

**Aus der Klinik für  
Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**DISSERTATION**

**Hat das CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum im Rahmen einer Leberresektion im Rattenmodell  
Einfluss auf die Leberregeneration?**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Nicole Klage  
aus Herzberg/ Elster

**Gutachter:**

- 1. Priv.- Doz. Dr. med. S.- Chr. Schmidt**
- 2. Prof. Dr. med. Chr. A. Jacobi**
- 3. Prof. Dr. med. M. Pross**

**Datum der Promotion:** **07.09.2012**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1. Anatomie und Regeneration der Leber der Ratte und des Menschen .....	8
1.1.1 Anatomie der Leber: Ratte <-> Mensch.....	8
1.1.2 Regeneration der Leber: Ratte <-> Mensch .....	10
1.2 Die Entwicklung der laparoskopischen Chirurgie .....	12
1.3 Aktueller Stand der laparoskopischen Leberchirurgie in der Klinik.....	16
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1 Materialien .....	20
3.1.1 Versuchstiere .....	26
3.2. Methoden.....	27
3.2.1 Vorversuch .....	27
3.2.2 Hauptversuch.....	27
3.2.3 Haltung der Versuchstiere .....	27
3.2.4 Lagerung und Vorbereitung zur Operation .....	28
3.2.5 Narkose.....	28
3.2.6 Anlage des CO <sub>2</sub> - Pneumoperitoneums .....	29
3.2.7 Technik der 70% Leberteilesektion .....	29
3.2.8 Probenentnahme .....	30
3.2.9 Biochemische Analysen- (AST, ALT, GLDH, LDH) .....	31
3.2.10 Histologie .....	31
3.2.10.1 Herstellung von Paraffin- Schnittpräparaten.....	31
3.2.10.2 Hämatoxylin- Eosin- Färbung .....	32
3.2.11 Immunhistochemie .....	34
3.2.11.1 Ki- 67 Immunhistologie .....	34
3.2.12 Zytokinbestimmungen durch PCR.....	36
3.2.12.1 RNA- Isolierung aus Rattenlebergewebe:.....	36
3.2.12.2 RT- PCR.....	37
3.2.12.3 PCR (Polymerase- Ketten- Reaktion) .....	38
3.2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.2.12.5 Semiquantitative Auswertung der Banden.....	39
3.2.13 Statistik.....	40
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
4.1 Vorversuch .....	41
4.2 Hauptversuch.....	42
4.2.1 Biochemische Analysen (AST, ALT, GLDH, LDH).....	42
4.2.2 Lebersyntheseparameter (Mitose- Index, Ki-67, $\beta$ - Aktin, VEGF, HGF) .....	47
4.2.2.1 Mitoseindex .....	47
4.2.2.2 Ki- 67.....	49
4.2.2.3 $\beta$ - Aktin ( 289 BP).....	51
4.2.2.4 VEGF (262, 394, 466 BP).....	52
4.2.2.5 HGF (328 BP) .....	53
4.2.3 Inhibitoren der Regeneration:.....	54
4.2.3.1 TGF $\beta$ ( 406 BP).....	55
4.2.3.2 IL 1 $\beta$ ( 306 BP).....	56
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>57</b>
5.1 Wahl des Tiermodells.....	57
5.2 CO <sub>2</sub> - Pneumoperitoneum und Leberregeneration .....	58
5.2.1 Leberenzyme (AST, ALT, LDH GLDH).....	58

5.2.2 Mitoseindex und Ki-67.....	60
5.2.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren .....	61
5.2.4 HGF (“hepatocyte growth factor“).....	63
5.2.5 VEGF (“vascular endothelial growth factor“).....	64
5.2.6 TGF- $\beta$ (transforming growth factor) und IL-1 $\beta$ (Interleucin 1- $\beta$ ).....	64
5.2.7 Ischämie und Reperfusion .....	65
5.2.8 Ischämische Präkonditionierung .....	65
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Lebenslauf .....</b>	<b>80</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>82</b>
<b>10. Erklärung.....</b>	<b>83</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
AG	Antigen
ALT	Alaninaminotransferase
APS	Ammonium Persulfate
AST	Aspartataminotransferase
BCA	Bichinonic Acid Solution
BP	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary (coding) DNA
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
DAB	3,3 Zoll- Diaminobenzidinchromogenlösung
d	Tag
DMF	N, N- Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (DNS)	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EPO	Erythropoietin
etc.	et cetera
g	Gramm
GLDH	Glutamat Dehydrogenase
h	Stunde
HE	Hämatoxylin Eosin
HCl	Salzsäure
HClO <sub>4</sub>	Perchlorsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfatsäure
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
IAP	intraabdomineller Druck

IG	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IR	Ischämie- Reperfusion
K <sub>2</sub> EDTA	Dikalium Ethylendiamintetraacetat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
LDH	Lactatdehydrogenase
LTR	Leberteilresektion
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MI	Mitoseindex
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPS	mononukläres phagozytäres System
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di Natriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
ODI	optische Dichte
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCNA	proliferating cell nuklear antigen
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
POD	postoperativer Tag
PV	portalvenös
RNA	Ribonukleinsäure
RT PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
STAT	signal transducers and activators of transcription
Tab	Tabelle

TGF $\beta$	Transforming Growth Factor
TMB	3,3,5,5 Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
UBP	urinary bladder pressure
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

## **1. Einleitung**

### **1.1. Anatomie und Regeneration der Leber der Ratte und des Menschen**

#### **1.1.1 Anatomie der Leber: Ratte <-> Mensch**

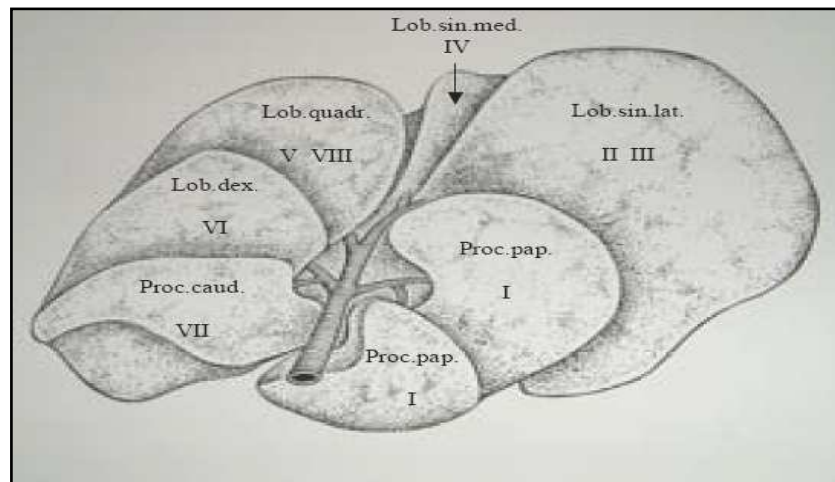
In der Literatur gibt es für die Leberlappen der Ratte verschiedene Nomenklaturen. In der dritten Auflage der Nomina Anatomica Veterinaria von 1983 gelten Lobus sinister lateralis und medialis, Lobus quadratus, Lobus dexter und caudatus mit Processus caudatus und die Processus papillares als anatomische Termini (*Abb.1*) [Hebel 1986; Popesko 1990, Nomina Anatomica Veterinaria 1983].

Die übliche acht- Segmenteinteilung der menschlichen Leber nach Couinaud (*Abb.2*) kann auf die Ratte übertragen werden, da die Aufzweigung der intrahepatischen Blutgefäße bei dieser Spezies der des Menschen ähnlich ist (*Tab.1*) [Couinaud 1957].

Die Processus papillares der Ratte entsprechen hierbei dem Segment I des Menschen [Födra 1991]. Den Segmenten II und III der menschlichen Leber entspricht der Lobus sinister lateralis, der zwei stammartige portale Äste enthält [Födra 1911]. Durch einen dieser portalen Äste wird der Lobus sinister medialis versorgt, der dem IV. Segment beim Menschen entspricht [Födra 1911]. Ebenfalls von einem Pfortaderast, der dem bogenförmigen aufsteigenden Ast für das Doppelsegment V und VIII der menschlichen Leber entspricht, wird der Lobus quadratus versorgt [Födra 1911]. Die Leberanteile Lobus dexter und Processus caudatus verfügen über eine unabhängige portale Versorgung, entsprechend den humanen Segmenten VI und VII [Födra 1911]. Ein kleiner portaler Ast, mit Aufzweigungen in zwei kleinere Segmentäste entspringt links der Vena portae. Dieser ist für die Versorgung der Processus papillares bei der Ratte verantwortlich [Födra 1911].

Aufgrund dieser Übereinstimmung der Segmenteinteilung ist die Durchführung vergleichbarer Leberresektionen bei Ratte und Mensch möglich.

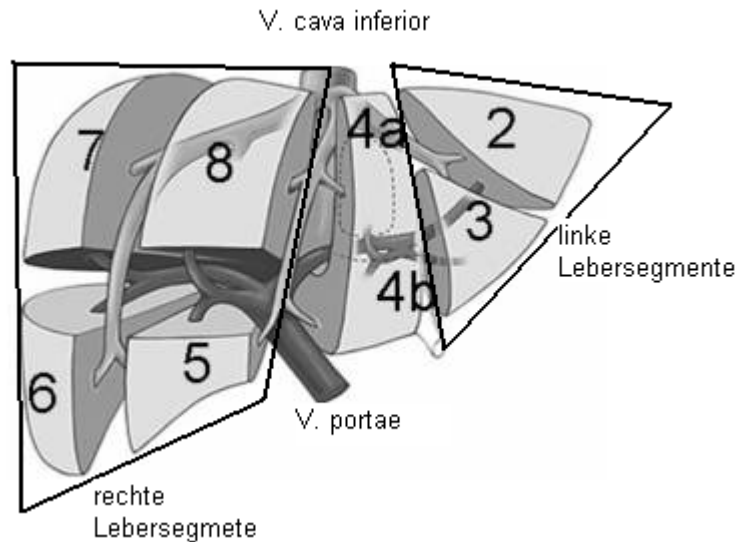




**Abb.1** Anatomie der Rattenleber (Födra 1991)

Ratte	Mensch
Processus papillares	Segment I
Lobus sinister lateralis	Segment II und III
Lobus sinister medialis	Segment IV
Lobus quadratus	Segment V und VIII
Lobus dexter	Segment VI
Processus caudatus	Segment VII

**Tab.1** Lebersegmente Ratte <-> Leber



**Abb.2** Segmenteinteilung der menschlichen Leber nach Couinaud

### 1.1.2 Regeneration der Leber: Ratte <-> Mensch

Die Leber ist die größte Drüse des Körpers und besitzt die erstaunliche Fähigkeit sich nach traumatischer Läsion, therapeutischer Resektion, chemischer oder toxischer Schädigung zu regenerieren. Sogar eine Parenchymresektion zwischen 75 bis 80% ist bei Patienten mit gesunder Restleber möglich [Markus 2000]. Der Grund dafür liegt in der enorm hohen Regenerationsfähigkeit der Leber, die bereits in der griechischen Mythologie, in der Sage des Prometheus beschrieben wurde [Irmscher 1982].

Normalerweise befinden sich die Hepatozyten im Ruhestadium G<sub>0</sub>. Bei etwa jeder 1000. Leberzelle findet sich beim gesunden Erwachsenen zu einem bestimmten Zeitpunkt durchschnittlich eine Mitose [Court 2002].

Die Regeneration kann entweder als Zellhyperplasie oder als Proliferation und Differenzierung von Lebervorläuferzellen erfolgen. Verantwortlich sind sowohl wachstumsfördernde als auch -hemmende Regulationsmechanismen, um das Ausgangsvolumen von  $\pm 15\%$  zu erreichen [Francavilla 1988, Markus 2000]. Es sind hierbei sowohl Leberzellen als auch Nicht-Leberzellen, wie Endothelzellen, Gallengangepithelzellen und Kupffer-Sternzellen beteiligt [Diehl 1996, Markus 2000]. Das gesamte Geschehen wird dabei von diversen Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen reguliert [Court 2002].

Die Zytokine Interleukin- 6 (IL- 6) und Tumor Nekrose Faktor-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) gehören zu den sogenannten „Priming Faktoren“. Sie sind für den Übertritt in das Zellteilungsstadium verantwortlich. Durch dieses „Priming“ werden die Zellen für verschiedene Wachstumsfaktoren, wie HGF, VEGF, und TGF- $\beta$  sensibilisiert und führen zu einem zeitgleichen Übertritt vom Ruhestadium G0 in das Progressionsstadium G1 [Kountouras 2001; Diehl 1996]. Nach etwa 12- 16 Stunden wird die Synthesephase, die ihr Maximum etwa 22- 24 Stunden nach dem leberschädigenden Ereignis hat, erreicht. Nach weiteren 6- 8 Stunden findet die eigentliche Mitose statt [Fausto 2000; Grisham 1962; Court 2002].

Bereits 1931 konnten Higgins und Anderson nachweisen, dass die Leberregeneration außerordentlich aber dennoch unterschiedlich schnell bei verschiedenen Spezies abläuft. So dauert nach  $\frac{2}{3}$  Hepatektomie beispielsweise die Regeneration bei Ratten 7- 14 Tage und bei Menschen zwischen 6- 12 Monate [Chen 1991; Gove 1991, Nagasuse 1987].

Bucher et al wiesen zudem nach, dass verschiedene weitere Faktoren, z.B. das Alter und/ oder das Ausmaß, bzw. die Art der Schädigung Einfluss auf die Regeneration nehmen [Bucher 1964]. In einem Versuch mit Rattenjungtieren kam es bei einer Gewebsläsion von 15- 75% zu einem linearen Anstieg der DNA- Synthese des Restlebergewebes im Verhältnis zum Gewebeverlust. Allerdings konnten sie auch nachweisen, dass mindestens eine Schädigung bzw. ein Gewebeverlust von  $>30\%$  von Nöten war um die Regeneration überhaupt zu indizieren. Bereits 48 Stunden postinterventionell konnte eine Verdopplung des Lebergewebes festgestellt werden. Nach 7- 10 Tagen war die Regeneration abgeschlossen [Bucher 1964, Court 2002]. Bei alten Ratten wurde der maximale DNA- Synthese Anstieg 7 Tage später erreicht [Bucher 1964]. Nach Erreichen von  $\pm 15\%$  des Leberausgangsvolumens sistiert die Proliferation [Court 2002].

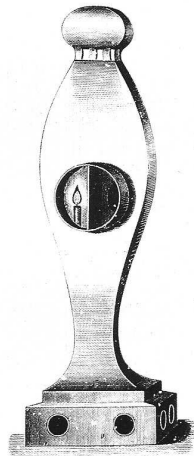
Auch wenn viele Mechanismen rund um die Regeneration der Leber noch nicht geklärt sind, konnte doch festgestellt werden, dass die Faktoren, die zur Regulierung der Leberregeneration beitragen, hauptsächlich extrahepatisch gebildet werden [Michalopoulos 1992; Michalopoulos 2007]. An Ausdauer und Intensität ist die Regeneration der Leber sogar mit der des hämatopoetischen Systems zu vergleichen [Overturf 1997].

## 1.2 Die Entwicklung der laparoskopischen Chirurgie

Bereits Funde aus der Antike in Griechenland und Italien, in Form von röhrenartigen Instrumenten (Spekula) für die Untersuchungen von Zervix, Enddarm, Nase und Ohr, bekundeten ein frühes Interesse am laparoskopischen Arbeiten [Goetz 1991].

Einer der ersten Mediziner, die endoskopische Untersuchungen durchführten, war Hippocrates. Er entwickelte eine Art Spekulum zur rektoskopischen Behandlung von Fisteln. Sein Instrument war den heute verwendeten Instrumenten bereits sehr ähnlich [Berci 2000]. Durch den arabischen Arzt Albucasis von Cordoba (980 - 1037n. Chr.), der als größter Chirurg des Mittelalters galt und später auch durch Giulio Cesare Aranzi (1530- 1589) wurde versucht durch die Einstrahlung natürlichen Lichtes, die so genannte „Camera obscura“, tieferliegende Körperhöhlen zu untersuchen. Während der Renaissance wurde diese Technik von dem französischen Arzt Peter Borell weiterentwickelt, indem er einen konkaven Spiegel zur Reflektion und Fokussierung des Lichtes auf das zu untersuchende Objekt entwickelte [Goetz 1991].

Bis anfänglich des 19. Jahrhunderts war das Hauptproblem jeder endoskopischen Untersuchung die unzureichende Beleuchtung. Im Jahr 1806 legte der italienisch stämmige Philipp Bozzini (1773- 1809) mit der Entwicklung des "Lichtleiters" den Grundstein der fortschrittlichen Endoskopie (*Abb.3*) [Bozzini 1806]. Das Instrument, welches noch ohne Optik auskommen musste, war aufgebaut aus einem doppelläufigen Rohr. Durch das eine Lumen traf Kerzenlicht auf einen konkaven Spiegel, der dieses reflektierte und den gewünschten Ausschnitt damit beleuchtete. Das zweite Lumen diente der Betrachtung des beleuchteten Ausschnittes. Obwohl die Lichtquelle viel zu schwach und das Sichtfeld sehr klein waren, basierten doch fast alle weiteren Versuche der nächsten Jahrzehnte auf diesem Prinzip [Goetz 1991, Berci 1994]. Antonin J. Desormeaux, ein französischer Arzt entwickelte Bozzinis Lichtleiter weiter, indem er die Kerze gegen eine Gasbogenflamme ersetzte. Ab 1853 wurde dieses Gerät vermehrt produziert und vertrieben. Aufgrund dessen gilt Desormeaux als „Vater der Endoskopie“ [Goetz 1991].



**Abb.3** „Lichtleiter“ von Bozzini 1805 [Goetz, 1991]

Das vom Urologen Maximilian Nitze kombinierte Zystoskop, mit der von Thomas Edison entwickelten Glühlampe stellten 1879 den ersten entscheidenden Schritt zur Entwicklung eines Endoskops dar. Zusammen mit dem Berliner Optiker Reinecke und dem Wiener Instrumentenbauer Leiter entwickelte er ein Linsensystem für Endoskope, das in seiner Grundstruktur jahrzehntelang Verwendung fand. Die Vorteile dieser neuen Technologie bestanden in einem größeren Sichtfeld und der korrekten Umkehr und Vergrößerung des Bildes [Nitze 1879, Goetz 1991].

Die erste diagnostische Laparoskopie erfolgte durch den dresdner Chirurgen Georg Kelling im Jahr 1901, welche er an einem Hund durchführte [Kelling 1902, Hatzinger 2006]. Er verwendete als erster ein weiterentwickeltes Leiterzystoskop zur Betrachtung der Bauchhöhle. Im Verlauf entwickelte Kelling gemeinsam mit dem breslauer Chirurgen Chlumsky eine Insufflationstechnik, mit der erstmalig erfolgreich Laparoskopien am Menschen vorgenommen wurden [Litynski 1996]. Eine Weiterführung Kelling's Gedanken und eine Verbesserung der Instrumente erfolgte etwa 10 Jahre später, durch den schwedischen Internisten Hans Christian Jacobaeus. Er führte mit weiterentwickelten verbesserten Instrumenten diagnostische Laparoskopien des Thorax und der Bauchhöhle, allerdings noch ohne Anlage eines Pneumoperitoneums, durch [Jacobaeus 1911]. Bereits 1911 veröffentlichte Jacobaeus seine ersten 115 laparoskopischen Fälle [Jacobaeus 1911, Hatzinger 2006]. Sieben Jahre später, im Jahr 1918 berichtete Otto Goetze in seinem Artikel "Die Röntgendiagnostik bei gasgefüllter Bauchhöhle; eine neue Methode" über seine Konstruktion einer automatischen Nadel, über die es möglich war, das Peritoneum gefahrlos mit Gas zu füllen [Goetze 1921]. Weitere zwanzig Jahre

später beschrieb der Ungar János Veress (1903- 1979) in der Deutschen Medizinischen Wochenschrift das gleiche Instrument " zur Brust- oder Bauchhöhlenpunktion" [Litynski 1996]. Seine spezielle Kanüle, die Veress- Kanüle verfügte über einen verbesserten Federungsmechanismus [Veress. 1938].

Das Pneumoperitoneum wurde zunächst mittels Luft erzeugt. Erstmals wurde 1924 hierfür Kohlendioxid durch den Schweizer Gynäkologen Richard Zollikofer verwendet, wodurch auch die gefahrlose Anwendung von Hochfrequenzstrom ermöglicht wurde [Zollikofer 1924, Litynski 1996].

Einen therapeutischen Aspekt erlangte die Laparoskopie 1933 durch den französischen Gynäkologen Carl Fervers, der die erste laparoskopische Bridenlösung unter Sicht durchführte [Fervers 1933]. Der Berliner Hepatologe Heinz Kalk standardisierte in der Folgezeit die Laparoskopie als feste diagnostische Routinemethode in der Inneren Medizin. Er veröffentlichte mehr als 21 Arbeiten zum Thema Laparoskopie. Zudem entwickelte er ein Laparoskop mit 135 Grad Optik. [Kalk 1951, Goetz 1991]. Im medizintechnischen Bereich gelang es im Jahr 1959 dem englischen Professor Harald Horace Hopkins der Reading Universität das Stabliniensystem für starre Endoskope, mit einer 80- fachen Steigerung der Lichtübertragung- im Vergleich zum Nitze- Zystoskop- zu patentieren. Die neue Konstruktion der Optik ermöglichte eine erheblich verbesserte Bildfarbe und ein größeres Sichtfeld [Hopkins 1954]. Der Internist B. Hirschowitz aus Michigan und der Physikprofessor C. Wilbur Peters entwickelten dieses System weiter und präsentierten wenige Jahre später das erste Endoskop, welches "kaltes Licht" aus einer externen Lichtquelle durch ein zweites Glasfaserbündel in die gewünschte Körperregion transportierte. Diese neue Technik war für die Weiterentwicklung der Laparoskopie von entscheidender Bedeutung, weil hiermit das Risiko der thermischen Verletzung abdominalen Organe beseitigt wurde [Hirschowitz 1958].

Zunächst erhielt die Laparoskopie kaum Aufmerksamkeit von Seiten der Chirurgie. Primär waren es die Gynäkologen, die die operativen Möglichkeiten der Laparoskopie erkannten und effektiv nutzten und somit als Pioniere der neueren Entwicklungen in der vorchirurgischen Übergangszeit der Laparoskopie gelten. Vor allem der Kieler Gynäkologe Kurt Semm hat in den 70er und 80er Jahren die Entwicklung entscheidend vorangetrieben. Neben der Erfindung eines automatischen Insufflators, zur kontrollierten und automatischen Gasinsufflation, mit Monitoring des Gasflusses und des intraabdominellen Drucks, entwickelte er u.a. die bipolare Koagulationszange sowie Elektrohäkchen und Instrumente für die Durchführung von intrakorporalen Knoten [Semm 1978]. Im Jahr 1982 führte er die erste laparoskopische

Appendektomie durch [Semm 1983]. Die erste laparoskopische Cholezystektomie wurde 1985 vom deutschen Chirurgen Erich Mühe aus Böblingen durchgeführt [Mühe 1986].

