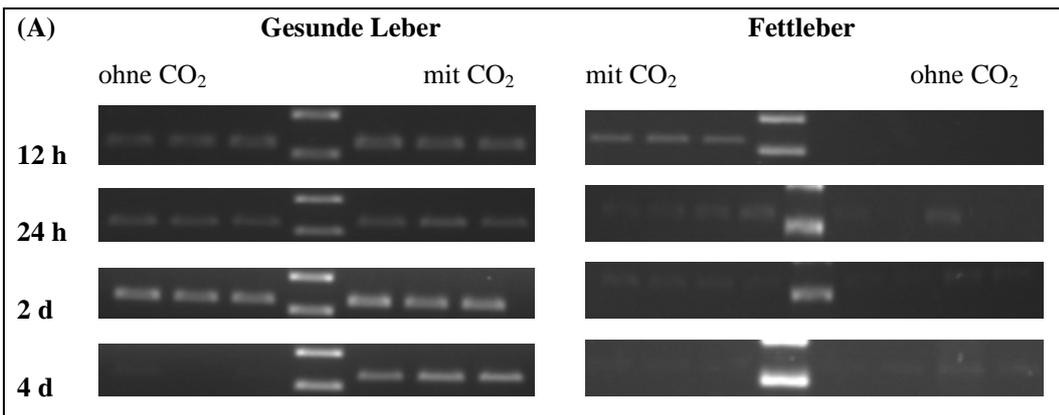


2.8. HGF (Hepatocyte growth factor)

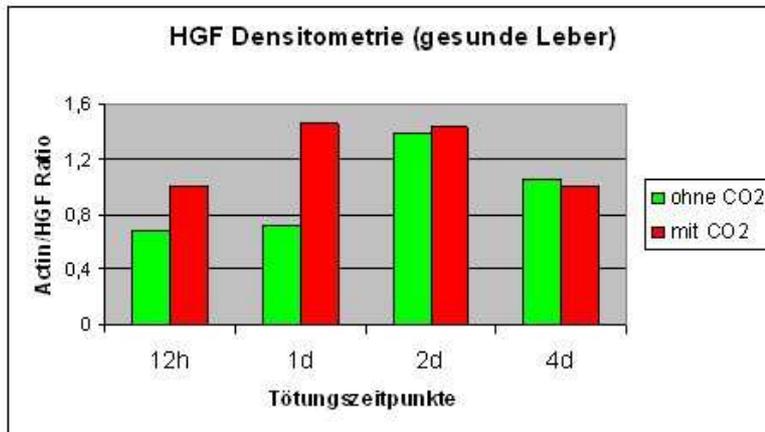
Zu allen Zeitpunkten der Leberregeneration zeigte sich, dass die gesunden Tiere mit CO₂-Pneumoperitoneum eine stärkere mRNA Expression des stimulierenden Wachstumsfaktors HGF aus dem Lebergewebe aufwiesen. Das Maximum an HGF Expression wurde am 2. postoperativen Tag nachgewiesen (Abb. 28A-C). Bei den Tieren mit Fettleber war die HGF Expression insgesamt weniger stark ausgeprägt als bei den gesunden Tieren. Der stärkste Nachweis an HGF wurde bei den Tieren mit CO₂-Pneumoperitoneum nach 12 h gemessen.

Abbildung 28 Darstellung der mRNA Expression des Wachstumsfaktors HGF

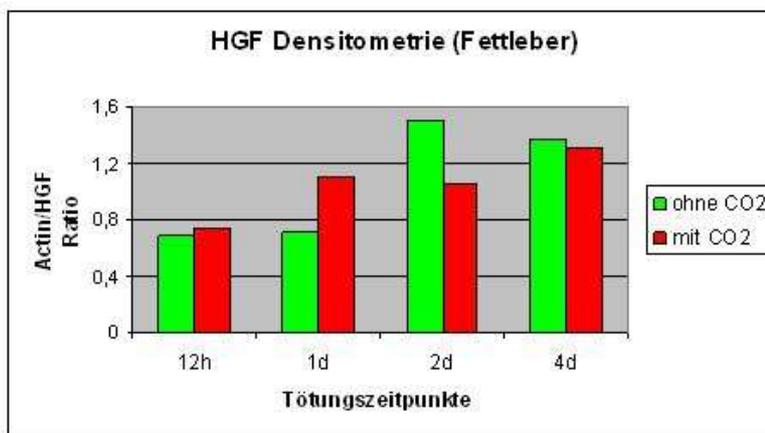
(A) HGF (328 bp) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion im zeitlichen Verlauf. (B), (C) Densitometrie Analyse der HGF Expression bei gesunder und Fettleber mit und ohne Pneumoperitoneum.



(B)



(C)



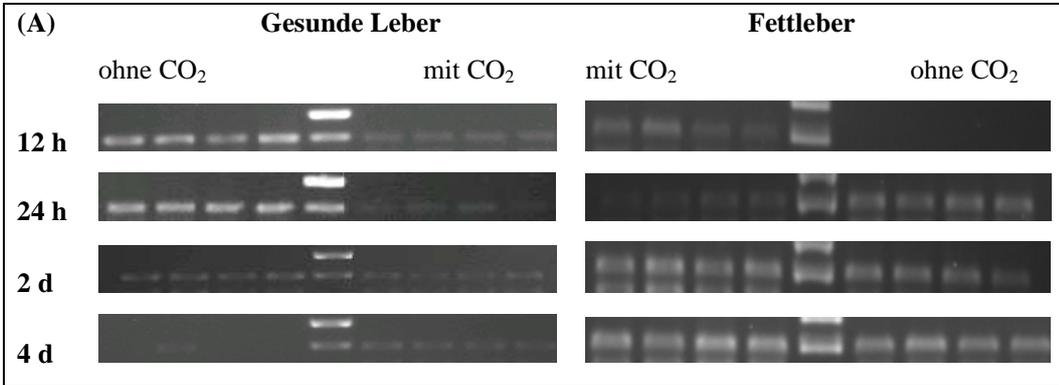
2.9. VEGF (Vascular endothelial growth factor)

Die mRNA des Wachstumsfaktors VEGF aus dem Lebergewebe der gesunden Tiere wurde bei den Tieren ohne CO₂-Pneumoperitoneum stärker exprimiert als bei der Vergleichsgruppe mit CO₂ (Abb. 29 A, B). Nach 24 h war die mRNA Expression von VEGF der Tiere ohne CO₂-Pneumoperitoneum am stärksten ausgeprägt und dann wieder rückläufig. Bei den Tieren mit CO₂-Pneumoperitoneum konnte dagegen ein verzögerter Anstieg der mRNA Expression des VEGF gemessen werden. Bei den Tieren mit Fettleber war die mRNA Expression von

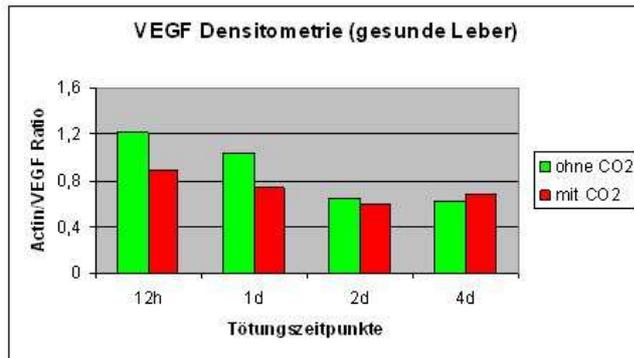
VEGF im Vergleich zu den gesunden Tieren zeitlich verzögert und hatte ihr Maximum nach 4 Tagen.

Abbildung 29 Darstellung der mRNA Expression des Wachstumsfaktors VEGF

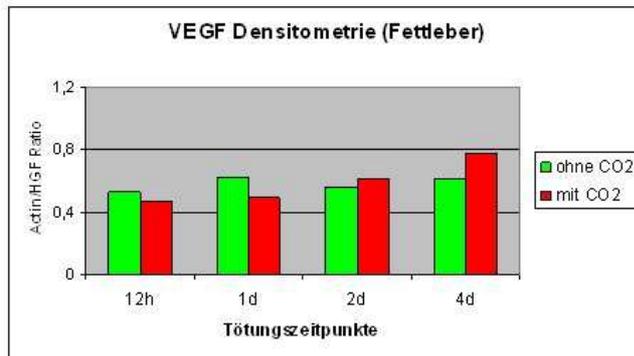
(A) VEGF (466 bp) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion im zeitlichen Verlauf. (B), (C) Densitometrie Analyse der VEGF Expression bei gesunder und Fettleber mit und ohne CO₂- Pneumoperitoneum.



(B)



(C)



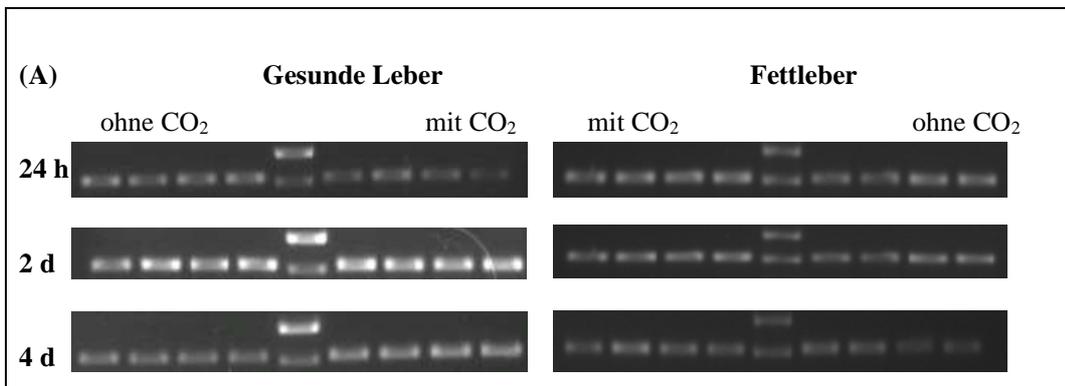
Regenerationshemmende Faktoren TGF- β und IL-1 β

2.10. TGF- β (Transforming growth factor- β)

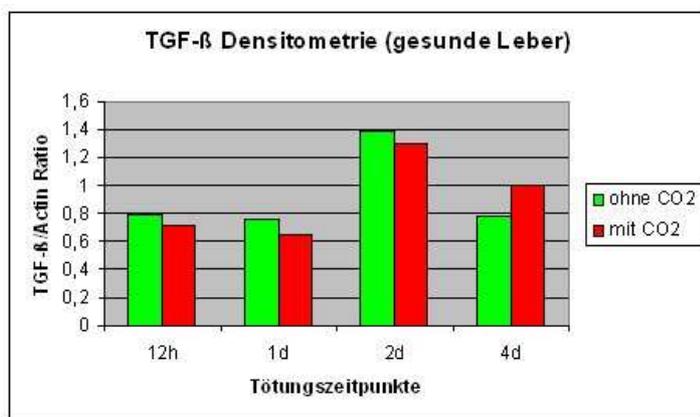
Bei den gesunden Tieren war die mRNA Expression des Regenerationsinhibitors TGF- β in beiden Gruppen am 2. postoperativen Tag am deutlichsten ausgeprägt (Abb. 30). In der CO₂-Pneumoperitoneum Gruppe war in der Frühphase der Regeneration die TGF- β mRNA schwächer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe ohne CO₂-Pneumoperitoneum. Am 4. postoperativen Tag war die Konzentration des TGF- β in der Gruppe ohne CO₂ geringer als in der Vergleichsgruppe. Bei den Tieren mit Fettleber war die mRNA Expression von TGF- β mit CO₂-Pneumoperitoneum stärker als in der Vergleichsgruppe ohne CO₂-Pneumoperitoneum.

Abbildung 30 Darstellung der mRNA Expression des Regenerationsinhibitors TGF- β

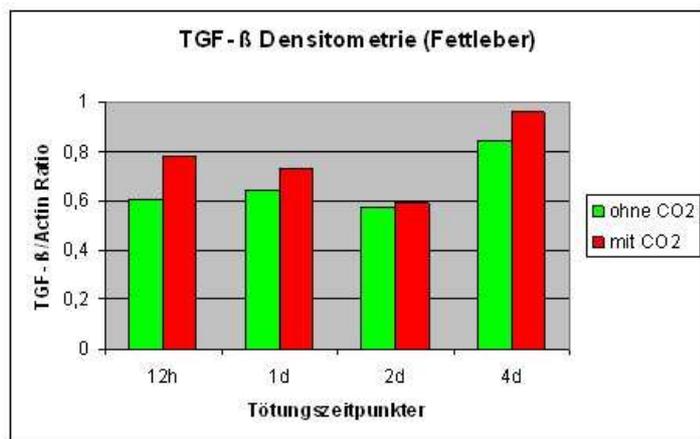
(A) TGF- β (406 bp) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion im zeitlichen Verlauf. (B), (C) Densitometrie Analyse der IL-1 β Expression bei gesunder und Fettleber mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum.



