

Aus der Klinik für
Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. U.P. Neumann)

Gas- und druckabhängige Auswirkung des Pneumoperitoneums auf die abdominale
Wundheilung am Kleintiermodell

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule
Aachen zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Nicole Zarges, geborene Mirgartz
aus Eschweiler

Berichter: Herr Privatdozent Dr. med. Raphael Rosch
Herr Privatdozent Dr. med. Matthias Knobe

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Geschichte der Laparoskopie.....	1
1.2	Vor- und Nachteile der Laparoskopie	2
1.3	Die physiologische Wundheilung.....	5
1.4	Kollagenmetabolismus.....	9
1.5	Matrixmetalloproteinasen.....	11
1.6	Ziel der Untersuchung	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Versuchstiere und Haltung	14
2.2	Versuchsgruppen	14
2.3	Anästhesie, Operationsvorbereitung und Operation.....	15
2.3.1	Anästhesie	15
2.3.2	Operativer Eingriff.....	16
2.3.3	Finalnarkose und Probenentnahme.....	17
2.4	Mikroskopische Untersuchungen	18
2.4.1	Immunhistologische Färbungen.....	18
2.4.1.1	Vorbereitungen	18
2.4.1.2	Während des Versuches frisch anzufertigende Lösungen	18
2.4.1.3	Durchführungen der immunhistologischen Färbungen.....	19
2.4.2	Auswertung.....	23
2.4.2.1	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Makroskopische Wundheilung.....	27
3.2	Expression von MMP-13	27
3.3	Kollagen I/III Quotient	30
3.4	Makrophagen (CD 68 Färbung)	32
3.5	Granulomformation (HE Färbung)	33

3.6	Zusammenfassung.....	35
4	Diskussion.....	36
4.1	Minimal invasive Chirurgie und Wundheilung: aktueller Kenntnisstand	36
4.1.1	Einfluss des Säure-Basen Haushaltes	36
4.1.2	Einfluss auf die Perfusion	37
4.1.2.1	Einfluss eines erhöhten intraabdominellen Druckes auf die Perfusion	37
4.1.2.2	Einfluss verschiedener Gase auf die Perfusion.....	38
4.1.3	Einfluss auf die Temperatur	39
4.1.4	Einfluss auf den Zellstoffwechsel und das Immunsystem	39
4.2	Diskussion der Methodik	40
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	41
4.3.1	Makroskopische Wundheilung	41
4.3.2	MMP-13.....	41
4.3.3	Kollagen I/III Verhältnis.....	44
4.3.4	Makrophagen (CD 68).....	45
4.3.5	Granulomformation.....	46
4.4	Zusammenfassung.....	47
5	Literaturverzeichnis.....	49
6	Danksagung.....	64
7	Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung	65
8	Eidesstattliche Erklärung gemäß §5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12 der Promotionsordnung	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematischer Aufbau der Haut [verändert nach 8].....	5
Abbildung 2: Frühe Phase der Wundheilung.....	8
Abbildung 3: Spätere Phase der Wundheilung	8
Abbildung 4: Anlage eines Pneumoperitoneums mittels intraperitoneal eingebrachter Venenverweilkanüle als Trokar.....	16
Abbildung 5: Beispiel MMP-13 positive Zellen, Granulomdarstellung, zytoplasmatische Färbung der positiven Zellen, 400fache Vergrößerung.....	23
Abbildung 6: Beispiel CD 68 positive Zellen, Granulomdarstellung, zytoplasmatische Färbung der positiven Zellen, 400fache Vergrößerung.....	24
Abbildung 7: Beispiel Granulomdarstellung in HE Färbung, Pfeile: innerer (Makrophagenwall) und äußerer Granulomanteil (Fibrozytenwall)	24
Abbildung 8: Beispiel Sirius Red 200fache Vergrößerung, Kollagen I rot/orange Fasern, Kollagen III grünliche Fasern	25
Abbildung 9: klinisch reizlos verheilte Laparotomiewunde am 5. postoperativen Tag.	27
Abbildung 10: prozentualer Anteil MMP-13 positiver Zellen in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag.....	28
Abbildung 11: repräsentative perifilamentäre MMP-13 Expression, 5. postoperativer Tag, Kontrollgruppe	29
Abbildung 12: repräsentative perifilamentäre MMP-13 Expression, 5. postoperativer Tag, 3 mmHg CO ₂ -Pneumoperitoneum.....	29
Abbildung 13: repräsentative perifilamentäre MMP-13 Expression, 5. postoperativer Tag, 3 mmHg Helium-Pneumoperitoneum	29
Abbildung 14: Kollagen I/III Quotient in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag	30
Abbildung 15: repräsentatives Beispiel perifilamentärer Kollagen I/III Quotient am 5. postoperativen Tag in der Kontrollgruppe	31
Abbildung 16: repräsentatives Beispiel Kollagen I/III Quotient am 5. postoperativer Tag, 3 mmHg Helium-Pneumoperitoneum.....	31
Abbildung 17: repräsentatives Beispiel Kollagen I/III Quotient am 5. postoperativer Tag, 6 mmHg Helium-Pneumoperitoneum	32
Abbildung 18: prozentualer Anteil CD 68 positiver Zellen in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag.....	33

Abbildung 19: perifilamentärer Granulomdurchmesser, HE Färbung, 5. und 10.

postoperativer Tag34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl von Charakteristika und Lokalisation einiger Kollagentypen [97] 10

Tabelle 2 Auswahl Humane Matrixmetalloproteinasen[59]12

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der Ratten15

Tabelle 4: Anteil MMP-13 positiver Zellen in der Bauchwunde am 5. und 10.

postoperativen Tag in %28

Tabelle 5: Kollagen I/III Quotient in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag

.....31

Tabelle 6: Anteil CD 68 positiver Zellen in der Bauchwunde am 5. und 10.

postoperativen Tag in %33

Tabelle 7: perifilamentärer Granulomdurchmesser, HE Färbung, 5. und 10.

postoperativer Tag in μm 34

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Laparoskopie

Die Laparoskopie hat sich aus endoskopischen Untersuchungen entwickelt. Schon Hippokrates (ca. 460 - 375 v. Chr.) beschrieb ein Spekulum, welches den heutigen Instrumenten sehr ähnlich war [11].

Das Hauptproblem der endoskopischen Untersuchungen war bis Anfang des 19. Jahrhunderts die ungenügende Beleuchtung. Bozzini, der als eigentlicher Erfinder des Endoskops geltende Frankfurter Arzt, führte 1806 zum ersten Mal einen externen Lichtleiter ein [21]. Nach einigen unbefriedigenden Lösungsansätzen konstruierte der Urologe Nitze mit dem Optiker Reinecke und dem Instrumentenbauer Leiter 1879 ein Linsensystem mit hintereinander geschalteten Linsen, bei dem ein größeres Sichtfeld, eine korrekte Umkehr und Vergrößerung des Bildes entstand [112]. Als Pioniere der Laparoskopie gelten Kelling, Chlumsky und Jacobaeus, Ott und Bernheim, die parallel und teilweise unabhängig voneinander Anfang des letzten Jahrhunderts eine Insufflationstechnik entwickelten, die es ermöglichte Laparoskopien am Menschen durchzuführen. 1910 führte Jacobaeus die erste Laparoskopie beim Menschen durch [11, 72, 95].

Für die ersten minimalinvasiven Eingriffe wurde gefilterte Luft benutzt. Aufgrund der geringeren Explosionsgefahr als Sauerstoff und besseren Resorption im Gewebe im Vergleich zu gefilterter Luft führte der Schweizer Richard Zollikofer 1923 Kohlenstoffdioxid als Insufflationsgas ein. Das Risiko einer thermischen Verletzung der inneren Organe konnte mit den von Hirschowitz und Wilbur Peters weiterentwickelten Glasfaserbündeln ausgeschlossen werden. Das sogenannte kalte Licht aus einer externen Lichtquelle konnte so an das Operationsfeld transportiert werden [65]. Durch die Computer Chip Video Kamera, die Mitte der achtziger Jahre von der Firma Cicron entwickelt wurde, hatten mehrere Chirurgen mittels Visualisierung auf einem Monitor gleichzeitig Einblick in das Operationsgebiet [44].

Als Beispiele erster laparoskopischer Operationen sind 1941 eine Tubensterilisation, 1974 eine Salpingotomie, 1975 eine Entfernung eines Myoms, 1982 eine Appendektomie und 1985 eine Cholezystektomie zu nennen [95, 106].

Durch diese Verbesserungen von Operationstechnik und Geräten, und damit einhergehender Steigerung der Sicherheit der Patienten, gewann die laparoskopische Diagnostik und Therapie in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung und erschließt sich weitere Einsatzgebiete [7, 62, 153]. Heutzutage sind die laparoskopischen Techniken für viele Indikationen Routine und zum Teil das Verfahren der ersten Wahl wie beispielsweise bei Cholezystektomien, Kolonresektionen oder der bariatrischen Chirurgie [141].

Obwohl die physiologischen Vorgänge immer besser verstanden und die operativen Techniken zunehmend verbessert werden, stellen Wundheilungsstörungen noch immer eine wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität dar [117]. Angesichts der vielfältigen Ursachen von Wundheilungsstörungen und der nur eingeschränkt möglichen Reduktion patienteneigener Risikofaktoren, gilt es grundsätzlich Operationsverfahren zu verbessern. Hierbei sollten insbesondere die alternativ zur Verfügung stehenden Techniken auch hinsichtlich ihrer Beeinflussung auf die Wundheilung miteinander vergleichend beurteilt werden.

1.2 Vor- und Nachteile der Laparoskopie

Zu den wissenschaftlich belegten Vorteilen der laparoskopischen Operationstechniken im Vergleich zur konventionellen Chirurgie zählen ein geringerer postoperativer Wundschmerz [5, 22, 51, 164, 165], eine Reduktion von Wundkomplikationen, eine Verkürzung der postoperativen Darmatonie mit schnellerem Kostaufbau [22, 50, 92, 103, 147], eine schnellere Mobilisation der Patienten und letztlich eine Verkürzung des stationären Aufenthaltes [27, 49, 51, 96, 114, 133, 157, 164, 165]. Ursächlich für die frühere Mobilisation ist eine Reduktion der postoperativen Schmerzintensität. So zeigte sich beispielsweise für Patienten nach laparoskopischer Appendektomie und Cholezystektomie ein geringerer Analgetikabedarf als nach konventionellen Operationsverfahren [38, 53]. Langfristig konnte eine Reduktion postoperativer Adhäsionen nachgewiesen werden [74, 89, 158]. In Tierversuchen wurde im Vergleich zu offenen Verfahren eine reduzierte immunologische Traumatisierung beobachtet [16, 22, 67, 111, 160]. So zeigte sich auch eine geringere Stressreaktion nach laparoskopischer versus offener Darmresektion [4, 16].

Zu den Nachteilen laparoskopischer Operationsmethoden gehören die zum Teil längeren Operationszeiten, der Verlust des Tastsinns, ein zweidimensionales Bild und die höheren Investitions- und Wartungskosten der eingesetzten Technik [141, 171]. Wobei die längere

Operationsdauer von laparoskopischen Koloneingriffen zumindest in einzelnen Studien nicht mit einer erhöhten Morbidität verbunden war [63, 113]. Die höheren Kosten werden zum Teil kompensiert durch eine geringe Wahrscheinlichkeit an postoperativen Komplikationen und einer kürzeren Aufenthaltsdauer im Krankenhaus [152]. Eine der wichtigsten Kontraindikationen für die Laparoskopie ist eine schwerste, vor allem restriktive, Atemwegserkrankung. Durch die respiratorische Insuffizienz kann eine durch das Pneumoperitoneum entstehende Hyperkapnie auch durch eine Hyperventilation seitens der Anästhesie nicht kompensiert werden. Komplikationen wie Azidose und Herzrhythmusstörungen bis hin zur Herzinsuffizienz sind möglich [66]. Auch ohne eine Atemwegserkrankung können durch die schnelle peritoneale Resorption des Kohlenstoffdioxids bei langen Operationen, hohen intraabdominellen Drücken und lagerungsbedingten Einschränkungen der Beatmung schwerste Hyperkapnien auftreten [58, 154]. Die vorerst lokale Erhöhung der Kohlenstoffdioxidkonzentration zeigt sich später auch systemisch und kann neben einer intraabdominellen auch eine subkutane beziehungsweise systemische Azidose zur Folge haben [12, 60, 90, 109]. Weitere mögliche Auswirkungen sind eine sympathoadrenerge Stimulation durch Vasodilatation der peripheren Gefäße, verminderter Inotropie und erhöhter Vulnerabilität des Herzens. Eine indirekte Stimulation kann zu einer Vasokonstriktion führen [32, 143, 172, 178]. Weitere hämodynamische Auswirkungen einer Erhöhung der endtidalen Kohlenstoffdioxid-konzentration, ohne Anlage eines Pneumoperitoneums, zeigen sich in einer Erhöhung des Herzzeitvolumens und der Gewebeoxygenisierung [2, 3]. Bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma kann eine Vasodilation nach Kohlenstoffdioxid Insufflation eine zusätzliche Hirndruckerhöhung provozieren [19, 79]. Bei einer Untersuchung in Schweinen mit Peritonitis, zeigte sich bei der Verwendung von Kohlenstoffdioxid eine Hyperkapnie, Azidose und systemische Hypertension, allerdings ohne Auswirkung auf die systemische immunologische Funktion [29].

Hinsichtlich der gasbedingten physiologischen Auswirkungen auf kardiopulmonale Funktionen konnten verschiedene klinische und tierexperimentelle Untersuchungen einen Vorteil für Helium als Insufflationsgas zeigen [76, 102, 144]. Auch zeigte sich für Helium im Vergleich zu Kohlenstoffdioxid keine Hyperkapnie, Azidose oder pulmonale Hypertonie [94]. Ein Vergleich des Einflusses von Helium und Kohlenstoffdioxid auf die kardiale Sympathikusaktivität während elektiven laparoskopischen Cholezystektomien zeigte einen Vorteil bei der Verwendung von Helium als Insufflationsgas. Kohlenstoffdioxid spielte bei der Untersuchung eine zentrale Rolle in der Erhöhung der

Sympathikusaktivität des Herzens. Für längere laparoskopische Eingriffe an Hochrisikopatienten wurde deshalb der Einsatz von Helium in Erwägung gezogen [17]. Wegen der geringeren Löslichkeit im Plasma ist jedoch theoretisch die Gefahr der Entstehung von Gasembolien erhöht. Diese oft tödliche Komplikation wurde bisher allerdings nur in tierexperimentellen Untersuchungen, bei denen das Helium direkt intravenös injiziert wurde, beobachtet [125, 130, 174]. Damit sind diese Ergebnisse nur bedingt auf die klinische Situation während einer Laparoskopie übertragbar. Eine tierexperimentelle Untersuchung, bei der an Ratten durch Lipopolysaccharide eine Sepsis hervorgerufen wurde, zeigte hingegen einen protektiven Effekt von Kohlenstoffdioxid im Vergleich zu Helium [61].

Hinsichtlich der Auswirkungen des Pneumoperitoneums mit Kohlenstoffdioxid auf die postoperative Wundheilung sind bislang nur wenige, zum Teil widersprüchliche Studien verfügbar. In einer vergleichenden Untersuchung der Zwerchfellheilung in Schweinen ergab sich hinsichtlich der Reißfestigkeit kein Unterschied zwischen der offenen und der laparoskopischen Operationsmethode mit Kohlenstoffdioxid [107]. In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung in Mäusen zur Auswirkung des Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneums auf die Reißfestigkeit und 5-Hydroxyprolin Konzentration von Hautwunden konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen der Kohlenstoffdioxid-Laparoskopie und Laparotomie beobachtet werden [1]. Ein tierexperimenteller Versuch an Ratten, in dem die Korrelation zwischen dem Berstungsdruck und der Reißfestigkeit von Kolonanastomosen nach Anwendung eines Pneumoperitoneums beziehungsweise einer Laparotomie untersucht wurde zeigte keine signifikanten Unterschiede. Das Pneumoperitoneum in den unterschiedlichen Gruppen wurde mit verschiedenen Druckniveaus unter Anwendung von Helium oder Kohlenstoffdioxid als Insufflationsgas hergestellt [39]. Ebenso zeigten sich beim Vergleich nach laparoskopischer und konventioneller Anlage von Ileum Anastomosen bei Ratten kein Vorteil von Helium gegenüber Kohlenstoffdioxid [128, 129].

Zu den in der Abdominalchirurgie häufigsten extraperitonealen Wundheilungsstörungen zählen Wundinfektionen im Bereich der Laparotomie, eine gestörte Heilung der Bauchwandschichten und langfristig die Ausbildung von Narbenbrüchen. Winslow et al. konnten in einer Untersuchung nach Laparoskopie mit Kohlenstoffdioxid eine höhere Rate an Wundinfektionen (14 % vs. 11 %) und Narbenhernien (24 % vs. 17 %) im Vergleich zur offenen Kolonresektion zeigen [173]. Konträr dazu zeigte sich in anderen klinischen Studien entweder eine gleiche oder sogar geringere Narbenhernieninzidenz

nach laparoskopischen Eingriffen im Vergleich zu Laparotomien [155, 171]. Bei einer retrospektiven Betrachtung von Patienten, die eine große Bauchwandhernie entweder laparoskopisch oder offen operiert bekamen, zeigte sich in der Laparoskopie Gruppe eine geringere Rate von postoperativen Wundkomplikationen. Die Rezidivrate war in beiden Gruppen vergleichbar [46].

Insgesamt sind verschiedene potentielle Einflussfaktoren von Laparoskopie und Pneumoperitoneum auf die Wundheilung beschrieben. Angesichts der zum Teil diskrepanten Ergebnisse in der bislang verfügbaren Literatur bleibt letztlich jedoch nach wie vor unklar, ob ein klinisch relevanter Einfluss von Druck und Gas beim Pneumoperitoneum besteht.

1.3 Die physiologische Wundheilung

Die Haut ist das größte Organ und dient hauptsächlich dem physikalischen, chemischen und immunologischen Schutz, der Wärmeregulation und zur Aufnahme von Sinnesreizen. Sie besteht aus zwei Schichten, der Epidermis (Oberhaut) und der Dermis oder auch dem Corium (Lederhaut). In der Dermis finden sich gut entwickelte elastische und Kollagenfasern (v.a. Typ I Kollagen). Die Blutkapillaren in der Dermis sorgen für die Bereitstellung von Nährstoffen auch für die avaskuläre Epidermis sowie für die Thermoregulation der Haut [8].

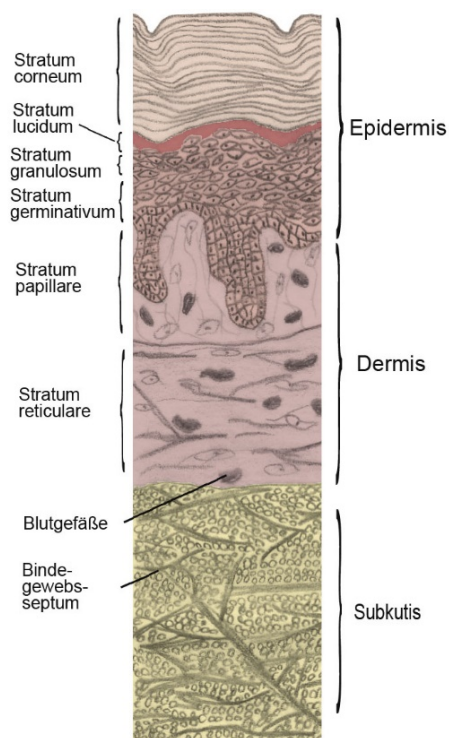


Abbildung 1: schematischer Aufbau der Haut [verändert nach 8]

Bei der Wundheilung wird in einem Umstrukturierungsprozess verletztes Gewebe durch neues ersetzt und dadurch die Gewebeintegrität wiederhergestellt. Die physiologische Wundheilung gliedert sich in drei Phasen, die sich teilweise zeitlich überlappen und somit nicht eindeutig voneinander abzugrenzen sind.

