

Aus der Abteilung Kinderchirurgie
Prof. Dr.med. BM Ure

**In vitro Proliferationsverhalten pädiatrischer Tumorzelllinien
nach zweistündiger Exposition mit
Kohlenstoffdioxid, Helium und Raumluft**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Catherine Bangen
aus Göttingen

Hannover 2008

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover

Am: 10.08.2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. D. Bitter- Suermann

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. R. Nustede

Referent/ Referentin: Prof. Dr. med. K. Welte

Korreferent/ Korreferentin: Prof. Dr. med. N. P. Malek

Tag der mündlichen Prüfung: 10.08.2009

Promotionsausschussmitglieder:
Prof. Dr. M. P. Manns
Prof. Dr. A. Ganser
Prof. Dr. A. M. Das

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Material und Methoden	7
2.1	Material	7
2.1.1	Geräte	7
2.1.2	Plastikmaterialien	8
2.1.3	Chemikalien	8
2.1.4	Gase	9
2.1.5	Zelllinien	10
2.2	Methoden	11
2.2.1	Zellkulturen	11
2.2.1.1	Kultivierung und Subkultivierung der Tumorzellen	11
2.2.1.2	Trypsinieren der Tumorzellen	12
2.2.1.3	Einfrieren und Auftauen der Tumorzellen	13
2.2.2	Zellzahlbestimmung	13
2.2.3	Gasexposition	14
2.2.4	Proliferationstest (MTT)	15
2.2.4.1	Ansetzen der Testreagenzien	15
2.2.4.2	Methodik	16
2.2.4.3	Durchführung	17
2.2.5	Statistik	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Neuroblastomzelllinien	21
3.2	Hepatoblastomzelllinien	26
3.3	Lymphomzelllinien	28
3.4	Rhabdomyosarkomzelllinie	30
3.5	Akute myeloische Leukämiezelllinie	31
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	32
4	Diskussion	33
5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis	47
7	Abbildungsverzeichnis	54
8	Anhang	
7.1	Lebenslauf	55
7.2	Danksagung	57
7.3	Erklärung laut §2, Abs. 2, Nr. 5 und 6 der Promotionsordnung	58

1 Einleitung

Mit der minimal invasiven Chirurgie ist eine neue Operationstechnik in der Kinderchirurgie hinzugekommen.¹ Die Laparoskopie stellt einen der großen Teilbereiche der Kinderchirurgie dar, in dem innerhalb der letzten Dekade wesentliche Fortschritte erzielt wurden.² Viele Eingriffe wie unter anderem auch die Appendektomien und Cholezystektomien werden heute zunehmend minimal invasiv operiert³, obwohl es noch keine generellen Empfehlungen über den Einsatz der Laparoskopie darüber gibt.¹ Ure et al.⁴ berichten beispielsweise, dass bereits bis zu 60% aller abdominalen Eingriffe minimal invasiv durchführbar sind.

Diese relativ neue Technik kommt nicht mehr nur allein bei benignen Erkrankungen sondern zunehmend auch bei diagnostischen und therapeutischen Operationen pädiatrischer Tumore zum Einsatz. Empfehlungen über den Einsatz der minimal invasiven Chirurgie in der Behandlung maligner Tumoren stehen jedoch noch aus.¹ Der Einfluss der neuen Operationstechnik auf die intra- und postoperativen Folgen in der Tumorchirurgie ist bisher nicht ausreichend aufgeklärt.

Rückblickend wurde in der chirurgischen Forschung lange Zeit überwiegend methodisch orientiert gearbeitet. Erst in den letzten Jahrzehnten ist ein Wandel hin zur physiologischen Betrachtung operativer Problemstellungen sowie zur Grundlagenforschung zellulärer Pathomechanismen erfolgt.

In der Wissenschaft allgemein kommt es immer wieder zum Wechsel grundlegender Forschungsprinzipien, so genannter Paradigmenwechsel.⁵ Die Paradigmenwechsel sind geprägt von Wechselbeziehungen zwischen den Bereichen Wissenschaft, Technologie, Medizin und Gesellschaft, die sich auf die Forschungspraxis auswirken und diese nachhaltig verändern.⁵

Mit der minimal invasiven Chirurgie ist nun wieder eine überwiegend technische Fragestellung von Interesse. Erneut ist man an dem Punkt angelangt, an dem die funktionellen sowie pathophysiologischen Betrachtungen operativer Probleme in den Hintergrund geraten sind und das klassisch chirurgisch technische Interesse im Mittelpunkt steht.

Zusätzlich ist der Übergang von einer gegenstandsbezogenen zu einer technologie- und datengetriebenen Forschung von Bedeutung: Die medizinische Forschung wird zunehmend durch die Methoden und Technologien bestimmt, wodurch der Bezug zu natürlichen Gegenständen sekundär wird.⁵

Die minimal invasive Chirurgie wird eingesetzt obwohl detaillierte Analysen der postoperativen Folgen, einschließlich der physiologischen Auswirkungen auf die Tumorbio­logie, oftmals noch ausstehen.