(B)



(C)

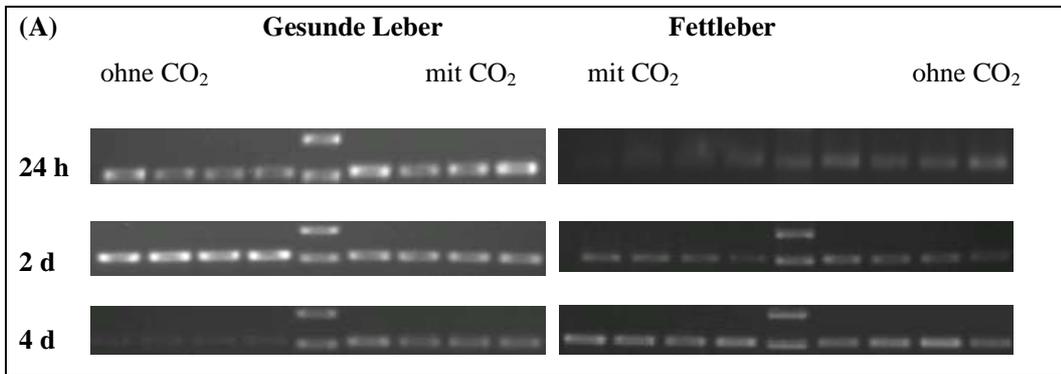


2.11. IL-1 β (Interleukin-1 β)

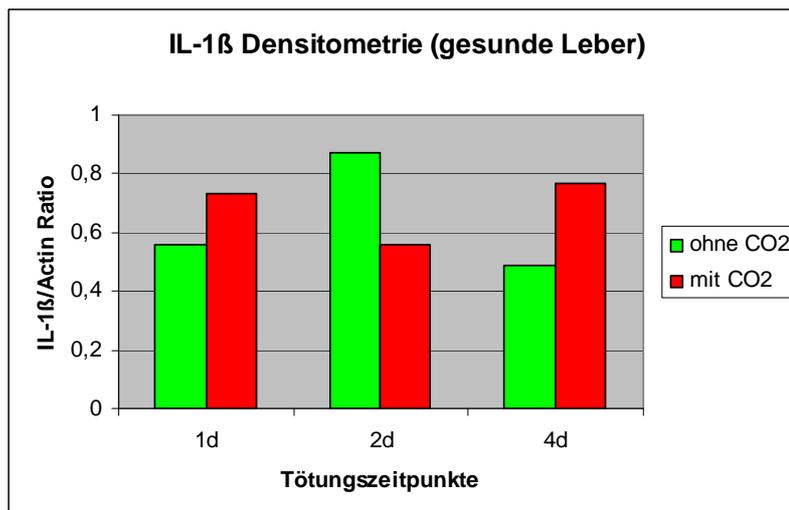
Bei den gesunden Tieren war der Nachweis der IL-1 β im Lebergewebe am 1. postoperativen Tag in der Gruppe mit CO₂-Pneumoperitoneum stärker ausgeprägt als bei den Tieren ohne CO₂-Pneumoperitoneum (Abb. 31). Am zweiten postoperativen Tag war die Expression des IL-1 β dagegen in der Gruppe der Tiere ohne CO₂-Pneumoperitoneum stärker. Am 4. postoperativen Tag war wiederum in der Gruppe der Tiere mit CO₂-Pneumoperitoneum die Expression der mRNA des IL-1 β deutlich stärker als in der Vergleichsgruppe ohne CO₂-Pneumoperitoneum.

Abbildung 31 Darstellung der mRNA Expression des Regenerationsinhibitors IL-1 β

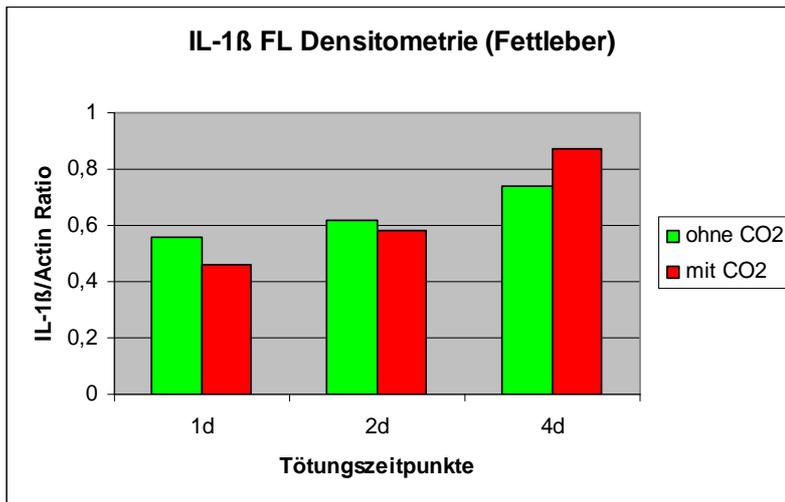
(A) IL-1 β (306 bp) mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion im zeitlichen Verlauf. (B), (C) Densitometrie Analyse der IL-1 β Expression bei gesunder- und Fettleber mit und ohne CO₂-Pneumoperitoneum.



(B)



(C)



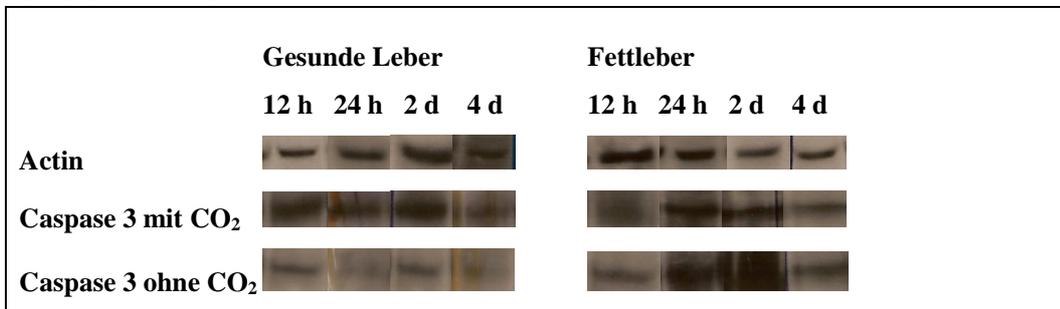
Apoptose

2.12. Caspase 3

Der Proteinnachweis des Apoptoseparameters Caspase 3 war bei den gesunden Tieren in der Gruppe mit CO₂-Pneumoperitoneum deutlich stärker ausgeprägt als in der Vergleichsgruppe ohne CO₂-Pneumoperitoneum (Abb. 32). Im zeitlichen Verlauf konnte kein Unterschied hinsichtlich der Bandenstärke ausgemacht werden. Bei den Tieren mit Fettleber fand sich kein Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Pneumoperitoneum.

Abbildung 32 Darstellung der mRNA Expression von Caspase 3

Caspase 3 (35 kd) mit und ohne CO₂- Pneumoperitoneum nach Leberteilresektion im zeitlichen Verlauf.



2.13 Tunel

Bei der Tunel Färbung zeigte sich insgesamt eine schwache apoptotische Aktivität (Tab. 31, 32). Der stärkste Apoptose Nachweis ließ sich bei den gesunden Tieren nach CO₂-Pneumoperitoneum nachweisen. Bei den Tieren mit Fettleber war die apoptotische Aktivität insgesamt geringer bis gar nicht ausgeprägt als bei den gesunden Tieren.

Tabelle 31 Semiquantitative Auszählung der Tunel Färbung bei gesunder Leber

Zeitpunkt	Tunel positive Zellen Gesunde Leber mit CO ₂	Tunel positive Zellen Gesunde Leber ohne CO ₂
d1	+	(+)
d2	+	(+)
d4	+	(+)

Tabelle 32 Semiquantitative Auszählung der Tunel Färbung bei Fettleber

Zeitpunkt	Tunel positive Zellen Fettleber mit CO ₂	Tunel positive Zellen Fettleber ohne CO ₂
d1	(+)	(-)
d2	(+)	(-)
d4	(+)	(-)

E Diskussion

1. Pneumoperitoneum und hepatozelluläre Schädigung

Laparoskopische Operationen mit CO₂-Pneumoperitoneum führen über einen erhöhten intraabdominellen Druck zu einer temporären Reduktion der visceralen Perfusion [Chiu 1995, Eleftheriadis 1998, Richter 2001, Junghans 2006]. In verschiedenen tierexperimentellen Modellen konnte durch das Kapnoperitoneum eine Verminderung der hepatischen-, renalen- und Splanchnikusdurchblutung von 10% bis 80% nachgewiesen werden [Rasmussen 1995, Schilling 1997, Jakimowicz 1998, Klopfenstein 1998, Sala-Blanch 1998, Takagi 1998, Gutt 1999, Schäfer 2001, Tunon 1999, Richter 2001, Junghans 2006]. In Bezug auf die Leberdurchblutung zeigte sich eine Abnahme der Perfusion mit steigendem intraperitonealem Druck [Gutt 1999, Richter 2001, Junghans 2006]. Gutt et al. bestimmten im Rattenmodell dopplersonographisch kontinuierlich die Pfortaderperfusion bei unterschiedlichen intraabdominellen Drücken und kam zum Ergebnis, dass es bereits bei PCO₂-Drücken von 2 mmHg zu einer Pfortaderflußreduktion von 22,3% kommt. Bei einer intraperitonealen Druckerhöhung auf 12 mmHg nahm die Pfortaderperfusion bereits um 84,4% ab [Gutt 1999]. Die arterielle Leberperfusion scheint hierbei weniger kompromittiert zu werden, was möglicherweise auf die stabilere Gefäßwand und den höheren Blutdruck zurückzuführen ist [Schäfer 2001]. Physiologisch wird bei portaler Minderperfusion die Leberperfusion über Autoregulationsmechanismen durch eine Erhöhung der arteriellen Durchblutung voll kompensiert. Im englischen wird dieser Mechanismus „hepatic arterial buffer response“ bezeichnet [Lautt 1985, Richter 2001]. Interessanterweise wird die Autoregulation der Leberdurchblutung durch das Kapnoperitoneum weitgehend außer Kraft gesetzt [Richter 2001]. Richter et al. konnten im Rattenmodell nachweisen, dass bei schrittweiser (5 minütlich) gesteigerter intraabdomineller CO₂-Druckerhöhung von 2 mm Hg auf 18 mmHg sowohl die portale als auch die arterielle Leberdurchblutung um etwa 50% reduziert wurden

[Richter 2001]. Die Autoren vermuten, dass der Autoregulationsmechanismus der Leberperfusion durch die metabolische Acidose einerseits und die Reduktion der Splanchnikusdurchblutung andererseits beeinträchtigt wird. Neben den hämodynamischen Auswirkungen des Kapnoperitoneums auf die intraabdominellen Organe wurde in mehreren tierexperimentellen und klinischen Studien die Leberfunktion bzw. der potentielle Leberzellschaden unter der Bedingung des CO₂-Pneumoperitoneums untersucht. In der Studie von Richter et al., in der bei der Ratte ein CO₂-Pneumoperitoneum von 18 mmHg für die Dauer von 2h erzeugt wurde, kam es unmittelbar nach Desufflation zu einem signifikanten Transaminasenanstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne CO₂-Pneumoperitoneum (AST 154 U/l vs. 81 U/l, p<0,01; ALT 136 U/l vs. 59 U/l, p<0,05) [Richter 2001]. In der Studie von Schemmer et al. kam es nach einem 90 minütigen Kapnoperitoneum von 8 mmHg 7 h nach Desufflation ebenfalls zu einem 1,5 fachen Transaminasenanstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe (AST 140 U/l vs. 90 U/l, p<0,05) [Schemmer 2005].

Welche klinische Relevanz kommt diesen Ergebnissen zu? In mehreren klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass es in den ersten postoperativen Tagen nach laparoskopischen Operationen mit CO₂-Pneumoperitoneum zu einem Anstieg der Leberenzyme kommt [Andrei 1998, Morino 1998, Saber 2000, Sato 2000, Hasukic 2005]. Die Höhe des Transaminasenanstiegs korrelierte bei Morino et al. mit der Operationsdauer und der Höhe des intraabdominellen CO₂-Drucks [Morino 1998]. Ähnliche Ergebnisse wurden von Hasukic et al. berichtet, der in einer prospektiv randomisierten Studie nachweisen konnte, dass die laparoskopische Cholecystektomie mit einem niedrigen CO₂-Druck (7 mmHg) mit einer signifikant niedrigeren Leberenzymerrhöhung als in der Kontrollgruppe, in der die Operation mit einem CO₂-Druck von 14 mmHg durchgeführt wurde [Hasukic 2005].