Eingeteilt werden diese drei Phasen in

- Entzündung/ Exsudation,
- Proliferation und
- Modulation.

Zu Beginn der Exsudationsphase stehen die Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskade, sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus den Thrombozyten. Weitere Mediatoren wie Histamin, Serotonin, Leukotriene, Bradykinin und Kallikrein werden zusätzlich als Folge des erniedrigten Sauerstoffangebots sezerniert. Durch die diversen chemotaktischen Faktoren kommt es zu einer akuten, unspezifischen Entzündungsreaktion. Das Zusammenwirken von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche mit verschiedenen Oberflächenproteinen auf den Granulozyten ruft eine Endothelzelladhäsion und ein Auswandern der neutrophilen Granulozyten als erster Zelltyp aus den Gefäßen hervor. Die Migration der Granulozyten in die Wunde wird durch eine erhöhte Kapillarpermeabilität unterstützt. Diese ist Folge einer durch die Entzündungsmediatoren verursachten Vasodilatation mit Strömungsverminderung in den Kapillaren. Die Granulozytenmigration hat nach etwa 48 Stunden ihr Maximum erreicht. Wundmakrophagen, differenziert aus Monozyten, erreichen ihr Maximum zwischen dem dritten und fünften Tag der Wundheilung. Die von den Granulozyten freigesetzten proinflammatorischen Zytokine bilden eine unspezifische Immunabwehr gegen die Bakterien und das Wunddebridement. Hierbei korreliert das Ausmaß der Freisetzung der Zytokine mit dem Ausmaß der ischämischen Nekrose. Der Abbau von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix sowie des Kollagen erfolgt durch chemisch aktive Mediatoren wie Plasmin, Proteasen, freigesetzten lysosomalen Enzymen, aus Fibroblasten stammenden Kollagenasen und unspezifischen Proteasen.

Wundmakrophagen sind neben der Phagozytose vor allem für die Freisetzung von Mediatoren bei der Bildung des Granulationsgewebes bedeutsam und leiten die Proliferationsphase ein. Bestandteile des Granulationsgewebes sind ein loses Netzwerk Extrazellulärmatrix bildender Fibroblasten, Entzündungszellen und Endothelzellen. Kollagen I und III stellen dabei den Hauptteil der extrazellulären Matrix. Die Modulation

der Extrazellulärmatrix wird dann von immigrierten T-Lymphozyten übernommen, deren höchste Konzentration zwischen dem fünften und siebten Tag vorliegt.

Die Fibroblasten werden ebenfalls durch Wachstumsfaktoren und zusätzlich durch Adhäsionsmoleküle und Stickstoffmonoxid zu Chemotaxis, Proliferation und synthetischer Aktivität angeregt. Durch die aus Fibroblasten umgewandelten Myofibroblasten wird die Wundfläche durch Kontraktion verkleinert. Die höchsten Fibroblastenzahlen finden sich um den siebten Tag in der Wunde. Im Verlauf der Wundheilung wird die Produktion der Wachstumsfaktoren von den Entzündungszellen auf die Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten übertragen. Zusätzlich sind die Fibroblasten für die Herstellung von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix verantwortlich. Das Kollagen, welches in die Extrazellulärmatrix ausgeschieden wird, erhält in dieser Phase seine Festigkeit durch kovalente Bindungen von Kollagenfasern mit einem kleinen Durchmesser. Durch lokale Faktoren wie Laktat, welches von Wundmakrophagen und Fibroblasten freigesetzt wird, und lokale Hypoxie getriggert wandern Endothelzellen ein und bilden neue Gefäße. In der proliferativen Phase bestehen komplexe Interaktionen zwischen synthetisierenden und hemmenden Faktoren [137, 169].

Mit der Strukturierung der Extrazellulärmatrix um den siebten Tag beginnt die Modulationsphase. Diese kann bis zu ein Jahr umfassen. In dieser Phase wird das Fibrin durch Kollagen ersetzt. Die Kollagenfasern erhöhen ihren Durchmesser bis zum zweiten postoperativen Monat und damit ihre Festigkeit [36, 37]. Vorherrschend ist hier zunächst das Kollagen III. Im Verlauf dominiert dann immer mehr Kollagen I, welches auch in unverletzter Haut einen Anteil von 90 % hat [137]. Diese Umstrukturierung des Kollagens ist von einem intakten Gleichgewicht von Synthese und Abbau abhängig. Hierbei haben die Matrixmetalloproteasen (MMPs), als Kollagen degradierende Proteasen eine wichtige Rolle. Makrophagen haben als Bestandteil des mononukleären Phagozytensystems eine hohe Bedeutung an der Proteasensekretion. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Makrophagenfunktion die Reißfestigkeit der Hautwunde durch einen gesteigerten Anteil von Hydroxyprolin erhöht [23, 121].

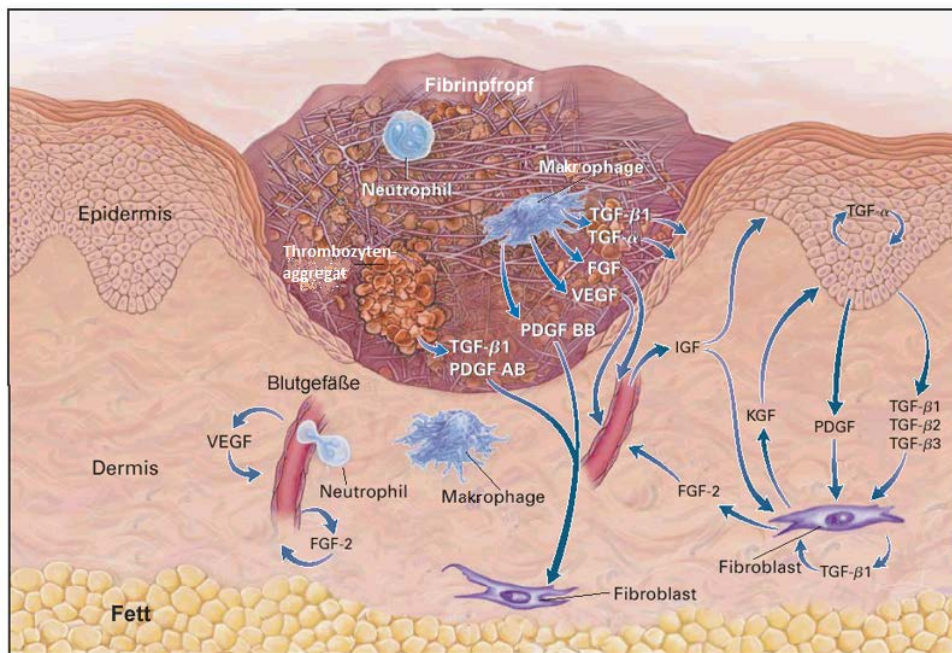


Abbildung 2: Frühe Phase der Wundheilung

Bildung eines Fibrinpfropfes infolge einer Verwundung. Von Thrombozyten produzierte Wachstumsfaktoren und Zytokine locken inflammatorische Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten in die Wunde. Diese wiederum produzieren zusätzliche Wachstumsfaktoren, die für den weiteren Verlauf der Wundheilung essentiell sind. Keratinozyten am Wundrand beginnen ins Wundbett zu migrieren [verändert nach 145].

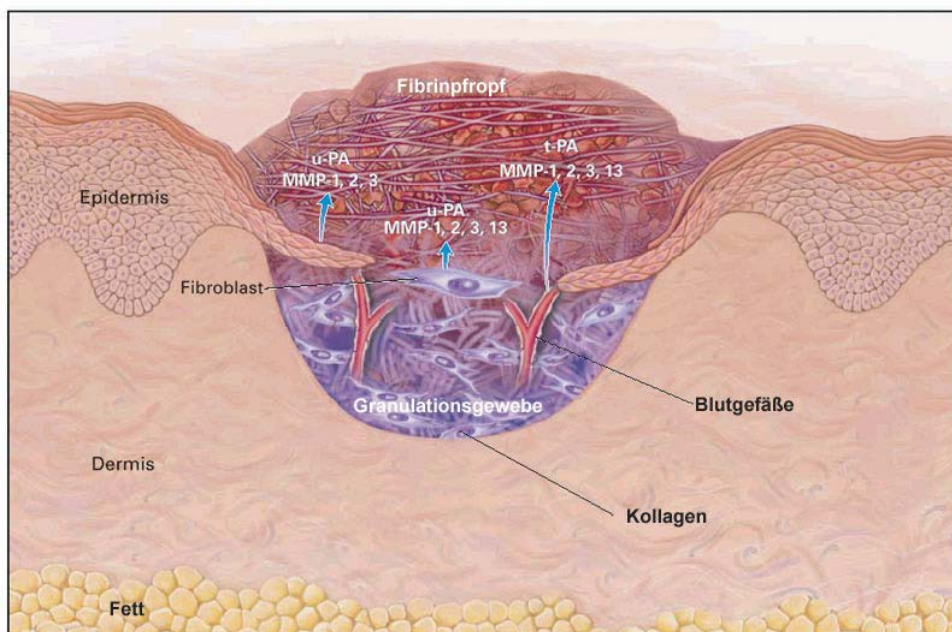


Abbildung 3: Spätere Phase der Wundheilung

Durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, die zu Beginn der Wundheilung vor allem von Makrophagen produziert wurden, sind Fibroblasten und neue Blutgefäße in die Wunde migriert und bilden nun das Granulationsgewebe. Keratinozyten wandern so lange zwischen Fibrinpfropf und Granulationsgewebe ein, bis die offene Wundfläche mit einer Schicht an Keratinozyten bedeckt ist [verändert nach 145].

Verschiedene Faktoren können sich negativ auf die Wundheilung auswirken und diese somit verzögern oder sogar vollständig hemmen. Zu solchen Störfaktoren gehören beispielsweise eine Wundinfektion, ein vermindertes Nährstoffangebot, eine veränderte Blutzusammensetzung oder auch eine insgesamt reduzierte Perfusion des Wundgebietes wie durch Gefäßerkrankungen.

Das Risiko einer Wundinfektion erhöht sich durch hochvirulente Erreger, Nekrosen oder Hohlräume und Fremdmaterial. Ein vermindertes Nährstoffangebot findet sich bei schweren Nebenerkrankungen, konsumierenden Krankheiten oder auch im höheren Alter. Eine durch Erkrankungen wie Leukämie, AIDS, aber auch durch Medikamente hervorgerufene Immunsuppression wirkt sich negativ auf die Wundheilung aus. Die meisten Wundheilungsstörungen entstehen allerdings aufgrund einer insgesamt verminderten Perfusion. Ursache sind Gefäßveränderungen wie sie bei Diabetes mellitus oder Hypertonie auftreten. Auch eine respiratorische Insuffizienz oder Anämie können Ursache eines generalisiert reduzierten Sauerstoffangebots sein und somit Wundheilungsstörungen begünstigen [141].

1.4 Kollagenmetabolismus

Aufgrund der von uns verwendeten Parameter werden im Folgenden der Kollagenmetabolismus und die Matrixmetalloproteinasen in Bezug auf den Wundheilungsverlauf ausführlicher erläutert.

Ab dem siebten Tag der Wundheilung beginnt die Modulationsphase, in der das zuvor gebildete Fibrin durch Kollagen ersetzt wird. Im Bindegewebe ist Kollagen das häufigste Protein und ist für die mechanische Stabilität und Festigkeit verantwortlich [126]. Es existieren unterschiedliche Kollagentypen (siehe Tabelle 1). Die unterschiedlichen Typen bestehen aus homo- oder heterotrimerischen α -Helices. Diese Helices wiederum werden hauptsächlich aus den Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin gebildet [122]. Die Entstehung des Kollagens erfolgt über einen Kollagenvorläufer. Nach Hydroxylierung der Prokollagenketten im endoplasmatischen Retikulum folgt die Verbindung der Kollagenketten mittels Disulfidbrücken und anschließend eine Glykolisierung. Folgend entsteht im Golgi-Apparat durch Verdrehung von je drei Ketten ein Prokollagen in Form einer Tripelhelix. Diese werden in die Extrazellulärmatrix sezerniert und dort vernetzt [126]. Die unterschiedlichen Strukturen der Kollagentypen und deren verschiedene Lokalisationen bewirken die Bindegewebscharakteristika in den entsprechenden

Gewebe [163]. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III zur Beurteilung der Wundheilung herangezogen.

Kollagen I besteht aus quergestreiften Fibrillen. Es findet sich normalerweise in der Haut, Faserknorpel, Faszien und Sehnen. In gesunder Haut hat Kollagen I normalerweise einen Anteil von 90 %. Kollagen III weist ebenfalls quergestreifte Fibrillen auf und ist vor allem in der Haut, frischen Wunden, glatter Muskulatur, Arterien, Leber und Lunge vorherrschend.

Vorerst dominiert in der Wundheilung Kollagen III mit einem Anteil von circa 80 %. Als unreife Form wird es physiologisch vor allem in der frühen Phase der Wundheilung synthetisiert. Im Verlauf ändert sich dies zu Gunsten des Kollagen I, welches eine hohe Zugfestigkeit hat. Kollagen III hat in der Narbe noch einen Anteil von 10-20 % [146, 167]. Ein verminderter Kollagen I/III-Quotient kann mit schweren Wundheilungsstörungen, wie der Entwicklung einer primären oder rezidivierenden Narbenhernie einhergehen [75, 150].

Zusammenfassend gilt der Anteil an Kollagen I im Verhältnis zum Kollagen III als Marker der Kollagenqualität im Rahmen der Wundheilung [48, 81, 151].

Tabelle 1: Auswahl von Charakteristika und Lokalisation einiger Kollagentypen [97]

Kollagen	Ketten	Charakteristika	Lokalisation
I	α 1,2	Quergestreifte Fibrillen	Haut, Knochen, Sehnen
II	α 1	Quergestreifte Fibrillen	Knorpel, Glaskörper
III	α 1	Quergestreifte Fibrillen	Haut, frische Wunden
IV	α 1-6	Netzwerk	Basalmembran
V	α 1-4	Fibrillen (mit Typ 1)	Haut, Kornea
VI	α 1-3	Mikrofibrillen	Ubiquitär
VII	α 1	Verankerungsfibrillen	Dermoepidermale Junktion
VIII	α 1,2	Hexagonales Netzwerk	Gefäßwand
IX	α 1-3	Fibrillen assoziiert	assoziiert mit Kollagen Typ II
X	α 1	Hexagonales Netzwerk	hypertropher Knorpel
XI	α 1-3	Fibrillen mit Typ I	Knorpel
XII	α 1	Fibrillen assoziiert	assoziiert mit Kollagen Typ I
XIII	α 1	Transmembrankollagen	Epidermis und Dermis

Kollagen	Ketten	Charakteristika	Lokalisation
XIV	α 1	Fibrillen assoziiert	assoziiert mit Kollagen Typ I
XV	α 1		Basalmembran
XVI	α 1	Mikrofibrillen	Ubiquitär
XVII	α 1	Transmembrankollagen	Epidermis
XVIII	α 1	Fragment Endostatin	Basalmembran
XIX	α 1		Basalmembran

1.5 Matrixmetalloproteinasen

In der Wundheilung sind die Matrixmetalloproteinasen (siehe Tabelle 2) die wichtigsten Enzyme zum Abbau der Extrazellulärmatrix und für die Migration von Zellen von Bedeutung. Durch eine kontrollierte Fragmentation von Basalmembran und Extrazellulärmatrixkomponenten ist erst eine Migration, der für die Wundheilung nötigen Zellen zur Angiogenese oder Epithelialisierung, in das Wundgebiet möglich [99, 105].

Der Familie der Matrixmetalloproteinasen zugehörig sind Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Membran-Typ-Matrixmetalloproteinasen [40, 148]. Nach Bildung als inaktives Zymogen und proteolytischer Spaltung des Propeptids werden die Matrixmetalloproteinasen in der Extrazellulärmatrix aktiviert [54, 108]. Moduliert wird die Synthese und Freisetzung einzelner oder mehrerer Proteinasen durch Wachstumsfaktoren, Keratinozyten, Zytokinen und gelegentlich auch von einzelnen Zellen des Granulationsgewebes [99]. Die Hemmung der Matrixmetalloproteinasen erfolgt durch spezielle Gewebsinhibitoren, die Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) [93].

MMP-13 (Kollagenase-3) degradiert vor allem fibrilläres Kollagen Typ I, II und III [137]. Es konnte gezeigt werden, dass MMP-13 physiologisch im Rahmen der Fetalentwicklung, beim postnatalen Knochenremodeling und der gingivalen Wundheilung exprimiert wird [73]. Allerdings ist es ebenfalls assoziiert mit der chronischen Parodontitis, abdominellen Aortenaneurysmen und chronischen Wundheilungsstörungen [101, 161].

In verschiedenen Phasen der Wundheilung werden, provoziert durch unterschiedliche Kollagengehalte, verschiedene Konzentrationen der Matrixmetalloproteinasen gefunden.

Durch die veränderten Zell-Matrix-Interaktionen werden eine erhöhte Aktivität und Expression gefördert [78]. Es wird vermutet, dass MMP-13 aufgrund ihres Expressionsmusters und ihrer Fähigkeit fibrilläres Kollagen zu spalten, vor allem extrazelluläre Matrix abbaut, um Zellen wie Keratinozyten, Fibroblasten und inflammatorischen Zellen die Migration während der Wundheilung zu ermöglichen [47, 84, 104]. Dabei wird die Matrixmetalloproteinase zu Beginn der Wundheilung von Keratinozyten und im Verlauf von Fibroblasten des Granulationsgewebes exprimiert.

Erhöhte, prolongierte Expression, wie durch Ischämien [135] oder auch verminderte Hemmung der Matrixmetalloproteinasen können zu einer verzögerten Wundheilung führen. Klinisch und experimentell scheinen vor allem eine erhöhte Anzahl und die verlängerte Anwesenheit von MMP-positiven Zellen die Wundheilung negativ zu beeinflussen [135, 161, 176].