Als die Firma *Circon* 1986 die Computer- Chip Video Kamera entwickelte, kam es schließlich zum Durchbruch der laparoskopischen Chirurgie [Filipi 1991]. Die erste video- assistierte laparoskopische Cholezystektomie wurde 1987 durch den Franzosen Philippe Mouret aus Lyon durchgeführt [Mouret 1996]. Standardisiert und perfektioniert wurde die laparoskopische Cholezystektomie durch die Chirurgen Francois Dubois und Jacques Périssat [Cuschieri 1992]. Seitdem gewann die Laparoskopie weltweit an Bedeutung und führte zu einer Verbesserung und Weiterentwicklung der Methode.

<b>Jahr</b>	<b>Erstbeschreiber</b>	<b>Eingriffe</b>
1980	Semm	Laparoskopische Appendektomie
1982	Ger	Laparoskopische Hernienreparation
1985	Mühe	Laparoskopische Cholezystektomie
1991	Dallemagne	Laparoskopische Fundoplikatio
1991	Jacobs	Laparoskopische Kolonresektion
1992	Gagner	Laparoskopische Adrenalektomie
1993	Corbitt Jr.	TAPP Reparation
1993	McKernan	TEP Reparation
1993	Belachew	Laparoskopisches >>gastric banding<<
1994	Weerts	Laparoskopische proximale selektive Vagotomie
1994	Katkhouda	Laparoskopische Leberteileresektion
1996	Cushieri	Laparoskopische Pankreasteileresektion

**Tab. 2** Erstbeschreibung laparoskopischer Operationstechniken

### **1.3 Aktueller Stand der laparoskopischen Leberchirurgie in der Klinik**

Heute wird die Laparoskopie zur Behandlung zahlreicher allgemein-, viszeral- und thoraxchirurgischer Erkrankungen eingesetzt [Carus 1995; Cuschieri 1992; Eypasch 1993; Tate 1993; Urbano 1994; Wexner 1992]. Die Laparoskopie beschränkt sich hierbei nicht nur auf Standardeingriffe, wie die laparoskopische Appendektomie, Hernioplastik, Splenektomie, Adrenalektomie sowie Eingriffen an Kolon, Magen und Rektum bei gutartigen Erkrankungen [Pugliese 2007; Bruch 2005; Leibl 2005; Roviario 2006, Kleemann 2010]. Die Weiterentwicklung führte zum verstärkten Einsatz der minimal invasiven Technik bei der Resektion bösartiger Tumoren [Fernandez 1993; Liorente 1994; Nathanson 1993; Wade 1994; Wayand 1993]. Die laparoskopische Entfernung von Kolonkarzinomen ist in großen Zentren inzwischen zu einer Standardoperation geworden. Dabei konnten klinische Studien zeigen, dass die laparoskopische kolorektale Chirurgie ohne Zunahme von Morbidität und Letalität durchgeführt werden kann. Allerdings wurde die Einführung der laparoskopischen Resektion bösartiger Tumore von der potentiellen Gefahr vermehrten Tumorwachstums überschattet. Berichte über die Entstehung von sogenannten Trokarmetastasen haben zu einer heftigen Diskussion über die Indikation der Laparoskopie in der Tumorchirurgie geführt [Jacobi 1995; Wexner 1995].

Seit den 90er Jahren gewann die laparoskopische Chirurgie auch zunehmend in der klinisch- und tierexperimentellen Forschung an Bedeutung [Gutt 2003; Gutt 2004; Leister 2002; Junghans 2006]. Es gibt bereits eine Vielzahl an Studien über den Einfluss des Pneumoperitoneums auf diverse Körperfunktionen, sowie die Auswirkungen auf das Immunsystem und das Tumorwachstum [Sylla 2005; Kirman 2005; Jacobi 2002].

Eines der letzten Hindernisse für die laparoskopische Chirurgie stellte lange Zeit die laparoskopische Leberchirurgie dar. Zum einen waren es die chirurgisch technischen Herausforderungen und zum anderen bestanden Zweifel an der onkologischen Sicherheit bei der laparoskopischen Resektion maligner Tumore, die den Großteil der Indikation zur Resektion darstellen [Gutt 2001]. Die erste atypische Leberteilektomie wurde bereits 1991 bei einer sechs Zentimeter großen fokal nodulären Hyperplasie durchgeführt [Gagner 1992, Schön 2010]. Bei einem Patienten mit einem benignen Adenom wurde jedoch erst 1996 die erste anatomische Leberteilektomie (Segmente II und III) vorgenommen [Azagra 1996]. Inzwischen gibt es weit mehr als 700 Publikationen zur laparoskopischen Leberteilektomie, einschließlich



Hemihepatektomien und Trisektorektomien [Gagner 2004]. Davon erfolgten allein 30% bei malignen Lebertumoren [Gagner 2004]. Die erste laparoskopische Donorhepatektomie erfolgte 2002, im Rahmen einer Transplantation durch Leberlebendspende [Cherqui 2002].

Die laparoskopische Operationsmethode wird vor allem bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion, wie z.B. Leberzirrhose oder Fettleber als therapeutische Option diskutiert. Gründe dafür sind das geringere Gewebetrauma, die geringe Letalitätsrate (<0,1%) und die geringere allgemeine Komplikationsrate (1 bis 5%) [Abdel Atty 1999, Schön 2010].

In einer Umfrage von Kleemann et al wurde der Stand der laparoskopischen Leberchirurgie in Deutschland für das Jahr 2008 ermittelt. Konstatiert werden konnte, dass die laparoskopische Leberchirurgie in Deutschland sowohl bei gut- als auch bei bösartigen Krankheitsbildern durchgeführt wird. Der laparoskopische Zugangsweg wurde hierbei allgemein hin favorisiert. Die primäre Indikation zur Laparoskopie ist die atypische, gefolgt von der linkslateralen Resektion. Alle weiteren Resektionen erfolgen nur in geringen Zahlen. Festgestellt wurde zudem, dass die laparoskopische Leberchirurgie in allen Krankenhausversorgungsstufen vertreten ist [Kleemann 2010, Schön 2010].

Eine ganze Dekade nach der ersten laparoskopischen Leberteileresektion lässt sich feststellen, dass die laparoskopische Leberchirurgie technisch sicher durchführbar ist. Allerdings ist bis heute der Einfluss des Pneumoperitoneums auf die Leberregeneration noch nicht geklärt, so dass eine abschließende Beurteilung des Verfahrens noch nicht möglich ist, vor allem im Hinblick auf eine mögliche Ausweitung des Indikationsspektrums.

Den hier womöglich größten Vorteil der minimalinvasiven Methode gegenüber der konventionellen Laparotomie könnte die Verminderung des durch die Operation bedingten Traumas und Stresses für die Patienten darstellen. Vermindertes Trauma bedeutet unter anderem weniger postoperative Schmerzen, was die postoperative Mobilisation erleichtert. Damit kann gerade bei älteren Patienten zum einen das operative Risiko selbst und zum anderen die Rate postoperativer Komplikationen reduziert werden [Jorgensen 1995, Rosen 2001, Schön 2010, Weber 2003, Wexner 1997]. Diese Faktoren können kürzere Liegezeiten und damit, dank einer geringeren Anzahl an Krankheitstagen, eine deutliche Kostenersparnis bedeuten [Rosen 2001]. Darüber hinaus beschreiben einige Autoren, für am Tiermodell durchgeführte Laparoskopien, eine geringere Inzidenz postoperativer Adhäsionen als nach konventioneller Laparotomie [Jorgensen 1995]. Dies gilt für die Visceralchirurgie sowie alle anderen Disziplinen, welche die Methode des laparoskopischen Operierens für sich in Anspruch nehmen [Muzii 1996].

Die minimal invasive Chirurgie befindet sich immer noch in der Weiterentwicklung. Zu Beginn des neuen Jahrtausends war vor allem die Einführung der Operationsroboter (Da Vinci System,

ZEUS) ein zusätzlicher Quantensprung. Bei diesen Techniken steuert der Chirurg einen Roboter, der für ihn die Instrumente sowie die Kamera führt [Ballantyne 2002]. Es wurden eigens Operationssimulatoren zur Schulung der Chirurgen entwickelt, um deren manuelle Fähigkeiten zu trainieren [Hyltander 2002].

Die Einführung der NOTES Laparoskopie und der LESS Technik (Laparoscopic Endoscopic Singleport Surgery) stellen momentan die aktuellsten minimalinvasiven Operationstechniken dar [Hatzinger 2010].

Auch in den kommenden Jahren ist mit einer Weiterentwicklung der minimal- invasiven OP-Technik zu rechnen.

## 2. Fragestellung

Die laparoskopische Operationstechnik in der Leberchirurgie weitet sich immer mehr aus und lässt die Frage aufkommen, ob die Leberregeneration durch das Pneumoperitoneum negativ beeinflusst wird. Zielsetzung der Arbeit ist es, anhand verschiedener Proliferationsparameter den Einfluss des CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneums auf die Leberregeneration, im Vergleich zwischen laparoskopisch und konventionell resezierten Rattenlebern, zu ermitteln.

Es gibt derzeit nur zwei experimentelle Untersuchungen am Rattenmodell, die eine Hemmung der postoperativen Leberregeneration nach partieller Leberteileresektion mit vorangegangem CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum feststellten [Kaya 2002, Yagmurdur 2004].

Die Leberresektion im Modell von Kaya et al. erfolgte nach 24-stündigem CO<sub>2</sub>-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 Leberteileresektion ungeeignet.

In der Studie von Yagmurdur et al. wurde das Pneumoperitoneum für 60 Minuten bei einem Druck von 15 mm Hg aufrecht erhalten, was der klinischen Situation schon eher entspricht. Festgestellt wurde in dieser Studie, dass es zu einer Suppression der Leberregeneration am 5. postoperativen Tag kommt.

Wie in der Einleitung erwähnt, tritt das Maximum an mitotischer Aktivität bereits 22 h-24 h nach einer Leberschädigung auf.

Um die Auswirkung des Pneumoperitoneums auf den Zellzyklus zu untersuchen, sind frühere Messzeitpunkte notwendig.

In dieser Dissertation sollen folgende Fragen im Rattenmodell untersucht werden:

- Welchen Einfluss hat das CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum auf die postoperative Leberregeneration der gesunden Leber?
  
- Falls das CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum zu einer Hemmung der Leberregeneration führt, auf welchen molekularbiologischen Abläufen beruhen eventuelle Veränderungen der Regeneration?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

Reagenz	Hersteller	Ort
β- Mercaptoethanol	Calbiochem	Darmstadt, D
Aceton	J.T. Baker	Deventer, NL
Agarose	Seakem	
Aqua destillata	Fresenius Kabi	Bad Homburg, D
Basenpaarleiter 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas	
BCA Reagenz ( <i>Biochinonic Acid Solution</i> )	Sigma	Steinheim, D
Biotin Blocking Solution	DAKO	Carpintiera, USA
Borsäure	Sigma	Steinheim, D
Bromphenolblau	Sigma	St. Louis, USA
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Sigma	Steinheim, D
CuSO <sub>4</sub> (Kupfersulfat)	Merck	Darmstadt, D
DAKO Pen	DAKO	Glostup, DK
DMSO ( <i>Dimethylsulfoxid</i> )	Sigma	Steinheim, D
dNTP ( <i>Desoxynukleotidtriphosphat</i> )	Qiagen	Hilden, D
DTT ( <i>Dithiothreitol</i> )	Sigma	Deisenhofen, D
EDTA Lösung	Sigma	Steinheim, D
Entelan	Merck	Darmstadt, D
Eosin	Sigma	Deisenhofen, D
Essigsäure	Riedel de Haen	Seelze, D
Ethanol (100%, 96%, 80%, 70%)	Herbata	Berlin, D
Ethidiumbromid	Sigma	Steinheim, D

Glycin	Serva	Heidelberg, D
Glycerol	Sigma	Steinheim, D
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	DAKO	Hamburg, D
HClO <sub>4</sub> (Perchlorsäure)	Merck	Darmstadt, d
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt, D
Härris Hämatoxylin	Sigma	Steinheim, D
HEPES	Roth GmbH & CoKG	Karlsruhe, D
Igepal CA 630	Sigma	Steinheim, D
Isofluran	Abbott GmbH	Wiesbaden, D
Kaisers Glycerol Gelatine	Merck	Darmstadt, D
Liquid Dab+ Substrate- Chromogen Solution	DAKO	Carpintiera, USA
Methanol	J.T. Baker	Deventer, NL
MgCl (Magnesiumchlorid)	Merck	Darmstadt, Dt
NaCl (Natriumchlorid)	Merck	Darmstadt, Dt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt, D
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt, D
NaOH- (Natriumhydroxid) Plätzchen	Sigma	Steinheim, D
Natronlauge 1N	J.T. Baker	Deventer, NL
Oligo (dT)Primer	Invitrogen	Carlsbad, USA
Paraclear	Quartett	USA
Peroxidase blocking solution	DAKO	Carpintiera, USA
Peroxidase- Conjugated Streptavidin	DAKO	Carpintiera, USA
PMSF ( <i>Phenylmethylsulfonyl</i> fluoride)	Sigma	Deisenhofen, D
Protease Inhibitor Cocktail Tbl.	Roche GmbH	Mannheim, D
RNasin	Promega	Madison, USA

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Merck	Hohenbrunn, D
Taq Polymerase	Gibco BRL	
Tris Base	Sigma	Steinheim, D
Tris HCl	Sigma	Steinheim, D
Tween 20	Aldrich	Steinheim, D
Ultramount	Sigma	Steinheim, D
Xylol	Merck	Darmstadt, D
Zitronensäure	Merck	Darmstadt, D

**Tab.4** Reagenzien und Chemikalien

Alle weiteren Chemikalien stammten aus kommerziellen Quellen und hatten die höchste verfügbare Reinheit.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Citratpuffer (pH 6,0)	18ml Citronensäure- Monohydrat 0,1mol, 82ml Natriumcitrat- Dihydrat 0,1mol, mit Aqua dest. auf 1l auffüllen, pH 6,0 einstellen mit 1N NaOH oder 1N HCl
Laufpuffer	62,5mM Tris pH 8,3 (30g Tris base), 144g mM Glycine 192 mM, 0,1%SDS, mit Aqua dest. auf 1l
PBS Puffer 10* (Stock)	82,3g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,58M, 26,5g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O 0,17M, 39,7g NaCl 0,68M, add. 800ml Aqua dest. auf 1l
PBS <sub>t</sub>	1:10 Verdünnung 10*PBS mit Aqua dest. + 0,1% Tween 20
RIPA- Puffer	100ml PBS, 1g Nonidet P40 1% oder 1ml Igepal CA 630, 0,5g Sodiumdeoxycholate 0,5%, 0,1g SDS 0,1%, 40µl PMSF (10mg/ml Isopropanol)
TBE- Puffer 5* (Stock)	54g Tris base, 37,5g Borsäure, 20ml EDTA Lösung 0,5M (pH 8), NaOH Plätzchen, add auf 1l Aqua dest; Verdünnung 1:10 für 0,5-fach Verwendung
Waschpuffer (pH 7,4)	0,9 g Tris base, 6,85 g Tris HCl, 8,78 g NaCl, Aqua dest, pH 7,4 einstellen mittels 1N HCl oder 1N NaOH

**Tab.5** Puffer

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
DAKO LSAB 2 Kit	DakoCytomation, Capintiera, USA
Omniscript RT- Kit (200)	Quiagen, Hilden, D
Total RNA- Isolationsset	Nucleo Spin RNA II

**Tab.6 Kits**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller/ Bezeichnung</b>
96- Well- Platte (Microtest 96)	Decton Dickinson
Dampfkochtopf	
Deckgläschen	Menzel Gläser
Endoskopische Polypektomieschlinge	Storz, Tuttlingen, D
Feinwaage	Sartorius type 1518, Göttingen, D
	Sartorius AC 1215, Göttingen, D
Fotometer (FLUOstar Galaxy V4.30-0)	BMG Labtechnologies, Offenburg, D
HF- Strom- Generator	Storz, Tuttlingen, D
Kamera Leica Wild MPS	Leitz DMRB, Bensheim, D
Kamera Leica 52	Leica, Bensheim, D
Magnetrührgerät	
Mikrochirurgische Operationsinstrumente	Aeskulap
Microtom	Leica Microsystem, Nussloch, D
Mikroskope	Leitz, Wetzlar GmbH, D
Mini- protean 3 Electrophoresis Cell-Set	Bio Rad, München, D
Nanodrop ND 1000	
Narkosegerät	
Neutralelektrode	Storz, Tuttlingen, D
Nitrozellulose- Membran	Bio Rad, München, D
Objektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck, Teningen, D
Parafilm	
pH- Meter CG 840	



Short plates (Miniprot. III)	Bio Rad, München, D
Thermocycler	PTC- 100TM ; Programmable Thermal Controller Bio Rad, Oldendorf, D
	DNA Engine Gradient Cyler MJ Research PTC- 200 Peltier Thermal Cyler, Oldendorf, D
Ultra- Turrax T25	Janke & Kunkel; IKA Labortechnik, Staufen, D
Veress Nadel	Ethicon, Hamburg, D
Vicryl 3-0	Ethicon, Norderstedt, D
Vortex Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Wipp-/Horizontalschüttler	Heidolph Promax 2020, Kelheim, D
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R

**Tab.7** Geräte

Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Ähnliches wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon und Sarstedt bezogen.

<b>Primer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>β- Actin</b>	Interactiva, Ulm, D
Sense: 5` ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3` Antisense: 5`CGG AAC CGC TCA TTG CC 3`	
<b>VEGF</b>	Interactiva, Ulm, D
Sense: 5`GGT GTG GTG GTG ACA TGG TTA ATC3` Antisense: 5`CCA GCA CAT AGG AGA GAT GAG CTT C3`	
<b>HGF</b>	Eurofins MWG GmbH, Bad Homburg, D
Sense: 5` GCT GCC TCC TCC ACC AAT GA 3` Antisense: 5` CCC CTA TGC AGA AGG ACA GA 3`	
<b>TGF β</b>	Interactiva, Ulm, D
Sense: 5`CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC3` Antisense: 5`CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC3`	
<b>IL- 1β</b>	Interactiva, Ulm, D
Sense: 5` AAG AAG GTG CTT GGG TCC TCA TCC3` Antisense: 5`CTT CCT TGT GCA AGT GTC TGA AGC3`	

**Tab.8** Primer

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Biotinylated Rabbit Anti Mouse- Streptavidin	DAKO, Hamburg, D
DAB + Substrat Chromogen	DAKO, Hamburg, D
Mouse anti rat Ki- 67 Antigen	DAKO, Hamburg, D
Rabbit anti Mouse Immunglobulins	DAKO, Carpintiera, USA

*Tab.9 Antikörper*

### **3.1.1 Versuchstiere**

Für die Präparation wurden 60 männliche Wistar- Ratten, Charles- River Wiga GmbH, 97633 Sulzfeld verwendet. Ihr Körpergewicht betrug zwischen 220g- 250g.

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte gemäß der geltenden Richtlinien für die Haltung und Behandlung von Labortieren, nach Genehmigung durch das Landesamt für Arbeits-, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin vom 06.09.2005 (AZ G0127/05).

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1 Vorversuch**

Im Vorversuch wurden die Tiere mit einer 60 minütigen alleinigen Inhalationsnarkose bzw. einer 60 minütigen Inhalationsnarkose mit Anlage eines CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneums unterzogen. Die Tiere, die ausschließlich der Inhalationsnarkose unterzogen wurden, erhielten eine kleine Stichinzision, um ein analoges Bauchdeckentrauma zu simulieren.

### **3.2.2 Hauptversuch**

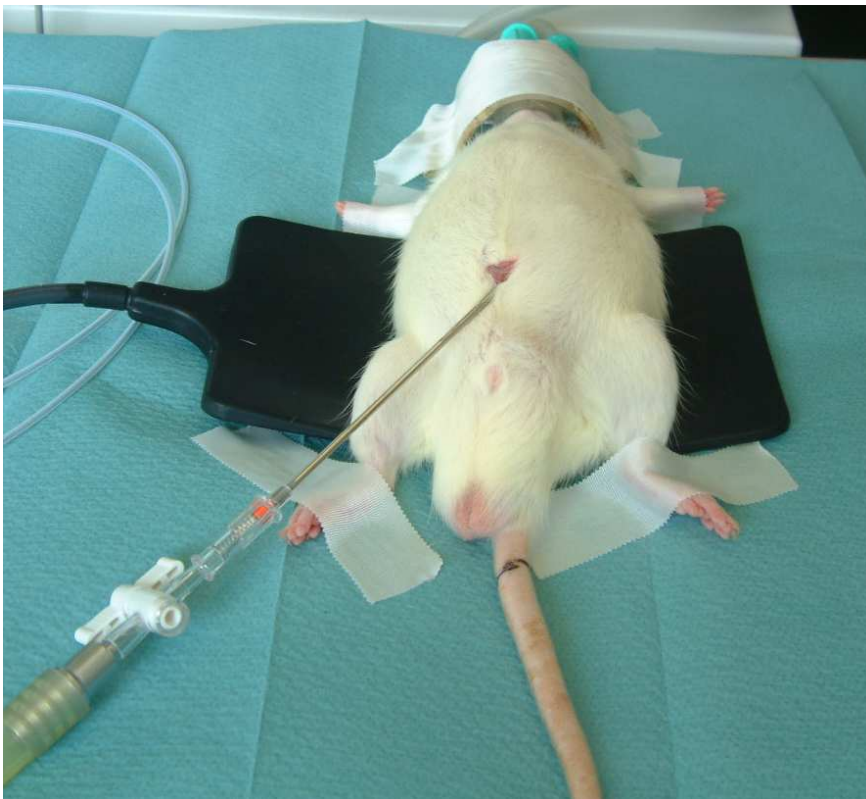
Im Hauptversuch wurden die Tiere einer 60 minütigen alleinigen Inhalationsnarkose bzw. einer 60 minütigen Inhalationsnarkose mit Anlage eines CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneums unterzogen. Im Anschluss erfolgte bei allen Tieren unter Inhalationsnarkose eine offene 70%ige Leberteilresektion.

### **3.2.3 Haltung der Versuchstiere**

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Charité Campus-Virchow-Klinikum, Universitätsmedizin Berlin. Während der Eingewöhnungszeit von einer Woche wurde ein Hell-Dunkel- Rhythmus von 12 Stunden eingehalten. Die Wistar- Ratten hatten freien Zugang zu Standardfutter und Wasser ad libitum.