Die erhöhten Leberenzyme normalisierten sich nach laparoskopischer Cholecystektomie in der Regel nach 48 bis 72 h [Morino 1998, Hasukic 2005], in den Studien von Sakorafas et al. und Tan et al. fielen die erhöhten Transaminasen allerdings erst nach 7-10 Tagen in den Bereich der Normalwerte [Sakorafas 2005, Tan 2003]. Morino et al. und Hasukic et al. konnten darüber hinaus auch einen nichtsignifikanten postoperativen Anstieg des Serumbilirubins [Hasukic 2005] und eine nichtsignifikante Verlängerung der Prothrombinzeit feststellen [Morino 1998]. In keiner der Studien hatte jedoch die Leberzellschädigung einen sichtbar klinisch negativen Einfluss auf den postoperativen Verlauf. Während die meisten Patienten das Kapnoperitoneum offensichtlich gut tolerieren, gibt es Hinweise, dass durch das CO₂-Pneumoperitoneum die lokale hepatische Immunfunktion alteriert werden könnte. So zeigten Bendet et al., dass die Kupffer- und Endothelzellaktivität in den Lebersinusoiden bei Patienten nach laparoskopischer Cholecystektomie gestört ist [Bendet 1999]. Gutt et al. gelang es, im Rattenmodell eine Reduktion der Kupfferzellen sowie eine funktionelle Beeinträchtigung des mononukleären Phagozytensystems nach CO₂-Pneumoperitoneum nachzuweisen [Gutt 1999, 2002].

Interessanterweise zeigte sich, dass der Leberzellschaden und die Leberperfusion durch das CO₂-Pneumoperitoneum bei älteren Patienten (über 65 Jahre) signifikant stärker beeinträchtigt werden [Sato 2000]. Ursache ist einerseits ein erniedrigtes Blutvolumen sowie eine bei älteren Patienten oftmals vorhandene reduzierte Herzleistung. Insbesondere aber auch die steigende Prävalenz von Leberzellverfettung im Alter kann zur erhöhten Vulnerabilität der Leber unter Stressbedingung, wie es das CO₂-Pneumoperitoneum darstellt, beitragen. [Clark 2006]. In den Ländern der westlichen Welt liegt die geschätzte Prävalenz der (nicht alkoholbedingten) Fettleber immerhin zwischen 6% und 24% [Clark 2006].

So wie in der Literatur zeigen auch unsere Ergebnisse einen signifikanten Anstieg der Serumtransaminasen AST und ALT, der LDH und GLDH nach alleinigem CO₂-Pneumoperitoneum sowohl bei der gesunden als auch bei der Fettleber, wobei der maximale Anstieg 12 h postoperativ zu verzeichnen ist. Bereits nach 24 h ist ein deutlicher Rückgang der Serumkonzentration dieser Enzyme zu verzeichnen. Der signifikant stärkere Transaminasenanstieg in der Fettlebergruppe ist als Hinweis auf die größere Vulnerabilität verfetteter Lebern zu werten. Hierüber liegen in der Literatur keine vergleichbaren Daten vor. Tsuboi et al. zeigten, dass bei Ratten mit Leberzirrhose nach CO₂-Pneumoperitoneum die Gesamtleberperfusion im Vergleich zu gesunden Tieren signifikant niedriger ist [Tsuboi 2002].

Ähnlich wie bei den Versuchen ohne Resektion verhielt es sich bei den Untersuchungen mit 70%iger Leberteileresektion. Der Leberzellschaden war bei den gesunden und bei den Tieren mit einer Fettleber nach vorhergehendem CO₂-Pneumoperitoneum signifikant höher als bei den Tieren ohne CO₂-Pneumoperitoneum. Die Spitzenkonzentrationen wurden nach 12 h gemessen. Danach kam es zu einem kontinuierlichen, aber langsamen Abfall der Transaminasen, LDH und GLDH. Nach 7 Tagen pendelten sich Werte um den Normbereich herum ein. Auch in dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass es bei Tieren mit einer Fettleber zu einem signifikant größeren Leberzellschaden kam. Veteläinen et al. zeigten, dass Ratten mit einer schweren, über 60%igen Fettleber nach partieller Hepatektomie einen signifikant stärkeren hepatozellulären Schaden aufwiesen, als Tiere mit gesunder Leber [Veteläinen 2007]. Über den Einfluss eines Pneumoperitoneums auf die Fettleber liegen in der Literatur bislang keine Daten vor.

Die Ursachen der Leberzellschädigung unter CO₂-Pneumoperitoneum sind vielfältig und umfassen hämodynamische, metabolische, neurologische und humorale Veränderungen [Eleftheriadis 1996]. Zusätzlich kommt es durch die Induktion des CO₂-Pneumoperitoneums mit nachfolgender Desufflation zu einem Ischämie-Reperfusionsschaden mit gastrointestinaler Ischämie und oxydativem Stress. Mit dem Begriff „oxidativer Stress“ wird eine Imbalance zwischen Antioxidantien und Oxidantien zugunsten der Oxidantien beschrieben. Die physiologische Antwort auf ein operatives Trauma ist die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und inflammatorischer Zytokine [Vittimberga 1998]. Erst die exzessive Produktion von Sauerstoffradikalen wird für den Organismus gefährlich, da über Lipidperoxidation Zell- bzw. Organschäden hervorgerufen werden können. Sehr hohe Konzentrationen von freien Sauerstoffradikalen können schließlich auch zur Apoptose und Nekrose führen [Genestra 2007]. Nachgewiesen kommt es während Operationen mit Kapnoperitoneum zu oxidativen Stressreaktionen, die stärker ausgeprägt sind als bei vergleichbaren Eingriffen ohne intraabdominelle Druckerhöhung [Glantzounis 2001, Yilmaz 2003, Yilmaz 2004, Altindis 2004,]. Eleftheriadis et al. konnten im Rattenmodell bei einem Pneumoperitoneum von 15 mmHg eine signifikante Reduktion der Splanchnikusdurchblutung mit nachfolgender erhöhter bakterieller Translokation und Freisetzung von Sauerstoffradikalen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Pneumoperitoneum nachweisen [Elefthariadis 1996]. Die Metaboliten der Lipidperoxidation waren in unterschiedlichen tierexperimentellen Studien in der Dünndarmmukosa, Milz, Leber und Lunge und Niere nachweisbar [Elefthariadis 1996, Pross 2000, Altindis 2004]. Als Endprodukt der Lipidperoxidation ist Malondialdehyd als Indikator der oxidativen Stressreaktionen gut geeignet.

Parallel zur Freisetzung der Sauerstoffradikale kommt es zum Verbrauch von Antioxidantien, wie z.B. Glutathion und Glutathionreduktase [Glantzounis 2001]. Glantzounis et al. zeigten, dass die Lipidperoxidation bei Patienten nach laparoskopischer Cholecystektomie im Vergleich zu Patienten nach offener Cholecystektomie in der frühen postoperativen Phase signifikant stärker ausgeprägt ist und einhergeht mit einer signifikanten Reduktion der antioxidativen Kapazität. In der gleichen Studie konnte in der Gruppe der laparoskopisch operierten Patienten ein signifikanter Anstieg der Serumtransaminasen AST und ALT und der Bilirubinkonzentration im Serum beobachtet werden. Damit ließe sich der postoperative Anstieg der Leberenzyme als Ausdruck einer Leberzellschädigung nicht allein Ischämie bedingt, sondern durch das in Gang gesetzte Ischämie-Reperusionsphänomen erklären [Glantzounis 2001].

Über die Abhängigkeit der Ausprägung der oxidativen Stressreaktionen von der Höhe des verwendeten intraabdominellen Drucks gibt es in der Literatur kontroverse Ergebnisse. Insgesamt ist jedoch die Ausprägung der oxidativen Stress Antwort bei einem höheren intraabdominellen Druck (15 mmHg) stärker als bei niedrigeren Drücken (10 mmHg), wengleich der Unterschied nicht in allen Studien statistisch signifikant ist [Giraud 2001, Polat 2003, Cevrioglu 2004]. Obwohl der physiologische Pfortaderdruck beim Menschen sowie bei der Ratte zwischen 7 und 10 mmHg liegt, kommt es interessanterweise kommt es bereits bei intraabdominellen CO₂-Drücken von 5-6 mmHg zu oxidativen Stressreaktionen [Bentes de Souza 2003]. Auch Pross et al. Konnten im Rattenmodell nach einem nur 20 minütigem CO₂-Pneumoperitoneum von 6 mm Hg einen signifikanten Anstieg an Malondialdehyd im Lungengewebe messen [Pross 2000]. Bei einem Pneumoperitoneum von 7 mmHg werden bereits Leberzellschäden messbar [Schemmer 2004]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass möglicherweise nicht nur die Höhe des intraabdominellen Drucks für die Genese des oxidativen Stresses verantwortlich ist, sondern auch das verwendete Gas, in

der Regel CO₂ [Cevrioglu 2004]. Das CO₂-Pneumoperitoneum verursacht über eine systemische CO₂-Absorption eine metabolischen Azidose und Hyperkapnie, wodurch über eine Erhöhung des Gefäßwiderstands zur Vasokonstriktion und Hypoperfusion kommt [Mynbaev 2002, Hazebroek 2002]. Yilmaz et al. zeigten im Rattenmodell, dass bei intraabdominellen Drücken von 15 mmHg bei Verwendung von CO₂ signifikant mehr Lipidperoxidation stattfindet als bei einem Pneumoperitoneum mit Helium [Yilmaz 2004].

Die bislang vorliegenden Studien und auch unsere Ergebnisse zeigen, dass die oxidativen Stressreaktionen innerhalb der ersten postoperativen Stunden am stärksten ausgeprägt sind und dann schnell wieder rückläufig sind. Die damit einhergehenden Leberfunktionsstörungen sind ebenfalls nur in der frühen postoperativen Phase messbar. In den bislang vorliegenden Studien gibt es keinen Hinweis darauf, dass der postoperative Verlauf durch den oxidativen Stress bzw. die Leberfunktionsstörung negativ beeinflusst wurde. Bei Patienten ohne Vorschädigung der Leber, die kardiopulmonal stabil sind, ist die oxidative Schädigung durch das Pneumoperitoneum wahrscheinlich nur von akademischem Interesse. Allerdings zeigen unsere Ergebnisse auch, dass die hepatischen Funktionsveränderungen und das Ausmaß der oxidativen Schädigung bei vorgeschädigter Leber deutlich stärker ausgeprägt sind, als bei der gesunden Leber. Bei älteren Patienten mit hepatischen oder kardialen Dysfunktionen, könnte die Anwendung der laparoskopischen Chirurgie durchaus einen negativen Einfluss auf den postoperativen Verlauf haben, so dass bei diesem Patientenkollektiv die Indikation zur laparoskopischen Operation kritisch gesehen werden muss. Eine Möglichkeit, das Ausmaß der Leberschädigung zu reduzieren, ist die ischämische Präkonditionierung dar. Da die Anlage eines Pneumoperitoneums mit anschließender Desufflation ein Ischämie-Reperfusionmodell darstellt, wurde in mehreren Studien versucht, den Reperfusionsschaden durch eine vorherige ischämische Präkonditionierung zu begrenzen [Yilmaz 2003, Yilmaz 2004, Altindis 2004]. Die ischämische Präkonditionierung wurde durch eine dem länger

andauernden Pneumoperitoneum vorangehende kurzzeitige Erhöhung des intraabdominellen Druckes durchgeführt. In allen drei Studien zeigte sich, dass nach ischämischer Präkonditionierung der oxidative Stress [Yilmaz 2003] und der Anstieg der proinflammatorischen Zytokine im Lebergewebe [Altindis 2004] signifikant geringer ausgeprägt war als in den Vergleichsgruppen ohne ischämische Präkonditionierung. In der konventionellen Leberchirurgie wurde in mehreren tierexperimentellen und klinischen Studien die Effizienz einer präoperativen hochdosierten Glukokortikoid Verabreichung hinsichtlich der Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens nachgewiesen [Muratore 2003, Glanemann 2004, Aldrighetti 2006, Schmidt 2007]. Hier zeigte sich, dass die proinflammatorischen Interleukine IL-6 und Interleukin- α im Serum in den Untersuchungsgruppen, die vor der Leberresektion, eine - in der Regel einmalige - hochdosierte Glukokortikoid Infusion erhielten, signifikant niedriger waren als in den Vergleichsgruppen ohne medikamentöse Vorbehandlung. Ob die Methylprednisolongabe auch vor laparoskopischen (leberchirurgischen) Eingriffen, die postoperativen Stressreaktionen vermindern könnte, lässt sich derzeit nur vermuten. Hier stehen weitere experimentelle Studien aus. Dagegen wurde bereits ein weiteres Medikament - der Wachstumsfaktor Erythropoetin - im laparoskopischen Tiermodell zur Vorbehandlung eingesetzt, um den postoperativen oxidativen Stress zu reduzieren. So konnten Ates et al. im Rattenmodell zeigen, dass nach subkutaner Injektion von 1000 U/kg Erythropoetin vor Anlage eines 60 minütigen Pneumoperitoneums die postoperative Plasmakonzentration von LDH, MDA und TNF- α signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe ohne Vorbehandlung war [Ates 2006]. Allerdings war der protektive Effekt des Erythropoetins im Vergleich zur ischämischen Präkonditionierung weniger stark ausgeprägt. Interessant wäre auch hier die Fragestellung, ob präoperativ appliziertes Erythropoetin vor laparoskopischen Leberteilresektionen den Ischämie-Reperfusionsschaden reduzieren könnte.