Tabelle 2 Auswahl Humane Matrixmetalloproteinasen[59]

MMP	Name	Substrate
MMP-1	intersteritielle Kollagenase	Kollagen Typ I, II, III, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, pro TNF, MMP-1/9
MMP-2	Gelatinase A	Kollagen Typ I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Elastin, Aggrecan, TNF, MMP-2/9
MMP-3	Stromelysin	Kollagen Typ I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, TNF, MMP-1/7/8/9/13
MMP-7	Matrilysin	Kollagen Typ IV, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Elastin, pro TNF, MMP-1/2/9
MMP-8	Neutrophile Kollagenase	Kollagen Typ I, II, III, V, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin
MMP-9	Gelatinase B	Kollagen Typ IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Fibronectin, α 1-Protease-Inhibitor
MMP-10	Stromelysin 2	Kollagen Typ III, IV, V, Gelatine, Aggrecan, Elastin, Fibronectin, MMP-1/8
MMP-11	Stromelysin 3	α 1-Protease-Inhibitor
MMP-12	Metalloelastase	Kollagen Typ IV, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Laminin, pro TNF
MMP-13	Kollagenase 3	Kollagen Typ I, II, III, IV, Gelatine, Agrecan
MMP-14	MT1-MMP (membrane type)	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Elastin, Fibronectin, Aggrecan, MMP-2/13, pro TNF
MMP-15	MT2-MMP (membrane type)	MMP-2, Gelatine, Fibronectin, Laminin

MMP	Name	Substrate
MMP-16	MT3-MMP (membrane type)	MMP-2
MMP-17	MT4-MMP (membrane type)	Fibrinogen, Fibrin, pro TNF

1.6 Ziel der Untersuchung

In Anbetracht der immer noch widersprüchlichen Ergebnisse zur Auswirkung des Kohlenstoffdioxids auf die Wundheilung war es Ziel dieser vergleichenden Untersuchung mögliche gas- und druckabhängige Beeinflussungen der Bauchwandwundheilung prospektiv randomisiert im Kleintiermodell zu untersuchen. Verglichen wurde die konventionelle Chirurgie mit der laparoskopischen Technik mit Kohlenstoffdioxid und Helium unter Verwendung zweier Druckniveaus. Hierbei wurde Helium als inertes Gas wegen seines geringeren Einfluss auf den Säure-Basen-Haushalt als Alternativgas gewählt [32, 60, 90, 94, 109, 144, 170].

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltung

Die Studiengruppe bestand aus 78 männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Durchschnittskörpergewicht von 300 ± 11 Gramm.

Um systematische Störungen wie zum Beispiel durch Stressreaktionen der Tiere möglichst gering zu halten, wurden die Tiere nach ihrer Ankunft vor Versuchsbeginn eine Woche lang an die neue Umgebung und die Personen, die in der Studie mit ihnen arbeiten sollten, gewöhnt.

Die Bedingungen zur Haltung entsprachen den Vorgaben des Leitfadens für Pflege und Gebrauch von Labortieren vom nationalen Gesundheitsinstitut. Zu den standardisierten Laborbedingungen gehörten eine Temperatur zwischen 22-24°Celsius, eine Luftfeuchtigkeit von 50-60% und ein zirkadianer Tag/Nacht Rhythmus mit je zwölf Stunden Licht und zwölf Stunden Dunkelheit.

Die Ratten hatten freien Zugang zu Trockenfutter (Altromin, Standardlabordiät für Ratten und Mäuse) und Trinkflaschen mit Wasser, wobei das Futter je zwölf Stunden vor und nach dem Eingriff entfernt wurde.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Polykarbonatkäfigen (Makrolon III) mit Weichholzgranulat zu je zwei Ratten.

2.2 Versuchsgruppen

Zur Untersuchung des gas- und druckabhängigen Einflusses des Pneumoperitoneums wurden die Tiere mittels Losverfahren in folgende Gruppen prospektiv randomisiert (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der Ratten

Gruppe	Druck	Anzahl Ratten 5 Tage postoperativ	Anzahl Ratten 10 Tage postoperativ
Kontrollgruppe Laparotomie		9	9
CO₂- Pneumoperitoneum	3 mmHg	9	9
	6 mmHg	6	6
Helium- Pneumoperitoneum	3 mmHg	9	9
	6 mmHg	6	6

2.3 Anästhesie, Operationsvorbereitung und Operation

2.3.1 Anästhesie

Zur Vorbereitung auf die Anästhesie wurde das Futter zwölf Stunden vor dem geplanten Eingriff entfernt, der freie Zugriff auf Wasser war weiterhin möglich. Durch die Nüchternheit sollte das durch das Pneumoperitoneum erhöhte Risiko einer Aspiration minimiert werden.

Die inhalative Einleitung der Anästhesie erfolgte mit Isofluran in einem Exsikkator mit Doppelboden. Die spontane Atmung der Tiere blieb bestehen. Aufrechterhalten wurde die Narkose durch die intramuskuläre Verabreichung einer Mischung aus Medetomidin 0,3 mg/kg Körpergewicht (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht (Ketanest® 10 %, Sanofi-Ceva GmbH, Düsseldorf, Deutschland) in den Hinterlauf.

Die Narkosetiefe wurde anhand des Reflexstatus bestimmt.

Nach erfolgter Operation wurde durch Atipamezolhydrochlorid (Antisedan, Pfizer) die Wirkung des Medetomidin antagonisiert, um die Anästhesie zu beenden.

Eine Schmerztherapie erfolgte nach Beendigung der Narkose mit 0,05-0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) subcutan. Die Injektion wurde nach zwölf Stunden wiederholt.

2.3.2 Operativer Eingriff

Als Operationsvorbereitung wurden die Ratten zur Bestimmung des Ausgangsgewichtes gewogen und das Abdomen im Bereich des Operationsgebietes (5 cm x 5 cm) rasiert. Es folgte eine Fixierung in Rückenlage auf dem Operationstisch. Zur Desinfektion wurde Polyvidon-Jod Lösung (Betaisodona®, Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) verwendet. Anschließend erfolgte eine Abdeckung mit einer sterilen Folie.

Die Augen wurden mit Dexpanthenol (Bepanthen Roche Augen und Nasensalbe®, Hoffman-LaRoche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt und die Lider verschlossen.

In den Tieren der laparoskopischen Gruppen erfolgte über eine 1 cm lange Medianlaparotomie die Anlage des Pneumoperitoneums mit 3 mmHg oder 6 mmHg. Ein venöser Katheter 15 G (Vygon, Ecoen, Frankreich) diente als Trokar und wurde durch eine Tabaksbeutelnaht fixiert. Darüber konnte nun ein Pneumoperitoneum je nach Gruppe mit Kohlenstoffdioxid oder Helium mit je 3 mmHg oder 6 mmHg hergestellt werden (Kohlenstoffdioxid-Insufflator: Richard Wolf, Knittlingen, Deutschland; Helium-Insufflator: Storz, Tuttlingen, Deutschland, Prototyp).



Abbildung 4: Anlage eines Pneumoperitoneums mittels intraperitoneal eingebrachter Venenverweilkanüle als Trokar

Nach 15 Minuten wurde der Trokar entfernt. Die Bauchdecke wurde mittels einer 3 cm langen Mittellinieninzision schichtweise eröffnet und das Ileum mobilisiert. Anschließend erfolgte eine Durchtrennung des Darmes erst 6 cm, dann 12 cm proximal des Zökums und anschließend jeweils eine Reanastomisierung der beiden Darmabschnitte durch einen allschichtigen einreihigen End zu End Verschluss mit sechs atraumatischen Einzelknopfnähten aus resorbierbarem Material (Maxon™ 6/0, Braun-Dexon GmbH, Melsungen, Deutschland). Abschließend wurde die Durchgängigkeit der Anastomose und die Perfusion überprüft.

Die Bauchwand wurde mit einer fortlaufenden Naht Stoß auf Stoß, zweischichtig mit resorbierbaren Polyglactin Faden (Vicryl® 3/0, Ethicon, Hamburg, Deutschland) verschlossen. Das Peritoneum wurde gemeinsam mit der Bauchmuskulatur gefasst anschließend die Haut verschlossen (Dexon® 3/0, Braun-Dexon, Spangenberg, Deutschland). Ein Trokar wurde mit eingenäht und mittels Tabaksbeutelnaht fixiert, um abschließend nochmals ein Pneumoperitoneum mit Kohlenstoffdioxid oder Helium mit jeweils 3 mmHg oder 6 mmHg für 15 Minuten anzulegen. Nach Desufflation wurde der Trokar entfernt.

Bei der Kontrollgruppe fand präoperativ und postoperativ keine intraabdominelle Druckerhöhung statt. Nach dem 3 cm langen Medianschnitt entlang der Linea alba wurde die Bauchhöhle vor und nach der intestinalen Anastomose jeweils für 15 Minuten der Luft im OP-Saal ausgesetzt. Die restliche Vorgehensweise war identisch. Auf die Wunde wurde zum Schutz aluminiumhaltiges Sprühpflaster aufgetragen. Den Gruppen wurde kein Antibiotikum verabreicht.

Ein Team bestehend aus zwei Ärzten und einer Doktorandin führten alle Operationen zu gleichen Zeiten und Bedingungen mit sterilisierten Instrumenten durch. Perioperative Besonderheiten wie notwendige Nachinjektionen von Narkotika, größere Blutverluste oder Veränderungen der Kreislaufparameter wurden in einem Operationsprotokoll festgehalten. Postoperativ erfolgte täglich eine klinische Kontrolle mit Dokumentation der makroskopisch sichtbaren Wundheilung, um frühzeitig Anzeichen einer Nahtinsuffizienz, Peritonitis oder Verschlechterung des Allgemeinzustandes festzustellen. Tiere, die Auffälligkeiten aufwiesen wurden nach Rücksprache mit dem verantwortlichen Tierarzt des Instituts für Versuchstierkunde aus dem Versuch genommen.

2.3.3 Finalnarkose und Probenentnahme

Am fünften oder zehnten postoperativen Tag wurden die Tiere gemäß Randomisierung getötet. Zur Euthanasie wurde den Tieren eine Überdosis des Inhalationsnarkotikums Isofluran verabreicht. Die Bauchdecke wurde mit einem Abstand von 1 cm zur Narbe komplett entnommen. Die Gewebestücke wurden zwischen zwei Blätter Zellstoff eingebettet, und in mit gepufferten 10 %igen Formalin gefüllte Behälter gegeben. Nach ein- bis zweitägiger Fixierung erfolgte die Einbettung der Explantate in Paraffin.

2.4 Mikroskopische Untersuchungen

2.4.1 Immunhistologische Färbungen

2.4.1.1 Vorbereitungen

Herstellung von Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS-Lösung):

Hinzufügen von 9,55 g PBS zu einem Liter aqua dest. Vermischen mit einem Magnet-rührer.

Herstellung von 2 % Milchpulver:

Vermischen von 50 ml PBS-Lösung und 1 g Milchpulver unter Rühren mit dem Magnet-rührer.

Herstellung von Citratpuffer:

Hinzufügen von 2 g Zitronensäure wurden zu einem Liter aqua dest. Vermischen mit Magnetrührer. Ziel pH-Wert: 6.

Verwenden des Vectastain ABC-Kit (Vector, Burlingame, CA, USA) mit fertigen Lösungen A und B.

Verwenden der Hämalaun-Färbelösung (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland). Fertige Färbelösung abgefüllt in einer Flasche.

2.4.1.2 Während des Versuches frisch anzufertigende Lösungen

Herstellung des Primärantikörpers:

Vorlegen von 1000 µl 2 % Milchpulver für MMP-13 pro Schnittpräparat in ein Gefäß. Pipettieren von 1 µl polyklonaler Kaninchen Anti-MMP-13 (1:1000, Biomol, Hamburg, Deutschland) pro 10 Schnittpräparate.

Hinzufügen von 1 µl monoklonalem Maus Anti-Ratte CD 68 Antikörper (1:250, DPC Acris, Bad Nauheim, Deutschland) zu 250 µl 2 % Milchpulver.

Herstellung des Sekundärantikörpers:

Pipettieren von 500 µl 2 % Milchpulver und 1 µl Ziege Anti-Kaninchen Antikörper (Dako, Hamburg, Deutschland) pro fünf Schnittpräparate.

Herstellung des ABC-Komplexes:

Hinzufügen von 100 µl 2 % Milchpulver zu je 2 µl Lösung A und B des Vectastain ABC-Kits in einem Reagenzglas.

Herstellung des DAB-Substrates:

Vermischen von 50 ml aqua dest mit 0,3 g Tris mit dem Magnetrührer. Ziel pH: 7,6. Zugabe von 3 DAB Tabletten (Diaminobenzidin, Sigma, Steinheim, Deutschland) und 30 Minuten im lichtgeschützten Gefäß mit dem Magnetrührer mischen.

Herstellung von aktivierter DAB-Lösung:

Zugabe von 30 µl 30 %iges H₂O₂ zum hergestellten DAB-Substrat. Diese Lösung war für 10 Minuten aktiv.

2.4.1.3 Durchführungen der immunhistologischen Färbungen

2.4.1.3.1 Matrix-Metalloproteinasen

Einstellen der Schnitte für 20 Minuten in Xylol. Folgend ziehen durch eine absteigende Alkoholreihe. Anschließend Wässerung in einer Küvette unter fließendem Wasser.

1. Einstellen der Küvette in 250 ml aqua dest und 8 ml H₂O₂ für 30 Minuten.
2. Wässerung der Schnitte unter fließendem Wasser.
3. Füllen der Küvette mit PBS-Lösung.
4. Einstellen der Schnitte in mit Citratpuffer (pH 6) gefüllte Küvetten.
5. Küvette mit MMP-13 Schnitten: Mikrowelle 600 Watt 8 Minuten.
6. Abkühlen der Küvette 20 Minuten bei Raumtemperatur. Gegebenenfalls Auffüllen mit PBS-Lösung. Nach den 20 Minuten vollständiger Ersatz des Citratpuffers durch PBS-Lösung.
7. Aufziehen der Schnitte mit der Schnittfläche zum cover plate, luftblasenfrei auf den in der vorgesehenen Halterung liegenden Objektträger.
8. Einsetzen der Objektträger in die Schiene der Immunhistokammer.
9. Überprüfung des Abstandes cover plate und Schnitt mittels Flussgeschwindigkeit der PBS-Lösung. Eventuell Neuplatzierung des Schnittes auf die cover plate.
10. Pipettieren von 100 µl 1:20 verdünntem goat Serum in die Lücke. (Verdünnung: 100 µl 2 % Milchpulver; 5 µl goat Serums) Verschluss der Kammer und Inkubation für 60 Minuten. Hinzufügen von 100 µl Primärantikörper. Verschluss der Kammer. Aufbewahrung über Nacht bei 4 ° Celsius.

11. Angleichen an Raumtemperatur. Anschließend Spülung der Lücke mit PBS-Lösung.
12. Gabe von 100 µl Sekundärantikörpers (nach Ansetzen) in die Lücke. Verschluss der Kammer und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Parallel Ansetzen von ABC-Komplex. Ebenfalls 30 Minuten Inkubation.
13. Spülung mit PBS-Lösung.
14. Füllen der Lücke mit 100 µl ABC-Komplex. Verschluss der Kammer und 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Ansetzen des DAB-Substrates. Inkubation 30 Minuten bei Raumtemperatur.
15. Spülen der Lücke mit PBS-Lösung. Anschließend Entnahme der Schnitte aus der Immunhistokammer. Einsatz in eine Küvette mit PBS-Lösung.
16. Ansetzen der aktivierten DAB-Lösung. Zugabe über 5 Minuten zu den Schnitten nach Abgießen der PBS-Lösung.
17. Dreimalige Wässerung der Schnitte.
18. Auffüllen der Küvette mit Hämalaulösung für 15 Sekunden.
19. Dreimalige Wässerung der Schnitte. Bläuen über 5 Minuten in Wasser.
20. Abschließend Eindecken der Schnitte nach Durchlaufen der folgend beschriebenen aufsteigenden Alkoholreihe mit Kunstharz (Eukitt®).

1. 70 % Ethanol

2. 96 % Ethanol

3. 100 % Ethanol

4. 100 % Ethanol

5. Xylol

6. Xylol

2.4.1.3.2 Sirius Red

Die Sirius Red Färbung (Sirius Red; Polysciences, Warrington, PA) wurde zur Beurteilung des Gesamtkollagenanteils und des Verhältnisses von Kollagen I zu Kollagen III verwendet. Dazu wurden die gefärbten Schnitte unter einem Polarisationsmikroskop ausgewertet. Kollagen I fluoresziert orange bis rot und Kollagen III grün.

Herstellung von Sirius Red:

Lösen von 0,1 g Sirius Red (Polysciences Inc. Cat. Nr. 09400) in 100 ml wässriger,

gesättigter, kalter Pikrinsäurelösung aus der Apotheke. Zusetzen einer 2 N Natronlauge (Merck Cat. Nr. 1.09136). Ziel pH-Wert: 2

Herstellung von 0,01 N Salzsäurelösung:

Vermischen von 1 ml 1 N Salzsäurelösung (Merck Cat. Nr. 1.09057) mit 99 ml aqua dest.

Durchführung der Färbung:

1. Herstellung von 5 µm dicke Schnitte mit einem Schlittenmikrotom.
2. Vermeidung von störenden Artefakten unter dem polarisierenden Licht durch Befreiung der Schnitte vom Paraffin bei 60 °Celsius für 40 Minuten im Brutschrank.
3. Einstellen der Schnitte für 10 Minuten in ein Xylolbad und anschließend Durchführung einer absteigenden Alkoholreihe. Kurze fließende Wässerung in einer Küvette.
4. Einstellen der Schnitte für 60 Minuten in die Sirius Red Färbelösung.
5. Schnitte für 2 Minuten in 0,01 N Salzsäurelösung differenzieren.
6. Kurze Spülung der Schnitte in einer Küvette mit Wasser.
7. Abschließend Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe oben), Einstellen in Xylol und eindeckeln.

2.4.1.3.3 CD 68

Färbung:

Herstellung von 3 µm dicke Schnitten mit dem Schlittenmikrotom Entfernung des Paraffins über Nacht im Brutschrank bei 37 °Celsius.

Anwendung der Avidin Biotin Komplex Methode. Verwendung eines Primärantikörper, der im vorliegenden Fall gegen das CD68 Antigen gerichtet ist. Folgend Markierung des gebundenen Primärantikörpers mit einem biotinylierter Sekundärantikörper.

1. 60 Minuten Inkubation der Schnitte in mit 2%igem Milchpulver verdünntem Normalserum.
2. Pipettieren von monoklonalem mouse-anti-rat ED1 (DPC, Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) (Primärantikörper) in einer Verdünnung von 1:250.
3. Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 4 °Celsius.
4. Nach Erreichen der Raumtemperatur Spülung mit PBS und anschließend hinzufügen des rabbit-anti-mouse (Dako, Glostrup, Denmark) (Sekundärantikörper) in einer Verdünnung von 1:300.

5. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur weitere Spülung mit PBS.
6. 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mit ABC-Komplex.
7. Spülung mit PBS und anschließende Zugabe von aktivierten DAB (3,3 Diamienzidine tablets, Firma Sigma, Steinheim, Deutschland)
8. Mehrfache Waschung mit Wasser zum Entfernen der Reste der Lösung.
9. Gegenfärbung der Schnitte für 18 Sekunden in einer Häkalaunlösung (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)
10. Erneute Spülung mit Wasser und folgend Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe oben)

2.4.1.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)

Die HE-Färbung ist eine Standardmethode in der Histologie. Hierbei werden basophile Zellkerne mit Hämatoxylinblau und eosinophile Zellstrukturen wie das Zytoplasma, Kollagen und Muskel durch das Eosin rosa bis rot angefärbt. Die Methode fand Anwendung zur Darstellung der Granulome im Bereich der Hautnähte.

Ansetzen der 1 %igen Eosin Lösung:

Auflösen von 5 g Eosin G (gelblich), (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 500 ml aqua dest. Zugabe von 100 % Essigsäure, bis die Lösung eine hellrote Farbe hatte.

Durchführung der HE Färbung:

1. Entparaffinisierung der Schnitte bei 60 ° Celsius im Brutschrank für 40 Minuten.
2. Einstellen für 10 Minuten in Xylol und folgend Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe:
 1. 100 % Ethanol
 2. 100 % Ethanol
 3. 96 % Ethanol
 4. 70 % Ethanol
 5. kurz mit destilliertem Wasser abspülen
3. Einstellen der Schnitte in Kernfärbung Mayers-Häkalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 2 Minuten. Folgend unter fließendem Wasser ca. 5 Minuten bläuen.
4. Abspülen mit destilliertem Wasser und für circa 18 Sekunden Durchführung einer Gewebefärbung mit 1 % Eosin Lösung.