### 3.2.4 Lagerung und Vorbereitung zur Operation

Präoperativ wurden die Tiere gewogen und das Operationsfeld im Mittelbauchbereich desinfiziert und anschließend rasiert. Für den operativen Eingriff wurden die Versuchstiere in Rückenlagerung fixiert. Aufgrund des späteren Gebrauchs einer Diathermieschlinge erfolgte zur Erdung die Lagerung auf einer Neutralelektrode (**Abb. 4**).



**Abb.4** auf Neutralelektrode gelagerte Wistarratte mit Veressnadel in situ

### 3.2.5 Narkose

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einem Gemisch aus Sauerstoff, Isofluran und Lachgas. Die Eingriffe wurden in tiefer Inhalationsnarkose, mit einem Isofluran/ Sauerstoff/ Lachgas-Gemisch (1,5%- 3% Isofluran, 0,5l/min Sauerstoff) durchgeführt. Unter dieser Narkosetechnik atmeten die Tiere spontan und selbständig. Die Narkosetiefe wurde durch den Chirurgen anhand der Herz- und Atemfrequenz überwacht und reguliert.

### 3.2.6 Anlage des CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneums

Zur Anlage des Pneumoperitoneums wurde zwischen dem Processus xyphoideus und dem Os pubis mittig auf der Linea alba eine Stichinzision durchgeführt, über die eine Veress- Nadel in das Abdomen eingebracht und ein intraabdomineller Druck von 9mmHg erzeugt wurde (*Abb.5*). Die Anlage und Aufrechterhaltung des Pneumoperitoneums über 60 Minuten erfolgte über einen speziellen automatisch gesteuerten Insufflator.

Postoperativ wurde den Versuchstieren zeitnah das Analgetikum Pentazocin (2-10mg/kg KG) subkutan appliziert.



*Abb.5* Anlage des CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneums

### 3.2.7 Technik der 70% Leberteileresektion

Im Anschluss an die Desufflation des Pneumoperitoneums, bzw. der 60- minütigen Narkose erfolgte, erfolgte in Anlehnung an Higgins und Anderson [Anderson und Higgins 1931] die 70%ige Leberresektion. Der Zugang fand über eine mediane Laparotomie statt, wobei die Haltebänder der Leber durchtrennt wurden. Reseziert wurden der linkslaterale und der mediane Lappen mit Hilfe einer Diathermieschlinge, die um den zu resezierenden Leberlappen platziert wurde. Durch den einwirkenden Strom [Krähenbühl 1998] wurde eine plane Resektionsfläche

am verbleibenden minimalen Parenchymrest hinterlassen, sowie für eine Blutstillung gesorgt (**Abb.6**). Die Abdominalhöhle wurde anschließend durch eine zweireihig fortlaufende Naht mit Vicryl 3-0 verschlossen. Postoperativ wurden alle Tiere mit Pentazocin analgisiert unter eine Wärmelampe gelegt und nach dem Erwachen aus der Narkose in Einzelkäfigen untergebracht. Sie erhielten Futter ad libitum und freien Zugang zu Wasser.



*Abb.6 resezierter mittlerer und linkslateraler Leberlappen*

### **3.2.8 Probenentnahme**

Je nach Versuch erfolgte die Tötung und Gewebeasservierung 12, 24, 48 Stunden oder 4 Tage nach der Leberresektion.

Getötet wurden die narkotisierten Tiere mit Hilfe einer 24G Kanüle, über die gleichzeitig Blut aus der infrarenalen Aorta entnommen wurde. Das Blut wurde in jeweils ein Serum- und Heparinröhrchen überführt. Das Serumröhrchen wurde bei 1500 U/min und 4 Grad Celsius für

10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Das Heparinröhrchen wurde umgehend zur serologischen Analyse in das Zentrallabor überführt.

Die Leber wurde nach Entnahme gewogen und Gewebeproben aus der Restleber zum einen in vier prozentiger Formalin- Lösung fixiert und zum anderen in Nalgeneröhrchen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

### **3.2.9 Biochemische Analysen- (AST, ALT, GLDH, LDH)**

Die Analyse der Parameter AST (Aspartat- Amino- Transferase), ALT (Alanin- Amino- Transferase), GLDH (Glutamat Dehydrogenase) sowie LDH (Lactat Dehydrogenase) erfolgte unmittelbar nach der Blutentnahme anhand heparinierter Serumproben mit den handelsüblichen Kits im Zentrallabor der Charité, Campus Virchow-Klinikum Berlin.

Die Alanin- Amino- Transferase als leberspezifisches Enzym ist zu 70% im Zytosol der Hepatozyten lokalisiert [Schmidt 2000]. Die Lactat Dehydrogenase ist ubiquitär im Zytoplasma vorhanden und stellt einen Marker für die ischämische Schädigung der Leber dar.

Die AST (zu 70%) und die Glutamat Dehydrogenase sind überwiegend in den Mitochondrien der Leberzellen lokalisiert. Wobei die GLDH ebenfalls als leberspezifisch gilt [Schmidt 2000].

Durch die Analyse dieser Enzyme lassen sich Aussagen über die Schwere der zellulären Schädigung der Leberzellen treffen.

### **3.2.10 Histologie**

#### **3.2.10.1 Herstellung von Paraffin- Schnittpräparaten**

Das in Paraffin eingebettete Lebergewebe wurde auf -2 °C gekühlt, in die Halterung des Microtoms eingespannt und unmittelbar unter die Schnittebene des fest eingeschraubten Messers gebracht. Danach wurden Schnitte in der gewünschten Dicke von fünf Mikrometern geschnitten.

Der Schnitt schiebt sich dabei auf das Messer. Mit Hilfe eines Pinsels wird der Schnitt in ein Warmwasserbad mit Aqua destilata übertragen. Das angewärmte Wasser bewirkt eine Glättung und Streckung des Schnittes. Anschließend erfolgt das Aufziehen auf saubere, fettfreie und beschichtete Objektträger. Dazu werden diese so tief und schräg in das Wasserbad gehalten, dass der Schnitt an der gewünschten Stelle aufgezogen werden kann. Die Objektträger werden bei Raumtemperatur getrocknet und können bis zur Weiterverwendung bei Raumtemperatur gelagert werden. Von jedem Block wurden mindestens 5 Schnitte angefertigt, die für eine Hämatoxylin-Eosin- Färbung, eine immunhistologische Ki-67- Färbung, sowie als Reserve und zur Etablierung von Inkubationsprotokollen verwandt wurden.

### 3.2.10.2 Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Die HE- Färbung ist eine Übersichtsfärbung und erfolgt nach Fixation mittels Hämatoxylin und Eosin. Durch Oxidation des Hämatoxylins entsteht Hämatin, welches mit Phosphationen einen positiv geladenen Komplex bildet. Die negative Phosphatgruppe der DNA bindet mit dem Farbkomplex und stellt sich im Schnitt anhand der blau gefärbten Zellkerne dar. Das Zytoplasma erscheint infolge der Anfärbung mit dem sauren Eosin leicht rötlich.

Darstell- und beurteilbar sind durch diese Färbung zum einen die Proliferation der Leberzellen, anhand der Auszählung der Mitosen und anschließender Berechnung des Mitoseindex (MI) (**Abb.7**) und zum anderen kann eine Aussage zur hepatozellulären Schädigung, Nekrosen und Apoptosen getroffen werden.

Nach Auszählung der mitotischen und nicht mitotischen Zellen, in zufällig ausgewählten Leberfeldern bei 400- facher Vergrößerung, konnte der prozentuale Anteil der mitotischen Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt werden. Die Gesamtzellzahl rangiert bei 1000 Hepatozyten.

$$\text{MI (\%)} = \frac{\text{Mitosefiguren}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

**Abb.7** Berechnung Mitoseindex



Bevor die Paraffinschnitte gefärbt werden konnten, mussten die Schnitte zunächst entparaffinisiert werden. Hierfür wurden die Objektträger nacheinander in Paraclear und verschiedene Alkohole zunehmender Hydrophilie getaucht.

Paraclear	2x 15 min
Ethanol 100%	2x 2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Aqua dest.	1- 2 min

**Tab.10a** Färbeprotokoll Hämatoxylin Eosin, Schritt I

Die Schnitte wurden anschließend folgendem Hämatoxylin-Eosin-Färbeverfahren unterzogen

Härris Hämatoxylin (Kernfärbung)	20 min
Spülen unter lauwarmem Leitungswasser	3 min
Färben in wässrigem Eosin+ 100µl Eisessig (Verstärkung der Farbintensität)	1- 2 min
Kurz spülen in Aqua destillata	

**Tab.10b** Färbeprotokoll Hämatoxylin Eosin, Schritt II

Zur Dehydrierung und Entalkoholisierung wurden die Präparate nacheinander in folgende Lösungen eingebracht

Ethanol 80%	1 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 100%	2x 2 min
Paraclear	2x 15 min

**Tab.10c** Färbeprotokoll Hämatoxylin Eosin, Schritt III

Im noch feuchten Zustand wurden die Präparate mit einem Tropfen Entelan luftdicht unter Deckgläschen eingedeckt. Luftbläschen und überquellendes Medium wurden entfernt. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte 24- 48 Stunden unter dem Abzug getrocknet.

### 3.2.11 Immunhistochemie

#### 3.2.11.1 Ki- 67 Immunhistologie

Das Zellkernprotein Ki- 67 wurde Anfang der 80er Jahre von Gerdes et al. entdeckt und definiert. Die Bezeichnung “Ki“ steht für den ursprünglichen Entdeckungsort Kiel und die Zahl “67“ für die Lokalisation auf der Mikrotiterplatte [Gerdes 1983].

Ki- 67 ist ein Antigen, das zu den Proliferationsmarkern gehört. Es färbt die sich vermehrenden Zellkerne, die sogenannte Wachstumsfraktion in allen aktiven Phasen des Zellzyklus an. Die genaue Funktion des Proteins ist bis heute nicht bekannt [Scholzen 2000].

Der Nachweis des Antigens erfolgt nach der LSAB- Methode. Hierbei wird im ersten Schritt ein Primär-Antikörper gegen das gesuchte Antigen aufgetragen. Darauf folgt ein gegen den ersten Antikörper gerichteter biotinylierter, polyklonaler Sekundärantikörper, gewonnen aus einer anderen Tierspezies als der Primär-Antikörper. Der dritte Schritt ergibt sich aus einem peroxidase-konjugierten Streptavidin-Komplex, bei dem das Streptavidin mit dem Biotin des Sekundär-Antikörpers eine Verbindung herstellt. Durch die Nutzung einer Substrat Chromogenlösung kann das Enzym Peroxidase und damit das gebundene Antigen sichtbar gemacht werden.

Ki- 67- positive Zellen sind gekennzeichnet durch eine bräunliche Zellkernfärbung, wobei die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus als charakteristisches Färbemuster erkennbar sind. Die relative Zahl der Zellen, die sich in der Proliferation befinden, kann als Gesamtproliferationsindex durch die Auszählung der positiven Zellen, bezogen auf 1000 Hepatozyten, bestimmt werden.

Die fünf Mikrometer dicken Paraffinschnitte wurden zunächst für 30 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend wie folgt weiterbearbeitet:

Ethanol 100%	10 min
Ethanol 96%	10 min
Ethanol 70%	10 min
Aqua destillata	10 min

**Tab.11** Entparaffinisierungsschritte

Demaskierung mit Citratpuffer (pH 6,0):

Lösung A: Citronensäure Monohydrat 0,1 mol (21,014 g/ 1000 ml)

Lösung B: Natriumcitrat- Dihydrat 0,1 mol (29,41 g/ 1000 ml)

18 ml Lösung A+ 82 ml Lösung B, mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Die Objektträger werden in einer Farbküvette im Dampfkochtopf gut mit Citratpuffer bedeckt, der Topf geschlossen und 20 min gekocht. Anschließend werden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgekühlt.

Zur Verkleinerung der Fläche, die nachfolgend mit Antikörper benetzt werden soll, wird das Organ mit einem Fettstift umfahren (DAKO- Pen).

Die Schnitte wurden folgendem Ki- 67 Färbeverfahren nach DAB- Methode unterzogen

Peroxidase blocking Solution	10 min
Spülen mit Aqua destillata	10 min
Primärantikörper (Ki 67 1: 25 bzw. PCNA 1:50) in TBS gelöst, bei 4°C in feuchter Kammer	über Nacht
Spülen mit TBS	2x 3 min
biotinylerter Sekundärantikörper	30 min
TBS	2x 3 min
Streptavidin HRP	10 min
TBS	2x 3 min
DAB- Komplex	1 min
Aqua destillata	ca. 1 min
Hämatoxylin- Gegenfärbung	ca. 20 sec.
Mit warmem Leitungswasser bläuen	

**Tab.12** Ki-67 Färbeverfahren nach DAB- Methode

Jedes Präparat wurde mit einem Tropfen Kaisers Glyceringelatine beträufelt, mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Abzug für 24- 48 h getrocknet.

### **3.2.12 Zytokinbestimmungen durch PCR**

Die PCR (Polymerase chain reaction) wurde von Kary Mullis entdeckt und erstmalig 1985 von der amerikanischen Arbeitsgruppe um Saiki beschrieben [Saiki 1985]. Sie dient der in vitro Vermehrung (Amplifizierung) bestimmter DNA- Stücke und ermöglicht einen schnellen, spezifischen Direktnachweis kleinster Anteile von RNA oder DNA. Das Prinzip beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten.

Zunächst wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge denaturiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung (Annealing) synthetischer Oligonukleotide (Primer) an die entsprechenden Enden des zu vermehrenden Bereiches. Abschließend kommt es, ausgehend von den Primern zu einer Neubildung (Elongation) doppelsträngiger DNA, katalysiert durch das Enzym DNA-Polymerase.

Zunächst ist es jedoch nötig die RNA aus Lebergewebe zu isolieren um sie anschließend als Matrize zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) zu nutzen. Dies erfolgt durch das Verfahren der reversen Transkription (RT). Die so entstandene cDNA dient anschließend in der PCR als Substrat.

Durch die zyklische Anwendung von Denaturieren, „Annealing“ und „Elongation“ gelingt die Amplifikation des gewünschten cDNA-Fragments. Dieses kann dann mittels Gelelektrophorese detektiert, identifiziert und quantifiziert werden.

$\beta$ - Actin diente in den untersuchten Proben als interner Standard zur Kontrolle für den Einsatz gleichmäßiger DNA- Mengen.

#### **3.2.12.1 RNA- Isolierung aus Rattenlebergewebe:**

Um einen Verdau der RNA zu verhindern, wurde bei allen Arbeiten darauf geachtet, immer Handschuhe zu tragen. Verdauende RNasen sind ubiquitär vorhanden, besonders auf der Haut. Des Weiteren wurden RNase-freies Wasser, Pipettenspitzen mit Filter und autoklavierte bzw. RNase-frei zertifizierte Reaktionsgefäße verwendet.

Die Isolierung der RNA aus Lebergewebe von Ratten erfolgte mit dem „Total RNA- Isolationsset“ von Nucleo Spin. In Gegenwart eines denaturierenden Lyse (RIPA) Puffers wurde

das Gewebe mit dem Ultra Turrax 25 lysiert und homogenisiert. Der Puffer inaktiviert RNase und stellt die Isolation intakter RNA sicher.

Das Homogenisieren des Gewebes sowie die ersten Schritte der RNA-Extraktion sind für die spätere Qualität der RNA von großer Bedeutung. Es wurde so schnell wie möglich und grundsätzlich, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis gearbeitet um einen Abbau der RNA zu vermeiden.

Das gefrorene Gewebe wurde mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff in möglichst kleine Stücke zerstoßen und 30mg abgewogen. In einem Eppendorf-Röhrchen wurde das Gewebe mit 350µl RA 1 Buffer + 3,5 µl beta- Mercaptoethanol versetzt. Das Gemisch wurde mit dem Ultraturax homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zwischen den einzelnen Zerkleinerungen wurde der Homogenisierer mit destilliertem Wasser und sterilen Kompressen gereinigt.

Anschließend wurde das Lysat in PCR- Tubes pipettiert und bei 11 000 xg eine Minute bei vier Grad Celsius zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in filterhaltige Tubes gefüllt und 350 µl 70% reinsten Ethanol hinzugegeben, wiederum eine Minute bei 11 000xg, zur Bindung der RNA, zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden jeweils 350 µl MDB auf den Filter gegeben und bei 11 000 xg eine Minute zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Es folgte die Zugabe von 95 µl DNase Reaktions- Mix zum DNA- Verdau und 15- minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden 200 µl RA 2- Buffer zur DNase- Inaktivierung zugefügt und eine Minute zentrifugiert bei 11000 xg. Die Reste wurden verworfen und jeweils 600 µl RA3 Puffer pro Tube hinzugegeben, eine Minute zentrifugiert, Reste verworfen, jeweils 250 µl RA3 hinzugegeben und erneut bei 11 000xg zwei Minuten zentrifugiert, um die Membran vollständig zu trocknen. Danach wurden die Filter auf Nuclease- freie 1,5ml Zentrifugation- Tubes gesetzt, 60 µl DNase freies Wasser hinzugefügt, eine Minute zentrifugiert bei 11 000 xg. Die RNA befindet sich nun im Tubelumen. Vier Microliter wurden entnommen, mit 196 µl destilliertem Wasser aufgefüllt und im Photometer die Ratio und Konzentration der RNA gemessen. Die RNA wurde umgehend bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

### **3.2.12.2 RT- PCR**

Die RT- PCR dient der Umschreibung der RNA zur cDNA und hat als Methode zur Analyse von Gen- Transkription an Bedeutung gewonnen, aufgrund ihrer Sensitivität und weil die Ergebnisse binnen kurzer Zeit eruierbar sind. Des Weiteren besteht die Möglichkeit die erhaltenen PCR-

Produkte zu klonieren und sequenzieren. Für die Reverse Transkription wurde folgender Ansatz pro Probe verwendet:

<b>Komponenten RT- Master- Mix</b>	<b>Menge in <math>\mu</math>l</b>
10*PCR Puffer	2 $\mu$ l
5 mM d NTP	2 $\mu$ l
50 $\mu$ M oligo dT	1 $\mu$ l
RNasin + H <sub>2</sub> O	Je 0,5 $\mu$ l
Omniscript	1 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen Master- Mix/ Probe</b>	<b>7<math>\mu</math>l</b>

**Tab.13** *Zusammensetzung Mastermix PCR*

Sieben Mikroliter des RT- Mixes und 1 $\mu$ l der RNA, aufgefüllt mit RNase-/ DNase freiem Wasser auf 20 $\mu$ l wurden an zentrifugiert und in den Thermocycler gestellt. Die entstandene cDNA wird anschließend in der PCR, wie unten beschrieben als Substrat verwendet.

### **3.2.12.3 PCR (Polymerase- Ketten- Reaktion)**

Die Reaktionskomponenten für die PCR, bis auf die Polymerase wurden auf Eis aufgetaut. In ein steriles Eppendorfgefäß wurden pro Probe 2 $\mu$ l cDNA mit je 18 $\mu$ l Mastermix, bestehend aus 10\*PCR- Puffer, dNTP, Primer sense und antisense, Taq- Polymerase, MgCl und DEPC- Wasser gegeben. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die Proben im nächsten Schritt, der eigentlichen Polymerase Kettenreaktion in den Thermocycler gestellt und das dem jeweiligen Primer entsprechende Programm gestartet.

### **3.2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese ist zum Nachweis der in der PCR amplifizierten DNA eine häufig eingesetzte Methode. Für die Auftrennung der doppelsträngigen, DNA-Fragmente eignet sich das Agarose-Gel. Dieses Gel trennt die Nukleinsäuren durch seine Porenstruktur der Größe nach auf. Durch die Phosphatgruppen erhält die DNA eine negative Ladung und wandert nach

Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Anode. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet.

Es wurden 10 µl des jeweiligen Amplifikates mit 2µl Ladepuffer gut gemischt und 5µl des Gemisches pro Tasche auf Ethidiumbromid- haltige Agarosegele aufgetragen. Durch den Ladepuffer wird die Dichte der Probe erhöht und ihr Einsinken in die Geltasche ermöglicht. Er färbt die Probe und erleichtert damit das Auftragen auf das Gel. Die in ihm enthaltenen Farbstoffe wandern mit reproduzierbarer Geschwindigkeit zur Anode.

Neben den Proben wurden in jeweils eine Tasche ein 100 Basenpaarmarker, als molekularer Massenstandard sowie destilliertes Wasser als Negativkontrolle geladen. Die durch Elektrophorese aufgetrennten DNA- Banden wurden unter UV- Licht zur Fluoreszenz angeregt, mit Hilfe des Gel- Dokumentations- Systems dargestellt, und im TIFF- Format dokumentiert.

### **3.2.12.5 Semiquantitative Auswertung der Banden**

Die Quantifizierung von PCR-Produkten wird mit Hilfe von internen Standards durchgeführt. Um Unterschiede zwischen dem Inhalt verschiedener Reagenzgefäße (Ladefehler, Pipettierfehler, etc.) abschätzen zu können, wird eine Sequenz, die in allen zu untersuchenden Proben gleich exprimiert ist, als Standard amplifiziert ( $\beta$ -Actin). Geht man davon aus, dass die optische Dichte (integrierte optische Dichte: ODI) der Bande im Gel proportional zur Menge des PCR-Produkts ist, kann das Verhältnis Probe zu Standard berechnet werden.

Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel wurde mit Hilfe des Gel-Dokumentations-Systems digitalisiert und als Bilddatei gespeichert. Die integrierte optische Dichte (ODI) der aufgetragenen Banden des Gels wurde mit der Software „UN SCAN IT“ bestimmt und die Werte in ein Tabellenkalkulationsprogramm importiert. Aus den Ergebnissen der aufgetragenen Banden des jeweiligen Gels wurde der Mittelwert gebildet (z.B. alle  $\beta$ - Actin-Werte dividiert durch Anzahl der Proben). Die relative mRNA Expression in der jeweiligen Probe wurde aus dem Quotienten von z.B. HGF und „housekeeping“-Gen  $\beta$ - Actin für jedes Experiment berechnet und mit den Ergebnissen des Mittelwerts multipliziert. Zur Veranschaulichung werden die Ergebnisse in dieser Arbeit mit Hilfe des Programms Microsoft Excel als Balkendiagramm dargestellt. Die entsprechend ermittelten Werte für die relative mRNA Expression geben jeweils nur Auskunft über die Verhältnisse in dem einzelnen durchgeführten Experiment (Gel). Die hier

gezeigten Ergebnisse (*Diagramm 7-11*) dürfen daher nicht überbewertet werden, da sie jeweils nur von einer Probenaufbereitung (Gel) stammen.