Unsere Versuche bestätigten die oxidativen Stressreaktionen in der Leber unter dem Einfluss des Pneumoperitoneums. Das Pneumoperitoneum hatte einen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von Malondialdehyd. Wahrscheinlich kommt es durch das Pneumoperitoneum zu einer Potenzierung der zellulären Schädigung. Bei den Tieren mit einer Fettleber war die Lipidperoxidation deutlich stärker ausgeprägt. Ursache hierfür ist möglicherweise eine geringere Konzentration an Antioxidantien in verfetteten Lebern [Veteläinen 2007]. Die Möglichkeit einer Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens durch eine ischämische Präkonditionierung vor Leberteilresektion im Zusammenhang mit einem Pneumoperitoneum muss in weiteren Studien untersucht werden. Neben dem Anstieg des Malondialdehyds nach Pneumoperitoneum war in unserem Modell auch die stärkere Aktivität der Myeloperoxidase, dem Markerenzym der aktivierten neutrophilen Granulozyten, im Lebergewebe nach Pneumoperitoneum zu sehen. Es ist bekannt, dass aktivierte neutrophile Granulozyten eine Reihe von freien Sauerstoffradikalen freisetzen, die wiederum die Lipidperoxidation in Gang setzen. Ähnlich wie Pross et al. [Pross 2000] beobachteten wir, dass die Lipidperoxidation bereits früher stattfindet als der Anstieg von MPO zu beobachten ist. Diese Beobachtung untermauert die zentrale Bedeutung des Pneumoperitoneums für die Entstehung der oxidativen Stressreaktion.

2. Zytokine

Zytokine stellen die Hauptmediatoren der akuten Phase-Reaktion nach einem chirurgischen Trauma dar. Sie induzieren eine Vielzahl metabolischer und immunologischer Antworten und können, bei überschießender Produktion zur Dysfunktion einzelner Organe bis hin zum Multiorganversagen führen [Guirao 1996].

Unter der Vielzahl von Zytokinen spielen insbesondere IL-6 und TNF- α eine herausragende Rolle als proinflammatorische Mediatoren der akute-Phase Reaktion. Nach einem chirurgischen Trauma kommt es zunächst zur verstärkten Produktion und Freisetzung von TNF- α aus und Monocyten/Makrophagen sowie aus T-Zellen [Biffi 1996]. Neben den peritonealen Monocyten/Makrophagen stellt der Verbund der Kupfferschen Sternzellen das größte Reservoir an Monocyten/Makrophagen dar [Vittimberga 2000]. TNF- α induziert die Produktion und Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine, einschließlich des IL-6, das praktisch ubiquitär gebildet wird, wobei die Kupfferschen Sternzellen auch hier das größte zusammenhängende Reservoir als Produktionsort darstellen [Vittimberga 2000]. Zusammen mit TNF- α reguliert das IL-6 die Synthese und Freisetzung von akute-Phase Proteinen, wie das CRP, alpha-2-macroglobulin und Fibrinogen [Wortel 1993]. Darüber hinaus sind IL-6 und TNF- α Mediatoren der durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten induzierten inflammatorischen Reaktionen [Biffi 1996]. Aktivierte polymorphkernige Granulozyten setzen ihrerseits freie Sauerstoffradikale (u.a. Superoxid Anion, Hydrogen peroxide, Hydroxyl radical, Peroxynitrit) frei und führen damit zu oxidativem Stress [Wortel 1993]. Die Ausprägung der IL-6 und TNF- α Produktion und deren Freisetzung ist vom Schweregrad des Traumas bzw. des chirurgischen Eingriffs abhängig [Biffi 1996]. In verschiedenen prospektiv randomisierten klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass laparoskopische Eingriffe als Ausdruck eines geringeren Gewebetraumas mit einer geringeren Freisetzung von proinflammatorischen Interleukinen (i.d.R. IL-6) einhergehen als offene Operationen [Schwenk 2000, Schietroma 2004, Kloosterman 1994]. In diesen Studien wurden laparoskopische Cholecystektomien und kolorektale Eingriffe mit entsprechenden konventionellen Eingriffen verglichen.

Obwohl nach laparoskopischen Operationen die systemische akute-Phase Reaktion - wahrscheinlich aufgrund des geringeren Gewebetraumas - geringer ausgeprägt ist, wird durch

das CO₂-Pneumoperitoneum die lokale Immunantwort durch Schädigung der peritonealen und hepatischen Makrophagen eher beeinträchtigt [Gutt 1997]. Nach CO₂-Laparoskopie wurden im Rattenmodell niedrigere TNF- α , IL-1- β , Stickoxid (NO) und induzierbare NO-Synthetase-Konzentrationen in peritonealen Makrophagen als in Vergleichsgruppen ohne CO₂-Pneumoperitoneum gemessen [Sylla 2005]. In weiteren tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Clearancekapazität [Jakobi 1998], die Phagozytosefähigkeit und die Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen der Peritonealmakrophagen nach CO₂-Pneumoperitoneum im Vergleich zur Laparotomie bzw. Laparoskopie mit Luft oder Helium reduziert ist [Sylla 2005]. In vitro Studien zeigten eine intrazelluläre Acidose mit signifikantem Kalziumanstieg [Wildbrett 2003], einhergehend mit einer signifikanten Abnahme der Zytokinproduktion [West 1997]. Über 90% des mononukleären Phagozyten Systems (MPS) sind in der Leber lokalisiert, das durch die Kupfferschen Sternzellen repräsentiert wird und eine entscheidene Rolle bei lokalen Abwehrmechanismen gegen zirkulierende Tumorzellen und Bakterien spielt [Malter 1986]. Im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens werden die Kupfferschen Sternzellen unmittelbar nach Reperfusion aktiviert und produzieren freie Sauerstoffradikale, proinflammatorische Zytokine und Adhäsionsmoleküle [Kimura 2006]. Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommt es zur Migration von neutrophilen Granulozyten in das Leberparenchym, wo sie durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen direkt die Hepatozyten schädigen [Jaeschke 1997]. Die Auswirkung des CO₂-Pneumoperitoneums auf die Funktion der Kupfferschen Sternzellen ist bislang nicht bis ins Detail geklärt. Im Rattenexperiment konnten Gutt et al. zeigen, dass die Zahl der Kupfferzellen nach Pneumoperitoneum mit CO₂ im Vergleich zur gaslosen Laparoskopie signifikant vermindert war [Gutt 2002]. In einer weiteren tierexperimentellen Studie am Rattenmodell zeigten Vittimberga et al., dass die Phagozytenfunktion der Kupfferschen Sternzellen, gemessen anhand der LPS-stimulierten Produktion von IL-6 und TNF- α in der Laparoskopie-,

Laparotomie- und Kontrollgruppe gleich war [Vittimberga 2000]. Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse einer weiteren Studie eine Steigerung der Phagozytosefähigkeit der Kupfferschen Sternzellen unter dem Einfluss eines CO₂-Pneumoperitoneums [Nickkholgh 2007]. Die Phagozytosekapazität der Kupfferschen Sternzellen wurde in dieser Studie anhand von phagozytierten Latexpartikeln bestimmt [Nickkholgh 2007]. Ähnlich wie in der Literatur zeigten unsere Untersuchungen ein signifikant erhöhtes IL-6 sowohl in der Gruppe der gesunden Lebern als auch in der Gruppe der Fettlebern unter dem Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums deutlich höher als in den entsprechenden Kontrollgruppen.

Die Ursache der erhöhten IL-6 und Produktion ist multifaktoriell. Jedoch führt die Leberteileresektion an sich bereits zu einer Expression von Zytokinen in der Restleber, wobei hier insbesondere IL-6, TNF- α und IL-10 produziert werden [Diehl 2000]. Aber auch der Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums führt bereits an sich zu einer Expression von IL-6 und TNF- α im Lebergewebe und zu einer erhöhten Konzentration dieser Interleukine im Serum [Altindis 2004, Cevrioglu 2004]. Zwar ist die überschießende, exzessive Produktion von proinflammatorischen Zytokinen mit dem Auftreten von postoperativen Infektionen bis hin zur Multiorgandysfunktion assoziiert [Biffl 1996]. Auf der anderen Seite ist aber das IL-6 jedoch essentiell für die Triggerung der Hepatozytenproliferation im Rahmen der Leberregeneration [Streetz 2000]. Das IL-6 führt dabei zu einer Aktivierung von einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, u.a. „signal transducers and activators of transcription“ (STAT) Proteine, was wiederum dazu führt, dass die Hepatocyten aus ihrem Ruhestadium (G0-Phase) in die präreplikative Phase (G1-Phase) übergehen [Court 2002, Streetz 2000]. Dem IL-6 wird bei der Induktion der Leberregeneration eine Führungsrolle zugeschrieben [Cressman 1996, Greenbaum 1998]. Eine Überstimulation durch IL-6 während der Leberregeneration führt dagegen zu einer deutlichen Verzögerung der Leberregeneration [Streetz 2000]. Verschiedene Autoren zeigten, dass die Konzentration von proinflammatorischen Interleukinen im Plasma

und Lebergewebe von Ratten mit einer Fettleber bereits präoperativ höher als bei gesunden Tieren ist [McCuskey 2004, Yang 1997].

3. Pneumoperitoneum und Leberregeneration bei der gesunden und bei der Fettleber

Es sind bislang erst wenige Studien durchgeführt worden, die den Einfluss eines Pneumoperitoneums auf die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie untersucht haben. Dabei ist genauere Erforschung der Zusammenhänge zwischen Leberregeneration und Pneumoperitoneum wichtig, da die Indikationsstellung zur laparoskopischen Leberchirurgie zunehmend ausgeweitet wird bis hin zur Durchführung laparoskopischer Leber-Lebendspende Operationen [Cuomo 2006, Koffron 2006]. Jüngere Untersuchungen zeigen, dass die intraabdominelle Druckerhöhung einen negativen Einfluss auf die postoperative Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie hat [Kaya 2002, Yagmurdur 2004]. Kaya et al. konnten im Rattenmodell nachweisen, dass nach 24 stündigem CO₂-Pneumoperitoneum (12-14 mm Hg) und anschließender 2/3-Hepatektomie sowohl die hepatozelluläre Schädigung als auch die Leberregeneration am 1. und am 4. postoperativen Tag signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe ohne Pneumoperitoneum war [Kaya 2002]. Die Leberzellschädigung wurde durch die Messung der Serumkonzentration der AST gemessen. Als Indikatoren der Zellproliferation wurden in dieser Studie der Mitoseindex und PCNA (proliferating cell nuclear antigen) positive Hepatozyten verwendet. Ähnliche Ergebnisse wurden von Yagdurmur et al. gezeigt [Yagmurdur 2004]. In dieser Studie war die Leberregeneration in der Gruppe mit Pneumoperitoneum (60 Minuten, 15 mm Hg) signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe ohne Pneumoperitoneum. Yagdurmur et al. untersuchten die Leberregeneration am 5. postoperativen Tag. Als Parameter der Leberregeneration wurde auch hier PCNA verwendet. Interessanterweise waren in der Gruppe mit Pneumoperitoneum, die postoperativen Serumkonzentrationen an IL-6 und TNF- α signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe der Tiere, die ohne vorheriges Pneumoperitoneum partiell hepatektomiert

wurden. Da die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 für die Leberregeneration eine essentielle Bedeutung haben diskutieren die Autoren über einen möglichen Zusammenhang zwischen der erniedrigten Zytokinkonzentration und der geringeren Leberregenerationskapazität nach Leberteilesektion mit vorausgegangenem CO₂ Pneumoperitoneum [Yagmurdu 2004]. Während die Studie von Kaya et al. aufgrund der Dauer des Pneumoperitoneums von 24 h kaum auf die klinischen Bedingungen einer laparoskopischen Leberteilesektion übertragen werden kann, kommt der Versuchsaufbau von Yagmurdu et al. der klinischen Situation näher.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein 60 minütiges CO₂-Pneumoperitoneum mit einem intraabdominellen Druck von 9 mm Hg vor partieller Hepatektomie die Leberregeneration im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne Pneumoperitoneum signifikant beeinträchtigt. Sowohl bei der gesunden Leber, aber noch viel stärker ausgeprägt bei der Fettleber sind die Regenerationsparameter Ki-67, Mitoserate und postoperative Zunahme an Lebermasse nach vorangegangenem Pneumoperitoneum geringer ausgeprägt. Die Leberregeneration war bei den Fettlebertieren im Vergleich zu den gesunden Tieren signifikant schlechter. Durch das Pneumoperitoneum kam es zu einer weiteren Beeinträchtigung der Leberregeneration. In der Literatur sind verschiedene Fettlebermodelle beschrieben, mit denen die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie untersucht wurde (Tab.33).