5. Abspülen mit destilliertem Wasser und nach der oben genannten aufsteigenden Alkoholreihe Eindecken der Schnitte in Kunstharz (Vitroclud, Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland).

2.4.2 Auswertung

Zur immunhistochemischen Auswertung wurden drei Areale des Schnittpräparates mittels einer auf dem Lichtmikroskop Olympus BX51 angebrachten Digitalkamera (Olympus C-3030, Hamburg, Deutschland) erfasst. Die Auswertung erfolgte bei 400facher Vergrößerung mit Olympus DP Soft 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) bei der Bestimmung der Granulomformation und mit Image Pro Plus Version 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) zur Analyse der immunhistochemisch aufgearbeiteten Proben (MMP-13, CD 68 und Sirius Red). Um eine möglichst repräsentative Auswertung zu erhalten wurde eine Ecke des Quadrates immer an einen Faden angelegt. Dadurch wurde sichergestellt, dass sich die Zellen im Bereich der Wundheilung befinden. Um eine vergleichbare Farbintensität zu erhalten wurden die Präparate pro Parameter immer zeitgleich gefärbt.

Zur Beurteilung der Aktivität der Kollagenasen, der Makrophagenaktivität und dem Fortschreiten der Wundheilung wurden in den Färbungen MMP-13 und CD 68 die durch die Färbung markierten Zellen in einem definierten Quadrat von 100 µm x 100 µm einzeln gezählt. Diese wurden dann ins Verhältnis mit der Gesamtzellzahl in diesem Quadrat gesetzt.

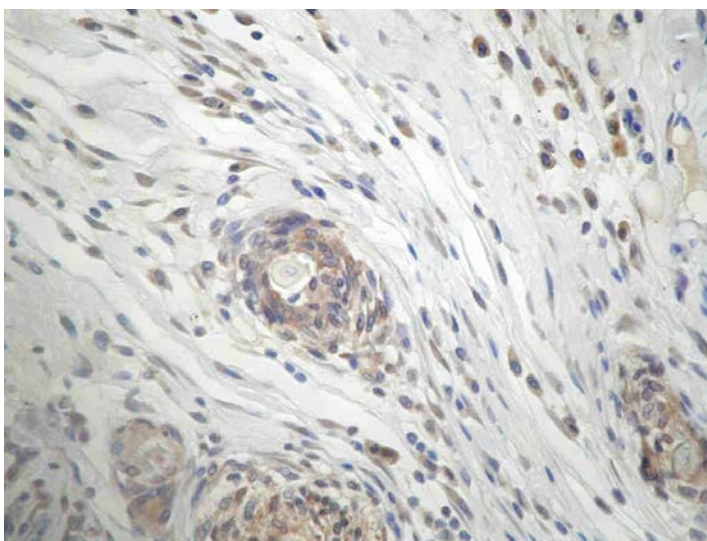


Abbildung 5: Beispiel MMP-13 positive Zellen, Granulomdarstellung, zytoplasmatische Färbung der positiven Zellen, 400fache Vergrößerung

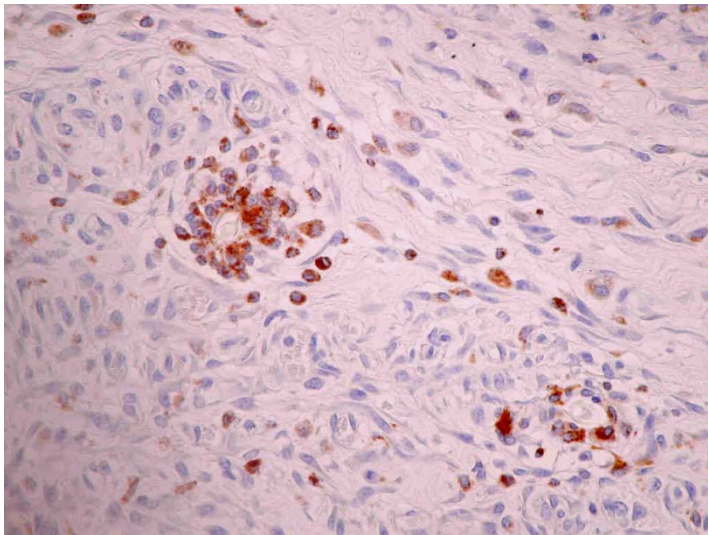


Abbildung 6: Beispiel CD 68 positive Zellen, Granulomdarstellung, zytoplasmatische Färbung der positiven Zellen, 400fache Vergrößerung

Die Bestimmung der Granulomdicke erfolgte nach HE-Färbung an 15 repräsentativen Stellen von Granulomen in Fadennähe. Hierbei wurde zum einen das Entzündungsinfiltrat, zum anderen die Bindegewebskapsel als Strecke in μm ausgemessen. Bei dem Entzündungsinfiltrat handelt es sich um die Breite des inneren Granulomanteils (Makrophagenwall), bei der Bindegewebskapsel um die Breite des äußeren Granulomanteils (Fibrocytenwall).

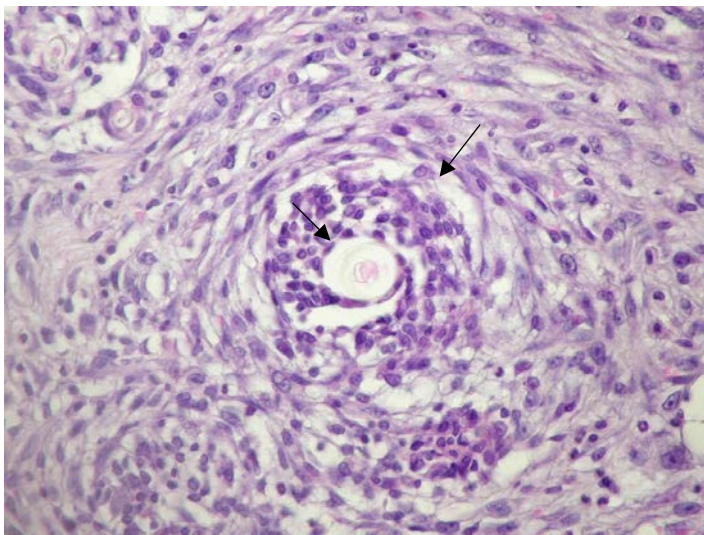


Abbildung 7: Beispiel Granulomdarstellung in HE Färbung, Pfeile: innerer (Makrophagenwall) und äußerer Granulomanteil (Fibrozytenwall)

Bei der Sirius Red Färbung erfolgte die Analyse der Farbzusammenstellung nach Verwendung eines Kreuzpolarisators mittels der Bildanalysesoftware Image Pro Plus in 200facher Vergrößerung. Dadurch ist es möglich Kollagen selektiv darzustellen und das

Kollagen I/III Verhältnis nach einer modifizierten Methode nach Junqueira [77] zu bestimmen.

Die Berechnung des Verhältnisses zwischen Kollagen I (rot/orange Fasern) und Kollagen III (grüne Fasern) erfolgte mit Image Pro Plus (Media Cybernatics, Silver Spring, MD, USA) und mit Hilfe eines eigens entworfenen Makros für Exel 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Durch Drehung der Ebene im polarisierten Licht ändert sich der Aspekt der Fasern, somit wird versucht den bestmöglichen Kontrast zwischen den Kollagen Fasern und dem restlichen Gewebe (schwarz) darzustellen.

Zur Darstellung eines möglichst guten Querschnitts aus dem Präparat wurden je drei in ihrer Größe definierte Areale ($100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$) pro Bild zur Quantifizierung herangezogen.



Abbildung 8: Beispiel Sirius Red 200fache Vergrößerung, Kollagen I rot/orange Fasern, Kollagen III grünliche Fasern

2.4.2.1 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte mittels Microsoft Excel.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels dem Programm Statistical Package for Social Sciences Version 12,0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Die Prüfung auf Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Für normalverteilte Daten wurde Gruppenunterschiede mittels ANOVA und folgend einem parametrischen Bonferroni Test dargestellt. Gruppenunterschiede wurden bei nicht Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Falls sich hier

statistisch relevante Unterschiede zeigten, erfolgte ein weiterer Gruppenvergleich mit Hilfe des Mann-Whithney-U Test.

Unterschiede zwischen den Zeitpunkten fünfter postoperativer Tag und zehnter postoperativer Tag innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des Wilcoxon Test untersucht.

Als signifikant galten Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Bei nicht parametrischen Tests erfolgte bei multiplen Vergleichen eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni.

Die Erstellung der Graphen erfolgte mit dem Programm Excel 2002 von Microsoft (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Damit die Ergebnisse übersichtlich miteinander verglichen werden können, wurden sie in Form von Säulendiagrammen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, dabei wurden statistisch relevante Unterschiede mit einem Stern markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Makroskopische Wundheilung

Makroskopisch zeigten sich in der Wundheilung bei keinem Tier Auffälligkeiten. Weder am fünften noch am zehnten postoperativen Tag konnten Wundinfektionen oder Nahtdehiszenzen festgestellt werden. Die Narben waren sowohl in den Pneumoperitoneum Gruppen als auch in den Kontrollgruppen stabil und reizlos.



Abbildung 9: klinisch reizlos verheilte Laparotomiewunde am 5. postoperativen Tag

3.2 Expression von MMP-13

Die erhobenen Daten der perifilamentären MMP-13 Expression sind in der Abbildung 10 und der Tabelle 4 zusammengefasst. Der niedrigste Anteil an MMP-13 positiven Zellen fand sich am fünften und zehnten postoperativen Tag mit $10 \pm 4\%$ und $14 \pm 2\%$ in der Kontrollgruppe. Der höchste Anteil an MMP-13 positiven Zellen fand sich am fünften und zehnten postoperativen Tag mit $41 \pm 7\%$ und $35 \pm 4\%$ in der 6mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe. Zu beiden Zeitpunkten zeigten sich bedeutsame Gruppenunterschiede. Am fünften postoperativen Tag ergab sich in allen Pneumoperitoneum Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der MMP-13 positiven Zellen ($p < 0,001$, Abbildungen 11, 12, 13). Diese vermehrte Expression persistierte und war am zehnten postoperativen Tag noch in der 6mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe und der 3mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppe signifikant ($p < 0,001$).

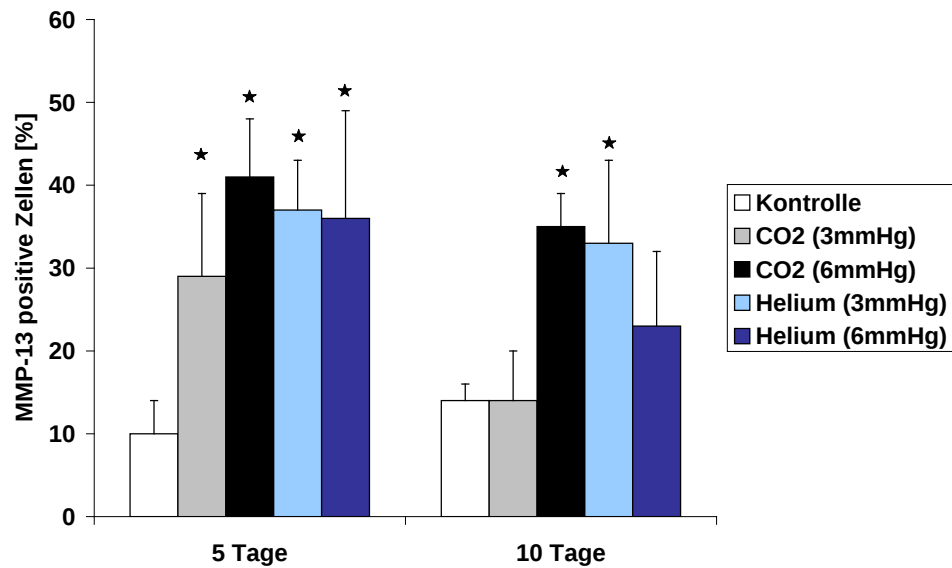


Abbildung 10: prozentualer Anteil MMP-13 positiver Zellen in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag

Tabelle 4: Anteil MMP-13 positiver Zellen in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag in %

Gruppe	IAD	5 Tage	10 Tage
Kontrolle		10 ± 4	14 ± 2
CO ₂	3 mmHg	29 ± 10	14 ± 6
	6 mmHg	41 ± 7	35 ± 4
Helium	3 mmHg	37 ± 6	33 ± 10
	6 mmHg	36 ± 13	23 ± 9

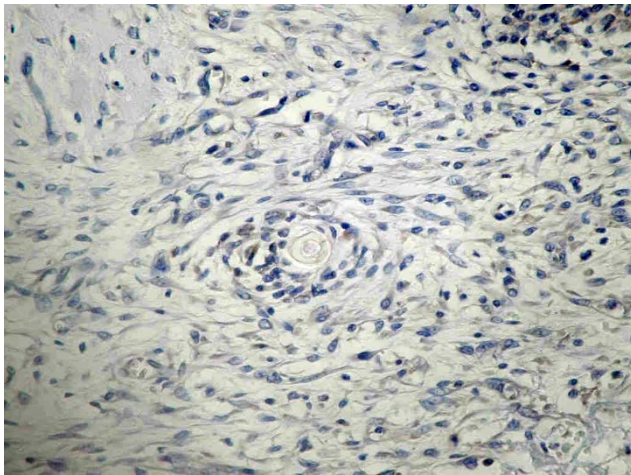


Abbildung 11: repräsentative perifilamentäre MMP-13 Expression, 5. postoperativer Tag, Kontrollgruppe

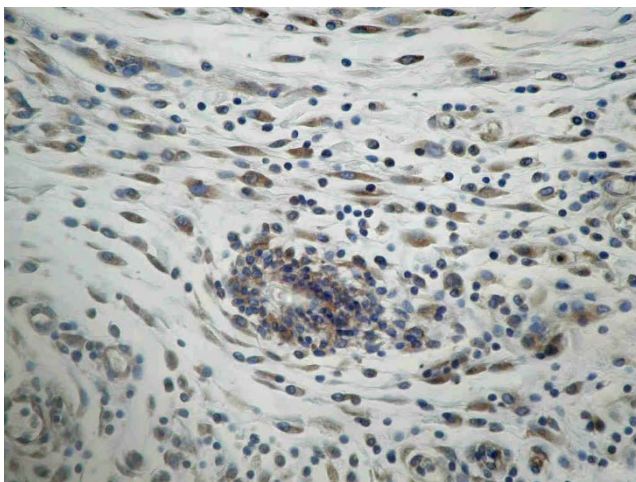


Abbildung 12: repräsentative perifilamentäre MMP-13 Expression, 5. postoperativer Tag, 3 mmHg CO₂-Pneumoperitoneum

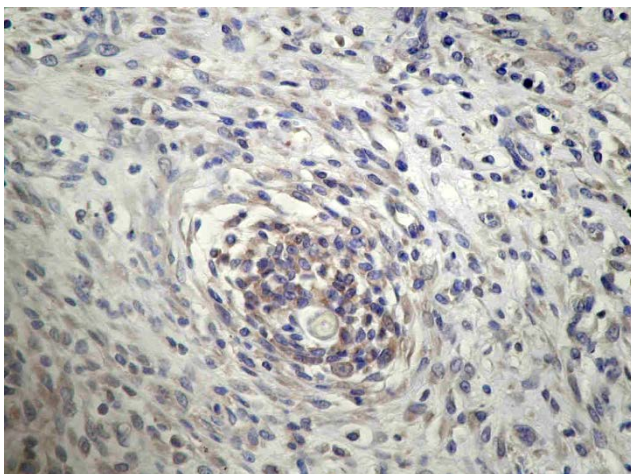


Abbildung 13: repräsentative perifilamentäre MMP-13 Expression, 5. postoperativer Tag, 3 mmHg Helium-Pneumoperitoneum

3.3 Kollagen I/III Quotient

Die niedrigsten Kollagen I/III Quotienten zeigten sich am fünften perioperativen Tag mit $3,8 \pm 1,6$ in der Kontrollgruppe, am zehnten postoperativen Tag mit $3,7 \pm 0,7$ in der 3mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe. Die höchsten Quotienten zeigten sich am fünften und zehnten postoperativen Tag mit $6,7 \pm 1,1$ und $6 \pm 0,7$ in der 3mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppe. Am fünften postoperativen Tag konnte eine statistisch signifikante Erhöhung ($p < 0,001$ bzw. 0,01, Abbildung 14, Tabelle 5) des Kollagen I/III Quotienten in den 3mmHg und 6mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden. Diese Erhöhung des Kollagen I/III Quotienten blieb bis zum zehnten postoperativen Tag bestehen, war nach der Bonferroni Korrektur statistisch aber nicht signifikant ($p > 0,05$). Bei der Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe zeigte sich am fünften postoperativen Tag kein relevanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Am zehnten postoperativen Tag zeigte sich eine Erniedrigung der Ratio. Eine Signifikanz bestand allerdings nur in der 3mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe ($p = 0,011$).