### **3.2.13 Statistik**

Zur Datenauswertung für die Variablen AST, ALT, LDH, GLDH, KI-67 und Mitosen wurde in allen Gruppen Mittelwerte, Standardabweichungen und die Quartile berechnet. Zusätzlich wurden die Variablen in Boxplots dargestellt. Um Normalverteilung zu erreichen, gingen in die confirmatorische 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 und mit/ohne CO<sub>2</sub>. 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.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vorversuch

Im Vorversuch wurde untersucht, ob das CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum die Leberzellen schädigt. Das Serum wurde nach 6 Stunden, 12 und 24 Stunden entnommen und der Gehalt von AST, ALT, GLDH sowie LDH bestimmt (Tab 14).

Im Vergleich zu den Tieren ohne CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum, zeigten sich bei den Tieren nach CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum signifikant erhöhte Serumwerte für AST ( $p < 0,001$ ), ALT ( $p < 0,001$ ), GLDH ( $p = 0,019$ ) und LDH ( $p = 0,009$ ) (ANOVA-Analyse).

Parameter	TZ	mit CO <sub>2</sub>	ohne CO <sub>2</sub>
AST (** $p < 0,001$ )	6h	74,0* (73,25; 137,3)	62,0 (55,3; 70,3)
	12h	85,5* (81,0; 94,5)	48,0 (41,5; 53,5)
	24h	63,5* (62,8; 68,0)	28 (21; 32)
ALT (** $p < 0,001$ )	6h	33,0* (27,0; 39, 3)	11,5 (11,5; 28,0)
	12h	53,5* (48,2; 56,2)	13,0 (11,5; 28,0)
	24h	40,0* (37,0; 41,3)	13 (12; 17)
GLDH (** $p < 0,019$ )	6h	12,0* (9,6; 15,6)	6,9 (5,0; 9,8)
	12h	6,1 (3,5; 8,7)	6,8 (5,0; 9,4)
	24h	5,9 (5,4; 7,9)	150 (132; 162)
LDH (** $p < 0,009$ )	6h	398,5* (239,0; 431,8)	247,0 (233,5; 292,0)
	12h	297,5* (239,0; 431,8)	200,0 (192,0; 209,0)
	24h	295 (274,5; 348,0)	5 (4; 8)

**Tab. 14** Einfluss des CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneums auf die Transaminasen im Vorversuch, Angegeben sind Medianwert sowie das 1. und 3. Quartil. \* $p < 0,05$  Vergleich der Parameter zuden einzelnen Zeitpunkten CO<sub>2</sub> versus ohne CO<sub>2</sub> (Mann-Whitney-Test). \*\* $p$  CO<sub>2</sub> versus ohne CO<sub>2</sub> (ANOVA-Test). TZ: Tötungszeitpunkt

## 4.2 Hauptversuch

Nachdem in den Vorversuchen eine signifikante Schädigung des Leberzellgewebes festgestellt werden konnte, wurde im Hauptversuch zudem der Einfluss des CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneums nach 70%iger Leberteileresektion auf die Leberregeneration untersucht.

### 4.2.1 Biochemische Analysen (AST, ALT, GLDH, LDH)

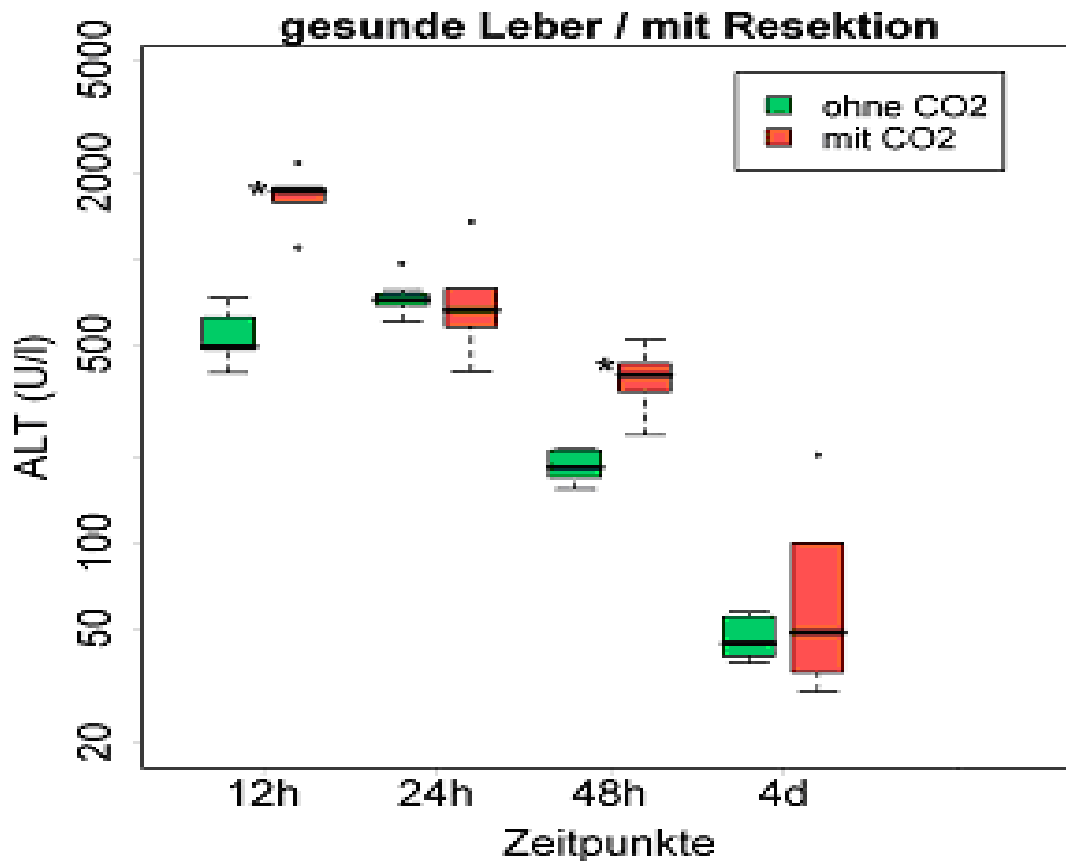
Beim Ermitteln der Transaminasen AST und ALT konnte bei den mit CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum resezierten Tieren im Vergleich zu den Tieren, die ohne Pneumoperitoneum reseziert wurden ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (AST,  $p < 0,001$ ; ALT,  $p < 0,001$ ). Die Leberzellschädigung ist bei den mit CO<sub>2</sub> resezierten signifikant höher.

Anhand von Tabelle 15 und Diagramm 1 kann man sehen, dass die Konzentration bei den mit CO<sub>2</sub> Behandelten im Vergleich zu den Kontrolltieren insgesamt stärker ansteigt und längere Zeit benötigt, um wieder zu sinken.

Das Maximum der ALT- Expression liegt bei den mit CO<sub>2</sub> resezierten Tieren 12 Stunden postoperativ. Die Werte sind im Vergleich zu den ohne CO<sub>2</sub>- behandelten Kontrolltieren 12 und 48 Stunden nach dem Eingriff signifikant höher. Bei den konventionell, ohne CO<sub>2</sub> resezierten Rattenlebern steigt der Enzymspiegel nach 12 Stunden bis zu einem nicht signifikanten Maximum 24 Stunden postoperativ an. Bis zum 4. postoperativen Tag trat eine weitgehende Normalisierung dieser Werte in beiden Gruppen ein und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr, wie man in **Tab.15** sehen kann.

ALT(**p<0,001)	12h	24h	48h	4d
CO2	1722,5* (1448,8; 1873,8)	656 (531,3; 919,5)	388* (314,8; 448,3)	48,5 (33,8; 125,8)
K	492 (475; 492)	714 (665; 770)	184,5 (166,3; 211,5)	44,5 (39,5; 55,5)

**Tab.15** ALT in U/l .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 (ANOVA-Test). TZ: Tötungszeitpunkt

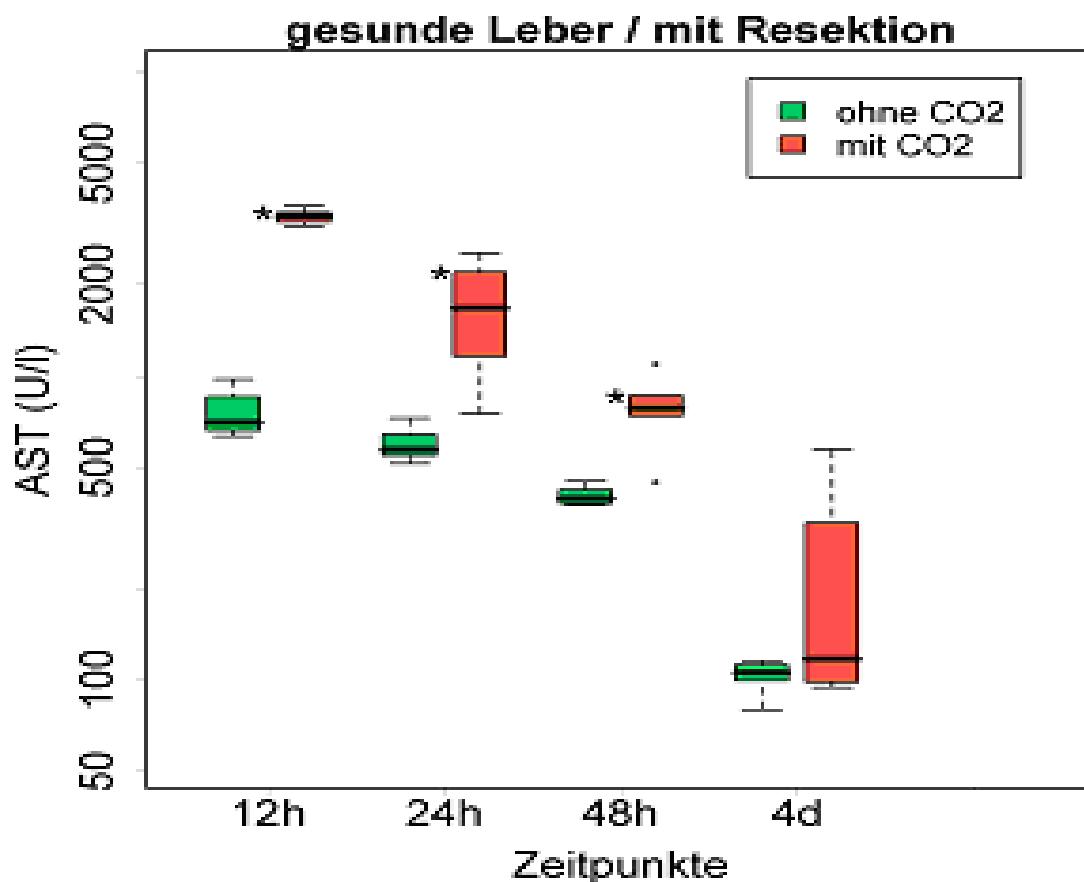


**Diagramm 1** ALT mit und ohne CO2 im zeitlichen Verlauf

Die Aspartataminotransferase (AST) beider Gruppen erreicht ihr Maximum 12 Stunden postoperativ und fällt zum 4. postoperativen Tag hin ab. Insgesamt erreichen die mit CO<sub>2</sub> behandelten Tiere bis zum 48 Stunden postoperativ signifikant höhere AST- Werte als die ohne CO<sub>2</sub> behandelten Kontrolltiere (**Tab.16, Diag 2**).

AST(**p<0,001)	12h	24h	48h	4d
CO <sub>2</sub>	3358* (3188,8; 3500)	1667* (1057,8; 2273,5)	780* (663,5; 918,8)	117 (97; 388,5)
K	701 (640; 870)	570 (540; 645)	395,5 (378,8; 429,3)	105,5 (94,3; 112,8)

**Tab.16** AST in U/l. Angegeben sind die Medianwerte sowie das 1. und 3. Quartil. \*p<0,05 Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO<sub>2</sub> versus ohne CO<sub>2</sub> (Mann-Whitney-Test). \*\*p CO<sub>2</sub> versus ohne CO<sub>2</sub> (ANOVA-Test). TZ: Tötungszeitpunkt

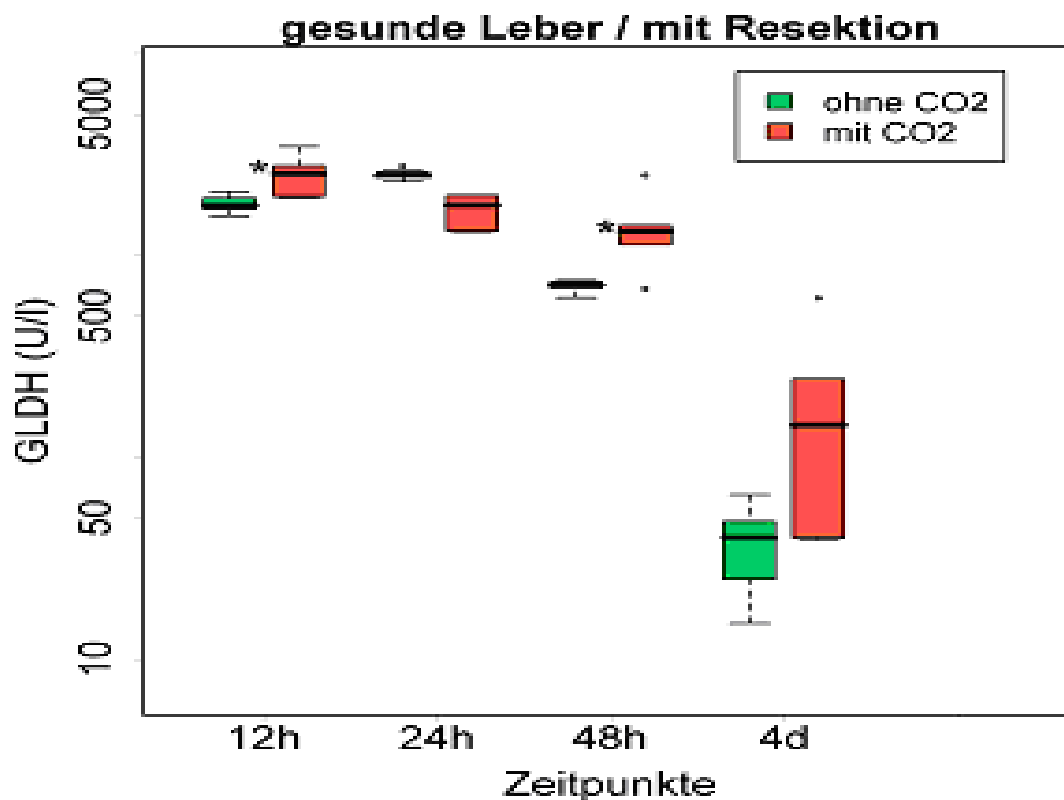


**Diagramm 2** AST mit und ohne CO<sub>2</sub> im zeitlichen Verlauf

Betrachtet man den Verlauf der GLDH- Konzentration in **Tabelle 17 und Diagramm 3**, zeigt sich bei den laparoskopisch Resezierten ein signifikantes Maximum 12 h postoperativ, sowie ein stetiger Abfall bis zu einem Minimum am 4. postoperativen Tag. Bei den Kontrolltieren erreicht der Enzymlevel sein Maximum am ersten Tag nach dem operativen Eingriff, um ebenfalls ein Minimum am 4. postoperativen Tag zu erreichen.

GLDH(**p=0,001)	12h	24h	48h	4d
CO2	2527,5* (1947,3; 2936,3)	1772,5 (1314; 1968)	1210* (1014,8; 1670,5)	143,5 (39,8; 336,3)
K	1772 (1640; 1941)	2490 (2430; 2624)	711 (671,3; 742,3)	40 (22,5; 52,3)

**Tab.17** *GLDH in U/l. 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 (ANOVA-Test). TZ: Tötungszeitpunkt*



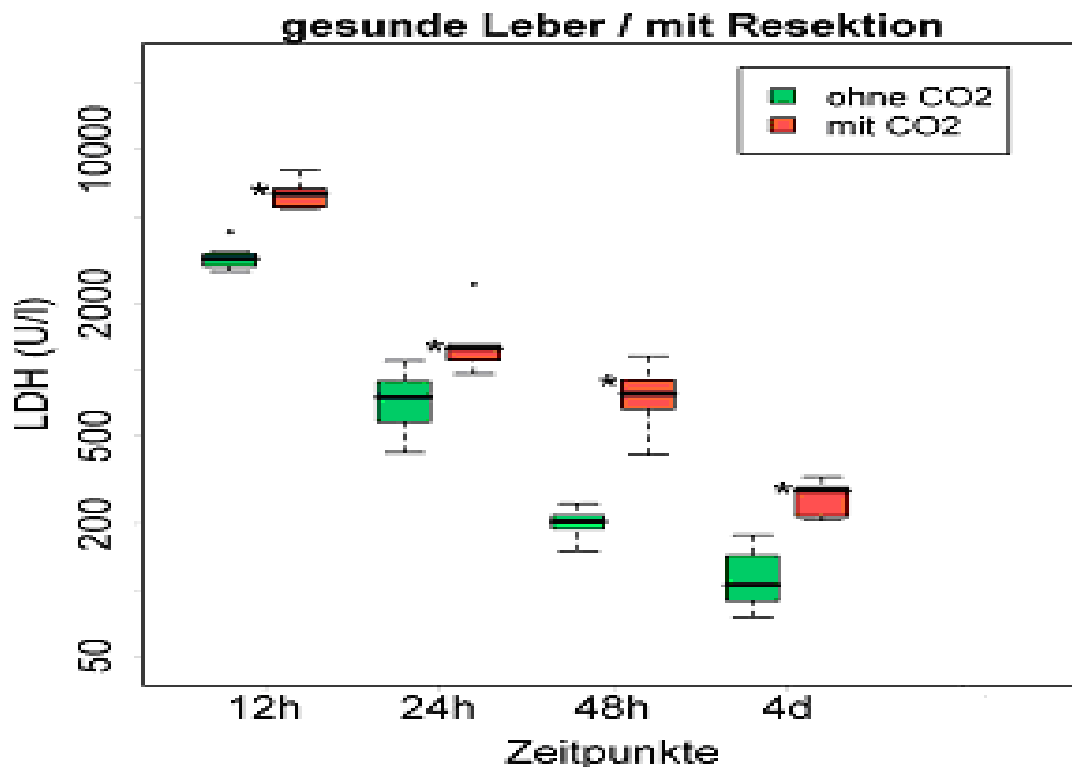
**Diagramm 3** *GLDH mit und ohne CO2 im zeitlichen Verlauf*

Bei der LDH verhält es sich ähnlich wie bei der AST (*Tab.18, Diagramm 4*). So lässt sich bei beiden Gruppen ein Maximum 12h nach Resektion, als dann ein stetiges Absinken bis zum 4. Tag nach der Operation beobachten, wobei LDH in doppelter Konzentration bei den mit CO<sub>2</sub> behandelten Tieren (signifikant 12 Stunden postoperativ) exprimiert wird.

Bei den mit CO<sub>2</sub>- Behandelten verglichen mit den Kontrolltieren steigen die Werte deutlich höher an und benötigen mehr Zeit, um in den Normbereich abzusinken.

LDH(p**<0,001)	12h	24h	48h	4d
CO <sub>2</sub>	6300* (5460; 7040)	1248,5* (1072; 1589,8)	777,5* (601,5; 964,5)	282,5* (212,8; 301,3)
K	3200 (2913; 3426)	752 (546; 913)	204 (179,3; 224,5)	105 (85,5; 151,8)

**Tab.18** LDH in U/l. Angegeben sind die Medianwerte sowie das 1. und 3. Quartil. \*p<0,05 Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO<sub>2</sub> versus ohne CO<sub>2</sub> (Mann-Whitney-Test). \*\*p CO<sub>2</sub> versus ohne CO<sub>2</sub> (ANOVA-Test). TZ: Tötungszeitpunkt



**Diagramm 4** LDH mit und ohne CO<sub>2</sub> im zeitlichen Verlauf

## **4.2.2 Lebersyntheseparameter (Mitose- Index, Ki-67, $\beta$ - Aktin, VEGF, HGF)**

Um den Regenerationsumfang histologisch zu quantifizieren, erfolgte einerseits die Auszählung des Mitose- Indexes zur Beurteilung der mitotischen Aktivität sowie Ki-67 positiver Leberzellen, andererseits wurde die Expression von VEGF, HGF und TGF- $\beta$  mittels Polymerasekettenreaktion betrachtet. Die bei der PCR immer mitgelaufenen negativ- und positiv Proben sind nicht abgebildet.

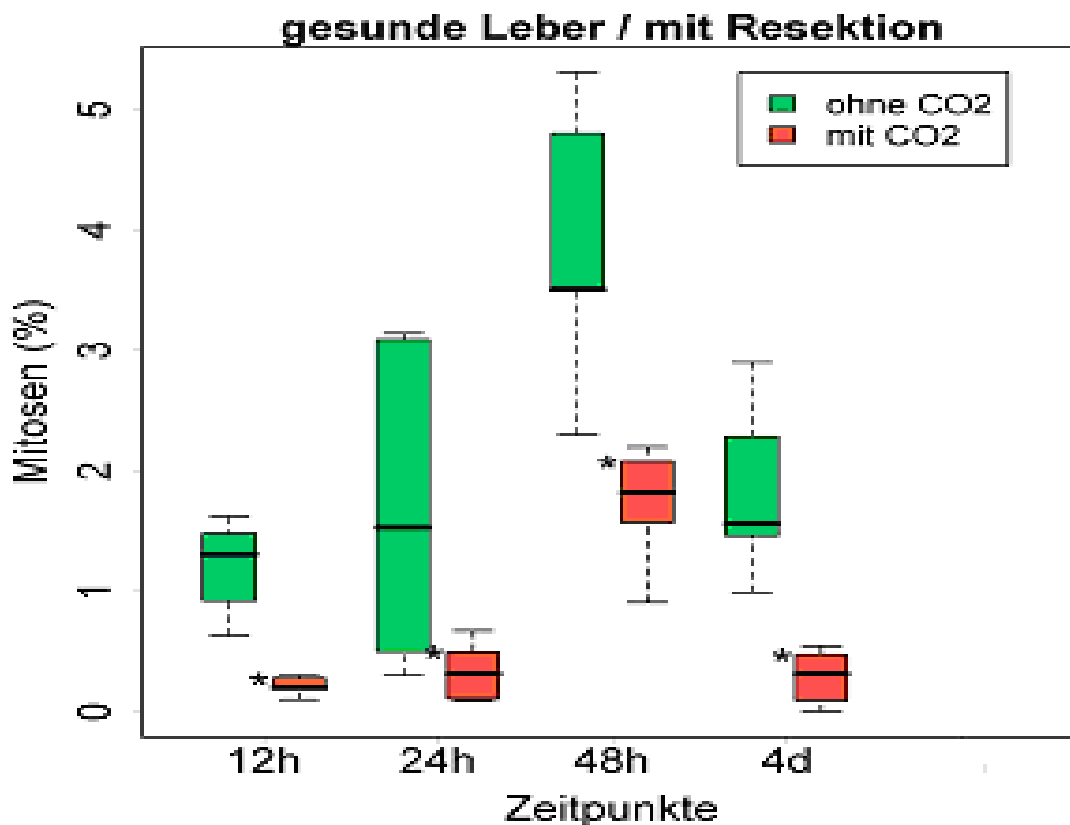
### **4.2.2.1 Mitoseindex**

Wie man in *Tabelle 19* und *Diagramm 5* erkennen kann, war der Mitoseindex nach Leberresektion mit CO<sub>2</sub> insgesamt schwächer signifikant. Die höchste Mitoserate wurde nach 48 Stunden erreicht.