Auswirkungen der Laparoskopie auf das kardiovaskuläre⁶ und respiratorische⁷ System sowie auf die zerebrale⁸, gastrointestinale⁹ und renale¹⁰ Durchblutung sind beschrieben. Hinsichtlich der Tumorbio­logie sind die Erkenntnisse bisher uneinheitlich (s.u.).

Der anfängliche Enthusiasmus über den Einsatz der Laparoskopie in der onkologischen Chirurgie wurde durch das Erkennen von postoperativen Tumorrezidiven rasch geschmälert.¹¹ Ein möglicher Einflussfaktor für das Auftreten der Tumorrezidive ist der metabolische Effekt des in die Körperhöhle eingebrachten Gases.¹²

Kohlenstoffdioxid ist das in der Laparoskopie bisher meist verwendete Gas. Es ist farblos, nicht explosiv, gut verfügbar und leicht absorbierbar. Experimentell kamen auch andere Gase wie beispielsweise Helium, Xenon, Argon oder auch Raumluft zum Einsatz (s.u.).

Bislang wurden ausschließlich Studien über die Auswirkungen einer Gasexposition von Tumorzellen erwachsener Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse der vorliegenden in vitro und in vivo Arbeiten sind jedoch außerordentlich heterogen. Sie lassen keine einheitliche Aussage über das Tumorzellverhalten nach der Exposition zu (s.u.). Als Beispiel seien an dieser Stelle Publikationen genannt, die in einem Rattenmodell die unterschiedlichen Auswirkungen eines Pneumoperitoneums mit Helium, Kohlenstoffdioxid, Raumluft und Xenon auf Parameter wie das postlaparoskopische Tumorzellvolumen, Histomorphologie, Leukozyten-Tumor-Endothelinteraktion, Tumorzellproliferation, Apoptose und Immunaktivierung u.a. mittels Laparoskopie, intravitaler Videomikroskopie, monoklonaler Antikörper, Formalinfixierung und Haematoxylinfärbung, untersuchten, ohne zu einem einheitlichen Ergebnis zu kommen.^{13,14,15,16}

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es das Proliferationsverhalten 14 pädiatrischer Tumorzelllinien nach einer zweistündigen Exposition mit Kohlenstoffdioxid, Helium und Raumluft innerhalb eines in vitro Modells zu untersuchen. Es wurden acht Neuroblastom-, zwei Hepatoblastom-, zwei Lymphom-, eine Rhabdomyosarkom- und eine myeloische Leukämiezelllinie zwei Stunden mit Kohlenstoffdioxid, Helium und Raumluft exponiert und anschließend mit dem standardisierten MTT-Proliferationstest untersucht.^{17,18}

Anhand der mitochondrialen Aktivität soll ein zellulärer Parameter untersucht werden, der auf die zelluläre Proliferation schließen lässt. Mit dem einfachen, standardisierten und unabhängigen MTT- Proliferationstest werden die Ergebnisse im Photospektrometer quantifiziert und anschließend mit dem Statistikprogramm SPSS in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover berechnet.

Insbesondere im Bereich der pädiatrischen Onkologie mangelt es noch immer an kontrollierten randomisierten Studien über den Einsatz der minimal invasiven Technik bei denen für diese Altersgruppe typischen Tumoren. Die bisherigen Erfahrungen reichen noch nicht aus, um generelle Empfehlungen auszusprechen, dennoch kann bereits die Anwendung der Laparoskopie bei malignen Erkrankungen beobachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Kammern für die Gasexposition:

1. Exposition mit 100% CO₂: Speziell angefertigte gasdichte Kammer, bestehend aus einer Kunststoffdose der Marke Tupper (Unterteil + Deckel) mit zwei Zugängen für die Gaseinleitung und -ausleitung.
2. Exposition mit 100% Helium: Exikator, mit einem Zugang für die Gaseinleitung, die Gasausleitung erfolgte über einen eigenen Einwegehahn im Deckel.

In beiden Kammern wurde eine ausreichende Luftfeuchtigkeit durch Zugabe von aqua dest. erreicht.