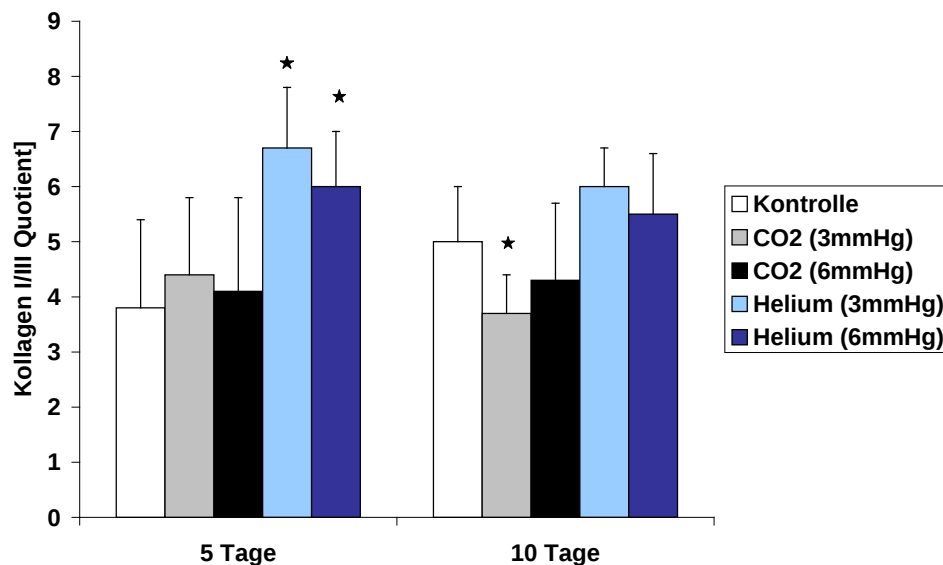


Abbildung 14: Kollagen I/III Quotient in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag

Tabelle 5: Kollagen I/III Quotient in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag

Gruppe	IAD	5 Tage	10 Tage
Kontrolle		$3,8 \pm 1,6$	$5 \pm 1,0$
CO ₂	3 mmHg	$4,4 \pm 1,4$	$3,7 \pm 0,7$
	6 mmHg	$4,1 \pm 1,7$	$4,3 \pm 1,4$
Helium	3 mmHg	$6,7 \pm 1,1$	$6 \pm 0,7$
	6 mmHg	$6,0 \pm 1,0$	$5,5 \pm 1,1$

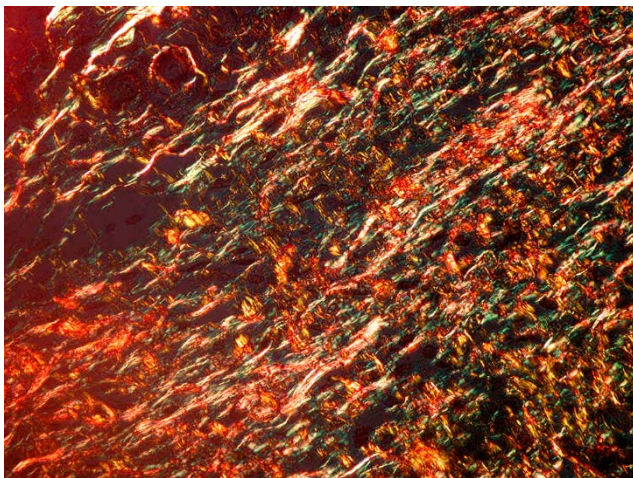


Abbildung 15: repräsentatives Beispiel perifilamentärer Kollagen I/III Quotient am 5. postoperativen Tag in der Kontrollgruppe

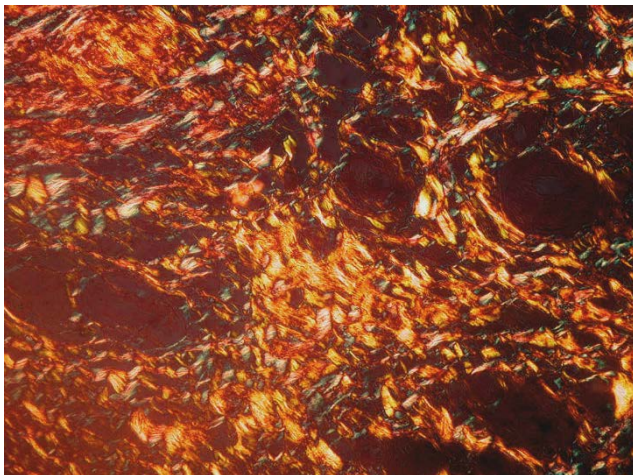


Abbildung 16: repräsentatives Beispiel Kollagen I/III Quotient am 5. postoperativer Tag, 3 mmHg Helium-Pneumoperitoneum



Abbildung 17: repräsentatives Beispiel Kollagen I/III Quotient am 5. postoperativer Tag, 6 mmHg Helium-Pneumoperitoneum

3.4 Makrophagen (CD 68 Färbung)

Die wenigsten CD68 positiven Zellen waren am fünften postoperativen Tag mit $28 \pm 7\%$ in der 3 mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe und am zehnten postoperativen Tag mit $26 \pm 4\%$ in der 6 mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe. Am fünften postoperativen Tag fanden sich in der 6 mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppe mit $39 \pm 5\%$ die meisten CD68 positiven Zellen und am zehnten postoperativen Tag mit $41 \pm 9\%$ in der 3 mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppe. Es zeigten sich in den Pneumoperitoneum Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine statistisch relevanten Unterschiede im alpha-adjustierten p-Test (Abbildung 18, Tabelle 6). Tendenziell war, sowohl am fünften als auch am zehnten postoperativen Tag, eine verminderte Expression CD68 positiver Zellen in der Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe und eine erhöhte Expression in der Helium-Pneumoperitoneum Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen.

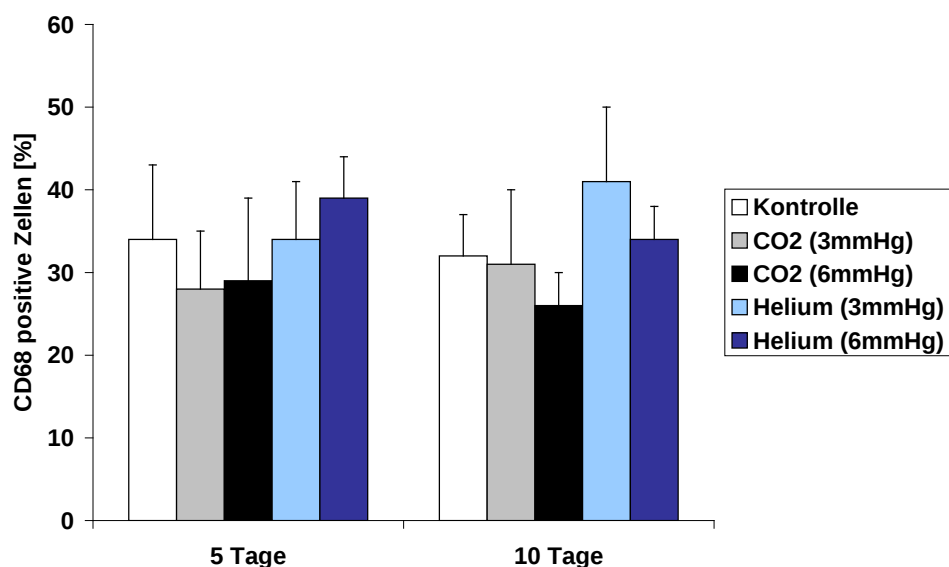


Abbildung 18: prozentualer Anteil CD 68 positiver Zellen in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag

Tabelle 6: Anteil CD 68 positiver Zellen in der Bauchwunde am 5. und 10. postoperativen Tag in %

Gruppe	IAD	5 Tage	10 Tage
Kontrolle		34 ± 9	32 ± 5
CO ₂	3 mmHg	28 ± 7	31 ± 9
	6 mmHg	29 ± 10	26 ± 4
Helium	3 mmHg	34 ± 7	41 ± 9
	6 mmHg	39 ± 5	34 ± 4

3.5 Granulomformation (HE Färbung)

Die kleinsten perifilamentären Durchmesser zeigten sich mit $22 \pm 5,2 \mu\text{m}$ am fünften perioperativen Tag in der 3 mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe und am zehnten postoperativen Tag mit $26 \pm 5,4 \mu\text{m}$ in der 6 mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe. Die größten perifilamentären Durchmesser zeigten sich am fünften postoperativen Tag mit $35 \pm 20 \mu\text{m}$ in der 3 mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppe und am zehnten postoperativen Tag mit $36 \pm 15 \mu\text{m}$ in der 3 mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe. Die Unterschiede der Durchmesser der perifilamentären Fremdkörpergranulome in der HE Färbung der Pneumoperitoneum Gruppen

im Vergleich zur Kontrollgruppe waren statistisch nicht relevant. ($p < 0,05$, Abbildung 19, Tabelle 7).

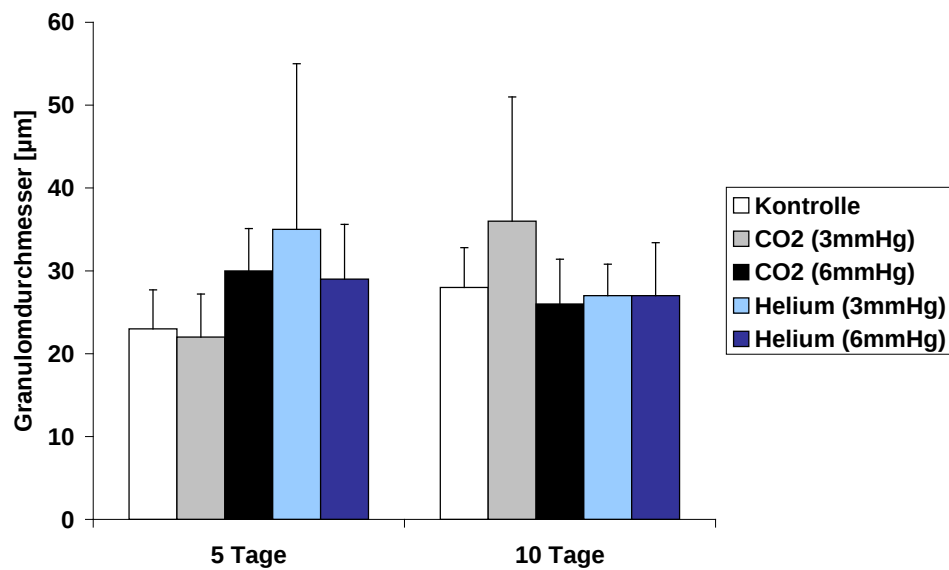


Abbildung 19: perifilamentärer Granulomdurchmesser, HE Färbung, 5. und 10. postoperativer Tag

Tabelle 7: perifilamentärer Granulomdurchmesser, HE Färbung, 5. und 10. postoperativer Tag in µm

Gruppe	IAD	5 Tage	10 Tage
Kontrolle		23 ± 4,7	28 ± 4,8
CO ₂	3 mmHg	22 ± 5,2	36 ± 15
	6 mmHg	30 ± 5,1	26 ± 5,4
Helium	3 mmHg	35 ± 20	27 ± 3,8
	6 mmHg	29 ± 6,6	27 ± 6,4

3.6 Zusammenfassung

Makroskopisch zeigten sich in der Wundheilung bei keinem Tier Auffälligkeiten.

Die MMP-13 Expression am fünften postoperativen Tag war in allen Pneumoperitoneum Gruppen statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese vermehrte Expression war am zehnten postoperativen Tag noch in den 6 mmHg Kohlenstoffdioxid- und 3 mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppen deutlich.

Am fünften postoperativen Tag zeigte sich in den 3 mmHg und 6 mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch relevante Erhöhung des Kollagen I/III Quotienten. Diese Erhöhung persistierte auch noch am zehnten postoperativen Tag, war aber nicht mehr statistisch signifikant. Die Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppen zeigten am fünften postoperativen Tag keinen relevanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Am zehnten postoperativen Tag konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erniedrigung des Kollagen I/III Quotienten beobachtet werden, welche nur in der 3 mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe statistisch signifikant war.

In der CD 68 Färbung war tendenziell, jedoch ohne statische Relevanz, sowohl am fünften als auch am zehnten postoperativen Tag in den Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppen eine verminderte und in den Helium-Pneumoperitoneum Gruppen eine erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten.

Bei der HE Färbung zeigten sich keine relevanten Unterschiede im Vergleich der Pneumoperitoneum Gruppen mit der Kontrollgruppe.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede durch die verschiedenen Druckniveaus dokumentiert werden.

4 Diskussion

4.1 Minimal invasive Chirurgie und Wundheilung: aktueller Kenntnisstand

Mittlerweile wurden verschiedene potentielle Einflussfaktoren der Laparoskopie und des Pneumoperitoneums auf die Wundheilung identifiziert. Allerdings ist ihre klinische Relevanz angesichts der derzeitigen Studienlage immer noch unklar. Da die Laparoskopie für eine Vielzahl von Indikationen zum Routineverfahren in der Abdominalchirurgie geworden ist, ist eine Analyse der Auswirkungen des Pneumoperitoneums und des verwendeten Gases auf die Wundheilung unabdingbar.

4.1.1 Einfluss des Säure-Basen Haushaltes

Initial zeigt sich in akuten Wunden durch die Produktion organischer Säuren wie Laktat und die stasebedingte Anreicherung von Kohlenstoffdioxid eine physiologische Azidose. Zusätzlich besteht in dem verletzten Gewebe ein erhöhter Bedarf und Verbrauch von Sauerstoff, was eine weitere Erhöhung der Kohlenstoffdioxidkonzentration zur Folge hat. Wird der Wundheilungsprozess durch eine Kontamination mit Bakterien oder das Ausbilden von Nekrosen verzögert, erfolgt ein weiterer Abfall des lokalen pH-Wertes [140]. Auch durch die Temperatur wird die Konzentration von Wasserstoffionen und somit der pH-Wert beeinflusst [siehe 4.1.3]

Da in den verschiedenen Phasen der Wundheilung unterschiedliche pH-Werte von Vorteil sind, ist es schwierig, einen optimalen pH-Wert für den gesamten Ablauf zu definieren. So erwies sich ein saurer pH-Wert bei spontaner Reepithelisation als günstig, während beim Anwachsen von Hauttransplantaten ein basisches Milieu überlegen war [140]. Diese Veränderungen im Säure-Base-Haushalt stellen möglicherweise eine Komponente in der Beeinflussung des Zellmetabolismus und der Zellen der Immunabwehr im Rahmen der Wundheilung dar. So wird durch eine Azidose die Differenzierung von monozytären Zellen supprimiert, die Proliferation von Fibroblasten hingegen gefördert [43, 140]. Es konnte eine Verminderung der Enzymaktivität um 40-90 % für einige, für die Wundheilung wichtigen Proteasen (MMP-2, Cathepsin G, Elastase und Plasmin) bei einem pH von 6 gezeigt werden [55]. Leighton et al. konnten in Untersuchungen nach laparoskopischer Verwendung von Kohlenstoffdioxid eine Azidose und einen Anstieg des pulmonal arteriellen Druckes zeigen [94]. Solche Veränderungen im Säure-Basen-

Haushalt haben einen negativen Effekt auf die Wundheilung. Weitere Untersuchungen bei Patienten nach laparoskopischer Sigmaresektion zeigten eine Stunde postoperativ ebenfalls erniedrigte Plasma pH-Werte [154]. Kurzfristige Erhöhungen des intraabdominellen Druckniveaus auf 20 mmHg zeigten negative Veränderungen im mittleren arteriellen Blutdruck, dem pH, der Bikarbonat-Konzentration und des Base Excess. Allerdings hatten diese Veränderungen keine klinischen Auswirkungen auf den Patienten [68].

4.1.2 Einfluss auf die Perfusion

4.1.2.1 Einfluss eines erhöhten intraabdominellen Druckes auf die Perfusion

Bei diversen Routineeingriffen ist häufig eine Aufrechterhaltung des Pneumoperitoneums mit intraabdominellen Druckwerten zwischen 12-15 mmHg über mehrere Stunden notwendig. Verschiedene Untersuchungen zeigten eine Beeinflussung des erhöhten intraabdominellen Druckes auf die Perfusion und damit auf die Wundheilung.

In Versuchen mit Hunden und Schweinen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des intraabdominellen Druckes vom Normwert zwischen 0-5 mmHg auf 14-16 mmHg über ein bis drei Stunden schon eine deutliche Verminderung der Durchblutung der mesenterialen Gefäße zur Folge hatte [20, 69, 88]. Im Versuch mit Ratten konnte ebenfalls eine Perfusionsminderung der soliden Organe sowie des Dünn- und des Dickdarms bei einem Pneumoperitoneum zwischen 4 und 15 mmHg dokumentiert werden [42, 136]. Eine weitere Untersuchung an Ratten zeigte eine durch ein Pneumoperitoneum hervorgerufene renale Hypoxie und eine Verminderung des renalen Blutflusses [168]. Auch beim Menschen zeigten sich eine Beeinträchtigung der hepatischen Mikrozirkulation und eine Reduktion des peripheren Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe durch die Laparoskopie [41, 45]. Im Kolon kann dies eine Reduktion des Blutflusses um 44 % und im parietalen Peritoneum um 60 % bewirken [34]. Dies zeigte auch eine weitere Studie an Patienten, die sich einer Routine Laparoskopie unterzogen. Bei einer intraabdominellen Druckerhöhung von 10 mmHg auf 15 mmHg war eine Perfusionsminderung von 40 % bis 54 % des Magens, 32 % des Jejunums, 44 % des Kolons, 39 % der Leber, 60 % des parietalen Peritoneums und 11 % des Duodenums messbar [138]. Gegensätzlich dazu zeigte eine Studie im Schwein bei einem Pneumoperitoneum von 15 mmHg initial eine gesteigerte und im Verlauf von zwei

Stunden eine gleichbleibende intestinale Perfusion [45]. Bei Patienten, die sich einer Cholezystektomie unterzogen, ergab eine Untersuchung, dass erhöhte intraabdominelle Druckwerte von über 14 mmHg bei Laparoskopien mit vermehrten Veränderungen der Herzfrequenz, des nichtinvasiven Blutdruckes und einer erhöhten peritonealen Kohlenstoffdioxidaufnahme einhergehen. Niedrigere Drücke zwischen 8-10 mmHg minimierten diese negativen Auswirkungen der Kohlenstoffdioxidinsufflation [162]. Gesichert ist eine bedeutsame Beeinträchtigung der Organfunktionen durch eine Durchblutungsminderung bei Druckwerten über 20 mmHg, wie es beim abdominalen Kompartmentsyndrom der Fall ist [15, 25, 35, 131]. Dabei ist eine regelrechte Perfusion eine der Grundvoraussetzungen für eine ungestörte Regeneration des Gewebes. Laut der Konsensuskonferenz des Second World Congress of Abdominal Compartment Syndrome stellen bereits Werte ab 12 mmHg eine intraabdominelle Hypertonie dar [100]. Eine durch das Pneumoperitoneum hervorgerufene Erniedrigung der Sauerstoffsättigung der Schleimhaut konnte in einer Studie an Patienten, die sich einer elektiven diagnostischen Laparoskopie unterzogen, beobachtet werden [142]. Ob eine durch das Pneumoperitoneum hervorgerufene lokale Hypoxie zu einer Beeinträchtigung der postoperativen Wundheilung führt, ist bislang nicht abschließend geklärt. Anastomoseninsuffizienzen stellen die schwerwiegendste intraabdominelle Wundheilungsstörung dar. Je nach Lokalisation treten sie mit einer Rate bis zu 27 % auf und führen zu einer Letalität bis zu 50 % [117]. Klinische Studien zeigten wiederholt eine vergleichbare Rate von Anastomoseninsuffizienzen bei konventionellen und minimal invasiven Operationsmethoden [9, 22, 63, 80, 85, 177].

4.1.2.2 Einfluss verschiedener Gase auf die Perfusion

Hinsichtlich der gasabhängigen Perfusionsbeeinflussung zeigte eine Studie an Ratten bei Verwendung von Kohlenstoffdioxid im Vergleich zu Helium eine Verminderung des portalvenösen Rückflusses [139].

Unter Verwendung von Kohlenstoffdioxid beim Schwein zeigte sich eine bessere Durchblutung der Leber, des parietalen Peritoneums und der Rektummuskulatur, als bei Anwendung mit Helium [132, 178, 179]. Die intestinale Perfusion wurde bei einer tierexperimentellen Studie an Schweinen weder durch ein mittels Helium noch durch ein mittels Kohlenstoffdioxid hergestelltes Pneumoperitoneum von 15 mmHg negativ beeinflusst [52]. Eine weitere tierexperimentelle Studie an Schweinen zeigte unter Verwendung von Helium und Kohlenstoffdioxid zur Herstellung eines

Pneumoperitoneums mit unterschiedlichen Drücken im Vergleich zur Laparotomie keinen Einfluss des Gases beziehungsweise des Druckes auf den renalen oder hepatischen Blutfluss. Allerdings zeigte sich eine signifikante Erhöhung des parietalen Blutflusses unter Verwendung von Kohlenstoffdioxid [24].