Beim Vergleich der CO<sub>2</sub> behandelten mit denen ohne CO<sub>2</sub> behandelten Rattenlebern ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die ohne CO<sub>2</sub> behandelte Kontrollgruppe hat zu den Tötungszeitpunkten 12h, 24h, und 48h einen deutlich höheren Mitoseindex als die mit CO<sub>2</sub> Behandelten.

Mitoseindex ( $p^{**} < 0,001$ )	12h	24h	48h	4d
CO <sub>2</sub>	0,20* (0,17; 0,28)	0,31* (0,10; 0,54)	1,82* (1,41; 2,11)	0,31* (0,07; 0,49)
K	1,31 (0,79; 1,49)	1,53 (0,45; 3,10)	3,51 (2,90; 5,06)	1,56 (1,46; 2,38)

**Tab. 19** *Mitoserate* Angegeben sind die Medianwerte sowie das 1. und 3. Quartil  $*p < 0,05$  Vergleich der Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten CO<sub>2</sub> versus ohne CO<sub>2</sub> (Mann-Whitney-Test).  $**p$  CO<sub>2</sub> versus ohne CO<sub>2</sub> (beides ANOVA-Test), TZ: Tötungszeitpunkt

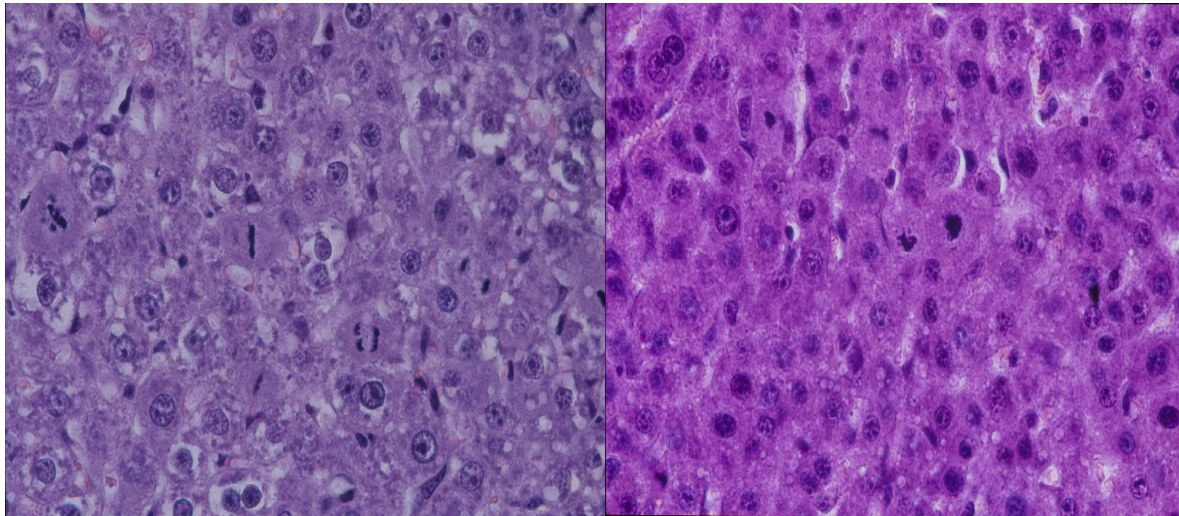


**Diagramm 5** Mitoseindex (MI) = absolute Anzahl aller mitotischen Hepatozyten pro 1000 Zellen



A)

B)



**Abb.9** Hämatoxylin- Eosin- Färbung **A)** ohne CO<sub>2</sub> reseziert, **B)** mit CO<sub>2</sub> reseziert, 400- fache Vergrößerung, pro Gruppe ein repräsentatives Tier vom 2.postoperativen Tag

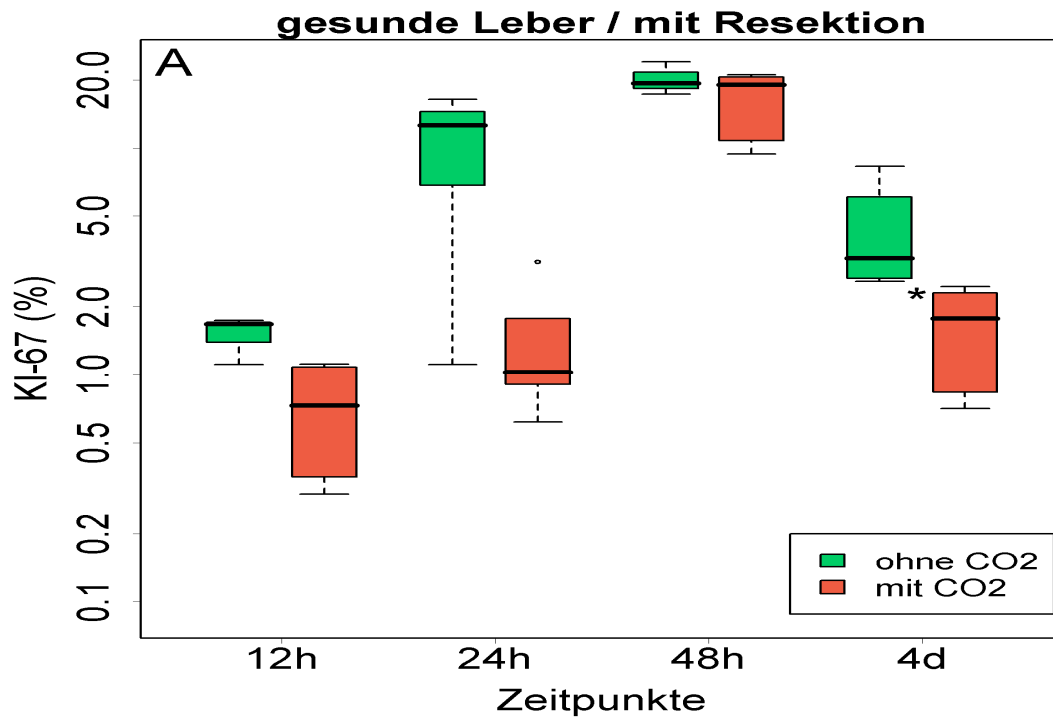
#### 4.2.2.2 Ki- 67

Beim Proliferationsmarker Ki-67 verhält es sich ähnlich. Bei beiden Gruppen liegt das Maximum der Ki-67 Expression 48 Stunden postoperativ. Hier war die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen signifikant stärker als zu den Zeitpunkten 12 h, 24 h und 4 Tage ( $p < 0,001$ ) unabhängig ob mit oder ohne CO<sub>2</sub> behandelt.

In der ohne CO<sub>2</sub> behandelten Gruppe steigt der Gehalt der Ki-67 positiven Hepatozyten ab 12 Stunden postoperativ bis das Maximum 48 Stunden postoperativ erreicht ist, um zum 4. postoperativen Tag deutlich abzufallen.

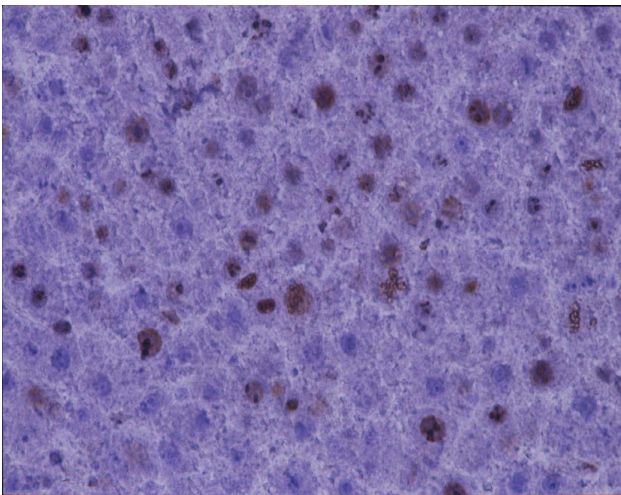
Bei den Rattenlebern, die mit CO<sub>2</sub> behandelt wurden, verhält es sich gleichermaßen. Es zeigt sich ein langsames Ansteigen von 12 Stunden postoperativ über den ersten Tag bis zu einem Maximum ebenfalls 48 Stunden postoperativ, um zum 4. postoperativen Tag wieder zu sinken (**Diagramm 6 und Abbildung 10**).

Bei dem Vergleich der ohne CO<sub>2</sub> behandelten mit den mit CO<sub>2</sub> behandelten Rattenlebern erkennt man, dass die Zahl der Ki-67 positiven Zellen bei den ohne CO<sub>2</sub> Behandelten schneller ansteigt zum ersten postoperativen Tag, als die mit CO<sub>2</sub> Behandelten.

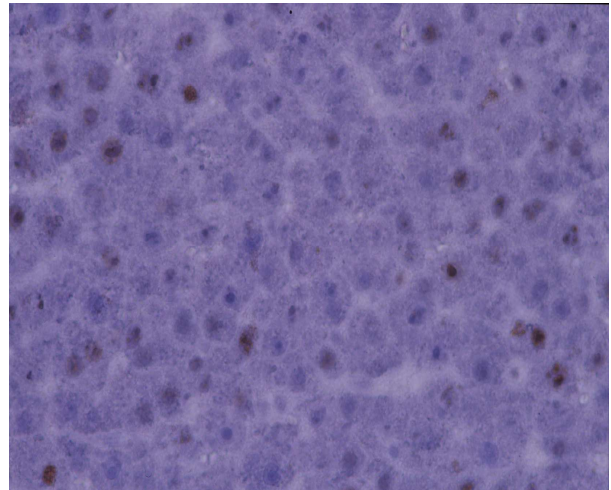


**Diagramm 6** Ki- 67 Index= absolute Anzahl aller proliferierenden Hepatozyten pro 1000 Zellen

**A)**



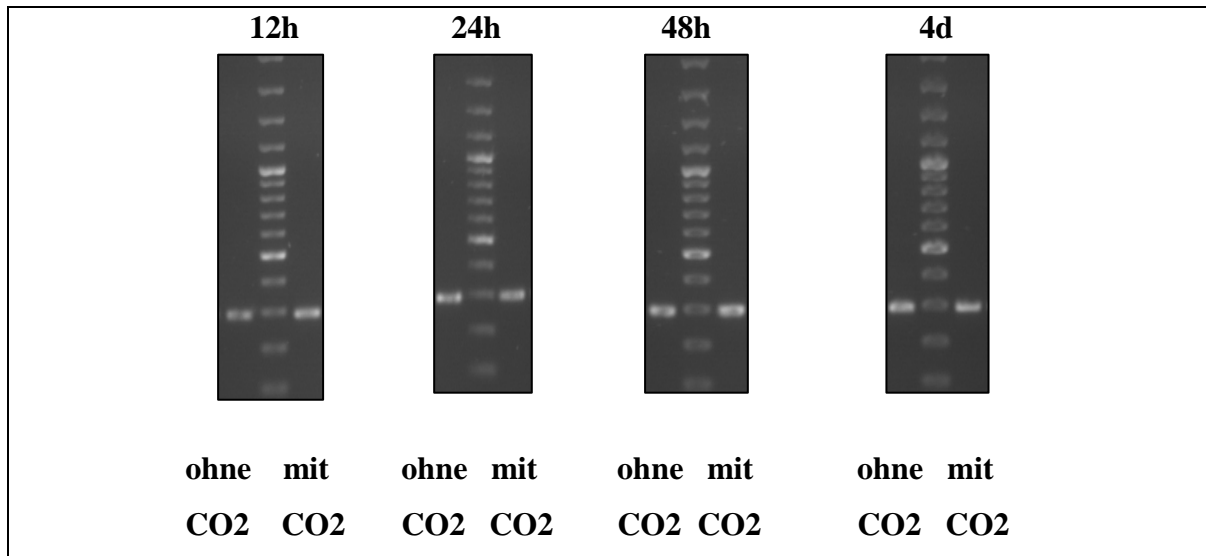
**B)**



**Abb.10** Immunhistochemie Ki- 67, **A)** ohne CO2 reseziert, **B)** mit CO2 reseziert 400- fache Vergrößerung, pro Gruppe ein repräsentatives Tier von 48 Stunden. Postoperativ

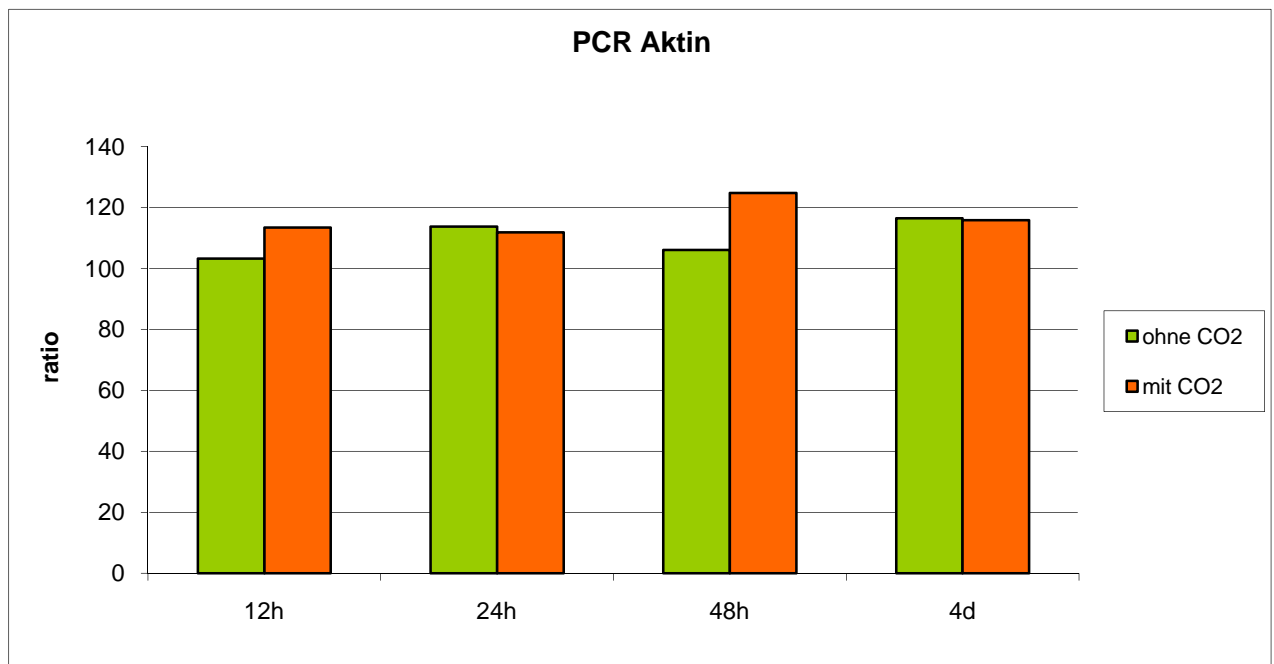
#### 4.2.2.3 $\beta$ - Aktin ( 289 BP)

Beta Aktin wurde als Positivkontrolle im Vorfeld nachgewiesen (*Abb.11*).



*Abb.11*  $\beta$ - Aktin im zeitlichen Verlauf, mit und ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum

Die untersuchten Rattenlebern enthielten, wie man auch in dem *Diagramm 7* sehen kann, annähernd denselben Aktingehalt. Was Grundvoraussetzung für die PCR ist.

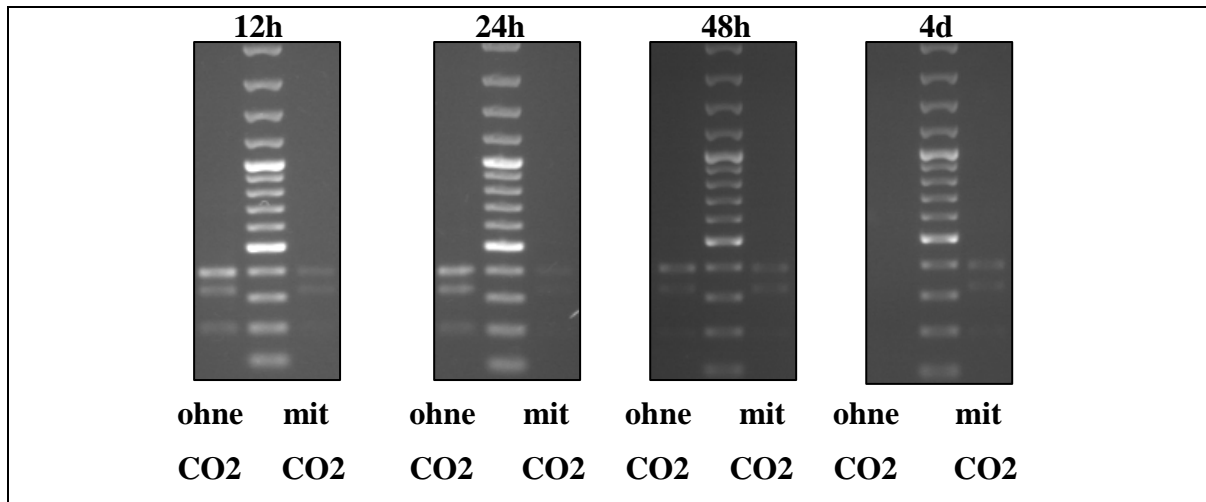


*Diagramm 7*  $\beta$ - Aktin Densitometrie im zeitlichen Verlauf, mit und ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum

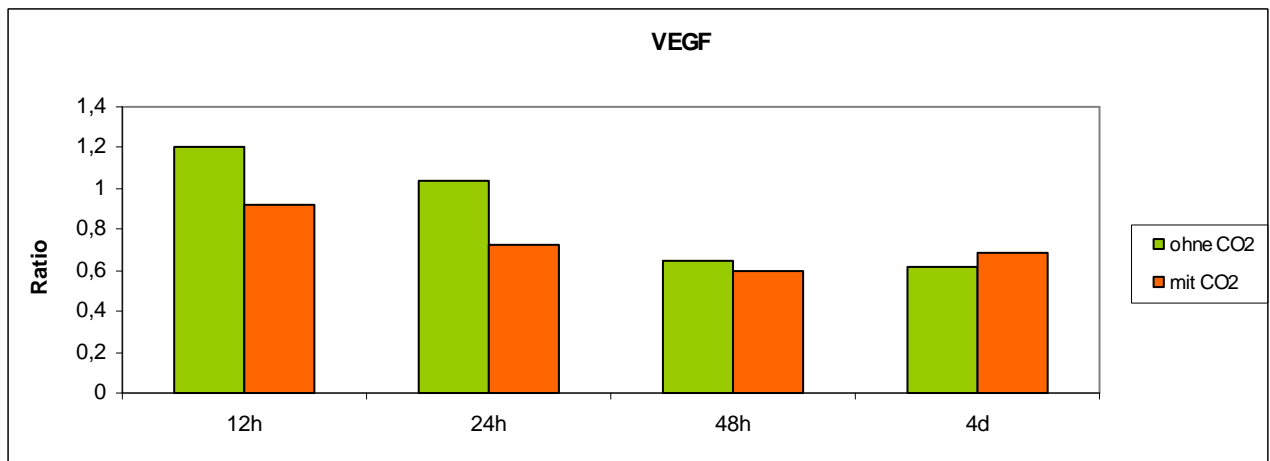
#### **4.2.2.4 VEGF (262, 394, 466 BP)**

Wie man in Abbildung 12 und Diagramm 8 sehen kann, zeigt sich nach 12 h die stärkste VEGF-Expression bei den Tieren, deren Leber ohne Einfluss eines CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum reseziert wurde. Zum 4. postoperativen Tag hin fällt die Konzentration ab. Bei den Tieren, die unter Einfluss eines CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneums reseziert wurden, konnte ebenfalls ein Expressionsmaximum vom Vascular endothelial growth factor nach 12h postoperativ gemessen werden. Im Verlauf kommt es zum Absinken ab dem 4. postoperativen Tag jedoch zu einem geringen Wiederanstieg.

Insgesamt wurde bei den Tieren ohne CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum stärker VEGF ausgeschüttet, insbesondere 12 und 24 Stunden postoperativ. Bei beiden Gruppen gleichen sich die Werte 48 Stunden und am 4. postoperativen Tag an (*Abb.12+ Diagramm 8*).



**Abb.12** VEGF in der PCR mit und ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum nach Leberteileresektion im zeitlichen Verlauf.