Tabelle 33 Verschiedene Tiermodelle zur Untersuchung der Leberregeneration bei der Fettleber nach partieller Hepatektomie

Autor/Jahr	Modell	Regeneration
Zhang 1999	MCDD, 68%ige Hepatektomie	=
Selzner 2000	Zucker Ratten, 70%ige Hepatektomie	↓
Rao 2001	CD, 70%ige Hepatektomie	= (bei Fettleber, verspätet einsetzend)
Picard 2002	Zuckerratten, 70%ige Hepatektomie	↓
	MCDD, 70%ige Hepatektomie	=
	Orotic acid, 70%ige Hepatektomie	=
Veteläinen 2007	MCDD, 70%ige Hepatektomie	=
	30% Steatosis	↓
	70% Steatosis	↓

MCDD: Methionine- and Choline deficient diet, CD: Choline deficient diet

Die Ergebnisse bei diätetisch erzeugten Fettlebern (CD, MCDD) sind hinsichtlich der Leberregeneration unterschiedlich. Selzner et al. und Picard et al. konnten bei Zucker Ratten eine signifikante Reduktion der Proliferation nach partieller Hepatektomie zeigen [Selzner 2000, Picard 2002]. Im Gegensatz dazu war die Leberregeneration bei MCDD bzw. CD induzierten Fettlebern in einigen Studien nicht beeinträchtigt [Zhang 1999, Picard 2002]. Rao et al. zeigten eine verzögert einsetzende Leberregeneration bei CD Ratten im Vergleich zu gesunden Tieren [Rao 2001]. Die unterschiedlichen Ergebnisse machen deutlich, dass die Fettleber an sich nicht unbedingt zu einer Hemmung der postoperativen Leberregeneration führt. Wahrscheinlich ist das Ausmaß der Verfettung für den Proliferationsverlauf maßgeblich entscheidend. So konnten Veteläinen et al. zeigen, dass die schwere Steatosis hepatis (>60% der Hepatozyten verfettet) im Vergleich zur milden Steatosis hepatis zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Leberregeneration nach 70%iger Hepatektomie führt [Veteläinen 2007]. Auch in unserer Studie kam es durch die MCDD zu einer über 60%igen Leberzellverfettung, so dass die Ergebnisse mit denen von Veteläinen übereinstimmen. In den Studien von Zhang et al., Picard et al. und Rao et al. wurde das Ausmass der Leberzellverfettung nicht exakt angegeben [Zhang 1999, Rao 2001, Picard 2002]. Bei den Zucker Ratten ist die Situation

noch einmal anders, denn die Fettleber ist hier nicht diätetisch bedingt, sondern durch das Fehlen von zentralen Leptinrezeptoren. Hierdurch kommt es zu einer Vielzahl von metabolischen Störungen, wie Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und Hyperlipidämie, die alle indirekt negativ auf die Hepatozytenproliferation wirken [Kaplan 1998]. Wie weiter oben bereits diskutiert ist möglicherweise der exzessive Anstieg der proinflammatorischen Enzyme mitentscheidend für die postoperative Regenerationshemmung der Hepatozyten. Interessanterweise zeigte sich in unserer Studie, dass unter dem Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums der Wachstumsfaktor HGF stärker exprimiert wurde als in der Vergleichsgruppe. HGF gehört zu den Wachstumsfaktoren, die für die Zellzyklusprogression eine entscheidende Rolle spielen [Fausto 2006]. HGF induziert DNA Synthese in den Hepatozyten und aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege, die für die Zellzyklusprogression und für das Zellüberleben verantwortlich sind [Fausto 2006]. Der stärkste Anreiz für die mesenchymalen Zellen, HGF zu produzieren stellt ein Lebertrauma dar [Court 2002]. Durch das Pneumoperitoneum wird das durch die partielle Hepatektomie induzierte Trauma wahrscheinlich potenziert, dass die stärkere Expression des HGF hierdurch erklärt werden könnte. Trotz der vermehrten HGF Ausschüttung bei den Tieren mit Pneumoperitoneum war die Leberregeneration gehemmt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass HGF erst dann seine Wirkung entfaltet, wenn die Zellen aus der G₀- in die G₁-Phase übergetreten sind. Die Hemmung der Proliferation durch das Pneumoperitoneum könnte also bereits in der Priming Phase beginnen. Der zweite untersuchte Wachstumsfaktor VEGF ist besonders in der Frühphase der Leberregeneration von großer Bedeutung [Sowa 2008]. VEGF gehört zu den stärksten Angiogenesefaktoren und führt in der sich regenerierenden Leber zur Proliferation von Endothelzellen aber auch von Hepatozyten innerhalb der ersten 24 h nach partieller Hepatektomie [Sowa 2008]. Wir konnten nachweisen, dass VEGF im Lebergewebe nach Pneumoperitoneum geringer exprimiert wurde als in der Kontrollgruppe.

Bei den Tieren mit Fettleber kam es zu einem zeitlich verzögerten Anstieg der VEGF Konzentration, wobei sich kein Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Pneumoperitoneum nachweisen ließ. Über den direkten Einfluss eines Pneumoperitoneums auf die Wachstumsfaktoren HGF und VEGF sind uns keine Untersuchungen bekannt. Fine et al. konnten eine höhere VEGF Konzentration nach konventionellen Kolonresektionen im Vergleich zu laparoskopischen Kolonresektionen feststellen [Fine 2003]. Der größere VEGF Anstieg wurde von den Autoren mit dem größeren chirurgischen Stress bei der konventionellen Kolonresektion erklärt.

Die Regenerationshemmung, die wir nach Pneumoperitoneum beobachteten ließ sich nicht durch die inhibitorischen Zytokine TGF- β und IL-1 β erklären. Hier zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Kopernik et al. in einem in vitro Versuch, bei dem humane Peritonealmakrophagen einem CO₂-Pneumoperitoneum Modell ausgesetzt waren, eine temporäre Hemmung der IL-1 β Sekretion nachweisen [Kopernik 1998].

Schließlich untersuchten wir, ob der Regenerationshemmung nach Pneumoperitoneum eine verstärkte Apoptoseinduktion zu Grunde liegt. Unsere Ergebnisse zeigten bei den gesunden Tieren eine leicht verstärkte Caspase 3 Aktivität nach Pneumoperitoneum. Somit könnte zumindest bei den gesunden Tieren das Pneumoperitoneum über diesen Weg zu einer Hemmung der postoperativen Leberregeneration führen. In der Literatur gibt es kaum Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Pneumoperitoneum und Apoptose. Arikan et al. wiesen im Rattenmodell ebenfalls eine verstärkte Apoptose in der Leber nach einem CO₂-Pneumoperitoneum nach [Arikan 2007]. Bei den Fettlebern ist die Situation hinsichtlich der Apoptose etwas anders, denn hier liegt eine Störung der Aktivierung des Apoptosemechanismus vor. So konnten Selzner et al. eine signifikant geringere Aktivität an

intrazellulären Apoptosemediatoren, wie Caspase 3, Caspase 8 und Zytochrom c bei Tieren mit Fettleber im Vergleich zu gesunden Tieren nachweisen [Selzner 2000].

In klinischen Studien, die den Einfluss der Steatosis hepatis auf den postoperativen Verlauf nach Leberteilesektion oder Lebertransplantation untersuchen, zeigte sich, dass ab einer Leberzellverfettung von über 30% die Komplikationsrate zunimmt. Kooby et al. konnten bei 485 Patienten nach Leberteilesektion eine signifikant höhere Rate an hepatobiliären und gastrointestinalen Komplikationen sowie Wundinfektionen bei Patienten mit einer Fettleber von über 30% im Vergleich zu Patienten mit gesunder bzw. geringgradiger Leberzellverfettung nachweisen [Kooby 2003]. Auch in einer Studie von Belghiti et al. mit 478 Patienten nach Leberteilesektion - davon 37 Patienten mit einer über 30%igen Fettleber - war die postoperative Morbidität bei den Patienten mit Fettleber signifikant erhöht [Belghiti 2000]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren publiziert (Tab. 34).

Tabelle 34 Postoperative Morbidität nach Leberteilresektion bei Patienten mit Fettleber

Autor	Jahr	Steatosis (%)	Patienten	Komplikationen (%)	p-Wert	Mortalität (%)	p-Wert
Behrns	1998	keine	72	10	k.A.	3	k.A.
		<30%	56	14		7	
		>30%	7	29		14	
Belghiti	2000	keine	441	8	0,003	1	0,5
		>30%	37	22		0	
Jarnagin	2002	keine	1275	48	0,197	3,9	0,309
		>30%	380	44		2,8	
Kooby	2003	keine	160	35	0,01	3,1	0,29
		<30%	223	48		3,6	
		>30%	102	62		5,9	
Cho*	2006	<5%	36	22	n.S.	0	k.A.
		5-30%	18	33		0	
Mc Cormack	2007	keine	58	6,9	0,001	1,7	0,21
		>10%	58	27		8,6	

*Leberlebendspende-Hepatektomie, k.A.: keine Angabe, n.S.: nicht signifikant

Auch in der Lebertransplantation hat die Steatosis hepatis einen negativen Einfluss auf den postoperativen Verlauf. Bei stark verfetteten Lebern (>60%) ist beispielsweise das Risiko einer initialen Non- bzw. Dysfunktion sehr hoch [Selzner 2001]. Hinsichtlich der Leberregeneration bei der Fettleber gibt es nur wenige klinische Studien. Cho et al. zeigten, dass die Regeneration nach Spenderhepatektomie bei Patienten mit bis zu 30%iger Fettleber im Vergleich zu bis zu 5%iger Leberzellverfettung in der frühen postoperativen Phase verzögert stattfindet [Cho 2006]. Über den Einfluss des Pneumoperitoneums auf die Fettleber gibt es in der aktuellen Literatur keine Daten. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass bei Steatosis hepatis einerseits der hepatozelluläre Schaden durch das Pneumoperitoneum größer ist als bei gesunden Lebern. Auch die Leberregeneration war im Fettlebermodell nach vorausgegangenem Pneumoperitoneum im Vergleich zur gesunden Leber reduziert.

Welche klinische Relevanz haben unsere Ergebnisse? Die Indikation zu größeren laparoskopischen Leberteilresektionen sollte bei ausgeprägter Steatosis hepatis aufgrund des erhöhten Risikos des stärkeren hepatozellulären Schadens mit möglicher Beeinträchtigung der postoperativen Regeneration besonders kritisch gestellt werden. Auch die laparoskopische Leberlebendspende bei Patienten mit stärkerer Leberzellverfettung sollte vermieden werden, wobei eine abschließende Empfehlung auf der Grundlage der bisher vorliegenden Daten sicher nicht erlaubt ist. Weitere experimentelle Studien, die auch protektive Massnahmen einschließen sollten sind notwendig.

F Zusammenfassung

In unserer Arbeit wurde der Einfluss des CO₂-Pneumoperitoneums auf die gesunde und auf die Fettleber im Rattenmodell untersucht. Hauptzielkriterien waren das Ausmass der hepatozellulären Schädigung sowie die Evaluierung der postoperativen Leberregeneration. Darüber hinaus wurde der Einfluss des Pneumoperitoneums auf die Ausprägung der oxidativen Stressreaktion und die Ausschüttung des proinflammatorischen Interleukin-6 untersucht.

Hierfür wurden im ersten Versuchsabschnitt sowohl gesunde Tiere als auch Tiere mit einer diätetisch (Methionine und Choline defiziente Diät) induzierten Fettleber einem 60 minütigem CO₂-Pneumoperitoneum mit einem intraabdominellen Druck von 9 mmHg unterzogen. Im zweiten Versuchsabschnitt erfolgte nach dem 60 minütigem CO₂-Pneumoperitoneum die 70% Hepatektomie.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die alleinige 60 minütige Verabreichung eines CO₂-Pneumoperitoneums von 9 mmHg bereits bei der gesunden Rattenleber zu einem erheblichen Anstieg der Transaminasen, der GLDH und der LDH führte. Bei einer vorbestehenden Steatosis hepatis war die hepatozelluläre Schädigung nach dem CO₂-Pneumoperitoneum signifikant stärker ausgeprägt als es bei der gesunden Leber der Fall war.