4.1.3 Einfluss auf die Temperatur

Ein weiterer wichtiger Faktor für eine physiologische Wundheilung ist die Körpertemperatur, welche vor allem perioperativ gesteuert werden muss. Studien zeigten, dass eine Unterkühlung mit einer erhöhten Rate an Wundinfektionen und einer Beeinträchtigung der Wundheilung verbunden ist [91, 118]. Der kleinere Zugangsweg durch die minimal invasive Chirurgie scheint hier zunächst einen Vorteil darzustellen. Es konnte jedoch in Untersuchungen dargestellt werden, dass der Wärmeverlust durch Verdunstung bei eröffneter Bauchhöhle vergleichbar mit der Abkühlung durch das kontinuierlich zu insufflierende Gas ist [31, 149]. Eine tierexperimentelle Studie an Ratten zeigte, dass durch Erwärmung und Anfeuchten des für das Pneumoperitoneum verwendeten Gases, eine Prävention der Hypothermie erfolgt [64]. Weitere klinische und experimentelle Untersuchungen mit gewärmten Gas konnten keine eindeutigen Ergebnisse liefern [18, 33, 110]. In einer Untersuchung an Ratten zeigte sich kein Effekt von erwärmtem und befeuchtetem Gas auf Marker des oxidativen Stresses [134]. Klugsberger et al., weist eine Reduktion des postoperativen Schmerzes am Tag der Operation nach laparoskopischer Cholezystektomie mit erwärmten und befeuchteten Insufflationsgas nach [83].

In der Konsequenz werden die Patienten, in Analogie zu offenen Verfahren, bei langen und aufwendigen laparoskopischen Operationen unter Temperaturkontrolle einer externen Wärmezufuhr, zum Beispiel durch Wärmematten, unterzogen [159].

4.1.4 Einfluss auf den Zellstoffwechsel und das Immunsystem

Überwiegend wurde in Studien eine geringere Beeinflussung des Immunsystems, eine geringere Stressreaktion und eine weniger kompromittierte zellvermittelte Immunantwort durch Laparoskopie mit Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum im Vergleich zur konventionellen Laparotomie gezeigt [4, 16, 124]. In einer tierexperimentellen Studie an Ratten zeigte sich, dass ein erhöhter intraabdomineller Druck für Ischämien, freie Radikal Produktion und proinflammatorische Cytokine Erhöhung verantwortlich ist [115].

Gasabhängige Einflüsse auf das Immunsystem und den Zellstoffwechsel wurden in verschiedenen Studien untersucht. Nach Laparoskopien mit Kohlenstoffdioxid wurden eine größere Ausschüttung von Sauerstoffradikalen und Tumornekrosefaktoren durch Peritonealmakrophagen, eine signifikante Reduktion der Phagozytoseaktivität und eine niedrigere Serumkonzentration von Interleukin-6 im Vergleich zur gaslosen Laparoskopie beobachtet [56, 70, 166, 180]. Bei der Verwendung von Helium zeigten sich in einer tierexperimentellen Untersuchung an Ratten im Vergleich zu Kohlenstoffdioxid weniger Bakteriämien, verringerte Abzessraten und niedrigere TNF-alpha-Spiegel [71], sowie allgemein eine verbesserte lokale und systemische Immunabwehr [28, 71]. Andere in vitro Untersuchungen konnten für beide Gase ebenfalls eine Beeinflussung der intra- und extrazellulären Funktionen, wie oxidative Phosphorylierung zur Produktion von ATP, die Zellproliferation oder die Einleitung einer Apoptose, zeigen. Untersucht wurden in der einen die Produktion von MMP-2, MMP-9 und Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator, welche durch die Laparoskopie anstiegen sowie intrazelluläre Calciumkonzentrationen und der pH-Wert in der anderen Untersuchung. Eine gasabhängige Auswirkung auf den Wundheilungsprozess aufgrund der Veränderung der intra- und extrazellulären Parameter ist wahrscheinlich [116, 170].

4.2 Diskussion der Methodik

Am standardisierten Kleintiermodell wurden die Auswirkungen von Insufflationsgasen und verschiedenen Druckniveaus auf die Wundheilung nach Laparoskopie im Vergleich zur Laparotomie untersucht. Hierzu wurden Kohlenstoffdioxid und Helium zur Etablierung des Pneumoperitoneums mit zwei tieradaptierten Druckniveaus (3 mmHg und 6 mmHg) mit einer Kontrollgruppe verglichen und mit Untersuchungen am fünften und zehnten postoperativen Tag zwei Wundheilungsstadien erfasst.

Die gewählten Druckniveaus und die Dauer des Pneumoperitoneums beruhten auf Voruntersuchungen in der Ratte: Caldwell und Ricotta beschrieben eine ausgeprägte Erniedrigung der Perfusion in den meisten gastrointestinalen Organen nach 30 Minuten erhöhtem intraabdominellen Druck [26]. In anderen tierexperimentellen Studien an Ratten führten Druckniveaus größer 10 mmHg zu einer respiratorischen Azidose und Druckwerte über 5 mmHg verursachten eine signifikante Bradykardie [14]. Es zeigte sich, dass komplexe laparoskopische Eingriffe in der Ratte bereits ab einem 2 mmHg Pneumoperitoneum durchzuführen sind [13]. Die Druckniveaus wurden deshalb auf

3mmHg und 6mmHg festgelegt. Mit diesen Voraussetzungen ist von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen auszugehen.

Hinsichtlich der klinischen Übertragbarkeit der vorliegenden Ergebnisse gilt es einschränkend festzuhalten, dass mit dem Versuchsaufbau eines 30minütigen Pneumoperitoneums keine Rückschlüsse auf mögliche zeitliche Auswirkungen auf die Wundheilung erfolgen können.

Ein Vorteil randomisierter, prospektiver Studien im Tiermodell liegt in der Vereinheitlichung der Versuchsbedingungen und der Möglichkeit Fehlerquellen zu reduzieren. Zur Stressreduktion hatten die Tiere eine Woche Zeit zur Eingewöhnung. Es lagen standardisierte und konstante Laborbedingungen vor und die Operationen wurden immer zur selben Tageszeit und durch das gleiche Team durchgeführt. Die entnommenen Gewebeproben wurden zügig in Formalin fixiert. Pro Parameter wurden alle Schnittpräparate gleichzeitig gefärbt, um eine konstante und vergleichbare Farbintensität zu erhalten.

Zur Auswertung wurden stets perifilamentäre Regionen im Präparat herangezogen, um eine Nähe zu den Wundheilungsprozessen nachvollziehen zu können.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Proteasen zeigen quantitative Ergebnisse positiv gefärbter Zellen. Aussagen zur Proteasenaktivität lassen sich hierdurch jedoch nicht ableiten. Hierfür wären weitere Untersuchungen mittels Zymographie notwendig.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Makroskopische Wundheilung

Klinisch wurden in keiner Gruppe Wundheilungsstörungen beobachtet. Makroskopisch sichtbare Infekte oder Wunddehiszenzen zeigten sich nicht.

4.3.2 MMP-13

Im Rahmen der Umbau- und Syntheseprozesse der Wundheilung werden unter anderem für den Abbau der Kollagene spezielle Kollagenasen, die Matrixmetalloproteinasen, benötigt. In verschiedenen Phasen der Wundheilung werden, provoziert durch unterschiedliche Kollagengehalte, verschiedene Konzentrationen der Matrixmetalloproteinasen gefunden. Durch die veränderten Zell-Matrix-Interaktionen

werden eine erhöhte Aktivität und Expression gefördert [78]. Matrixmetalloproteinasen werden zu Beginn der Wundheilung von Keratinozyten und im Verlauf von Fibroblasten des Granulationsgewebes exprimiert. Erhöhte, prolongierte Expression, wie durch Ischämien [135] oder auch verminderte Hemmung der Matrixmetalloproteinasen, können zu einer verzögerten Wundheilung führen [176]. Klinisch und experimentell scheinen vor allem eine erhöhte und verlängerte Expression von MMP-positiven Zellen die Wundheilung negativ zu beeinflussen [135, 161, 176]. In vitro Experimente zeigten, dass bei Verwendung von Kohlenstoffdioxid und auch von Helium die Produktion von Proteasen signifikant verstärkt wurde [116].

Für MMP-13 zeigte sich in Untersuchungen eine Korrelation der Expression mit dem Gewebstrauma [6, 98, 175]. Weitere bisherige Untersuchungen lassen darauf schließen, dass eine ausgeglichene Expression von Matrixmetalloproteasen für die Wundheilung wichtig ist. In Studien an Mäusen, in denen die humane Kollagenase-1 (MMP-1) überexprimiert wurde, kam es zu einem verzögerten Wundschluss und nicht wie vielleicht zu erwarten gewesen wäre, aufgrund des höheren Umsatzes zu einem beschleunigten Umbauprozess und damit auch zu einer schnelleren Wundheilung. Andererseits zeigte sich ebenfalls eine verzögerte Wundheilung bei Mäusen mit mutierten Kollagen I Molekül, welches von der Kollagenase nicht gespalten werden konnte. Somit wurde hier aufgrund der fehlenden Wirkung der Matrixmetalloprotease eine verringerte Aktivität simuliert [10, 119].

Am fünften postoperativen Tag konnte in allen Pneumoperitoneum Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der MMP-13 positiven Zellen verzeichnet werden ($p < 0,01$). Diese vermehrte Expression persistierte und war am zehnten postoperativen Tag noch in den 6 mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum und 3 mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppen relevant ($p < 0,001$).

Die zu beobachtende Erhöhung der MMP-13 positiven Zellen in allen Pneumoperitoneum Gruppen am fünften postoperativen Tag könnte als Hinweis auf eine negative Beeinflussung der Wundheilung gewertet werden. Am zehnten postoperativen Tag war diese Tendenz immer noch erkennbar.

Allerdings lassen sich die Ergebnisse nicht ganz mit den Ergebnissen des Kollagen I/III Quotienten vereinbaren. Da hier in der Helium-Pneumoperitoneum Gruppe am fünften postoperativen Tag eine statistisch relevante und am zehnten postoperativen Tag immer noch tendenziell eine erhöhte Ratio beobachtet werden konnte. Damit wäre keine

Erhöhung der MMP-13 positiven Zellen zu erwarten gewesen und die Aussagekraft der Ergebnisse sinkt.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in der Kohlenstoffdioxid Gruppe könnte eine durch die Insufflation des Gases vor Ort hervorgerufene Vasodilatation sein. Durch diese könnte die indirekte Vasokonstriktion durch den erhöhten intraabdominellen Druck zumindest teilweise kompensiert werden. Dadurch würde intraabdominell die Gefahr einer Ischämie reduziert und damit auch die durch sie hervorgerufene vermehrte MMP Expression [135, 156]. Die Gefäße der Haut sind von dem vasodilatierenden Effekt des Kohlenstoffdioxids gegebenenfalls nicht mehr in dem Ausmaß betroffen, dass die durch die unphysiologische Druckerhöhung hervorgerufene Vasokonstriktion ausgeglichen werden kann.

Fleischmann et al. untersuchten den Sauerstoffpartialdruck während Kolektomien. Dabei wurde eine Gruppe der Patienten konventionell operiert und bei der anderen Gruppe erfolgte die Resektion laparoskopisch. Die Messungen zeigten einen Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im subkutanen Gewebe in der Laparoskopie Gruppe. Da der Sauerstoffpartialdruck des Gewebes gut mit dem Infektionsrisiko einer Wunde korreliert, kann tendenziell von vermehrten Komplikationen der Wundheilung nach Laparoskopie ausgegangen werden [45].

Eine weitere Studiengruppe untersuchte an Schweinen den parietalen, renalen und hepatischen Blutfluss während Laparotomie und Laparoskopie mittels Helium und Kohlenstoffdioxid. Der renale und hepatische Blutfluss wurde durch keine Operationsmethode beeinflusst. Der parietale Blutfluss war nach Kohlenstoffdioxid Insufflation allerdings signifikant erhöht, nach Insufflation mit Helium ergab sich keine Änderung des Blutflusses [24]. Allerdings zeigte hinsichtlich der gasabhängigen Perfusionsbeeinflussung eine andere Studie an Ratten bei Verwendung von Kohlenstoffdioxid im Vergleich zu Helium eine Verminderung des portalvenösen Rückflusses [139]. Was wiederum das Risiko für eine verzögerte Wundheilung erhöht. In unseren Ergebnissen zeigte sich ein negativer Einfluss des Kohlenstoffdioxids auf die Wundheilung. Eine Ursache könnte nach der oben genannten Studie ein durch Kohlenstoffdioxid verminderter Blutfluss sein.

4.3.3 Kollagen I/III Verhältnis

Mit dem Kollagen I/III Quotienten lässt sich eine Aussage zur Qualität und Reife des Narbengewebes machen. Wie in Kapitel 1.4 schon erwähnt, verändert sich das Verhältnis mit dem Fortschreiten der Wundheilung zugunsten des Kollagen I. Liegt also ein erhöhtes Kollagen I/III Verhältnis vor, deutet dies auf ein stabileres Narbengewebe und eine fortgeschrittenere Wundheilung hin.

Am fünften postoperativen Tag konnte eine signifikante Erhöhung des Quotienten in den 3 mmHg und 6 mmHg Helium-Pneumoperitoneum Gruppen im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden. Die Erhöhung des Quotienten blieb bis zum zehnten postoperativen Tag bestehen, war dann jedoch nicht mehr statistisch signifikant. Bei der Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe zeigte sich am zehnten postoperativen Tag eine Erniedrigung der Ratio im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine Signifikanz bestand nur im Vergleich mit der 3 mmHg Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe.

Die Ergebnisse zeigen aufgrund der Erhöhung der Ratio einen Vorteil der Helium-Pneumoperitoneum Gruppe hinsichtlich der Qualität des Narbengewebes im Vergleich zur Kontrolle. In der Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe wurde eine Erniedrigung des Quotienten am zehnten postoperativen Tag beobachtet. Daraus könnte ein negativer Einfluss des Kohlenstoffdioxids auf die Wundheilung geschlossen werden.

Kologlu et al. zeigte in Versuchen nach Anlage eines Pneumoperitoneums mit erhöhtem intraabdominellem Druck eine verzögerte Wundheilung. Dazu wurden bei Ratten während der Anlage von Kolonanastomosen verschiedene intraabdominelle Druckwerte (4 mmHg-6 mmHg, 12 mmHg und 18 mmHg) angelegt. Intraabdominelle Druckwerte bis 6 mmHg verzögerten dabei die Wundheilung genauso lange wie eine fäkale Peritonitis, Drücke grösser als 6 mmHg sogar noch mehr [87]. Eine weitere Untersuchung nach Laparoskopie mit Kohlenstoffdioxid zeigte eine höhere Rate an Wundinfektionen und Narbenhernien im Vergleich zur offenen Kolonresektion [173]. Allerdings sind auch zu diesem Aspekt in der Literatur keine einheitlichen Berichte zu finden. Andere Untersuchungen konnten keine erhöhte Anastomoseninsuffizienzrate nach Druckerhöhungen nachweisen und die Autoren beschrieben eine vergleichbare Sicherheit zwischen laparoskopischer und konventioneller Kolon- beziehungsweise Rektumresektion [39, 63, 85, 177].

Eine Erklärung der Ergebnisse könnten pH-Wert Veränderungen durch das verwendete Gas sein. Nach Insufflation von Kohlenstoffdioxid zeigte sich in Untersuchungen an Ratten ein lokaler pH-Abfall und bei Helium ein pH-Anstieg oder eine Stagnation. Die pH Messungen erfolgten zum einen im Blut, subcutan und intraabdominell und zum anderen intrazellulär. [90, 170]. Diese Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt wirken sich auch auf die Wundheilung aus. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Azidose die Enzymaktivität von für die Wundheilung wichtigen Enzyme und Proteasen vermindert [55]. Die Differenzierung von monozytären Zellen wird supprimiert, die Proliferation von Fibroblasten hingegen gefördert [43, 140].

4.3.4 Makrophagen (CD 68)

CD 68 ist ein Oberflächenantigen, welches im menschlichen Gewebe von Makrophagen und Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird [123]. Wundmakrophagen stellen den größten Anteil an Zellen zwischen dem dritten und fünften Tag und spielen eine wichtige Rolle innerhalb der Wundheilung. Angelockt werden sie durch Macrophage Inflammatory Protein-1 und -2 (MIP-1/-2), Macrophage Chemoattractant and Activating Factor (MCAF) oder auch Zytokin Gro. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Migration der Makrophagen ist die Expression von Selektinen und anderen Adhäsionsmolekülen durch die Aktivierung des Endothels. Eine Aktivierung der Makrophagen in der Wunde führt zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Entzündungsmediatoren. Zusätzlich sind sie für die Beseitigung von in die Wunde gelangten pathogenen Organismen zuständig [137, 169]. Durch seine Eigenschaften gilt CD 68 als Entzündungsmarker. Untersuchungen an Ratten, in denen Makrophagen durch Glucan Gabe stimuliert wurden, zeigten eine erhöhte Zugfestigkeit der Wunde. Unabhängig davon wurde eine erhöhte Kollagensynthese durch Messung vom Hydroxyprolinegehalt festgestellt. Durch die erhöhte Kollagensynthese ergab sich eine höhere Reißfestigkeit der Wunde [23, 121].

Eine Erhöhung der CD68 positiven Zellen in den Untersuchungen könnte auf eine vermehrte Aktivierung von Makrophagen und somit verbesserte Wundheilung hinweisen. Eine Aussage über die Zellfunktion ist allerdings in der vorliegenden Studie nicht möglich, da durch die Färbung zwar Makrophagen identifiziert werden, ihre Funktion damit aber nicht beurteilt werden kann. Aufgrund der zuvor zitierten Studienergebnisse kann jedoch darauf geschlossen werden, dass eine erhöhte Anzahl auf eine höhere Reißfestigkeit der Wunde hinweist. Es zeigten sich keine statistisch relevanten

Unterschiede. Tendenziell war aber, sowohl am fünften als auch am zehnten postoperativen Tag, eine verminderte Expression CD68 positiver Zellen in der Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe und eine erhöhte Expression in der Helium-Pneumoperitoneum Gruppe zu verzeichnen.

Nach der Insufflation mit Helium zeigt sich also eine statistisch nicht signifikante bessere Wundheilung im Vergleich zur Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum und Kontrollgruppe. Jacobi et al. zeigten nach Kohlenstoffdioxid Insufflation ebenfalls eine vermehrte Rate von Bakteriämien, Abszessen und TNF-alpha Spiegeln im Vergleich zur Helium Insufflation [71].

Insgesamt zeigen sich auch hier in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits wurde eine Funktionsbeeinträchtigung der Makrophagen nach Laparoskopien gezeigt [56, 70], andererseits eine verbesserte Wundheilung und peritoneale Immunreaktion [30, 57, 86, 127]. Wir konnten mit unseren Untersuchungen keine statistisch relevanten Unterschiede in den Gruppen erkennen.

4.3.5 Granulomformation

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung der Entzündungsreaktion im Rahmen der Wundheilung liegt in der Auswertung der perifilamentären Granulomformationen. Bei dem Entzündungsinfiltrat handelt es sich um die Breite des inneren Granulomanteils (Makrophagenwall), bei der Bindegewebskapsel um die Breite des äußeren Granulomanteils (Fibrocytenwall). Die Art, Menge, Struktur und Oberflächeneigenschaften implantierter Fremdkörper wirken sich auf das Ausmaß der Granulombildung aus [82]. Durch die Verwendung von Inzuchttieren und identischem Nahtmaterial, wurden soweit wie möglich „patientenabhängige“ und durch verschiedene Fremdmaterialien verursachte unterschiedliche Reaktionen ausgeschlossen.

In der Auswertung mit dem Kruskal Wallis Test zeigten sich keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede der Durchmesser der perifilamentären Fremdkörpergranulome.

Damit zeigte sich in dieser Teiluntersuchung ebenfalls kein gas- oder druckabhängiger Einfluss der Laparoskopie auf die perifilamentäre Entzündungsreaktion im Rahmen der Wundheilung.

4.4 Zusammenfassung

Der Wissensstand hinsichtlich der Auswirkung von Kohlenstoffdioxid auf die Wundheilung ist, obwohl die Laparoskopie längst zu den Standardmethoden in der Chirurgie geworden ist, immer noch gering und die in der Literatur vorhandenen Informationen sind in ihrer Gesamtheit widersprüchlich.