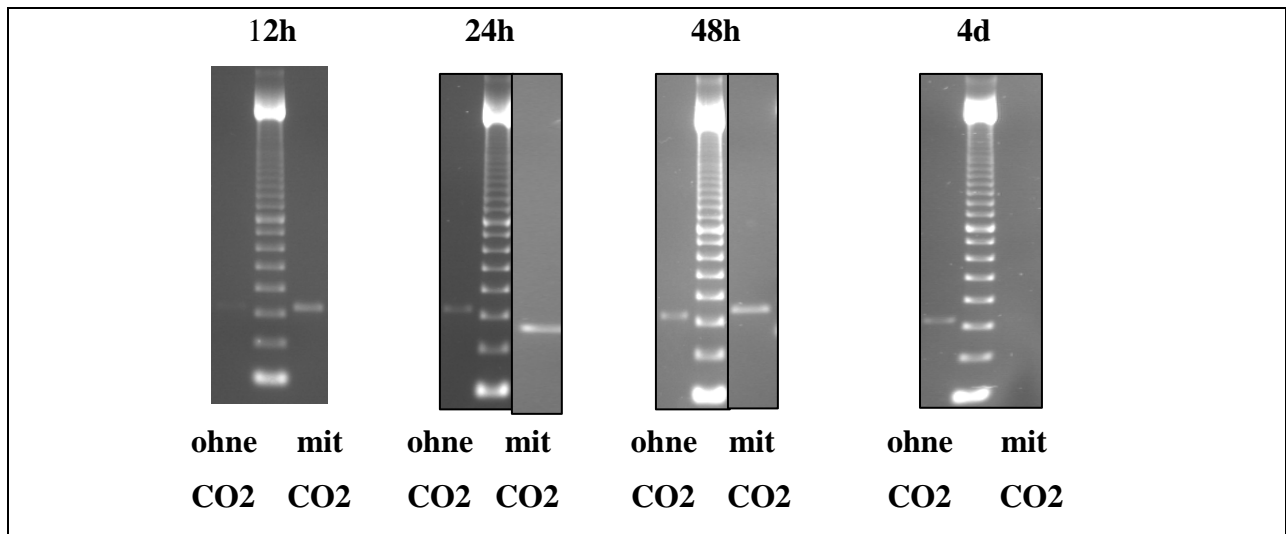


**Diagramm 8** VEGF Densitometrie mit und ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum im zeitlichen Verlauf

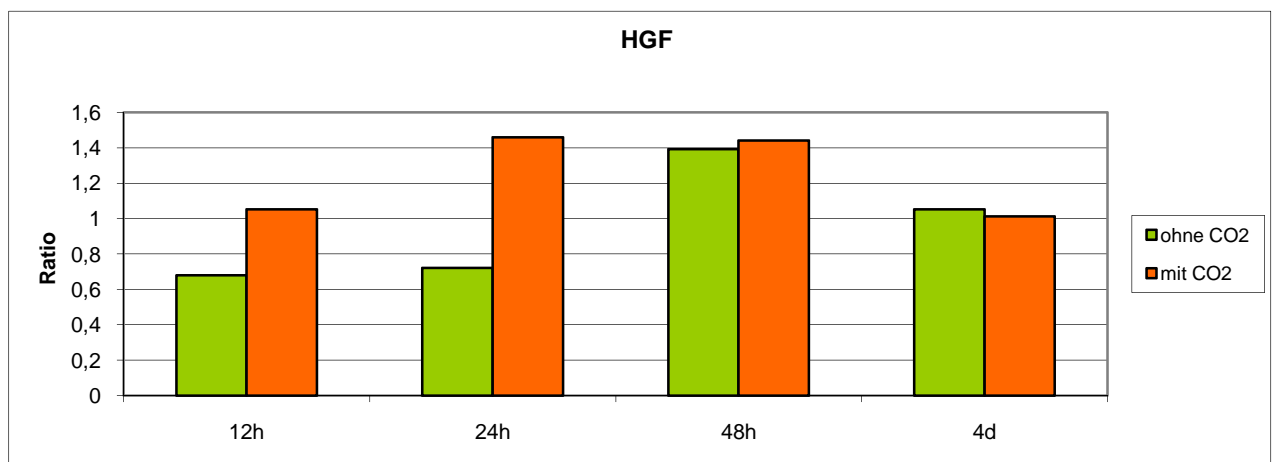
#### 4.2.2.5 HGF (328 BP)

Bei den gesunden Tieren, deren Lebern einem CO<sub>2</sub> -Pneumoperitoneum ausgesetzt wurden, zeigte sich eine stärkere Expression des Stimulationsfaktors HGF als bei denen ohne CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum. Das Maximum bei den ohne CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum behandelten Tieren zeigte sich 48 Stunden postoperativ. Bei den Tieren, die mit CO<sub>2</sub> behandelt wurden, zeigte sich

das Expressionsmaximum 24 und 48 Stunden postoperativ, wie man in Abbildung 13 und Diagramm 9 sehen kann.



**Abb.13** Expression von HGF mit und ohne CO2 Pneumoperitoneum im zeitlichen Verlauf



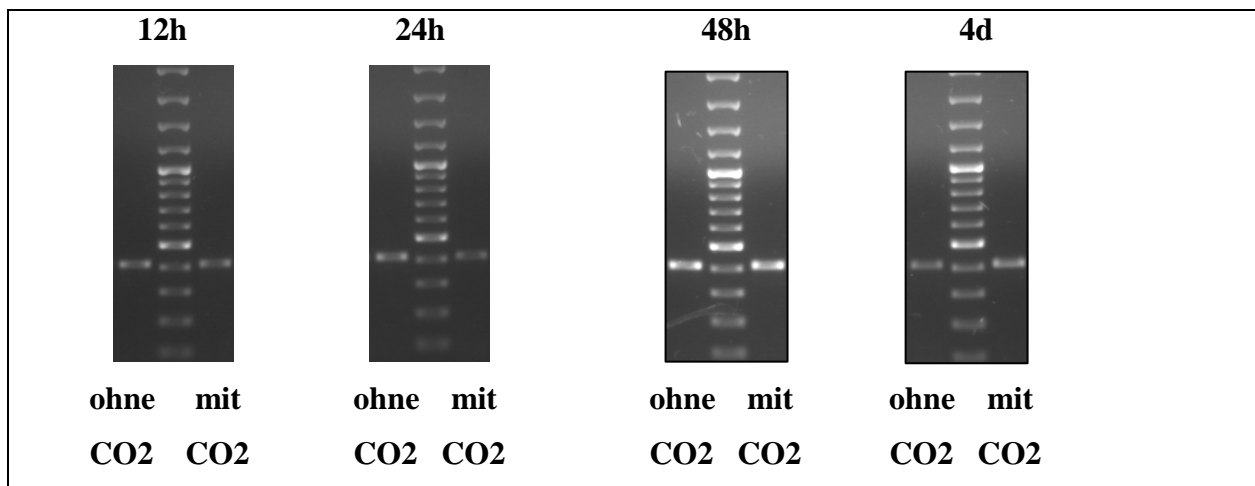
**Diagramm 9** HGF Densitometrie mit und ohne CO2- Pneumoperitoneum im zeitlichen Verlauf

#### 4.2.3 Inhibitoren der Regeneration:

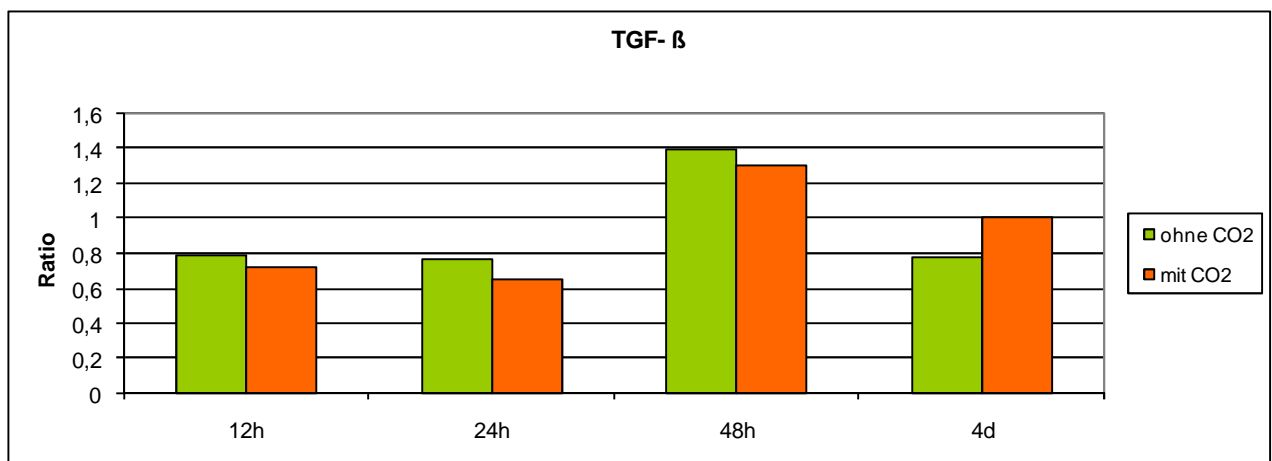
Mit Hilfe der PCR- Methode wurden außerdem auch TGF  $\beta$  und Interleukin 1 $\beta$  im isolierten Lebergewebe nachgewiesen. Diese beiden Proteine gehören zu den wichtigsten Inhibitoren der Leberregeneration.

#### 4.2.3.1 TGF $\beta$ ( 406 BP)

Sowohl die mit CO<sub>2</sub>, als auch die ohne CO<sub>2</sub> behandelten Rattenlebern zeigten die maximale Konzentration am zweiten postoperativen Tag (*Abb. 14, Diagramm 10*). Zu Beginn wird TGF-  $\beta$  stärker bei den ohne CO<sub>2</sub> behandelten Tieren ausgeschüttet. Am 4. postoperativen Tag exponieren die mit CO<sub>2</sub> Behandelten verstärkt TGF- beta, wie man anhand der PCR- Bilder und Densitometrie sehen kann.



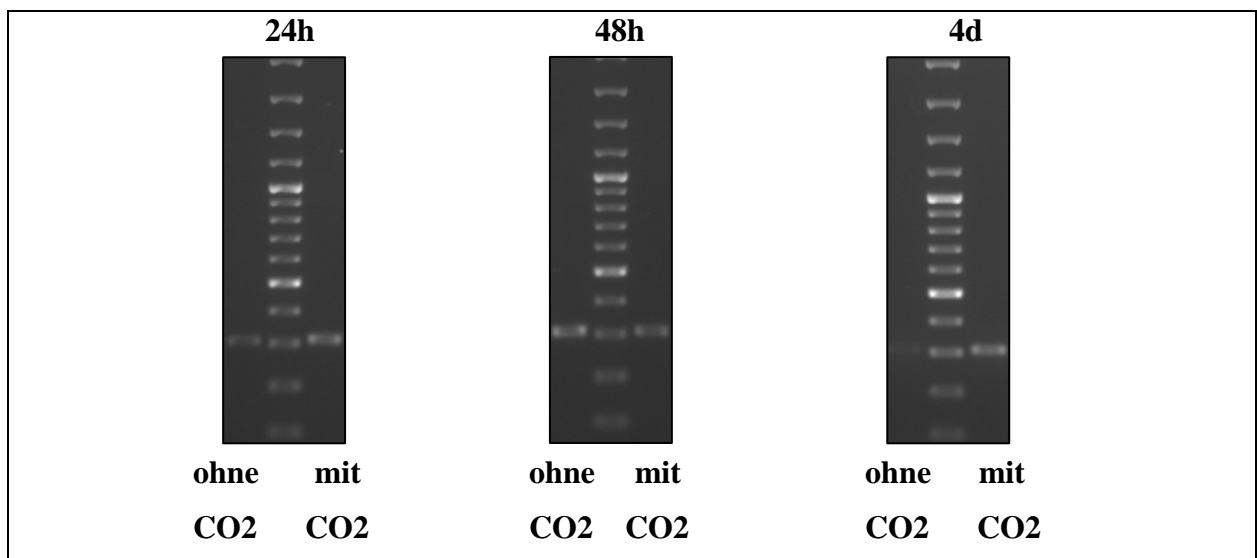
*Abb.14 Expression von TGF- $\beta$  mit und ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum im zeitlichen Verlauf*



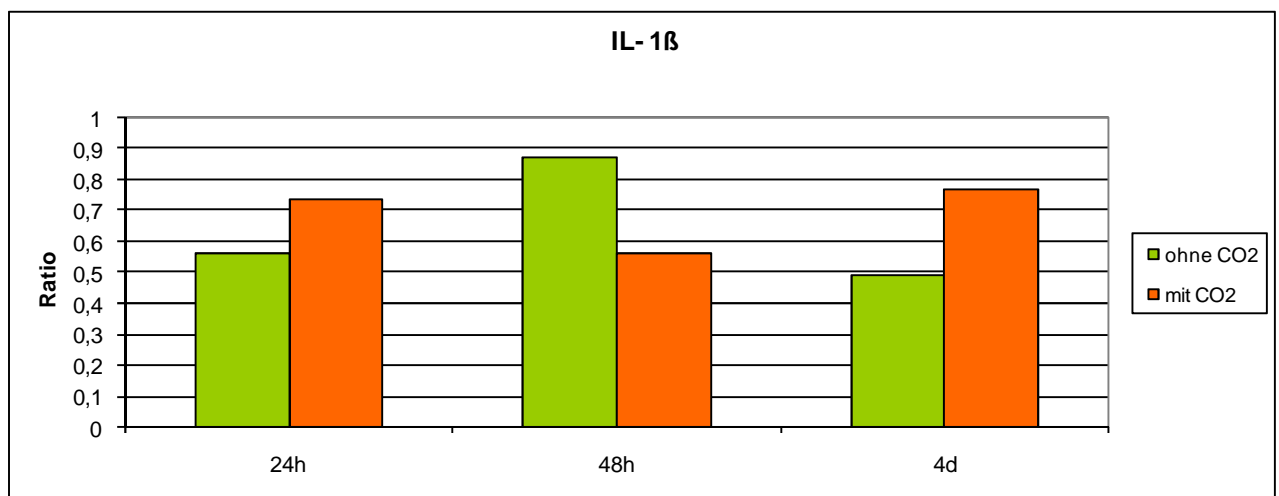
*Diagramm 10 TGF- $\beta$  Densitometrie mit und ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum im zeitlichen Verlauf*

#### 4.2.3.2 IL 1 $\beta$ ( 306 BP)

Wie man in der *Abbildung 15* und *Diagramm 11* sieht, wird Interleukin- 1 beta am zweiten postoperativen Tag am stärksten in dem ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum behandelten Lebergewebe nachgewiesen. Bei den mit CO<sub>2</sub> behandelten Rattenlebern lässt es sich am ersten und vierten postoperativen Tag vermehrt nachweisen. Optisch und densitometrisch konnte IL- 1 $\beta$  in geringster Menge am 4. postoperativen Tag, bei denen ohne CO<sub>2</sub> Behandelten aufgezeigt werden.



*Abb.15* Expression von IL- 1 $\beta$  mit und ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum im zeitlichen Verlauf



*Diagramm 11* IL- 1 $\beta$  Densitometrie mit und ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum im zeitlichen Verlauf



## **5. Diskussion**

Es wurde in der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit untersucht, ob das CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum nach Leberresektion einen Einfluss auf die anschließende Leberregeneration hat und wie sich dieser Einfluss, im Vergleich zur Regeneration nach konventioneller Resektion auswirkt. Dafür wurden sowohl histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Verfahren angewandt, durch die die Regeneration auf zellulärer und molekularer Ebene sichtbar gemacht werden kann.

Es konnte nachgewiesen werden, dass das CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum die Leberregeneration nach Leberresektion verzögert.

### **5.1 Wahl des Tiermodells**

Für diese tierexperimentelle Studie bietet die Ratte gegenüber anderen Tiermodellen verschiedene Vorteile. Zum einen sind das die ökonomischen Aspekte (niedrigere Kosten für Anschaffung und Unterbringung, geringerer Futtermittelverbrauch) und zum anderen eignet sich die Rattenleber sehr gut für die Durchführung partieller Leberresektionen. Wegen der starken Lappung der Rattenleber ist es möglich, jeweils einen gesamten Lappen basisnah mit nur einer Ligatur zu entfernen. Man umgeht eine große Resektionsfläche und beugt damit einem hohen Blutungsrisiko vor. Zudem erlaubt die Anatomie der Rattenleber aufgrund ihrer Lappung und Gefäßversorgung die übliche Einteilung nach Couinaud (1957) in acht Segmente, wie bereits in der Einleitung aufgeführt.

Es liegen zahlreiche standardisierte Techniken zur Resektion vor. Diese ermöglichen es eine genau definierte Menge an Parenchym zu resektieren und dadurch die Regenerationsraten vergleichen zu können (Higgins 1931; Panis 1997).

Der Beobachtungszeitraum von 4 Tagen wurde gewählt, weil keine wesentlichen Erkenntnisse zur Regeneration nach Tag 5 erwartet wurden, v.a. bei den molekularen Prozessen. Wie auch in der Einleitung erwähnt, laufen die initialen Kaskaden und Zytokinreaktionen bereits wenige Stunden nach einem Eingriff/ einer Gewebeschädigung ab. Die Hepatozytenproliferation beginnt etwa 12- 24 Stunden postoperativ [Court 2002, Fausto 2006]. Das Ausgangsvolumen der Leber

ist bei den Nagetieren ca. nach 5- 10 Tagen wiederhergestellt [Michalopoulos 1997, Markus 2000, Court 2002].

## **5.2 CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum und Leberregeneration**

Bisher gibt es nur eine geringe Anzahl an Studien darüber; welchen Einfluss ein CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum auf die Regeneration der Leber nach Resektion hat [Yagmurdu 2004, Kaya 2002]. Wohingegen es eine Vielzahl von Studien gibt, die gezeigt haben, dass eine Erhöhung des intraabdominellen Drucks, z.B. durch CO<sub>2</sub>-Insufflation zu einem Ischämie/Reperfusionsschaden führt [Glantzounis 2001, Tan 2003, Yilmaz 2004, Cevrioglu 2004, Schemmer 2005, Junghans 2006].

Das laparoskopische Operieren, insbesondere die laparoskopische Leberchirurgie gewinnt zunehmend an Bedeutung im klinischen Alltag, bis hin zur laparoskopischen Durchführung von Leber-Lebendspenden. Gerade hierbei ist es umso wichtiger die Zusammenhänge zwischen Leberregeneration und Pneumoperitoneum zu erforschen [Cuomo 2006, Koffron 2006].

### **5.2.1 Leberenzyme (AST, ALT, LDH GLDH)**

Unter normalen Bedingungen liegt der intraabdominelle Druck (IAP) des Menschen bei 1-6,5mmHg [Björck 2008, Papavramidis 2009]. Ermittelt werden kann er indirekt über die Messung des Harnblasendruckes (UBP= urinary- bladder- pressure) nach Kron [Björck 2008, Töns 2000, Kron 1984].

Ein erhöhter IAP begegnet einem im klinischen Alltag häufiger, z.B. verursacht durch ein abdominelles Trauma, Leberchirurgische Eingriffe aufgrund traumatischer oder tumoröser Läsionen [Kaya 2001].

Verschiedene Forschergruppen konnten nachweisen, dass ein erhöhter intraabdomineller Druck Auswirkungen sowohl auf das kardiovaskuläre, pulmonale, renale als auch das hepatische System haben kann [Patel 2007, Kaya 2001, Meierhenrich 2005, Klopfenstein 1998].

In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die portalvenöse Durchblutung bei ansteigendem intraperitonealen Druck nachlässt, was infolge dessen zu einer

verminderten Blutversorgung der gesamten Leber und somit zu einer Störung der Leberfunktion führen kann [Richter 2001].

In der Studie von Richter et al. kam es in der laparoskopischen Gruppe unmittelbar nach Desufflation zu einem signifikanten Transaminasenanstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe (AST 154 U/l vs. 81 U/l,  $p > 0,01$ ; ALT 136 U/l vs. 59 U/l,  $p > 0,05$ ) [Richter 2001].

Es stellt sich die Frage welche klinische Relevanz diesen Ergebnissen zukommt.

Wie in mehreren klinischen Studien gezeigt werden konnte, kommt es in den ersten postoperativen Tagen nach laparoskopischen Operationen mit CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum zu einem Anstieg der Leberenzyme [Andrei 1998, Morino 1998, Saber 2000, Sato 2000, Hasukic 2005]. Morino und Kollegen untersuchten hierfür 52 Patienten, die unterschiedlichen laparoskopischen Eingriffen unterzogen wurden. Es wurde ein IAP zwischen 10 und 14 mmHg aufgebaut. Die Operationsdauer und die Höhe des intraabdominellen CO<sub>2</sub>-Drucks korrelierten mit der Veränderung der Transaminasen [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 CO<sub>2</sub>-Druck (7 mmHg) mit einer signifikant niedrigeren Leberenzymhöhung als in der Kontrollgruppe, in der die Operation mit einem CO<sub>2</sub>-Druck von 14 mmHg durchgeführt wurde [Hasukic 2005].

Sakorafas et al. untersuchten 72 Patienten, wobei 36 laparoskopisch und 36 konventionell cholezystektomiert wurden. Um die Leberfunktion beurteilen zu können, wurden präoperativ sowie am 1., 3., 7. und 10. postoperativen Tag die Leberenzyme gemessen. Mit dem Ergebnis, dass am 1. und 3. POD sowohl ALT als auch AST bei den laparoskopisch operierten Patienten statistisch signifikant erhöht waren (ALT 24h: 87.1±24.2 U/L  $P < 0.001$ ; AST 24h: 82.8±19.1 U/L,  $p < 0.001$ , ALT 72h: 99.3±19.5 U/L,  $p < 0.001$ ; AST 72h: 103.5±21.6 U/L,  $p < 0.001$ ) im Gegensatz zu den konventionell Cholezystektomierten, deren Serumwerte zu jedem Messzeitpunkt innerhalb des Grenzbereiches lagen [Sakorafas 2005].

Unterschiedliche Resultate gibt es bezüglich der Normalisierung der Leberenzyme nach laparoskopischen Operationen. In den Studien Hasukic`s und Morino`s dauerte es jeweils nach laparoskopischer Cholecystektomie zwei bis drei Tage [Morino 1998, Hasukic 2005], wobei es bei Sakorafas et al. und Tan et al. 7-10 Tage dauerte, bis die erhöhten Leberenzyme in den Bereich der Normalwerte sanken [Sakofaras 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].

Glantzounis et al. zeigten, dass es bei Patienten nach laparoskopischer Cholecystektomie verglichen mit Patienten, die konventionell cholezystektomiert wurden zu einem signifikanten Anstieg der Serumtransaminasen AST und ALT und der Bilirubinkonzentration im Serum kommt [Glantzounis 2001].

Obgleich die Leberenzyme in allen Studien erhöht waren, zeigten sich im postoperativen Verlauf keine negativen Auswirkungen.

Bei älteren Patienten (> 65 Jahre) war bemerkenswert, dass sowohl die Leberdurchblutung als auch der Leberzellschaden durch das CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum signifikant beeinträchtigt wurden [Sato 2000]. Ursächlich dafür sind zum einen ein vermindertes Blutvolumen und zum anderen eine Einschränkung der Herzleistung [Sato 2000].

Übereinstimmend zu den Resultaten in der Literatur zeigen auch unsere Ergebnisse einen Anstieg der Serumtransaminasen AST und ALT, der LDH und GLDH. Bereits in den Vorversuchen, bei denen die Lebern ausschließlich dem CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum ausgesetzt wurden, kam es zu einem signifikanten Anstieg der vier Parameter. Auch im Hauptversuch konnte ein Anstieg verzeichnet werden. Wobei ALT und GLDH ihr Maximum bei den Kontrolltieren am ersten postoperativen Tag und die mit CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum Behandelten ihren Höchstpunkt bereits 12 Stunden nach dem Eingriff erreichten.

Bei AST und LDH wurden die Höchstwerte sowohl bei den Kontroll-, als auch bei den mit CO<sub>2</sub> behandelten Tieren 12 Stunden nach dem Eingriff erlangt.

Anschließend kam es zu einem langsamen kontinuierlichen Abfall der Transaminasen sowie von LDH und GLDH.

Glutamatdehydrogenase und Alanin- Aminotransferase sind leberspezifische Enzyme und reagieren bei Leberzellschädigungen empfindlicher als AST und LDH, die auch in der quergestreiften Muskulatur und Magenmucosa vorkommen.