Auch nach einer 70%igen Leberteileresektion war das Ausmass des hepatozellulären Schadens mit CO₂-Pneumoperitoneum signifikant stärker als ohne CO₂-Pneumoperitoneum. Auch hier zeigte sich ein größerer Schaden bei Tieren mit Steatosis hepatis. Weiterhin zeigte sich, dass die oxidative Stressreaktion - gemessen an Malondialdehyd im Lebergewebe - nach CO₂-Pneumoperitoneum sowohl bei den gesunden als auch bei den Tieren mit Fettleber signifikant stärker als ohne CO₂-Pneumoperitoneum war. Auch die Ausschüttung des proinflammatorischen Interleukin-6 war nach CO₂-Pneumoperitoneum bei den gesunden und bei den Tieren mit Fettleber signifikant verstärkt. Im Fettlebermodell war die Lipidperoxidation bereits ohne CO₂ Applikation signifikant stärker ausgeprägt als bei den gesunden Tieren.

Unsere Versuche zeigten, dass das CO₂-Pneumoperitoneum einen negativen Effekt auf die postoperative Leberregeneration hatte. Sowohl die Mitoserate als auch der Nachweis des Zellkernproteins Ki-67 waren bei den gesunden und deutlicher noch bei den Tieren mit Fettleber in den CO₂-Pneumoperitoneum Gruppen signifikant erniedrigt. Die postoperative Zunahme des Lebergewichts war ebenfalls in den Gruppen mit CO₂-Pneumoperitoneum erniedrigt. Auch auf den Zellzyklusstimulator Cyclin D1 hatte das CO₂-Pneumoperitoneum einen negativen Effekt. Unabhängig vom Pneumoperitoneum war die Leberregeneration bei den Tieren mit Steatosis hepatis im Vergleich zu den gesunden Tieren eingeschränkt.

Als eine der Ursachen der verminderten Regeneration kommt die in stärkerem Ausmaß nachgewiesene oxidative Schädigung der Leber sowie die ausgeprägtere Interleukin-6 Ausschüttung nach vorangegangenen CO₂-Pneumoperitoneum in Betracht. Dagegen ergaben die Ergebnisse der Untersuchungen der Wachstumsfaktoren HGF und VEGF sowie der Regenerationsinhibitoren TGF- β und Interleukin 1- β kein wegweisendes Bild. Zwar war die Expression des VEGF nach vorangegangenen Pneumoperitoneum schwächer als in der Vergleichsgruppe ohne Pneumoperitoneum. Umgekehrt dagegen verhielt es sich mit der Expression des Wachstumsfaktors HGF, die bei den Tieren mit Pneumoperitoneum stärker nachweisbar war. Bei den gesunden Tieren war die Apoptose nach Pneumoperitoneum stärker ausgeprägt als bei den Tieren ohne Pneumoperitoneum. Bei den Tieren mit Steatosis hepatis hatte das Pneumoperitoneum dagegen keinen sichtbaren Einfluss auf die Apoptose.

Die hier erhobenen Daten zeigen insgesamt einen negativen Effekt des CO₂-Pneumoperitoneums auf die hepatozelluläre Integrität und die Leberregeneration. Bei der Indikationsstellung zu erweiterten laparoskopischen Leberteilresektionen sollte - insbesondere bei vorgeschädigter Leber - der potentielle Nachteil eines Pneumoperitoneums mit berücksichtigt werden.

Literaturverzeichnis

1. Abdel-Atty MY, Farges O, Jagot P, Belghiti J. Laparoscopy extends the indications for liver resection in patients with cirrhosis. *Br J Surg* 1999; 86:1397-400
2. Albrecht JH, Rieland BM, Nelsen CJ, Ahonen CL. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the liver: role of nuclear localization and p27 sequestration. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 1):G1207-16
3. Allendorf JD, Bessler M, Horvath KD, Marvin MR, Laird DA, Whelan RL. Increased tumor establishment and growth after open vs laparoscopic surgery in mice may be related to differences in postoperative T-cell function. *Surg Endosc* 1999; 13:233-5
4. Aldrighetti L, Pulitanò C, Arru M, Finazzi R, Catena M, Soldini L, Comotti L, Ferla G. Impact of preoperative steroids administration on ischemia-reperfusion injury and systemic responses in liver surgery: a prospective randomized study. *Liver Transpl* 2006; 12:941-9
5. Altindis M, Yilmaz S, Polat C, Serteser M. Sequential periods of preconditioning decrease laparoscopy-related elevations in hepatic TNF-alpha and IL-6 levels in rats. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2004;14: 380-3
6. Andrei VE, Schein M, Margolis M, Rucinski JC, Wise L. Liver enzymes are commonly elevated following laparoscopic cholecystectomy: is elevated intra-abdominal pressure the cause? *Dig Surg* 1998; 15:256-9
7. Arii S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10:189-194
8. Arikan Y, Tosun M, Saykol V, Kalkan S, Erdem S. p53 Expression and apoptosis in liver and spleen during CO2 pneumoperitoneum. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393:877-82.
9. Ates E, Yilmaz S, Ihtiyar E, Yasar B, Karahuseyinoglu E. Preconditioning-like amelioration of erythropoietin against laparoscopy-induced oxidative injury. *Surg Endosc* 2006; 20:815-9
10. Azagra JS, Goergen M, Gilbert E, Jacobs D. Laparoscopic anatomical (hepatic) left lateral segmentectomy-technical aspects. *Surg Endosc* 1996; 10:758-61
11. Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 1998; 2:292-8
12. Belizon A, Balik E, Feingold DL, Bessler M, Arnell TD, Forde KA, Horst PK,

- Jain S, Cekic V, Kirman I, Whelan RL. Major abdominal surgery increases plasma levels of vascular endothelial growth factor: open more so than minimally invasive methods. *Ann Surg* 2006; 244:792-8
13. Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault P, Sauvanet A, Farges O. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* 2000; 191:38-46
 14. Belli G, Fantini C, D'Agostino A, Belli A, Russolillo N. Laparoscopic liver resections for hepatocellular carcinoma (HCC) in cirrhotic patients. *HPB (Oxford)*. 2004; 6:236-46
 15. Belli G, Fantini C, D'Agostino A, Cioffi L, Langella S, Russolillo N, Belli A. Laparoscopic versus open liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with histologically proven cirrhosis: short- and middle-term results. *Surg Endosc* 2007; 21:2004-11.
 16. Bendet N, Morozov V, Lavi R, Panski M, Halevy A, Scapa E. Does laparoscopic cholecystectomy influence peri-sinusoidal cell activity? *Hepatogastroenterology* 1999; 46:1603-6.
 17. Bentes de Souza AM, Rogers MS, Wang CC, Yuen PM, Ng PS. Comparison of peritoneal oxidative stress during laparoscopy and laparotomy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2003; 10:65-74
 18. Berci G.: History of endoscopic surgery. In: *Endoscopic surgery*. F.L. Green, J.L. Ponsky, editors. Philadelphia, Saunders, 1994.
 19. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996; 224:647-64
 20. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000; 32: 508-515
 21. Bittner R, Leibl BJ, Ulrich, M. *Chirurgie der Leistenhernie. Minimalinvasive Operationstechniken*. Karger AG, Basel 2007
 22. Borzellino G, Ruzzenente A, Minicozzi AM, Giovinazzo F, Pedrazzani C, Guglielmi A. Laparoscopic hepatic resection. *Surg Endosc* 2006; 20:787-90
 23. Bruch HP, Esnaashari H, Schwandner O. Current status of laparoscopic therapy of colorectal cancer. *Dig Dis* 2005; 23:127-34
 24. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*. 1992; 25:31-40

25. Buell JF, Koffron AJ, Thomas MJ, Rudich S, Abecassis M, Woodle ES. Laparoscopic liver resection. *J Am Coll Surg* 2005; 200:472-80
26. Cai X, Wang Y, Yu H, Liang X, Peng S. Laparoscopic hepatectomy for hepatolithiasis: a feasibility and safety study in 29 patients. *Surg Endosc* 2007; 21:1074-8.
27. Caraceni P, Bianchi C, Domenicali M, Maria Pertosa A, Maiolini E, Parenti Castelli G, Nardo B, Trevisani F, Lenaz G, Bernardi M. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat fatty liver exposed to preservation-reperfusion injury. *J Hepatol.* 2004; 41:82-8
28. Carter JJ, Whelan RL. The immunologic consequences of laparoscopy in oncology. *Surg Oncol Clin N Am* 2001; 10:655-77
29. Cevrioglu AS, Yilmaz S, Koken T, Tokyol C, Yilmazer M, Fenkci IV. Comparison of the effects of low intra-abdominal pressure and ischaemic preconditioning on the generation of oxidative stress markers and inflammatory cytokines during laparoscopy in rats. *Hum Reprod* 2004; 19:2144-51
30. Cherqui D, Husson E, Hammoud R, Malassagne B, Stéphan F, Bensaid S, Rotman N, Fagniez PL. Laparoscopic liver resections: a feasibility study in 30 patients. *Ann Surg* 2000; 232:753-62
31. Cherqui D, Soubrane O, Husson E, Barshasz E, Vignaux O, Ghimouz M, Branchereau S, Chardot C, Gauthier F, Fagniez PL, Houssin D. Laparoscopic living donor hepatectomy for liver transplantation in children. *Lancet* 2002; 359:392-6
32. Cherqui D, Laurent A, Tayar C, Chang S, Van Nhieu JT, Loriau J, Karoui M, Duvoux C, Dhumeaux D, Fagniez PL. Laparoscopic liver resection for peripheral hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: midterm results and perspectives. *Ann Surg* 2006; 243:499-506
33. Chiu AW, Chang LS, Birkett DH, Babayan RK. The impact of pneumoperitoneum, pneumoretroperitoneum, and gasless laparoscopy on the systemic and renal hemodynamics. *J Am Coll Surg* 1995; 181:397-406
34. Cho JY, Suh KS, Kwon CH, Yi NJ, Lee KU. Mild hepatic steatosis is not a major risk factor for hepatectomy and regenerative power is not impaired. *Surgery* 2006;139:508-15
35. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(3 Suppl 1):S5-10

36. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998; 28: 281-285
37. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000; 232: 155-162
38. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1-16
39. Cooperman AM, Katz V, Zimmon D, Botero G. Laparoscopic colon resection: a case report. *J Laparoendosc Surg* 1991 1:221-4
40. McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Furrer K, Clavien PA. Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg.* 2007; 245:923-30
41. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002; 89:1089-95
42. Cuomo O, Ragozzino A, Iovine L, Santaniello W, Di Palma M, Ceriello A, Arenga G, Canfora T, Picciotto F, Marsilia GM. Living donor liver transplantation: early single-center experience. *Transplant Proc* 2006; 38:1101-5
43. Curet MJ. Port site metastases. *Am J Surg* 2004; 187:705-12
44. Cuschieri A, Buess G: Introduction and historical aspects. In: *Operative manual of endoscopic surgery*, A. Cuschieri, G. Buess, J. Périssat, editors. Berlin, Springer Verlag, 1992, S. 1-5
45. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996; 274:1379-83
46. Dagher I, Proske JM, Carloni A, Richa H, Tranchart H, Franco D. Laparoscopic liver resection: results for 70 patients. *Surg Endosc* 2007; 21:619-24
47. Dallemagne B, Weerts JM, Jehaes C, Markiewicz S, Lombard R. Laparoscopic Nissen fundoplication: preliminary report. *Surg Laparosc Endosc* 1991; 1:138-43
48. Delaitre B, Maignien B. [Splenectomy by the laparoscopic approach. Report of a case] *Presse Med* 1999; 20:2263
49. Descottes B, Glineur D, Lachachi F, Valleix D, Paineau J, Hamy A, Morino M, Bismuth H, Castaing D, Savier E, Honore P, Detry O, Legrand M, Azagra JS, Goergen M, Ceuterick M, Marescaux J, Mutter D, de Hemptinne B, Troisi R, Weerts J, Dallemagne B, Jehaes C, Gelin M, Donckier V, Aerts R, Topal B, Bertrand C,