In der Auswertung der MMP-13 Färbung wurde insgesamt ein negativer Einfluss der Laparoskopie im Vergleich zur Laparotomie auf die Wundheilung beobachtet. Bei der Bestimmung des Kollagen I/III Quotienten konnte eine positive Beeinflussung der Wundheilung in der Helium-Pneumoperitoneum Gruppe dokumentiert werden. Diese war am fünften postoperativen Tag statistisch relevant, zeigte sich am zehnten postoperativen Tag noch tendenziell. Am zehnten postoperativen Tag konnte in der Kohlenstoffdioxid-Pneumoperitoneum Gruppe eine Erniedrigung des Quotienten beobachtet werden, der in der 3 mmHg Gruppe statistisch signifikant war. Die Darstellung der Entzündungsreaktion mit CD68 ließ keine Unterschiede in den verschiedenen Gruppen im Verlauf der Wundheilung erkennen. Sowohl in den Granulomformationen, als auch in der makroskopischen Wundheilung wurden ebenfalls keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet.

Zusammenfassend konnte kein eindeutiger Unterschied in der Bauchdeckenheilung zwischen den Insufflationsgasen Kohlenstoffdioxid und Helium im Vergleich zu Laparotomien festgestellt werden. Der Vergleich der verschiedenen Druckniveaus von 3 mmHg und 6 mmHg ergab ebenfalls keine relevanten Unterschiede. Die kurzfristig gasbedingte Veränderung in der Kollagenzusammensetzung und in der Expression der MMP-13 war am zehnten postoperativen Tag nur noch teilweise erkennbar. Die Erhöhung der Kollagen I/III Ratio der Helium-Pneumoperitoneum Gruppen könnten auf einen möglichen positiven Einfluss des Helium-Pneumoperitoneums auf die abdominale Wundheilung deuten und somit als Hinweis auf eine mögliche temporäre druck- und gasabhängige Beeinflussung der Bauchdeckenwundheilung gewertet werden. Ursächlich könnten direkte und indirekte, pH-abhängige, Auswirkungen des zur Herstellung des Pneumoperitoneums verwendeten Gases sein.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich festhalten, dass auf Grundlage des aktuellen Forschungsstandes keine fundierte Aussage darüber getätigt werden kann, ob Kohlenstoffdioxid oder Helium als bevorzugtes Insufflationsgas bei Laparoskopien

verwendet werden sollte. Die Verwendung beider Gase scheint verschiedene Vor- und Nachteile mit sich zu bringen.

5 Literaturverzeichnis

1. Agalar F, Hamaloglu E, Daphan C, Tarim A, Onur R, Renda N, Sayek I; Effects of CO₂ insufflation and laparotomy on wound healing in mice. *Aust N Z J Surg* 2000; 70: 739-742
2. Akca O, Doufas AG, Morioka N, Iscoe S, Fisher J, Sessler DI; Hypercapnia improves tissue oxygenation. *Anesthesiology* 2002; 97: 801-806
3. Akca O, Liem E, Suleman MI, Doufas AG, Galandiuk S, Sessler DI; Effect of intraoperative end-tidal carbon dioxide partial pressure on tissue oxygenation. *Anaesthesia* 2003; 58: 536-542
4. Allendorf JD, Bessler M, Whelan RL, Trokel M, Laird DA, Terry MB et al; Postoperative immune function varies inversely with the degree of surgical trauma in a murine model. *Surg Endosc* 1997; 11: 427-430
5. Ambacher T, Kasperk R, Schumpelick V; Tumor recurrence after transanal excision of stage I rectal cancer in comparison with radical resection. *Der Chirurg* 1999; 70: 1469-1474
6. Armstrong DG, Jude EB; The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc* 2002; 92: 12-18
7. Attwood SE, McGrath J, Hill AD, Stephens RB; Laparoscopic approach to Meckel's diverticulectomy. *Br J Surg* 1992; 79: 211
8. Aumüller G; Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zikh HG; *duale Reihe Anatomie*, Georg Thieme Verlag 2010: 1164-1172
9. Bärlechner E, Benhidjeb T, Anders S, Schicke B; Laparoscopic resection for rectal cancer: outcomes in 194 patients and review of the literature. *Surg Endosc* 2005; 19: 757-766
10. Beare AH, O'Kane S, Krane SM and Ferguson MW; Severely impaired wound healing in the collagenase-resistant mouse. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 153-163
11. Berci G, Forde KA, History of endoscopy: what lessons have we learned from the past? *Surg Endosc* 2000; 14: 5-15
12. Bergström M, Falk P, Park PO, Holmdahl L; Peritoneal and systemic pH during pneumoperitoneum with CO₂ and helium in a pig model. *Surg Endosc*. 2008; 22: 359-364

13. Berguer R, Cornelius T, Dalton M; The optimum pneumoperitoneum pressure for laparoscopic surgery in the rat model. A detailed cardiorespiratory study. *Surg Endosc* 1997; 11: 915-918
14. Berguer R, Gutt C, Stiegmann GV; Laparoscopic surgery in the rat. Description of a new technique. *Surg Endosc* 1993; 7: 345-347
15. Bertram P, Schachtrupp A, Rosch R, Schumacher O, Schumpelick V; Abdominal compartment syndrome. *Chirurg* 2006; 77: 573-574, 576-579
16. Bessler M, Whelan RL, Halverson A, Treat MR, Nowygrod R; Is immune function better preserved after laparoscopic versus open colon resection? *Surg Endosc* 1994; 8: 881-883
17. Bickel A, Kukuev E, Popov O, Ivry S, Roguin N, Yahalom M, Eitan A; Power spectral analysis of heart rate variability during heliumpneumoperitoneum: The mechanism of increased cardiac sympathetic activity and its clinical significance. *Surg Endosc*. 2005 Jan; 19: 71-76
18. Birch DW, Manouchehri N, Shi X, Hadi G, Karmali S; Heated CO(2) with or without humidification for minimally invasive abdominal surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Jan 19: CD007821
19. Böhm B, Schwenk W, Junghans T; Das Pneumoperitoneum. Auswirkungen der Laparoskopie auf die Organsysteme. Springer 2000: 157
20. Bongard F, Pianim N, Dubecz S, Klein SR; Adverse consequences of increased intra-abdominal pressure on bowel tissue oxygen. *J Trauma* 1995; 39: 519-524
21. Bozzini P; Lichtleiter, eine Erfindung zur Anschauung innerer Teile und Krankheiten. *J Prak Heilk* 1806; 24:107
22. Breukink S, Pierie J, Wiggers T; Laparoscopic versus open total mesorectal excision for rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD 005200
23. Browder W, Williams D, Lucore P, Pretus H, Jones E, McNamee R; Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery* 1988; 104: 224-230
24. Brundell SM, Tsopelas C, Chatterton B, Touloumtzoglou J, Hewett PJ; Experimental study of peritoneal blood flow and insufflation pressure during laparoscopy. *Br J Surg* 2002; 89: 617-22
25. Bumashny E; The abdominal compartment Syndrome. *Curr Op Crit Care* 1998; 4: 236-244
26. Caldwell CB, Ricotta JJ; Changes in visceral blood flow with elevated intraabdominal pressure. *J Surg Res* 1987; 43: 14-20

27. Castro PM, Akerman D, Munhoz CB, Sacramento Id, Mazzurana M, Alvarez GA; Laparoscopic cholecystectomy versus minilaparotomy in cholelithiasis: systematic review and meta-analysis. *Arq Bras Cir Dig* 2014; 27: 148-153
28. Chekan EG, Nataraj C, Clary EM, Hayward TZ, Brody FJ, Stamat JC et al; Intraperitoneal immunity and pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 1999; 13: 1135-1138
29. Clary EM, Bruch SM, Lau CL, Ali A, Chekan EG, Garcia-Oria MJ, Eubanks S; Effects of pneumoperitoneum on hemodynamic and systemic immunologic responses to peritonitis in pigs. *J Surg Res.* 2002; 108: 32-38
30. Collet D, Vitale GC, Reynolds M, Klar E, Cheadle WG; Peritoneal host defenses are less impaired by laparoscopy than open operation. *Surg Endosc* 1995; 9: 1059-1064
31. Danelli G, Berti M, Perotti V, Albertin A, Baccari P, Deni F, Fanelli G, Casati A; Temperature control and recovery of bowel function after laparoscopic or laparotomic colorectal surgery in patients receiving combined epidural/general anesthesia and postoperative epidural analgesia. *Anesth Analg* 2002; 95: 467-71
32. Davidson BS, Cromeens DM, Feig BW; Alternative methods of exposure minimize cardiopulmonary risk in experimental animals during minimally invasive surgery. *Surg Endosc* 1996; 10: 301-304
33. Davis SS, Mikami DJ, Newlin M, Needleman BJ, Barrett MS, Fries R, Larson T, Dundon J, Goldblatt MI, Melvin WS; Heating and humidifying of carbon dioxide during pneumoperitoneum is not indicated: a prospective randomized trial. *Surg Endosc* 2006; 20: 153-158
34. Diebel LN, Dulchavsky SA, Wilson RF; Effect of increased intra-abdominal pressure on mesenteric arterial and intestinal mucosal blood flow. *J Trauma* 1992; 33: 45-48
35. Diebel LN, Wilson RF, Dulchavsky SA, Saxe J; Effects of increased intraabdominal pressure on hepatic arterial, portal venous, and hepatic microcirculatory blood flow. *J. Trauma* 1992; 33: 279-282
36. Doillon CJ, Dunn MG, Berg RA, Silver FH; Collagen deposition during wound repair. *Scan Electron Microsc* 1985; 897-903
37. Doillon CJ, Dunn MG, Silver FH; Relationship between mechanical properties and collagen structure of closed and open wounds. *J Biomech Eng* 1988; 110: 352-356
38. Downs SH, Black NA, Devlin HB, Royston CMS, Russel RCG, Systematic review of the effectiveness and safety of laparoscopic cholecystectomy. *Ann R Coll Surg Engl* 1996; 78: 241
39. Durães Lde C, Durães EF, Lobato LF, Oliveira PG, Sousa JB; Correlation between bursting pressure and breaking strength in colonic anastomosis. *Acta Cir Bras.* 2013 Jun; 28: 447-52.

40. Egeblad M and Werb Z; New function for matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 161-174
41. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Botsios D, Tzartinoglou E, Farmakis H, Dadoukis J; Splanchnic ischemia during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 1996; 10: 324-326
42. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K; Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg* 1996; 20: 11-16
43. Eljaafari A, Duperrier K, Mazet S, Bardin C, Bernaud J, Durand B, Gebuhrer L, Bétuel H, Rigal D; Generation of stable monocyte-derived dendritic cells in the presence of high concentrations of homologous or autologous serum: influence of extra-cellular pH. *Hum Immunol* 1998; 59: 625-634
44. Filipi CJ, Fitzgibbons RJ, Salerno GM. Historical review: diagnostic laparoscopy to laparoscopic cholecystectomy and beyond. In: Zucker KA, editor. *Surgical Laparoscopy*. St. Louis: Quality Medical Publishing, 1991, 3-21
45. Fleischmann E, Kugener A, Kabon B, Kimberger O, Herbst F, Kurz A; Laparoscopic surgery impairs tissue oxygen tension more than open surgery. *Br J Surg* 2007; 94: 362-368
46. Fox M, Cannon RM, Egger M, Spate K, Kehdy FJ; Laparoscopic component separation reduces postoperative wound complications but does not alter recurrence rates in complex hernia repairs. *Am J Surg*. 2013; 206: 869-874
47. Freije JP, Diez-Itza O, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tovilia J and Lopez-Otin C; Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269: 16766-16773
48. Friedman DW, Boyd CD, Mackenzie JW, Olson RM, Norton P, Olson RM, Deak SB; Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J surg Res* 1993; 55: 214-222
49. Fukushima R, Kawamura YJ, Saito H, Saito Y, Hashiguchi Y, Sawada T, Muto T; Interleukin-6 and stress hormone response after uncomplicated gasless laparoscopic-assisted and open sigmoid colectomy. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 29-34
50. Garcia-Caballero M, Vara-Thorbeck C; The evolution of postoperative ileus after laparoscopic cholecystectomy. A comparative study with conventional cholecystectomy and sympathetic blockade treatment. *Surg Endosc* 1993; 7: 416-419

51. Glaser F, Sannwald GA, Buhr HJ, Kuntz C, Mayer H, Klee F, Herfarth C; General stress response to conventional and laparoscopic cholecystectomy. *Ann Surg* 1995; 221: 372-380.
52. Goitein D, Papasavas P, Yeane W, Gagne D, Hayetian F, Caushaj P et al; Microsphere intestinal blood flow analysis during pneumoperitoneum using carbon dioxide and helium. *Surg Endosc* 2005; 19: 541-545
53. Golub R, Siddiqui F, Pohl D; Laparoscopic versus open appendectomy: a meta analysis. *J Am Coll Surg*, 1998; 186: 545-553
54. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP; Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122
55. Greener B, Hughes AA, Bannister NP, Douglass J; Proteases and pH in chronic wounds. *J Wound care* 2005; 14: 59-61
56. Gutt CN, Heinz P, Kaps W, Paolucci V; The phagocytosis activity during conventional and laparoscopic operations in the rat. A preliminary study. *Surg Endosc* 1997; 11: 899-901
57. Gutt CN, Kuntz C, Schmandra T, Wunsch A, Heinz P, Bouvy N, Bessler M, Sanger P, Bonjer J, Allendorf J, Jacobi CA, Whelan R; Metabolism and immunology in laparoscopy. First workshop on experimental laparoscopic surgery, Frankfurt 1997. *Surg Endosc* 1998; 12: 1096-1098
58. Gutt CN, Oniu T, Mehrabi A, Schemmer P, Kashfi A, Kraus T, Buchler MW; Circulatory and respiratory complications of carbon dioxide insufflation. *Dig Surg* 2004; 21: 95-105
59. Hamacher S, Matern S, Roeb E; Extracellular matrix – from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases. *Dtsch med Wochenschr* 2004; 129: 1976-1980
60. Hanly EJ, Aurora AR, Fuentes JM, Shih SP, Marohn MR, De Maio A, Talamini MA; Abdominal insufflation with carbon dioxide causes peritoneal acidosis independent of systemic pH. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1245-1251
61. Hanly EJ, Fuentes JM, Aurora AR, Bachman SL, De Maio A, Marohn MR, Talamini MA; Carbon dioxide pneumoperitoneum prevents mortality from sepsis. *Surg Endosc*. 2006; 20: 1482-1487
62. Hansen JB, Smithers BM, Schache D, Wall DR, Miller BJ, Menzies BL; Laparoscopic versus open appendectomy: prospective randomized trial. *World J Surg* 1996; 20:17-21.
63. Hartley JE, Mehigan BJ, Qureshi AE, Duthie GS et al; Total mesorectal excision: assessment of the laparoscopic approach. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 315-321

64. Hazebroeck EJ, Schreve MA, Visser P, De Bruin RW, Marquet RL, Bonjer HJ; Impact of temperature and humidity of carbon dioxide pneumoperitoneum on body temperature and peritoneal morphology. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2002; 12: 355-364
65. Hirschowitz BJ, Curtis LE, Peters CW, Pollard HM; Demonstration of a new gastroscope "The Fiberscope". *Gastroenterology* 1958; 35:50
66. Hoffmann K, Sirtl C, Jesch F; Anästhesiologisches Notizbuch, Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott GmbH und Co KG 2001; 5.Auflage: 41.1-41.8
67. Horgan PG, Fitzpatrick M, Couse NF, Gorey TF; Laparoscopy is less immunotraumatic than laparotomy. *Minimally Invasive Ther* 1992; 1: 241-244
68. Hypolito O, Azevedo JL, Gama F, Azevedo O, Miyahira SA, Pires OC, et al; Effects of elevated artificial pneumoperitoneum pressure on invasive blood pressure and levels of blood gases. *Braz J Anesthesiol.* 2014; 64: 98-104
69. Ishizaki Y, Bandai Y, Shimomura K, Abe H, Ohtomo Y, Idezuki Y; Changes in splanchnic blood flow and cardiovascular effects following peritoneal insufflation of carbon dioxide. *Surg Endosc* 1993; 7: 420-423
70. Jackson PG; Evans SR; Intraperitoneal macrophages and tumor immunity: a review. *J Surg Oncol* 2000; 75: 146-154
71. Jacobi CA, Ordemann J, Halle E, Volk HD, Muller JM; Impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on local and systemic inflammation in an animal model of peritonitis. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 1999; 9: 305-312
72. Jacobeus HC; Kurze Übersicht über meine Erfahrungen mit der Laparothoraskopie. *Münch med Wochenschr* 1911; 58:2017-2019
73. Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J et al; Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 1997; 208: 387-397
74. 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: 342-344
75. Junge K, Rosch R, Bialasinski L, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V; Persistent extracellular matrix remodelling at the interface to polymers used for hernia repair. *Eur Surg Res* 2003; 35: 497-504
76. Junghans T, Böhm B, Gründel K, Schwenk W; Effects of pneumoperitoneum with carbon dioxide, argon, or helium on hemodynamic and respiratory function. *Arch Surg* 1997; 3: 272-278

77. Junqueira LC, Assis Figueiredo MT, Torloni H, Montes GS; Differential histologic diagnosis of osteoid. A study on human osteosarcoma collagen by the histochemical picosirius-polarization method. *J Pathol* 1986; 148: 189-196
78. Kahari VM, Saarialho-Kere U; Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6: 199-213
79. Kamine TH, Papavassiliou E, Schneider BE; Effect of abdominal insufflation for laparoscopy on intracranial pressure. *JAMA Surg.* 2014; 149:380-382
80. Kim SH, Park IJ, Joh YG, Hahn KY; Laparoscopic resection for rectal cancer: a prospective analysis of thirty-month follow-up outcomes in 312 patients. *Surg Endosc* 2006; 20: 1197-1202
81. Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B; Abnormal Collagen I and III distribution in the skin of Patients with incisional hernia. *Eur Surg Res* 2000; 32: 43-48
82. Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V; Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials* 1998; 19: 2235-2246
83. Klugsberger B, Schreiner M, Rothe A, Haas D, Oppelt P, Shamiyeh A, Warmed, humidified carbon dioxide insufflation versus standard carbon dioxide in laparoscopic cholecystectomy: a double-blinded randomized controlled trial. *Surg Endosc.* 2014 Apr 23
84. Knäuper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G and Murphy G; Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271: 1544-1550
85. Kockerling F, Rose J, Schneider C, Scheidbach D, Scheuerlein H; Laparoscopic colorectal anastomosis: risk of postoperativ leakage, Results of a multicenter study. *Surg Endosc* 1999; 13: 639-644
86. Kollmorgen CF, Thompson GB, Grant CS, van Heerden JA, Byrne J, Davies ET, Donohue JH, Ilstrup DM, Young WF; Laparoscopic versus open posterior adrenalectomy: comparison of acute-phase response and wound healing in the cushingoid porcine model. *World J Surg* 1998; 22: 613-619
87. Kologlu M, Sayek I, Kologlu LB, Onat D; Effect of persistently elevated intraabdominal pressure on healing of colonic anastomoses. *Am J Surg* 1999; 178: 293-297
88. Kotzampassi K, Eleftheriadis E, Aletras H; Gastric mucosal blood flow in portal hypertension patients – a laser Doppler flowmetry study. *Hepatogastroenterology* 1992; 39: 39-42.