### **5.2.2 Mitoseindex und Ki-67**

Kaya et al. und Yagmurdu et al. konnten im Rattenmodell nachweisen, dass eine intraabdominelle Druckerhöhung einen negativen Einfluss, nach Leberresektion auf die Regeneration hat [Kaya 2002, Yagmurdu 2004]. Nach etwa 24- stündigem CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum (12-14 mm Hg) und anschließender 2/3-Hepatektomie waren sowohl die

hepatozelluläre Schädigung als auch die Regenerationsfähigkeit am ersten und am vierten postoperativen Tag signifikant niedriger als in der Gruppe ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum [Kaya 2002]. Ähnliche Ergebnisse wurden von Yagdurmur et al. ermittelt. In dieser Studie erfolgte die Leberresektion nach 60- minütigem CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum, bei einem intraabdominalen Druck von 15 mm Hg. Die Leberregeneration bei den mit Kapnoperitoneum Vorbehandelten war signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe ohne CO<sub>2</sub>. Yagmurdur et al. untersuchten die Leberregenerationsparameter und die Apoptose ausschließlich am 5. postoperativen Tag. In beiden Studien wurde als Parameter für die Leberregeneration PCNA (proliferating cell nuclear antigen), bei Kaya zusätzlich der Mitoseindex verwendet [Kaya 2002, Yagmurdur 2004].

Wir nutzten als Regenerationsmarker den Mitoseindex und das Kernantigen Ki-67. Histomorphologisch sind in der HE- Färbung nur die Zellen als sich teilend erkennbar, die in Vorbereitung auf die Mitose sind. Um jedoch eine Aussage zur gesamten proliferierenden Zellpopulation treffen zu können, ist die immunhistochemische Markierung des Ki- 67 eine geeignete Methode. Ki-67 ist in allen aktiven Phasen des Zellzyklus nachweisbar und wird während der Ruhephase G<sub>0</sub> nicht exprimiert [Scholzen 2000].

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass ein 60 minütiges CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum mit einem IAP von 9 mm Hg, unmittelbar vor partieller Hepatektomie die Leberregeneration, im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum signifikant beeinträchtigt. Die Regenerationsparameter Ki-67 und der Mitoseindex sind bei den Tieren mit vorangegangenen CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum geringer ausgeprägt als bei den Tieren deren Leber auf konventionelle Weise reseziert wurde. Somit konnten auch wir feststellen, dass das Pneumoperitoneum zu einer Beeinträchtigung der Leberregeneration führt.

### **5.2.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren**

Auf ein operatives Trauma reagiert der Körper gewöhnlicherweise, indem er inflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies freisetzt. Dabei ist es irrelevant, ob es sich um einen konventionellen oder laparoskopischen Eingriff handelt [Markus 2000].

Zytokine sind Glykoproteine, die außer einer mitogenen Wirkung regulierende Funktionen erfüllen, wie unter anderem die Aktivierung von Effektorzellen, Immunantwort und Zelladhäsion. Wachstumsfaktoren, im Englischen "Growth factors" sind Proteine, die entweder

stimulierend oder hemmend auf den Zellzyklus wirken. Sie haben jedoch auch Einfluss auf die Angiogenese, Zellmotilität, Zelldifferenzierung und das Überleben der Zelle [Fausto 1995].

Die Zytokine können in fünf Hauptgruppen unterteilt werden. Zu den zwei Wichtigsten gehören die Tumornekrosefaktoren (TNF) und die Interleukine. Zytokine können ubiquitär gebildet und ausgeschüttet werden [Markus 2000].

Zu einer erhöhten Produktion und Freisetzung von TNF-  $\alpha$  aus Monozyten/Makrophagen und aus T-Zellen kommt es beispielsweise nach einem chirurgischen Trauma [Markus 2000]. Der Verbund der Kupfferschen Sternzellen stellt neben den peritonealen Monozyten/Makrophagen den größten Speicher an Monozyten/Makrophagen dar [Lin 2009].

Die Kupfferschen Sternzellen repräsentieren das mononukleäre phagozytäre System (MPS), welches zu 90% in der Leber lokalisiert ist und eine entscheidende Rolle bei lokalen Abwehrmechanismen gegen zirkulierende Tumorzellen und Bakterien spielt [Curley 1993, Roh 1992]. Die Kupfferschen Sternzellen werden im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschadens unmittelbar nach der Reperfusion aktiviert und produzieren unter anderem, neben freien Sauerstoffradikalen, proinflammatorische Zytokine und Adhäsionsmoleküle [Lemasters 1997, Okaya 2003, Kimura 2006]. Die freigesetzten proinflammatorischen Zytokine führen zu einer Migration neutrophiler Granulozyten in das Leberparenchym, wo sie durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen direkt die Hepatozyten schädigen [Jaeschke 1997].

Die Auswirkung des CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneums auf die Funktion der Kupfferschen Sternzellen ist bislang nicht vollständig geklärt.

Die weitere Produktion und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, inklusive Interleukin 6, wird durch TNF- $\alpha$  induziert. Auch Interleukin 6 wird, wie bereits oben erwähnt nahezu ubiquitär gebildet. Aber auch hier stellen die Kupfferschen Sternzellen den vorrangigen Produktionsort dar [Lin 2009, Vittimberga 2000]. Gemeinsam mit TNF- $\alpha$  reguliert das IL-6 die Synthese und Freisetzung von akute- Phase Proteinen (CRP, alpha-2-Makroglobulin und Fibrinogen) [Baumann 1994, Wortel 1993]. Das Ausmaß der Produktion und Freisetzung von IL-6 und TNF alpha ist vom Schweregrad der Läsion bzw. des chirurgischen Eingriffs abhängig [Biffl 1996, Shenkin 1989, Lin 2009]. In verschiedenen Studien, beispielsweise von Demirer und Schietroma wurden laparoskopische Cholecystektomien und kolorektale Eingriffe mit entsprechenden konventionellen Eingriffen verglichen. Es konnte in diesen prospektiv randomisierten klinischen Studien gezeigt werden, dass laparoskopische Eingriffe mit einer geringeren Freisetzung von proinflammatorischen Interleukinen einhergehen als offene Operationen [Demirer 2000, Lauro 1999, Schwenk 2000, Bruce 1999, Suter 2002, Karayiannakis

1997, Schietroma 2004]. Wobei laparoskopische Eingriffe als Ausdruck eines geringeren Gewebetraumas gelten.

Für eine erhöhte IL-6 und TNF-  $\alpha$  Produktion gibt es verschiedene Ursachen. Wie Cataldegirmen et al. zeigen konnte, führt bereits die Leberteileresektion an sich zu einer Ausschüttung von Zytokinen in der Restleber. Es werden insbesondere IL-6, TNF-  $\alpha$  und IL-10 produziert [Cataldegirmen 2005]. Cevrioglu und Altinidis et al. zeigten, dass aber auch der Einfluss des CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneums zu einer erhöhten Konzentration von IL-6 und TNF-  $\alpha$  sowohl im Lebergewebe als auch im Serum führen kann [Altinidis 2004, Cevrioglu 2004].

Die übermäßige Produktion proinflammatorischer Zytokine kann assoziiert sein mit leichten postoperativen Infektionen bis hin zu schwerwiegenden Folgen wie Funktionseinschränkungen, -ausfällen multipler Organe [Biffl 1996, Roumen 1993].

#### **5.2.4 HGF (“hepatocyte growth factor“)**

Der hepatocyte growth factor (oder auch “Scatter Faktor“) ist einer der potentesten mitogenen Wachstumsfaktoren, der, wie auch VEGF, für die Zellzyklusprogression eine große Rolle spielt [Fausto 2006]. Er induziert die DNA Synthese in den Hepatozyten und aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege, die für die Zellzyklusprogression und für das Zellüberleben verantwortlich sind [Geier 2008].

Die Synthese von HGF wird stimuliert durch Erkrankungen des Lebergewebes [Michalopoulos 1992]. Laut Court und Kollegen stellt ein Lebertrauma den stärksten Anreiz für mesenchymale Zellen dar, HGF zu produzieren [Court 2002].

Interessanterweise konnten wir in unseren Ergebnissen zeigen, dass HGF stärker bei den mit CO<sub>2</sub> Behandelten exprimiert wird, als bei denen, die ohne CO<sub>2</sub>- Einfluss reseziert wurden. Anzunehmen ist, dass das Pneumoperitoneum, das durch die partielle Hepatektomie induzierte Trauma potenziert. Trotz der vermehrten HGF- Ausschüttung bei den Tieren mit Pneumoperitoneum war die Leberregeneration insgesamt gehemmt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der Scatter Faktor seine Wirkung erst entfaltet, wenn die sich teilenden Zellen von der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub> Phase übergetreten sind. Eine Proliferationseinschränkung könnte durch das CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum also bereits in der Priming Phase beginnen.

### **5.2.5 VEGF (“vascular endothelial growth factor“)**

VEGF (“vascular endothelial growth factor“) gehört ebenfalls zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren. VEGF ist besonders in der Frühphase der Leberregeneration von großer Bedeutung [Bockhorn 2007] und gehört zu den stärksten Angiogenesefaktoren. In der sich regenerierenden Leber stimuliert er innerhalb der ersten 24- 48 Stunden nach partieller Hepatektomie die Proliferation von Endothelzellen aber auch von Hepatozyten [Bockhorn 2008]. Wir konnten nachweisen, dass VEGF im Lebergewebe nach Pneumoperitoneum geringer ausgeschüttet wurde als in der Kontrollgruppe. Belizon und Fine et al. konnten ebenfalls eine höhere VEGF Konzentration nach konventionellen, verglichen mit laparoskopischen Kolonresektionen feststellen. Sie erklärten den größeren VEGF- Anstieg mit dem größeren chirurgischen Stress bei der konventionellen Kolonresektion [Fine 2003, Belizon 2006]. Die Ergebnisse in unserer Studie lassen sich dadurch erklären, dass der chirurgische Stress durch das zusätzliche Pneumoperitoneum wahrscheinlich noch erhöht wurde und dadurch die VEGF-Ausschüttung gehemmt wurde.

### **5.2.6 TGF- $\beta$ (transforming growth factor) und IL-1 $\beta$ (Interleucin 1- $\beta$ )**

Der Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) gehört wie das Interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) zu den Inhibitoren der Leberregeneration. TGF- $\beta$  wird hauptsächlich in den Myofibroblasten der Leber gebildet [Markus 2000].

Die Regenerationshemmung, die wir nach dem Pneumoperitoneum beobachteten, ließ sich dagegen nicht durch die inhibitorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-1 $\beta$  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 CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum Modell ausgesetzt waren, eine temporäre Hemmung der IL-1 $\beta$  Sekretion nachweisen [Kopernik 1998].



### **5.2.7 Ischämie und Reperfusion**

Neurologische, humorale, metabolische und hämodynamische Veränderungen zählen wie auch die metabolische Azidose und die Hyperkapnie zu möglichen Folgen eines Pneumoperitoneums, die eine Leberzellschädigung bedingen können [Eleftheriadis 1996].

Außerdem wird durch den Aufbau des CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneums und die anschließende Desufflation ein Ischämie-Reperfusionsschaden verursacht, der mit einer Minderdurchblutung des Magen- Darm- Traktes sowie oxidativem Stress einhergehen kann. Über eine systemische CO<sub>2</sub>-Absorption bedingt das Kapnoperitoneum zudem eine metabolische Azidose und Hyperkapnie, wodurch es über eine Erhöhung des Gefäßwiderstands zur Vasokonstriktion und dadurch ebenfalls zur Minderdurchblutung kommt [Hazebroeck 2002]. Schemmer und Kollegen konnten bereits bei einem Pneumoperitoneum von 7mmHg eine Störung in der Mikrozirkulation der Leber messen [Schemmer 2004].

Bei Patienten ohne Vorschädigung der Leber, die kardiopulmonal stabil sind, ist die oxidative Schädigung der Hepatozyten durch das Pneumoperitoneum wahrscheinlich nur von akademischem Interesse. Jedoch bei älteren Patienten mit vorbestehenden kardialen und/ oder hepatischen Organfunktionsstörungen, könnte die Anwendung der laparoskopischen Chirurgie in jedem Falle einen negativen Einfluss auf den postoperativen Verlauf haben. Bei diesen Patienten muss die Indikation zu laparoskopischen Operationen differenziert abgewogen werden.

### **5.2.8 Ischämische Präkonditionierung**

Eine Variante, das Ausmaß der Leberschädigung zu mindern, stellt die ischämische Präkonditionierung dar.

Die Anlage eines Pneumoperitoneums mit anschließender Desufflation kann durchaus als ein Ischämie- Reperfusionsmodell angesehen werden. In mehreren Studien wurde versucht, durch eine präoperative ischämische Präkonditionierung den Schaden zu begrenzen [Yilmaz 2003, Yilmaz 2004, Altindis 2004]. Durchgeführt wurde die ischämische Präkonditionierung indem der IAP- vor dem eigentlichen länger andauernden Pneumoperitoneum- kurzweilig gesteigert wurde. In der Studie von Altinidis zeigte sich, dass nach ischämischer Präkonditionierung der Anstieg der proinflammatorischen Zytokine im Lebergewebe signifikant geringer ausgeprägt war, verglichen mit Gruppen ohne ischämische Präkonditionierung [Altinidis 2004].

In weiteren Studien muss untersucht werden, ob eine Minimierung des IR- Schadens durch ischämische Präkonditionierung bei der Leberteileresektion während oder nach einem Pneumoperitoneum erzielt werden kann.

Bereits in mehreren tierexperimentellen und klinischen Studien zur konventionellen Leberresektion wurde zudem die Effizienz einer präoperativen hochdosierten Glukokortikoid Gabe, hinsichtlich der Reduzierung des Ischämie- Reperfusionsschadens untersucht und nachgewiesen [Glanemann 2004, Aldrighetti 2006, Schmidt 2007]. Die ersten Berichte über die protektive Wirkung von Glukokortikoiden auf die Leberischämie wurden bereits 1975 von Santiago- Delpin und Figueroa veröffentlicht.

Der Ischämie- Reperfusionsschaden wurde bei Aldrighetti et al durch die Messung der Transaminasen im Serum am 1., 2. und 5. postoperativen Tag evaluiert. Es zeigte sich, dass bei den zuvor einmalig mit 500mg Methylprednisolon behandelten Patienten die Werte für ALT und AST signifikant niedriger waren als in den Vergleichsgruppen ohne Steroidbehandlung. Ebenso kam es zu einer signifikant geringeren Ausschüttung der Zytokine IL-6 und TNF  $\alpha$  [Aldrighetti 2006].

Ob die Glucokortikoidgabe auch vor laparoskopischen, insbesondere den leberchirurgischen Eingriffen, die postoperativen Stressreaktionen vermindern könnte, lässt sich derzeit nur vermuten. Hier stehen weitere experimentelle Studien aus.

Des Weiteren konnten Kirimlioglu et al in ihrer experimentellen Studie zeigen, dass eine Substitution von Resveratrol vor und nach einer Leberteileresektion zu einer Minderung der schädigenden Effekte führen kann, unter anderem der IL- 6 Produktion. Dieses kann vor allem hilfreich sein bei Spendern und Empfängern einer Leberlebenspende [Kirimlioglu 2008].

Ein weiterer Gegenstand der Forschung, zur Reduktion des postoperativen Stresses nach laparoskopischen Eingriffen ist das Erythropoetin. Erythropoietin ist ein pleiotropisches Zytokin, welches dafür bekannt ist die Erythropoese zu steigern und sich protektiv auf IR-Schädigungen einer Vielzahl verschiedener Organe, einschließlich Myokard und Niere auszuwirken [Klemm 2008; Greif 2010].

Klemm et al konnten zudem im konventionellen Rattenmodell zeigen, dass bei systemischer Erythropoietingabe auch eine Stimulierung der Leberregeneration durch Inhibition der Apoptose und Steigerung der Leberzellproliferation nachweisbar ist [Klemm 2008].

In einer weiteren tierexperimentellen Studie wurde durch Seehofer und Kollegen die Wirkung von u.a. Erythropoietin allein und in Kombination mit Curcumin, einem hepatoprotektiven

Antioxidans, getestet. Der Regenerationsprozess der Leber konnte durch die alleinige EPO-Gabe nur gering und nicht signifikant verbessert werden. Wohingegen die Kombination von EPO mit Curcumin eine hochsignifikante Verbesserung der Regenerationsparameter (Mitoseindex, Ki- 67) zur Folge hatte. Zudem konnte eine deutliche Verringerung des oxidativen Stresses festgestellt werden [Seehofer 2008].

Ebenfalls in einem Rattenmodell, jedoch laparoskopisch konnten Ates et al. zeigen, dass vor Anlage eines 60 minütigen Pneumoperitoneums und nach subkutaner Injektion von 1000 U/kg Erythropoetin die postoperative Plasmakonzentration von LDH und TNF- $\alpha$  signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe ohne Vorbehandlung war [Ates 2006]. Die protektive Wirkung des Erythropoietins war jedoch im Vergleich zur ischämischen Präkonditionierung deutlich geringer ausgeprägt.

Von hohem Interesse wäre auch hier die Fragestellung, ob präoperativ appliziertes Erythropoietin, allein oder in Kombination von beispielsweise Curcumin vor laparoskopischen Leberteileresektionen den Ischämie/Reperfusionsschaden reduzieren und die Regeneration fördern könnte.

## **6. Zusammenfassung**

### **Hat das CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum im Rahmen einer Leberresektion im Rattenmodell Einfluss auf die Leberregeneration?**

#### **Einleitung**

Gegenstand der Untersuchungen war es, den Einfluss des CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneums auf die Leberregeneration nach Leberteileresektion zu untersuchen. Als Hauptkriterien galten das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung sowie der Leberregeneration. Die Versuche erfolgten im Rattenmodell.

#### **Material und Methoden**

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 60 männliche Wistarratten, mit einem Gewicht zwischen 220g und 250g.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde für 60 Minuten ein CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum von 8mmHg erzeugt. Anschließend erfolgte in der einen Gruppe die Leberteileresektion nach dem Modell von Anderson & Higgins [Anderson 1931]. Bei den Tieren der Kontrollgruppe erfolgte ausschließlich die Leberteileresektion ohne vorheriges CO<sub>2</sub>- Pneumoperitoneum.

Der Beobachtungszeitraum betrug 4 Tage, wobei Experimente 12 Stunden, 1, 2 und 4 Tage postoperativ erfolgten. Am Ende des jeweiligen Beobachtungszeitraums wurde den Tieren Blut für weitere Analysen entnommen und ihre Organe zur histologischen Aufarbeitung asserviert. Die Leberzellschädigung wurde anhand der leberspezifischen Enzyme ALT und GLDH sowie der unspezifischen Enzyme AST und LDH ermittelt.

Wir bedienten uns verschiedener Methoden um die Regeneration darzustellen, wie der Immunhistochemie und der PCR (Polymerase Kettenreaktion). Als Parameter für die Regeneration galten die HE- Färbung- zur Auszählung des Mitoseindexes, die Ki- 67- Antigenfärbung, HGF und VEGF. Zusätzlich wurden TGF- $\beta$  und IL- 1 $\beta$  als Regenerationsinhibitoren molekularbiologisch erfasst.

#### **Ergebnisse**

Hierbei konnte anhand der Ermittlung der Transaminasen sowie von LDH und GLDH gezeigt werden, dass das CO<sub>2</sub> zu einem deutlichen Anstieg führt und somit eine Leberzellschädigung bedingt und einen negativen Effekt auf die Regeneration hat. Auch die Mitoserate und Ki 67 waren bei den Tieren, die dem CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum ausgesetzt waren, herabgesetzt.

Dagegen ergaben die Ergebnisse der Untersuchungen der Wachstumsfaktoren HGF und VEGF sowie der Regenerationsinhibitoren TGF- $\beta$  und Interleukin 1- $\beta$  kein einheitliches Bild. Die Expression des VEGF war nach vorangegangenem Pneumoperitoneum schwächer als in der Vergleichsgruppe ohne Pneumoperitoneum ausgeprägt. Umgekehrt dagegen verhielt es sich mit der Expression des potentesten Wachstumsfaktors HGF, der bei den Tieren mit CO<sub>2</sub>-Behandlung stärker nachweisbar war.

### **Diskussion**

Unsere Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass durch das Pneumoperitoneum das durch die partielle Hepatektomie induzierte Trauma wahrscheinlich potenziert wird.

Insgesamt zeigten die Versuchsergebnisse, dass bereits die Resektion eine Leberzellschädigung hervorruft, jedoch das CO<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum die negativen Auswirkungen auf die Leberregeneration noch verstärkt.

Bei der Indikationsstellung zur erweiterten laparoskopischen Leberteileresektionen sollte der potentielle Nachteil eines Pneumoperitoneums mit berücksichtigt werden, was insbesondere die Indikationsstellung bei Patienten mit vorgeschädigter Leber betrifft.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Abdel-Atty MY**, Farges O, Jagot P, et al. Laparoscopy extends the indications for liver resection in patients with cirrhosis. *Br J Surg* 1999; 86:1397-400.
2. **Aldrighetti L**, Pulitanò C, Arru M, et al. 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.
3. **Altindis M**, Yilmaz S, Polat C, et al. 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 (6):380-3.
4. **Andrei VE**, Schein M, Margolis M, et al. Liver enzymes are commonly elevated following laparoscopic cholecystectomy: is elevated intra-abdominal pressure the cause? *Dig Surg* 1998; 15: 256-9.
5. **Ates E**, Yilmaz S, Ihtiyar E, et al. Preconditioning-like amelioration of erythropoietin against laparoscopy-induced oxidative injury. *Surg Endosc* 2006; 20:815-9.
6. **Azagra JS**, Goergen M, Gilbert E, et al. Laparoscopic anatomical (hepatic) left lateral segmentectomy-technical aspects. *Surg Endosc* 1996; 10: 758-61.
7. **Ballantyne GH**. Robotic surgery, telerobotic surgery, telepresence, and telementoring. Review of early clinical results. *Surg Endosc* 2002; 16 (10):1389-402.
8. **Belizon A**, Balik E, Feingold DL, et al. Major abdominal surgery increases plasma levels of vascular endothelial growth factor: open more so than minimally invasive methods. *Ann Surg* 2006; 244 (5):792-8.
9. **Berci G**. History of endoscopic surgery. *Endoscopic surgery*, F.L. Green, J.L. Ponsky, editors. Philadelphia, Saunders, 1994.
10. **Berci G**. and Forde, K. A. History of endoscopy: what lessons have we learned from the past? *Surg Endoscopy* 2000; 14 (1):5-15.
11. **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.
12. **Björck M**, Wanhainen A, Djavani K, et al. The clinical importance of monitoring intra-abdominal pressure after ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Scand J Surg* 2008;97(2):183-90.
13. **Bockhorn M**, Benkö T, Opitz B, et al. Impact of hepatic vein deprivation on liver regeneration and function after major hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393 (4):527-33.