- Mansvelt B, Van Krunkelsven L, Herman D, Kint M, Totte E, Schockmel R, Gigot JF. Laparoscopic liver resection of benign liver tumors. *Surg Endosc* 2003; 17:23-30
50. Desormeaux AJ. Endoscope and its application to the diagnosis and treatment of affections of the genitourinary passages. *Chicago Med J* 1867; 24:177-194
51. Diehl AM, Rai RM. Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J* 1996; 10:215-27
52. Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev* 2000; 174:160-71
53. Dulucq JL, Wintringer P, Stabilini C, Berticelli J, Mahajna A. Laparoscopic liver resections: a single center experience. *Surg Endosc* 2005; 19:886-91
54. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Botsios D, Tzartinoglou E, Farmakis H, Dadoukis J. Splanchnic ischemia during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 1996; 10:324-6
55. Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257:231-7
56. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11:81-128
57. Farges O, Jagot P, Kirstetter P, Marty J, Belghiti J. Prospective assessment of the safety and benefit of laparoscopic liver resections. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9:242-8
58. Fausto N. Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2:1036-42
59. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32(1 Suppl):19-31
60. Fausto N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* 2001; 7:835-44
61. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006; 43(2 Suppl 1):S45-53
62. Fervers C. Die Laparoskopie mit dem Cystoscope: ein Beitrag zur Vereinfachung der Technik und zur endoskopischen Strangdurchtrennung in der Bauchhöhle. *Med Klin* 1933; 29: 1042
63. Filipi CJ, Fitzgibbons RJ, Salerno GM. Historical review: diagnostic laparoscopy to laparoscopic cholecystectomy and beyond. In *Surgical Laparoscopy*, K.A. Zucker, editor. St. Louis, Quality Medical Publishing, 1991, S. 3-21

64. Fine AP Minimally invasive surgery may result in lower peak levels of circulating vascular endothelial growth factor. *JLS* 2003; 7:147-9
65. Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc* 1997; 29:412-5
66. Gagner M, Rheault M, Dubuc J. Laparoscopic partial hepatectomy for liver tumor. *Surg Endosc* 1992; 6:99
67. Gagner M, Pomp A. Laparoscopic pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *Surg Endosc* 1994; 8:408-10
68. Gagner M, Rogula T, Selzer D. Laparoscopic liver resection: benefits and controversies. *Surg Clin North Am* 2004; 84:451-62
69. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007; 19:1807-19
70. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31:13-20
71. Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, Daßler R, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1997; 26: 573-578
72. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 2005; 172:367-79
73. Gigot JF, Glineur D, Santiago Azagra J, Goergen M, Ceuterick M, Morino M, Etienne J, Marescaux J, Mutter D, van Krunckelsven L, Descottes B, Valleix D, Lachachi F, Bertrand C, Mansvelt B, Hubens G, Saey JP, Schockmel R; Hepatobiliary and Pancreatic Section of the Royal Belgian Society of Surgery and the Belgian Group for Endoscopic Surgery. Laparoscopic liver resection for malignant liver tumors: preliminary results of a multicenter European study. *Ann Surg* 2002; 236:90-7
74. Giraudo G, Brachet Contul R, Caccetta M, Morino M. Gasless laparoscopy could avoid alterations in hepatic function. *Surg Endosc*. 2001; 15:741-6
75. Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R, Münchow S, Dikopoulos N, Lippek F, Langrehr JM, Dietel M, Neuhaus P, Nussler AK. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135:203-14

76. Glantzounis GK, Tselepis AD, Tambaki AP, Trikalinos TA, Manataki AD, Galaris DA, Tsimoyiannis EC, Kappas AM. Laparoscopic surgery-induced changes in oxidative stress markers in human plasma. *Surg Endosc* 2001;15:1315-9
77. Goetze O. Ein neues Verfahren der Gasfüllung für das Pneumoperitoneum. *Münch Med Wochenschr* 1921; 51: 233-236
78. Goh P, Tekant Y, Kum CK, Isaac J, Shang NS. Totally intra-abdominal laparoscopic Billroth II gastrectomy. *Surg Endosc* 1992; 6:160
79. Gorden A. The history and development of endoscopic surgery. In: *Endoscopic surgery for gynecologists*. C. Sutton, M.P. Diamond, editors. London, Saunders, 1993
80. Gove CD, Hughes RD. Liver regeneration in relationship to acute liver failure. *Gut* 1991; Suppl:S92-6
81. Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, Taub R. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 1998 1;102:996-1007
82. Guirao X, Lowry SF. Biologic control of injury and inflammation: much more than too little or too late. *World J Surg* 1996; 20:437-46
83. Gutt CN, Schmandra TC. Portal venous flow during CO₂ pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 1999; 13:902-5
84. Gutt CN, Gessmann T, Schemmer P, Mehrabi A, Schmandra T, Kim ZG. The impact of carbon dioxide and helium insufflation on experimental liver metastases, macrophages, and cell adhesion molecules. *Surg Endosc* 2003; 17:1628-31
85. Gutt CN, Riemer V, Kim ZG, Erceg J, Lorenz M. Impact of laparoscopic surgery on experimental hepatic metastases. *Br J Surg* 2001; 88: 371-375
86. Gutt CN, Schmedt CG, Schmandra T, Heupel O, Schemmer P, Büchler MW. Insufflation profile and body position influence portal venous blood flow during pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 2003; 17:1951-7 Erratum in: *Surg Endosc* 2004; 18:351
87. Gumbs AA, Gayet B. Multimedia article. Totally laparoscopic extended right hepatectomy. *Surg Endosc* 2008; 22:2076-7
88. Hasukić S. Postoperative changes in liver function tests: randomized comparison of low- and high-pressure laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 2005; 19:1451-5
89. Hazebroek EJ, Gommers D, Schreve MA, van Gelder T, Roodnat JJ, Weimar W, Bonjer HJ, IJzermans JN. Impact of intraoperative donor management on short-term renal function after laparoscopic donor nephrectomy. *Ann Surg* 2002; 236:127-32

90. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202
91. Hüscher CG, Lirici MM, Chiodini S. Laparoscopic liver resections. *Semin Laparosc Surg* 1998; :204-10
92. Irmischer J. Antike Fabeln. Aufbau Verlag 1999
93. Jacobaeus H.C. Kurze Uebersicht über meine Erfahrungen mit der Laparothorakoskopie. *Münch Med Wschr* 58 (1911) 2017-2019
94. Jacobaeus HC. Über die Möglichkeit die Zystoskopie bei Untersuchungen seröser Höhlen anzuwenden. *Münch. Med. Wochenschr.* 1910; 57: 2090-2092
95. Jacobi CA, Krähenbühl L, Blöchle C, Bonjer HJ, Gutt CN. Peritonitis and adhesions in laparoscopic surgery. First workshop on experimental laparoscopic surgery, Frankfurt 1997. *Surg Endosc* 1998; 12:1099-101
96. Jacobi CA, Bonjer HJ, Puttick MI, O'Sullivan R, Lee SW, Schwalbach P, Tomita H, Kim ZG, Hewett P, Wittich P, Fleshman JW, Paraskeva P, Gessman T, Neuhaus SJ, Wildbrett P, Reymond MA, Gutt C, Whelan RI. Oncologic implications of laparoscopic and open surgery. *Surg Endosc* 2002; 16:441-5
97. Jacobi CA, De Cuyper KI, Müller JM. Laparoscopy. Basic science and future directions. *Surg Oncol Clin N Am* 2001; 10:679-91
98. Jacobi CA, Wenger F, Opitz I, Müller JM. Immunologic changes during minimally invasive surgery. *Dig Surg* 2002;19:459-63
99. Jakimowicz J, Stultiëns G, Smulders F. Laparoscopic insufflation of the abdomen reduces portal venous flow. *Surg Endosc* 1998; 12:129-32
100. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, DeMatteo RP, Ben-Porat L, Little S, Corvera C, Weber S, Blumgart LH. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* 2002; 236:397-406
101. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997; 61:647-53
102. Junghans T, Böhm B, Gründel K, Schwenk W, Müller JM. Does pneumoperitoneum with different gases, body positions, and intraperitoneal pressures influence renal and hepatic blood flow? *Surgery* 1997; 121:206-11

103. Junghans T, Modersohn D, Dörner F, Neudecker J, Haase O, Schwenk W. Systematic evaluation of different approaches for minimizing hemodynamic changes during pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 2006; 20:763-9
104. Kalk H, Brühl W. Leitfaden der Laparoskopie und Gastroskopie. Stuttgart, Thieme, 1951
105. Kaneko H, Takagi S, Otsuka Y, Tsuchiya M, Tamura A, Katagiri T, Maeda T, Shiba T. Laparoscopic liver resection of hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2005;189:190-4
106. Kaplan LM. Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology* 1998; 115:997-1001
107. Kaya Y, Aral E, Coskun T, Erkasap N, Var A. Increased intraabdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Surg Res* 2002; 108:250-7
108. Kelling G. Die Tamponade der Speiseröhre und des Magens mit biegsamen Instrumenten. *Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte*. Leipzig, Vogel Verlag, 1901; 73: 117-119
109. Kelling G. Zur Cölioskopie und Gastroskopie. *Arch. Klin. Chir* 1923; 126: 226-228
110. Kim YI. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 195-199
111. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Furukawa K, Mitsunashi N, Sawada S, Takeuchi D, Ambiru S, Miyazaki M. Circulating cytokines, chemokines, and stress hormones are increased in patients with organ dysfunction following liver resection. *J Surg Res* 2006; 133:102-12
112. Klopfenstein CE, Morel DR, Clergue F, Pastor CM. Effects of abdominal CO₂ insufflation and changes of position on hepatic blood flow in anesthetized pigs. *Am J Physiol* 1998; 275:H900-5
113. Kloosterman T, von Blomberg BM, Borgstein P, Cuesta MA, Scheper RJ, Meijer S. Unimpaired immune functions after laparoscopic cholecystectomy. *Surgery* 1994; 115:424-8
114. Koffron AJ, Auffenberg G, Kung R, Abecassis M. Evaluation of 300 minimally invasive liver resections at a single institution: less is more. *Ann Surg* 2007; 246:385-92
115. Koffron AJ, Kung R, Baker T, Fryer J, Clark L, Abecassis M. Laparoscopic-assisted right lobe donor hepatectomy. *Am J Transplant* 2006; 6:2522-5

116. Kooby DA, Fong Y, Suriawinata A, Gonen M, Allen PJ, Klimstra DS, DeMatteo RP, D'Angelica M, Blumgart LH, Jarnagin WR. Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 2003; 7:1034-44
117. Kopernik G, Avinoach E, Grossman Y, Levy R, Yulzari R, Rogachev B, Douvdevani A. The effect of a high partial pressure of carbon dioxide environment on metabolism and immune functions of human peritoneal cells-relevance to carbon dioxide pneumoperitoneum. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1503-10
118. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001; 48:556-62
119. Kowdley KV, Caldwell S. Nonalcoholic steatohepatitis: a twenty-first century epidemic? *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(3 Suppl 1):S2-4
120. Krahenbuhl et al. Laparoscopic partial hepatectomy in the rat: a new resectional technique. *Dig Surg* 1998;15(2):140-4
121. Kuhry E, Jeekel J, Bonjer HJ. Effect of laparoscopy on the immune system. *Semin Laparosc Surg* 2004; 11:37-44
122. Lauth WW. Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol* 1985; 249:G549-56
123. Lee KF, Cheung YS, Chong CN, Tsang YY, Ng WW, Ling E, Wong J, Lai PB. Laparoscopic versus open hepatectomy for liver tumours: a case control study. *Hong Kong Med J* 2007; 13:442-8
124. Leister I, Schüler P, Vollmar B, Füzesi L, Kahler E, Becker H, Markus PM. Microcirculation and excretory function of the liver under conditions of carbon dioxide pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 2004; 18:1358-
125. Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 327-338
126. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32: 169-173
127. Lesurtel M, Cherqui D, Laurent A, Tayar C, Fagniez PL. Laparoscopic versus open left lateral hepatic lobectomy: a case-control study. *J Am Coll Surg* 2003; 196:236-42
128. Mala T, Edwin B, Rosseland AR, Gladhaug I, Fosse E, Mathisen O. Laparoscopic liver resection: experience of 53 procedures at a single center. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12:298-303