89. Krähenbühl L, Schäfer M, Kuzinkovas V, Renzulli P, Baer HU, Büchler MW; Experimental study of adhesion formation in open and laparoscopic fundoplication. *Br J Surg* 1998; 85: 826-830
90. Kuntz C, Wunsch A, Bödeker C, Bay F, Rosch R, Windeler J et al: Effect of pressure and gas type on intraabdominal, subcutaneous, and blood pH in laparoscopy. *Surg Endosc* 2000; 14: 367-371
91. Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R; Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. *N Engl J Med* 1996; 334: 1209-1216
92. Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Pique JM, Delgado S, Campo E, Bordas JM et al; Short-term outcome analysis of a randomized study comparing laparoscopic versus open colectomy for colon cancer. *Surg Endosc* 1995; 9: 1101-1105
93. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E; TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49: 187-98
94. Leighton TA, Liu SY, Bongard FS; Comparative cardiopulmonary effects of carbon dioxide versus helium pneumoperitoneum. *Surgery* 1993; 113: 527-531
95. Litynski GS; Highlights in the History of Laparoscopy, Bernert Verlag Frankfurt am Main 1996
96. Liu M, Li L, He Y, Peng D, Wang X, Chen W, Fu X, Ma Y; Comparison of laparoscopy and laparotomy in the surgical management of early-stage ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2014; 24: 352-357
97. Löffler G, Petrides PE, Heinrich CH; Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag 2007: 717
98. Lopez-Rivera E, Lizarbe TR, Martinez-Moreno M, Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Barbero A, Rodrigo J et al; Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3685-3690
99. Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL, Degen JL, Stephens RW, Dano K; Functional, overlap between, two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *EMBO J* 1999; 18: 4645-4656
100. Malbrain ML, Cheatham ML, Kirkpatrick A, Sugrue M, Parr M, De Waele J et al; Results from the International Conference of Experts on a Intraabdominal Hypertension an Abdominal Compartment Syndrome. *Intensive Care Med* 2006; 32: 1722-1732
101. Mao D, Lee JK, VanVickle SJ, Thompson RW; Expression of collagenase-3 (MMP13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 904-910

102. McMahon AJ, Baxter JN, Murray W, Irmie CW, Kenny G, O'Dwyer PJ; Helium pneumoperitoneum for laparoscopic cholecystectomy: ventilatory and blood gas changes. *Br J Surg* 1994; 7:1033-1036
103. Milsom JW, Bohm B, Hammerhofer KA, Fazio V, Steiger E, Elson P; A prospective, randomized trial comparing laparoscopic versus conventional techniques in colorectal cancer surgery: a preliminary report. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 46-54
104. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF and Hambor JE; Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97: 761-768
105. Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WVL, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester JV, Wang M, et al; Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem* 2002; 277:2065-2072
106. Mühe E; Die erste Cholezystektomie durch das Laparoskop. *Langenb Arch Klein Chir* 1986; 369: 804
107. Murray JA, Cornwel III EE, Velmahos GC, Rivkind AI, Hedman T, Abrahams JH, Katkhouda N, Berne TV, Demetriades D; Healing of traumatic diaphragm injuries: comparison of laparoscopic vs open techniques in an animal model. *J Surg Res* 2001; 100: 189-191
108. Nagase H; Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-160
109. Neuberger TJ, Andrus CH, Wittgen CM, Wade TP, Kaminski DL; Prospective comparison of helium versus carbon dioxide pneumoperitoneum. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 38-41
110. Nguyen NT, Furdulj G, Fleming NW, Lee SJ, Goldman CD, Singh A, Wolfe BM; Effect of heated and humidified carbon dioxide gas on core temperature and postoperative pain: a randomized trial. *Surg Endosc* 2002; 16: 1050-1054
111. Nguyen NT, Luketich JD, Schatz S, Tran Q, Ho HS, Schauer PR; The effect of open and laparoscopic surgery on cellular immunity in a swine model. *Surg Endosc Percutan Tech* 1999; 9: 176-180
112. Nitze M; Beobachtungs und Untersuchungsmethode für Harnröhre Harnblase und Rektum. *Wien med Wochenschr*, 1879; 24:649-652
113. Nolde J, Keller R, Killaitis C, Bruch HP, Schwandner O; Längere Operationsdauer von laparoskopischen Koloneingriffen ist nicht mit erhöhter Morbidität verbunden. 123. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie; 02. bis 05.05.2006, Berlin

114. Ohtani H, Tamamori Y, Arimoto Y, Nishiguchi Y, Maeda K, Hirakawa K; Meta-analysis of the results of randomized controlled trials that compared laparoscopic and open surgery for acute appendicitis. *J Gastrointest Surg.* 2012; 16: 1929-1939
115. Ozmen MM, Zulfikaroglu B, Col C, Cinel I, Isman FK, Cinel L, Besler TH; Effect of increased abdominal pressure on cytokines (IL1 beta, IL6, TNFalpha), C-reactive protein (CRP), free radicals (NO, MDA), and histology. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2009; 19:142-147
116. Paraskeva PA, Ridgway PF, Jones T, Smith A, Peck DH, Darzi AW; Laparoscopic environmental changes during surgery enhance the invasive potential tumours. *Tumour Biol* 2005; 26: 94-102
117. Pauthner M, Lorenz D, Wedemeyer J; Postoperative Anastomoseninsuffizienz Endoskopische und chirurgische Therapieoptionen. *Gastroenterologe* 2014; 9: 237–243
118. Pietsch AP, Lindenblatt N, Klar E; Perioperative hypothermia: Impact on wound healing. *Anaesthesist* 2007; 56: 936-939
119. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG and Parks WC; The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on an type I collagen matrix. *J. Cell Biol.* 1997; 137: 1445-1457
120. Polat C, Arikan Y, Vatansev C, Akbulut G, Yilmaz S, Dilek FH, Gokçe O; The effects of increased intraabdominal pressure on colonic anastomoses. *Surg Endosc* 2002; 16: 1314-1319
121. Portera CA, Love EJ, Memore L, Zhang L, Müller A, Browder W, Williams DL; Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *Am Surg* 1997; 63: 125-131
122. Prockop DJ, Kadler KE, Hojima Y, Constantinou CD, Dombrowski KE, Kuivaniemi H et al; Expression of type I procollagen genes. *Ciba Found Symp* 1988; 136: 142-160
123. Pulford KA, Sipos A, Cordell JL, Stross WP, Mason DY; Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int Immunol* 1990; 2 :973-980
124. Redmond HP, Watson RW, Houghton T, Condrón C, Watson RG, Bouchier-Hayes D; Immune function in patients undergoing open vs laparoscopic cholecystectomy. *Arch Surg* 1994; 129: 1240-1246
125. Richter S, Hückstädt T, Aksakal D, Klitscher D, Wowra T, Till H, Schier F, Kampmann C; Embolism risk analysis - helium versus carbon dioxide. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2012; 22: 824-829
126. Riede UN, Werner M, Schaefer HE; Allgemeine und spezielle Pathologie, 5. Auflage; Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2004

127. Robbins SB, Pofahl WE, Gonzales RP; Laparoscopic ventral hernia repair reduces wound complications. *Am Surg* 2001; 67: 896-900
128. Rosch R, Stumpf M, Junge K, Ardic D, Ulmer F, Schumpelick V; Impact of pressure and gas type on anastomotic wound healing in rats. *Langenbecks Arch Surg.* 2004; 389: 261-266
129. Rosch R, Stumpf M, Junge K, Drinjakovic D, Schachtrupp A, Afify M, Schumpelick V; Influence of pneumoperitoneum on small bowel anastomoses: a histological analysis in the rat model. *J Invest Surg.* 2005; 18: 63-69
130. Rudston-Brown B, Draper PN, Warriner B, Walley KR, Phang PT; Venous gas embolism – a comparison of carbon dioxide and helium in pigs. *Can J Anaeth* 1997; 10: 1102-1107
131. Saggi BH, Sugerman HJ, Ivatury RR, Bloomfield GL; Abdominal compartment syndrome. *J Trauma* 1998; 45: 597-609
132. Sala Blanch X, Fontanals J, Matinez Palli G, Taura P, Delgado S, Bosch J, Lacy AM, Visa J; Effects of carbon dioxide vs helium pneumoperitoneum on hepatic blood flow. *Surg Endosc* 1998; 12: 1121-1125
133. Saleh F, Ambrosini L, Jackson T, Okrainec A; Laparoscopic versus open surgical management of small bowel obstruction: an analysis of short-term outcomes. *Surg Endosc.* 2014; 28:2381-3286
134. Sammour T, Mittal A, Delahunt B, Phillips AR, Hill AG; Warming and humidification have no effect on oxidative stress during pneumoperitoneum in rats. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2011; 20: 329-337
135. Savage FJ, Lacombe DL, Boulus PB, Hembry RM; Role of matrix metalloproteinases in healing of colonic anastomosis. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 962-970
136. Schäfer M, Sägesser H, Reichen J, Krähenbühl L; Alterations in hemodynamics and hepatic and splanchnic circulation during laparoscopy in rats. *Surg Endosc* 2001; 15: 1197-1201
137. Schäffer M, Becker HD; Immunregulation der Wundheilung. *Der Chirurg.* 1999; 70: 897-908
138. Schilling MK, Redaelli C, Krähenbühl L, Signer C, Büchler MW; Splanchnic microcirculatory changes during CO₂ laparoscopy. *Am Coll Surg* 1997; 184: 378-382
139. Schmandra TC, Kim ZG, Gutt CN; Effect of insufflation gas and intraabdominal pressure on portal venous flow during pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 2001; 15:405-408

140. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J; Influence of pH on wound healing: a new perspective for wound-therapy? *Arch Dermatol Res* 2007; 298: 413-420
141. Schumpelick V, Bleese N, Mommsen U; *Kurzlehrbuch Chirurgie*, Georg Thieme Verlag 2010
142. Schwarte LA, Scheeren TW, Lorenz C, De Bruyne F, Fournell A; Moderate increase in intraabdominal pressure attenuates gastric mucosal oxygen saturation in patients undergoing laparoscopy. *Anesthesiology* 2004; 100: 1081-1087
143. Sharma KC, Kabinoff G, Ducheine Y, Tierney J, Brandstetter RD: Laparoscopic surgery and its potential for medical complications. *Heart Lung* 1997; 26: 52-64
144. Shuto K, Kitano S, Yoshida T, Bandoh T, Mitarai Y, Kobayashi M; Hemodynamic and arterial blood gas changes during carbon dioxide and helium pneumoperitoneum in pigs. *Surg Endosc* 1995; 11: 1173-1178
145. Singer AJ and Clark RA; Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746
146. Stadelmann WK, Digenis G, Tobin GR; Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* 1998; 176: 26-38
147. Stage JG, Schulze S, Moller P, Overgaard H, Andersen M, Rebsdorf-Pedersen VB et al; Prospective randomized study of laparoscopic versus open colonic resection for adenocarcinoma. *Br J Surg* 1997; 84: 391-396
148. Sternlicht MD and Werb Z; How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516
149. Stewart BT, Stitz RW, Tuch MM, Lumley JW; Hypothermia in open and laparoscopic colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1292-1295
150. Stumpf M, Cao W, Klinge U, Klosterhalfen B, Kasperk R, Schumpelick V; Collagen distribution and expression of matrix metalloproteinases 1 and 13 in patients with anastomotic leakage after large-bowel surgery. *Langenbecks Arch Surg* 2002; 386: 502-506
151. Stumpf M, Klinge U, Wilms A, Zabrocki R, Rosch R, Junge K, Krones C, Schumpelick V; Changes of the extracellular matrix as a risk factor for anastomotic leakage after large bowel surgery. *Surgery* 2005; 137:229-234
152. Sussenbach SP, Silva EN, Pufal MA, Casagrande DS, Padoin AV, Mottin CC; Systematic Review of Economic Evaluation of Laparotomy versus Laparoscopy for Patients Submitted to Roux-en-Y Gastric Bypass. *PLoS One*. 2014; 9
153. Tate JJ, Dawson JW, Chung SC, Lau WY, Li AK; Laparoscopic versus open appendectomy: prospective randomized trial. *Lancet* 1993; 342:633-637

154. Taura P, Lopez A, Lacy AM, Anglada T, Beltran J, Fernandez Cruz L, Targarona E, Garcia-Valdecasas JC, Marin JL; Prolonged pneumoperitoneum at 15mmHg causes lactic acidosis. *Surg Endosc* 1998; 12: 198-201
155. Thaler K, Dinnewitzer A, Mascha E, Arrigain S, Weiss EG, Nogueras JJ, Wexner SD; Long-term outcome and health-related quality of life after laparoscopic and open colectomy for benign disease. *Surg Endosc* 2003; 17: 1404-1408
156. Thomson IA, Fitch W, Hughes RL, Campbell D; Effect of increased concentrations of carbon dioxide during halothane anaesthesia on liver blood flow and hepatic oxygen consumption. *Br J Anaesth* 1983; 55: 1231-1237
157. Tittel A, Schippers E, Anurov M, Titkova S, Öttinger A, Schumpelick V; Shorter postoperative atony after laparoscopic-assisted colonic resection? An animal study. *Surg endosc* 2001; 15:508-512
158. Tittel A, Schippers E, Treutner KH, Anuroff M, Polivoda M, Ottinger A et al; Laparoscopy vs laparotomy. An animal experiment study comparing adhesion formation in the dog. *Langenbecks Arch Chir* 1994; 379: 95-98
159. Torossian A, Bein B , Prof. Bräuer A, Greif R ,Höcker J, Horn EP, et al; S3 Leitlinie Vermeidung von perioperativer Hypothermie. 2014. Version 8 vom 30.04.2014
160. Trokel MJ, Bessler M, Treat MR, Whelan RL, Nowygrod R; Preservation of immune response after laparoscopy. *Surg Endosc* 1994; 8: 1385-1388
161. Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD et al: Collagenase-3 (MMP 13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol* 1998; 152: 1489-1499
162. Umar A, Mehta KS, Mehta N; Evaluation of hemodynamic changes using different intra-abdominal pressures for laparoscopic cholecystectomy. *Indian J Surg.* 2013; 75: 284-9
163. Van den Berg F; Angewandte Physiologie: Band 1: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen. Georg Thieme Verlag 2011: 30-42
164. Van Ye TM, Cattey RP, Henry LG; Laparoscopically assisted colon resections compare favorably with open technique. *Surg Laparosc Endosc* 1994; 4:25-31.
165. Vara-Thorbeck C, Garcia-Caballero M, Salvi M, Gutstein D, Toscano R, Gomez A, Vara-Thorbeck R; Indications and advantages of laparoscopic-assisted colon resection for carcinoma in elderly patients. *Surg Laparosc Endosc* 1994; 4: 110-118
166. Watson RW, Redmond HP, McCarthy J, Burke PE, Bouchier-Hayes D; Exposure of the peritoneal cavity to air regulates early inflammatory responses to surgery in a murine model. *Br J Surg* 1995; 82: 1060-1065

167. Wiedemann H, Chung E, Fujii T, Miller EJ, Kühn K; Comparative electron-microscope studies on type-III and type-I-collagens. *Eur J Biochem* 1975; 51: 363-368
168. Wiesenthal JD, Fazio LM, Perks AE, Blew BD, Mazer D, Hare G, Honey RJ, Pace KT; Effect of pneumoperitoneum on renal tissue oxygenation and blood flow in a rat model. *Urology*. 2011; 77: 1508
169. Wild T, Auböck J; *Manual der Wundheilung*. Springer Verlag 2009: 193-194
170. Wildbrett P, Oh A, Naundorf D, Volk T, Jacobi CA; Impact of laparoscopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell function. *Surg Endosc* 2003; 17: 78-82
171. Willis S, Ulmer F, Fell T, Butz N, Tittel A, Schumpelick V; Laparoscopic colectomy vs open colectomy for sigmoid diverticular disease in routine surgery. *Viszeralchirurgie* 2005; 40: 27-32
172. Windberger U, Siegl H, Woisetschläger R, Schrenk P, Podesser B, Losert U; Hemodynamic changes during prolonged laparoscopic surgery. *Eur Surg Res* 1994; 26: 1-9
173. Winslow ER, Fleshman JW, Birnbaum EH, Brunt LM; Wound complications of laparoscopic vs open colectomy. *Surg Endosc* 2002; 16: 1420-1425
174. Wolf JS Jr, Carrier S, Stoller ML; Gas embolism: helium is more lethal than carbon dioxide. *J Laparoendosc Surg* 1994; 3: 173-177
175. Wu N, Jansen ED, Davidson JM; Comparison of mouse matrix metalloproteinase 13 expression in free-electron laser and scalpel incisions during wound healing. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 926-932
176. Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK; Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermat* 1996; 107: 743-748
177. Yamamoto S, Watanabe M, Hasegawa H, Kitajima M; Prospective evaluation of laparoscopic surgery for rectosigmoidal and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1648-1654
178. Yavuz Y, Ronning K, Bakkelund K, Lyng O, Aadahl P, Marvik R, Gronbech JE; Hemodynamic and tissue blood flow responses to long-term pneumoperitoneum and hypercapnia in the pig. *Surg Endosc* 2006; 20: 1394-1401
179. Yavuz Y, Ronning K, Lyng O, Gronbech JE, Marvik R; Effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on tissue blood flow in the peritoneum, rectus abdominis, and diaphragm muscles. *Surg Endosc* 2003; 17: 1632-1635

180. Yoshida T, Kobayashi E, Suminaga Y, Yamauchi H, Kai T, Toyama N et al; Hormone-cytokine response. Pneumoperitoneum vs abdominal wall-lifting in laparoscopic cholecystectomy. Surg Endosc 1997; 11: 907-910

6 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Raphael Rosch, der mir während des praktischen Teils und des Manuskripterstellens immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne seine Hilfe bei der Planung und Ausführung der Dissertation hätte ich dieses Projekt nie beenden können.

Allen Mitarbeitern des chirurgischen Labors, hier vor allen Frau Ellen Krott, danke ich für die großartige Hilfe bei der histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung der Gewebeproben.

Danke, auch an das statistische Institut der RWTH Aachen, welches mir bei der statistischen Auswertung meiner Arbeit beratend zur Seite stand.

Danke an Frau Dr. D. Drinjakovic für die Durchführung des tierexperimentellen Teils.

Der Firma Storz möchte ich für den Umbau des Insufflators für das Helium und seine leihweise Bereitstellung zur Durchführung der Versuche danken.

Ebenso danke ich meiner Familie, die mich immer wieder motiviert hat.

7 Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei meinem Betreuer, Priv.-Doz. Dr. R. Rosch, Chefarzt Allgemein- und Visceralchirurgie Hermann Josef Krankenhaus, hinterlegt sind.

8 Eidesstattliche Erklärung gemäß §5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Nicole Zarges, geborene Mirgartz** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Gas- und druckabhängige Auswirkung des Pneumoperitoneums auf die abdominale Wundheilung am Kleintiermodell**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Durchführung der histologischen Färbungen (90%), sowie deren mikroskopische und statistische (90%) Auswertung

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

- A. Priv.-Doz. Dr. med. R. Rosch: Studiendesign und –überwachung; Durchführung des tierexperimentellen Teils; Einarbeitung in die mikroskopische Auswertung, Hilfe bei der statistischen Auswertung (10%), Korrektur der Dissertation
- B. Dr. med. D. Drinjakovic: Durchführung des tierexperimentellen Teils
- C. E. Krott: Einarbeitung und Hilfe bei der Durchführung der histologischen Aufarbeitung der Präparate (10%)
- D: Statistisches Institut: Beratung zur statistischen Auswertung