- 14. Bockhorn M**, Schöllmann S, Opitz B, et al. Vascular endothelial growth factor does not improve liver regeneration and survival after 90% subtotal liver resection. *Hepatol Res* 2007; 37(5):353-9.
- 15. Bozzini P**. Lichtleiter, eine Erfindung zur Anschauung innerer Teile und Krankheiten, *J Prak Heilk* 1806; Vol. 24:107.
- 16. Bruce DM**, Smith M, Walker CB, et al. Minimal access surgery for cholelithiasis induces an attenuated acute phase response. *Am J Surg* 1999; 178(3):232-4.
- 17. Bruch HP**, Esnaashari H, Schwandner O. Current status of laparoscopic therapy of colorectal cancer. *Dig Dis* 2005; 23:127-34.
- 18. Bucher NLR**. Liver regeneration: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6:615-624.
- 19. Carus T**, Rohn D. Diagnosis and surgical therapy of right-sided colonic diverticulitis. *Langenbecks Arch Chir* 1995; 380(5): 288-291.
- 20. Cataldegirmen G**, Zeng S, Feirt N, et al. RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF-alpha and NF-kappaB. *J Exp Med* 2005; 201(3):473-84.
- 21. Cevrioglu AS**, Yilmaz S, Koken T, et al. 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(9):2144-51.
- 22. Chen MF**, Hwang TL, Hung CF. Human liver regeneration after major hepatectomy. *Ann Surg* 1991, 213:227-229.
- 23. Cherqui D**, Soubrane O, Husson E, et al. Laparoscopic living donor hepatectomy for liver transplantation in children. *Lancet* 2002; 359:392-6.
- 24. Couinaud C**. Le foie. Études anatomiques et chirurgicales. Masson, Paris, 1957.
- 25. Court FG**, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, et al. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002; 89(9): 1089-1095.
- 26. Cuomo O**, Ragozzino A, Iovine L, et al. Living donor liver transplantation: early single-center experience. *Transplant Proc* 2006;38:1101-5.
- 27. Curley SA**, Roh MS, Feig B, et al. Mechanisms of Kupffer cell cytotoxicity in vitro against the syngeneic murine colon adenocarcinoma line MCA26. *J Leukoc Biol* 1993; 53(6):715-21.
- 28. Cuschieri A**, Shimi S, Banting S, Vander Velpen G. Technical aspects of laparoscopic splenectomy: hilar segmental devascularization and instrumentation. *J R Coll Surg Edinb* 1992; 37(6): 414-416.

- 29. Demirer S**, Karadayi K, Simşek S, et al. Comparison of postoperative acute-phase reactants in patients who underwent laparoscopic v open cholecystectomy: a randomized study. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2000; 10(5):249-52.
- 30. Diehl AM**, Rai RM. Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J* 1996; 10(2):215-27.
- 31. Eleftheriadis E**, Kotzampassi K, Botsios D, et al. Splanchnic ischemia during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 1996; 10:324-6.
- 32. Eypasch E**, Menningen R, Paul A, Troidl H. Die Bedeutung der Laparoskopie bei der Diagnostik und Therapie des akuten Abdomens. *Zentralbl Chir* 1993; 118: 726-732.
- 33. Fausto N**, Laird AD, Webber EM. Role of Growth Factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB Journal* 1995; 1530 (9).
- 34. Fausto N**. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32(1 Suppl):19-31.
- 35. Fausto N**, Campbell JS, Riehle KJ. Liver Regeneration. *Hepatology* 2006; 43: 45-53.
- 36. Fernandez del Castillo C**, Warshaw AL. Laparoscopy for staging in pancreatic carcinoma. *Surg Oncol* 1993; 2(1): 25-29.
- 37. 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.
- 38. 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, 3-21.
- 39. Fine AP**. Minimally invasive surgery may result in lower peak levels of circulating vascular endothelial growth factor. *JLS* 2003; 7(2):147-9.
- 40. Francavilla A**, Ove P, Polimeno L, et al. Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant Proc* 1988;20, 494-7.
- 41. Födra C**. Die Technik der partiellen, orthotopen Lebertransplantation im „small-for-size“-Modell an der Ratte im Vergleich zur orthotopen Ganzlebertransplantation unter besonderer Berücksichtigung laborchemischer Parameter. *Med Diss Erlangen-Nürnberg*, 1991
- 42. Gagner M**, Rheault M, Dubuc J. Laparoscopic partial hepatectomy for liver tumor. *Surg Endosc* 1992; 6:99.
- 43. Gagner M**, Rogula T, Selzer D. Laparoscopic liver resection: benefits and controversies. *Surg Clin North Am* 2004; 84:451-62.



- 44. Geier A**, Martin IV, Dietrich CG, et al., Hepatocyte nuclear factor-4alpha is a central transactivator of the mouse Ntcp gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295(2):226-33.
- 45. Gerdes J**, Schwab U, Lemke H, et al., Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31:13-20.
- 46. Glanemann M**, Strenziok R, Kuntze R, et al. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135:203-14.
- 47. Glantzounis GK**, Tselepis AD, Tambaki AP, et al. Laparoscopic surgery-induced changes in oxidative stress markers in human plasma. *Surg Endosc* 2001;15:1315-9.
- 48. Goetze O**. Ein neues Verfahren der Gasfüllung für das Pneumoperitoneum. *Münch Med Wochenschr* 1921; 51: 233-236.
- 49. Götz F**, Pier A, Schippers E, Schumpelick V. *Laparoskopische Chirurgie*. Thieme Verlag, Stuttgart 1991.
- 50. Gove CD**, Hughes RD. Liver regeneration in relationship to acute liver failure. *Gut*. 1991; Suppl: 92-6.
- 51. Greif F**, Ben-Ari Z, Taya R, et al., Dual effect of erythropoietin on liver protection and regeneration after subtotal hepatectomy in rats. *Liver Transpl* 2010; 16(5):631-8.
- 52. Grisham JW**. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1962;22:842-9.
- 53. Gutt CN**, Gessmann T, Schemmer P, et al. The impact of carbon dioxide and helium insufflation on experimental liver metastases, macrophages, and cell adhesion molecules. *Surg Endosc* 2003; 17: 1628-31.
- 54. 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.
- 55. Gutt CN**, Schmedt CG, Schmandra T, et al. 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.
- 56. Hasukić S**. Postoperative changes in liver function tests: randomized comparison of low- and high-pressure laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 2005; 19:1451-5.
- 57. Hatzinger M**, Badawi JK, Häcker A, Langbein S, Honeck P, Alken P. Georg Kelling (1866-1945) Der Erfinder der modernen Laparoskopie. *Urologe* 2006; 45: 868-871.
- 58. Hatzinger M**, Badawi JK, Häcker A, et al. Hans- Christian Jacobaeus (1879- 1937) Die erste Laparoskopie und Thorakoskopie beim Menschen. *Urologe* 2006; 45: 1184-1186.

- 59. Hatzinger M**, Konert J. Die Geschichte der Laparoskopie. *Aktuel Urol* 2010; 41: 155- 56.
- 60. Hazebroek EJ**, Haitzma JJ, Lachmann B, et al. Impact of carbon dioxide and helium insufflation on cardiorespiratory function during prolonged pneumoperitoneum in an experimental rat model. *Surg Endosc* 2002; 16(7): 1073-1078.
- 61. Hebel R**, Stromberg MW. *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. BioMed Verlag Würthsee 1986; 53- 55.
- 62. 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.
- 63. Hirschowitz**; Curtis and Peters. The fiberscope, *Gastroenterology* 1958, (35): 50.
- 64. Hyltander A**, Liljegren E, Rhodin PH, Lönroth H. The transfer of basic skills learned in a laparoscopic simulator to the operating room. *Surg Endosc* 2002;16(9):1324-8.
- 65. Irmischer J**, Johne R, *Lexikon der Antike*, VEB Bibliographisches Institut Leipzig, 1982
- 66. Jacobaeus HC**. Kurze Uebersicht über meine Erfahrungen mit der Laparo-thorakoskopie. *Münch. Med. Wschr* 58 (1911) 2017-2019.
- 67. Jacobi CA**, Bonjer HJ, Puttick MI, et al. Oncologic implications of laparoscopic and open surgery. *Surg Endosc* 2002; 16:441-5.
- 68. Jacobi CA**, Keller H, Mönig S, Said. Implantation metastasis of unsuspected gallbladder carcinoma after laparoscopy. *Surg Endosc* 1995, 9: 351-352.
- 69. Jacobi CA**, Wenger F, Opitz I, Müller JM. Immunologic changes during minimally invasive surgery. *Dig Surg* 2002; 19:459-63.
- 70. Jaeschke H**, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J, Leukoc Biol* 1997; 61:647-53.
- 71. Jorgensen JO**, Lalak NJ, Hunt DR. Is laparoscopy associated with a lower rate of postoperative adhesions than laparotomy? A comparative study in the rabbit. *Aust N Z J Surg* 1995; 65 (5):342-4.
- 72. Junghans T**, Modersohn D, Dörner F, et al. Systematic evaluation of different approaches for minimizing hemodynamic changes during pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 2006; 20:763-9.
- 73. Kalk H**, Brühl W. *Leitfaden der Laparoskopie und Gastroskopie*. Stuttgart, Thieme, 1951
- 74. Karayiannakis AJ**, Makri GG, Mantzioka A, et al., Systemic stress response after laparoscopic or open cholecystectomy: a randomized trial. *Br J Surg*. 1997, 84(4):467-71.
- 75. Kaya Y**, Aral E, Coskun T, Erkasap N, Var A. Increased Intraabdominal Pressure Impairs Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Rats. *Journal of Surgical Research* 2002; 108: 250-257.

- 76. Kelling G.** Über Ösophagoskopie, Gastroskopie und Kōlioskopie. Münch Med Wochenschr 1902; 49: 21-24.
- 77. Kimura F,** Shimizu H, Yoshidome H, et al. Circulating cytokines, chemokines, and stress hormones are increased in patients with organ dysfunction following liver resection. J Surg Res 2006; 133:102-12.
- 78. Kirimlioglu V,** Karakayali H, Turkoglu S, Haberal M., Effect of resveratrol on oxidative stress enzymes in rats subjected to 70% partial hepatectomy. Transplant Proc 2008;40(1):293-6.
- 79. Kirman I,** Cekic V, Poltoratskaia N, et al. Open surgery induces a dramatic decrease in circulating intact IGFBP-3 in patients with colorectal cancer not seen with laparoscopic surgery. Surg Endosc. 2005;19(1):55-9.
- 80. Kleemann M,** Kühling A, Hildebrand P, et al. Stand der laparoskopischen Leberchirurgie. Ergebnisse einer Umfrage der DGAV- Mitglieder. Chirurg 2010, 81: 1097- 1107.
- 81. Klemm K,** Eipel C, Abshagen K, et al. Erythropoietin verbessert die Leberregeneration durch Stimulation der Zellproliferation und Inhibition der Zellapoptose. Chir Forum 2008; 35: 303/304.
- 82. 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: 900-905.
- 83. Koffron AJ,** Kung R, Baker T, Fryer J, Clark L, Abecassis M. Laparoscopic-assisted right lobe donor hepatectomy. Am J Transplant 2006;6: 2522-2525.
- 84. Kopernik G,** Avinoach E, Grossman Y, et al. 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.
- 85. Kountouras J,** Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. Hepatogastroenterology 2001; 48:556-62.
- 86. Kron IL,** Harman PK, Nolan SP. The measurement of intra-abdominal pressure as a criterion for abdominal re-exploration. Ann Surg 1984; 199(1):28-30.
- 87. Lauro A,** Boselli C, Bufalari A, et al., Perioperative changes in the plasma levels of fibrinogen and D-dimer during laparoscopic cholecystectomy: the preliminary results of a prospective randomized clinical study. Ann Ital Chir 1999; 70 (4):561-7.
- 88. Leibl BJ.** Minimally-invasive surgery for inguinal hernia- pro. Dtsch Med Wochenschr 2005, 11;130(10):534.
- 89. Leister I,** Schüler P, Vollmar B, et al. A peritoneal cavity chamber for intravital microscopy of the liver under conditions of pneumoperitoneum. Surg Endosc 2003; 17(6): 939-942.

- 90. Lemasters JJ**, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 327-338.
- 91. Lin MT**, Yeh SL, Wu MS, et al. Impact of surgery on local and systemic responses of cytokines and adhesion molecules. *Hepatogastroenterology* 2009; 56 (94-95):1341-5.
- 92. Liorente J**. Laparoscopic gastric resection for gastric leiomyoma. *Surg Endosc* 1994; 8(8): 887-889.
- 93. Litynski**. Highlights in the History of Laparoscopy, Bernert Verlag, Frankfurt/ Main .1996
- 94. Markus PM**, König S, Liersch T, et al. Die Leberregeneration. *Onkologe* 2000; 6: 348-355.
- 95. Meierhenrich R**, Gauss A, Vandenesch P, et al. The effects of intraabdominally insufflated carbon dioxide on hepatic blood flow during laparoscopic surgery assessed by transesophageal echocardiography. *Anesth Analg* 2005; 100(2):340-7.
- 96. Michalopoulos GK**. Liver Regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213(2): 286–300.
- 97. Michalopoulos GK**, Zarnegav R. Hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1992; 15(1):149-55.
- 98. Morino M**, Giraudo G, Festa V. Alterations in hepatic function during laparoscopic surgery. An experimental clinical study. *Surg Endosc* 1998; 12:968-72.
- 99. Mouret P**. How I developed laparoscopic cholecystectomy. *Ann Acad Med Singapore* 1996; 25:744-747.
- 100. Muzii L**, Marana R, Marana E, et al. Evaluation of stress-related hormones after surgery by laparoscopy or laparotomy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996;3(2):229-34.
- 101. Mühe E**. Die erste Cholecystektomie durch das Laparoskop. *Langenbeck`s Arch Chir* 1986; 369: 804.
- 102. Naguse N**, Yukaya H, Ogawa Y, et al. 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.
- 103. Nathanson LK**. Lapraoscopy and pancreatic cancer: biopsy, staging and bypass. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1993; 7(4): 941-960.
- 104. Nitze M**. Beobachtungs und Untersuchungsmethode für Harnröhre Harnblase und Rectum, *Wien Med. Wochenschr* 1879, ( 24): 651.
- 105. Nomina Anatomica Veterinaria**, International Committee on Veterinari Gross Anatomical Nomenclature. 3. Aufl., Ithaka, New York, 1983: 28-30.
- 106. Okaya T**, Lentsch AB. Cytokine cascades and the hepatic inflammatory response to ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2003; 16(3):141-7.

- 107. Overturf K**, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M.. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151(5):1273-80.
- 108. Panis Y**, MC Cullan DM, Edmond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997; 121:142-149.
- 109. Papavramidis TS**, Duros V, Michalopoulos A, et al. Intra-abdominal pressure alterations after large pancreatic pseudocyst transcutaneous drainage. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 42.
- 110. Patel A**, Lall CG, Jennings SG, Sandrasegaran K. Abdominal compartment syndrome. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 189 (5):1037-43.
- 111. Popesko P**, Raitová V, Horák J. *A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals, Vol. II: Rat, Mouse, Hamster.* Saunders 1990; 60/61.
- 112. Pugliese R**, Maggioni D, Sansonna F, et al. Total and subtotal laparoscopic gastrectomy for adenocarcinoma. *Surg Endosc* 2007; 21:21-7.
- 113. Richter S**, Olinger A, Hildebrandt U, Menger MD, Vollmar B. Loss of physiologic hepatic blood flow control ("hepatic arterial buffer response") during CO<sub>2</sub>-pneumoperitoneum in the rat. *Anesth Analg* 2001; 93:872-7.
- 114. Roh MS**, Kahky MP, Oyedeji C, et al. Murine Kupffer cells and hepatic natural killer cells regulate tumor growth in a quantitative model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10(5):317-27.
- 115. Rosen MJ**; Malm JA; Tarnoff M, et al. Cost-effectiveness of ambulatory laparoscopic cholecystectomy. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2001;11(3):182-4.
- 116. Roumen RM**, van Meurs PA, Kuypers HH, et al. Serum interleukin-6 and C reactive protein responses in patients after laparoscopic or conventional cholecystectomy. *Eur J Surg* 1993; 158(10):541-4.
- 117. Roviario GC**, Vergani C, Varoli F, et al.. Videolaparoscopic appendectomy: the current outlook. *Surg Endosc* 2006; 20 (10):1526-30.
- 118. Saber AA**, Laraja RD, Nalbandian HI, et al. Changes in liver function tests after laparoscopic cholecystectomy: not so rare, not always ominous. *Am Surg* 2000; 66:699-702.
- 119. Saiki RK**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, et al. Enzym abc amplification of  $\beta$ 3-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.
- 120. Sakorafas G**, Anagnostopoulos G, Stafyla V, et al. Elevation of serum liver enzymes after laparoscopic cholecystectomy. *N Z Med J* 2005; 118:U1317.

- 121. Sato K**, Kawamura T, Wakusawa R. Hepatic blood flow and function in elderly patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg* 2000; 90:1198-202.
- 122. Schemmer P**, Barro-Bejarano M, Mehrabi A, et al. Laparoscopic organ retrieval for living donor liver transplantation does not prevent graft injury. *Transplant Proc* 2005; 37:1625-7.
- 123. Schietroma M**, Carlei F, Franchi L, et al. A comparison of serum interleukin-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:1595-9.
- 124. Schmidt E**, Schmidt F.W, Mann M.I. *Lebererkrankungen; Pathophysiologie-Diagnostik-Therapie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart 2000; 8-12.
- 125. Schmidt SC**, Hamann S, Langrehr JM, et al. 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.
- 126. Scholzen T**, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 182: 311-322.
- 127. Schön MR**. Stellenwert laparoskopischer Leberresektionen. *Chirurg* 2010, 81: 516- 525.
- 128. 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.
- 129. Seehofer D**, Carter J, Neumann UP, et al. Synergistic effect of erythropoietin and curcumin on impaired liver regeneration after partial hepatectomy. *Chirurgisches Forum* 2008, Band 37: 187- 189.
- 130. Semm K**. Tissue puncher and loop-ligation:new aids for surgical-therapeutic pelviscopy (laparoscopy) = endoscopic intraluminal surgery. *Endoscopy* 1978; 10:119-124.
- 131. Semm K**. Die endoskopische Appendektomie. *Gynäkologische Praxis*1983; 7: 131-140.
- 132. Suter M**, Martinet O, Spertini F. Reduced acute phase response after laparoscopic total extraperitoneal bilateral hernia repair compared to open repair with the Stoppa procedure. *Surg Endosc* 2002; 16 (8):1214-9.
- 133. Sylla P**, Kirman I, Whelan RL. Immunological advantages of advanced laparoscopy. *Surg Clin North Am* 2005; 85:1-18.
- 134. Tan M**, Xu FF, Peng JS, et al. Changes in the level of serum liver enzymes after laparoscopic surgery. *World J Gastroenterol* 2003; 9:364-7.
- 135. Tate J**, Dawson JW, Chung SC, Lau WY, LI AK. Laparoscopic versus open appendectomy: prospective randomised trial. *Lancet* 1993; 343: 633-637.

- 136. Tate JJT**, Kwok S, Dawson JW, Lau WY, Li AKC. Prospective comparison of laparoscopic and conventional anterior resection. *Br J Surg* 1993; 80: 1396-1398.
- 137. Töns Ch**, Schachtrupp A, Rau M, et al. Abdominelles Kompartmentsyndrom: Vermeidung und Behandlung. *Chirurg* 2000; 71: 918- 26.
- 138. Urbano D**, Rossi M, De Simone P, Berloco P, Alfani D, Cortesini R. Alternative laparoscopic management of perforated peptic ulcers. *Surg Endosc* 1994; 8:1208.
- 139. Vittimberga FJ**, Nolan B, Perugini RA, Spector L, Callery MP. Laparoscopic surgery and Kupffer cell activation. *Surg Endosc* 2000; 14: 1171 -6.
- 140. Wade TP**, Comitalo JB, Andrus CH, Goddwin MN, Kminski DL. Laparoscopic cancer surgery. *Surg Endosc* 1994; 8: 698 -701.
- 141. Wayand W**, Woisetschlager R. Laparoscopic resection of liver metastasis. *Chirurg* 1993; 64(3): 195-197.
- 142. Weber DM**: Laparoscopic surgery: an excellent approach in elderly patients. *Arch Surg* 2003, 138(10):1083-8.
- 143. Wexner SD**, Cohen SM (1995) "Port site metastases after laparoscopic colorectal surgery for cure of malignancy." *Br J Surg* 82: 295-298.
- 144. Wexner SD**, Latulippe JF: Laparoscopic colorectal surgery and cancer. *Swiss Surg* 1997;3(6):266-73.
- 145. Wortel CH**, van Deventer SJ, Aarden LA, et al. Interleukin-6 mediates host defense responses induced by abdominal surgery. *Surgery* 1993; 114(3):564-70.
- 146. Yagmurdur MC**, Basaran O, Ozdemir H, et al. The Impact of Transient Elevation of Intra-Abdominal Pressure on Liver Regeneration in the Rat. *Journal of Investigative Surgery* 2004; 17: 315-322.
- 147. Yilmaz S**, Koken T, Tokyol C, et al. Can preconditioning reduce laparoscopy-induced tissue injury? *Surg Endosc* 2003; 17:819-24.
- 148. Yilmaz S**, Polat C, Kahraman A, et al. 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.
- 149. Zollikofer R**. Zur Laparoskopie. *Schweiz Med Wochenschr* 1924; 54: 264.

## **8. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **9. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Sven-Christian Schmidt für die Überlassung des Dissertationsthemas, der gewährten fachlichen, persönlichen Unterstützung und Betreuung während der letzten Jahre.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Angelika Dürr bedanken für ihre Hilfsbereitschaft und persönliche Unterstützung, insbesondere beim letzten Abschnitt der Vervollständigung.

Weiterhin danke ich dem Team des Labors für experimentelle Chirurgie im Forschungshaus des Virchow-Klinikums mit Herrn Steffen Lippert, Frau Anja Schirmeier, Frau Evelin Hungerbühler sowie Frau Sabine Boas-Knoop und Frau Susanne Wojtke für das Heranführen an experimentelle Methoden und die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Zuletzt möchte ich vor Allem meiner Familie danken, die mich während meines gesamten Werdeganges unterstützt, mir das Studium der Humanmedizin und den Weg zur Promotion erst ermöglicht hat.

## **10. Erklärung**

Ich, Nicole Klage, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Hat das CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum im Rahmen einer Leberresektion im Rattenmodell einen Einfluss auf die Leberregeneration?“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum Unterschrift