129. Malter M, Friedrich E, Süss R. Liver as a tumor cell killing organ: Kupffer cells and natural killers. *Cancer Res* 1986; 46:3055-60
130. Markus PM, König S, Liersch T, Becker H. Die Leberregeneration. *Onkologe* 2000; 6: 348-355
131. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, Ward PA. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2000; 94: 185-194
132. Morino M, Giraud G, Festa V. Alterations in hepatic function during laparoscopic surgery. An experimental clinical study. *Surg Endosc* 1998; 12:968-72
133. Morino M, Morra I, Rosso E, Miglietta C, Garrone C. Laparoscopic vs open hepatic resection: a comparative study. *Surg Endosc* 2003; 17:1914-8
134. Mouret P. How I developed laparoscopic cholecystectomy. *Ann Acad Med Singapore* 1996; 25:744-747
135. Mühe E. Die erste Cholezystektomie durch das Laparoskop. *Langenbeck`s Arch Chir* 1986; 369: 804
136. Müller JM, Schwenk W, Jacobi CA, Böhm B. Endoscopic surgery: fit for malignancy? *World J Surg* 1999; 23:808-15
137. Müller AR, Platz KP, Haak M, Undi H, Muller C, Kottgen E, Weidemann H, Neuhaus P. The release of cytokines, adhesion molecules, and extracellular matrix parameters during and after reperfusion in human liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 1118-1126
138. Muratore A, Ribero D, Ferrero A, Bergero R, Capussotti L. Prospective randomized study of steroids in the prevention of ischaemic injury during hepatic resection with pedicle clamping. *Br J Surg* 2003; 90:17-22
139. Mynbaev OA, Molinas CR, Adamyan LV, Vanacker B, Koninckx PR. Pathogenesis of CO₂ pneumoperitoneum-induced metabolic hypoxemia in a rabbit model. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2002; 9:306-14
140. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg* 1987; 206:30-9
141. Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Cornerstone* 2001; 3:47-57
142. Nickkholgh A, Barro-Bejarano M, Liang R, Zorn M, Mehrabi A, Gebhard MM, Büchler MW, Gutt CN, Schemmer P. Signs of reperfusion injury following CO₂ pneumoperitoneum: an in vivo microscopy study. *Surg Endosc* 2008; 22:122-8

143. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-8
144. Picard C, Lambotte L, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Van den Berge V, Horsmans Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2000; 36:645-52
145. Polat C, Yilmaz S, Serteser M, Koken T, Kahraman A, Dilek ON. The effect of different intraabdominal pressures on lipid peroxidation and protein oxidation status during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc*. 2003; 17:1719-22
146. Powell CL, Kosyk O, Bradford BU, Parker JS, Lobenhofer EK, Denda A, Uematsu F, Nakae D, Rusyn I. Temporal correlation of pathology and DNA damage with gene expression in a choline-deficient model of rat liver injury. *Hepatology* 2005; 42:1137-47
147. Pross M, Schulz HU, Flechsig A, Manger T, Halangk W, Augustin W, Lippert H, Reinheckel T. Oxidative stress in lung tissue induced by CO₂ pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 2000; 14:1180-4
148. Pugliese R, Maggioni D, Sansonna F, Scandroglio I, Ferrari GC, Di Lernia S, Costanzi A, Pauna J, de Martini P. Total and subtotal laparoscopic gastrectomy for adenocarcinoma. *Surg Endosc* 2007; 21:21-7
149. Pugliese R, Scandroglio I, Sansonna F, Maggioni D, Costanzi A, Citterio D, Ferrari GC, Di Lernia S, Magistro C. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy: a retrospective review of 19 cases. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2008; 18:13-8
150. Rao MS, Papreddy K, Abecassis M, Hashimoto T. Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 2001; 46:1821-6
151. Rasmussen IB, Berggren U, Arvidsson D, Ljungdahl M, Haglund U. Effects of pneumoperitoneum on splanchnic hemodynamics: an experimental study in pigs. *Eur J Surg* 1995; 161:819-26
152. Richter S, Olinger A, Hildebrandt U, Menger MD, Vollmar B. Loss of physiologic hepatic blood flow control ("hepatic arterial buffer response") during CO₂-pneumoperitoneum in the rat. *Anesth Analg* 2001; 93:872-7
153. Rau HG, Buttler E, Meyer G, Schardey HM, Schildberg FW. Laparoscopic liver resection compared with conventional partial hepatectomy--a prospective analysis. *Hepatogastroenterology* 1998; 45:2333-8

- 154.Saber AA, Laraja RD, Nalbandian HI, Pablos-Mendez A, Hanna K. Changes in liver function tests after laparoscopic cholecystectomy: not so rare, not always ominous. *Am Surg* 2000; 66:699-702
- 155.Sakorafas G, Anagnostopoulos G, Stafyla V, Koletis T, Kotsifopoulos N, Tsiakos S, Kassaras G. Elevation of serum liver enzymes after laparoscopic cholecystectomy. *N Z Med J* 2005; 118:U1317
- 156.Sala-Blanch X, Fontanals J, Martínez-Palli G, Taurá P, Delgado S, Bosch J, Lacy AM, Visa J. Effects of carbon dioxide vs helium pneumoperitoneum on hepatic blood flow. *Surg Endosc* 1998; 12:1121-5
- 157.Sanyal AJ; American Gastroenterological Association. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123:1705-25
- 158.Sato K, Kawamura T, Wakusawa R. Hepatic blood flow and function in elderly patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg* 2000; 90:1198-202
- 159.Schäfer M, Sägesser H, Reichen J, Krähenbühl L. Alterations in hemodynamics and hepatic and splanchnic circulation during laparoscopy in rats. *Surg Endosc* 2001; 15:1197-201
- 160.Schilling MK, Redaelli C, Krähenbühl L, Signer C, Büchler MW. Splanchnic microcirculatory changes during CO2 laparoscopy. *J Am Coll Surg* 1997; 184:378-82
- 161.Schemmer P, Barro-Bejarano M, Mehrabi A, Gebhard MM, Kraus T, Büchler MW, Gutt CN. Laparoscopic organ retrieval for living donor liver transplantation does not prevent graft injury. *Transplant Proc* 2005; 37:1625-7
- 162.Schietroma M, Carlei F, Franchi L, Mazzotta C, Sozio A, Lygidakis NJ, Amicucci G. A comparison of serum interleukin-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:1595-9
- 163.Schmidt SC, Hamann S, Langrehr JM, Höflich C, Mittler J, Jacob D, Neuhaus P. Preoperative high-dose steroid administration attenuates the surgical stress response following liver resection: results of a prospective randomized study. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14:484-92
- 164.Schwenk W, Jacobi C, Mansmann U, Böhm B, Müller JM. Inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections - results of prospective randomized trial. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:2-9
- 165.Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000; 32:1280-8

- 166.Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 2000; 31:35-42
- 167.Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 2001; 21:105-13
- 168.Semm K. Die endoskopische Appendektomie. *Gynäkologische Praxis*1983; 7: 131-140
- 169.Semm K. Tissue puncher and loop-ligation:new aids for surgical-therapeutic pelviscopy (laparoscopy) = endoscopic intraluminal surgery. *Endoscopy* 1978; 10: 119-124
- 170.Seven R, Seven A, Erbil Y, Mercan S, Burçak G. Lipid peroxidation and antioxidant state after laparoscopic and open cholecystectomy. *Eur J Surg* 1999; 165:871-4
- 171.Shimada M, Hashizume M, Maehara S, Tsujita E, Rikimaru T, Yamashita Y, Tanaka S, Adachi E, Sugimachi K. Laparoscopic hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Surg Endosc* 2001; 15:541-4
- 172.Sowa JP, Best J, Benko T, Bockhorn M, Gu Y, Niehues EM, Bucchi A, Benedetto-Castro EM, Gerken G, Rauen U, Schlaak JF. Extent of liver resection modulates the activation of transcription factors and the production of cytokines involved in liver regeneration. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:7093-100
- 173.Steer CJ. Liver regeneration. *FASEB J* 1995; 9:1396-400
- 174.Stretz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 2000; 47:309-12
- 175.Sun CK, Zhang XY, Zimmermann A, Davis G, Wheatley AM. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation* 2001; 72:1625-31
- 176.Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994; 57:253-8
- 177.Sylla P, Kirman I, Whelan RL. Immunological advantages of advanced laparoscopy. *Surg Clin North Am* 2005; 85:1-18
- 178.Takagi S. Hepatic and portal vein blood flow during carbon dioxide pneumoperitoneum for laparoscopic hepatectomy. *Surg Endosc.*1998; 12:427-31.
- 179.Tan M, Xu FF, Peng JS, Li DM, Chen LH, Lv BJ, Zhao ZX, Huang C, Zheng CX. Changes in the level of serum liver enzymes after laparoscopic surgery. *World J Gastroenterol* 2003; 9:364-7

180. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 891-902
181. Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB, Clouse ME. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1993; 56:1076-82
182. Todo S, Demetris AJ, Makowka L, Teperman L, Podesta L, Shaver T, Tzakis A, Starzl TE. Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* 1989; 47:903-5
183. Tsuboi S, Kitano S, Yoshida T, Bandoh T, Ninomiya K, Baatar D. Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on hemodynamics in cirrhotic rats. *Surg Endosc* 2002; 16:1220-5
184. Tuñón MJ, González P, Jorquera F, Llorente A, Gonzalo-Orden M, González-Gallego J. Liver blood flow changes during laparoscopic surgery in pigs. A study of hepatic indocyanine green removal. *Surg Endosc* 1999; 13:668-72
185. Veteläinen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg* 2007; 245:44-50
186. Vial P, Riquelme A, Pizarro M, Solis N, Madariaga JA, Aguayo G, Duarte I, Soza A, Accatino L, Arrese M. Pentoxifylline does not prevent neither liver damage nor early profibrogenic events in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Hepatol* 2006; 5:25-9
187. Vibert E, Perniceni T, Levard H, Denet C, Shahri NK, Gayet B. Laparoscopic liver resection. *Br J Surg* 2006; 93:67-72
188. Vittimberga FJ, Nolan B, Perugini RA, Spector L, Callery MP. Laparoscopic surgery and Kupffer cell activation. *Surg Endosc* 2000; 14:1171-6
189. Waynforth HB. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press. S. 136
190. West MA, Hackam DJ, Baker J, Rodriguez JL, Bellingham J, Rotstein OD. Mechanism of decreased in vitro murine macrophage cytokine release after exposure to carbon dioxide: relevance to laparoscopic surgery. *Ann Surg* 1997; 226:179-90
191. Wildbrett P, Oh A, Naundorf D, Volk T, Jacobi CA. Impact of laparoscopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell function. *Surg Endosc*. 2003; 17:78-82

192. Wortel CH, van Deventer SJ, Aarden LA, Lygidakis NJ, Büller HR, Hoek FJ, Horikx J, ten Cate JW. Interleukin-6 mediates host defense responses induced by abdominal surgery. *Surgery* 1993; 114:564-70
193. Yagmurdur MC, Basaran O, Ozdemir H, Gur G, Turan M, Karakayali H, Haberal M. The impact of transient elevation of intra-abdominal pressure on liver regeneration in the rat. *J Invest Surg* 2004; 17:315-22
194. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 18; 94:2557-62
195. Yilmaz S, Koken T, Tokyol C, Kahraman A, Akbulut G, Serteser M, Polat C, Gokce C, Gokce O. Can preconditioning reduce laparoscopy-induced tissue injury? *Surg Endosc* 2003;17:819-24
196. Yilmaz S, Polat C, Kahraman A, Koken T, Arikan Y, Dilek ON, Gökçe O. The comparison of the oxidative stress effects of different gases and intra-abdominal pressures in an experimental rat model. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2004; 14:165-8
197. Yokoyama Y, Alterman DM, Sarmadi AH, Baveja R, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. Hepatic vascular response to elevated intraperitoneal pressure in the rat. *J Surg Res* 2002; 105:86-94
198. Zhang BH, Weltman M, Farrell GC. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999; 14:133-7
199. Zmora O, Weiss EG. Trocar site recurrence in laparoscopic surgery for colorectal cancer. Myth or real concern? *Surg Oncol Clin N Am*. 2001; 10:625-38
200. Zollikofer R. Zur Laparoskopie. *Schweiz Med Wochenschr* 1924; 54: 264

Danksagung

Mein tiefster Dank gilt meinem chirurgischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. Peter Neuhaus für die Ermöglichung einer jahrelangen, hervorragenden klinisch chirurgischen und wissenschaftlichen Ausbildung in seiner Klinik. Seine uneingeschränkte Förderung und Unterstützung hat die Fertigstellung dieser Habilitationsschrift erst ermöglicht.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Jan M. Langrehr und bei Herrn Prof. Dr. Ulf P. Neumann, die mich in meinen wissenschaftlichen und chirurgischen Aktivitäten immer unterstützt haben und gerade auch das Habilitationsprojekt maßgeblich gefördert haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Sabine Boas-Knoop bedanken, die mir bei der Durchführung der Tierexperimente und bei der Auswertung der Ergebnisse mit außergewöhnlich hohem Einsatz zur Seite stand. Ohne ihren Arbeitseinsatz auch in schwierigen Phasen wäre die Arbeit nicht zustande gekommen. Mein Dank gilt in diesem Zusammenhang auch Herrn Steffen Lippert, Frau Susanne Wojtke, Herrn Dietrich Polenz sowie meiner Doktorandin Frau Nicole Klage für die unermüdliche tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche und der experimentellen Arbeiten im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen und ganz besonders meiner lieben Frau, Christiane Schmidt-Schönthal und meinen lieben Kindern Jakob, Oskar und Johanna danken, die aufgrund dieser Arbeit so viele Stunden auf mich verzichten mussten.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

gemäß Habilitationsordnung der Charité

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Berlin, den 10.10.2009

Dr. med. Sven-Christian Schmidt