Brutschränke:

- a) Standard- Zellkulturbrutschrank, Heraeus, Hanau;(BBD 6220), 37°C, 5% CO₂, 95%rH
- b) Versuchs- Zellkulturbrutschrank, Heraeus, Hanau; 37°C, 100% rH

ELISA- Reader: Tecan, Deutschland; Sunrise Remote, Art.-Nr.: F039300, Ser.-Nr.: 03930000148

Mikroskop: Zeiss, West Germany; Nr.: 15942

Mikrowaage: Sartorius AG, Göttingen; Model- Nr.: MC BA 100, Ser.-Nr.: 50208950 0 93-09-148

Neubauerzählkammer: Neubauer improved, Marienfeld, Germany

Software: Tecan Magelan; EXEL, Microsoft; SPSS Version 14.0, SPSS Inc., Chicago/ IL

Sterile Werkbank: Heraeus, Hanau; Lamin Air HBB2448

Zentrifugen:

- 1) Heraeus, Hanau; Varifuge 3.2 S, Best.-Nr.: 5360, Fab.-Nr.: 006592
- 2) Heraeus, Hanau; Varifuge K, Best.-Nr.: 4070, Fab.-Nr.: 005418

2.1.2

Plastikmaterialien

Abdichtungsklebeband: tesa, Hamburg; Nr.: 4651

Abdichtungspaste: Bayer, Leverkusen; GE Bayer Silicones, Baysilone- Paste 35 g, mittelviskös, 1-20-71, bezogen von Neolas

Combitips: Eppendorf, Hamburg; Order No.: 0030 069.250

Einmalpipetten: Sarstedt, Nümbrecht, Serological Pipette, Non- Pyrogenic sterile, 10ml (No./REF: 86.1254.001); 5 ml (No./REF: 86.1253.001)

Einmalmikroliterpipettierspitzen: Sarstedt, Nümbrecht; No./REF: 70.760.002

Mikroliterpipetten: Eppendorf, Hamburg; Reference

Mikrotiterplatten: 96- Loch: Nunc, Hamburg; Nunc- Immuno Module, F8 Maxisorp Loose, Nr.: 469949

Probengefäße: Eppendorf, Hamburg; Order No.: 0030 121 023

Zellkulturflaschen: 50 ml: Nunc, Hamburg; No.: 3002460

250 ml: Greiner bio- one, Nütringen; Cat No.: 658170, standard cap

Zentrifugenröhrchen: greiner bio-one, Nütringen; Cat No.: 188271

2.1.3

Chemikalien

Medium: RPMI 1640 der Firma PAA, Pasching; Cat No.: E 15- 840

Fetales Kälber Serum (FCS): PAA, Pasching; Cat No.: A 15- 649

Penicillin/ Streptomycin (PS): Seromed, Berlin; Cat No.: A 2213

Phosphat buffered soline (PBS): Zentralapotheke Medizinische Hochschule Hannover

Ch.B.: 502231; Zusammensetzung: Na₂HPO₄-12H₂O (56,8 mMol/L),

KH₂PO₄ (17,9 mMol/L);

NaCl (75,0 mMol/L)

Trypsin- EDTA: PAA Laboratories GmbH, Pasching; Cat No: L-11-003

Trypanblau: Trypan Blue Solution, Fluka Chemika, Neu- Ulm, EC label: 93595,

EC-No.: 2007867

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT):

Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide

C₁₆H₁₆BrN₅S

Sigma M5655-1G

Store 4°C

CAS 298-93-1

Symbol T

R 29/21/22, R46

N,N, Dimethylformamid (DMF):

HCON(CH₃)₂

CAS 4472-41-7

Symbol Xn

R 61-20/21-36

Sodium dodecyl sulphate (SDS):

CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na

CAS 151-21-3

Symbol Xn

R 22-36/38

Dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma, München; Nr.: D 2650

2.1.4

Gase

Kohlenstoffdioxid:

- Hersteller/ Lieferant: Linde AG, Seitnerstrasse 70, 82049 Höllriegelskreuth
- Handelsname: Gasart 370 Kohlendioxid
- CAS-Nr.: 00124-38-9
- EG-Nr.: 204-696-9

Helium:

- Hersteller/ Lieferant: Linde AG, Seitnerstrasse 70, 82049 Höllriegelskreuth
- Handelsname: Helium 4.6
- Reinheiten, %: \geq 99,996
- Nebenbestandteile, ppm: O₂ \leq 5; N₂ \leq 20; H₂O \leq 5; C(n)H(m) \leq 1; Ne \leq 10

2.1.5

Zelllinien

Die in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien wurden aus der in der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover etablierten Tumorzellbank entnommen.

Zelltyp	Zelllinie	Referenzen
Humane Neuroblastome	IMR 32	Tumilowicz JJ, et al. Cancer Res. 30: 2110 (1970)
	SH- IN	Biedler JL, et al. Cancer Res. 33 : 2643- 2652 (1973)
	SH-SY-5Y	Biedler JL, et al. Cancer Res. 38 : 3751-3757 (1978)
	SK-N-AS	Sugimoto T, et al. J. Natl. Cancer Inst. 73 : 51-57 (1984)
	SK-N-BE 2	Biedler JL, et al. J. Natl. Cancer Inst. 57 : 683-695 (1976)
	SK-N-BE 2c	Ciccarone V, et al. Cancer Res. 49(1): 219- 225 (1989)
	SK-N-BE M17	Biedler JL, et al. J. Natl. Cancer Inst. 57 : 683-695 (1976)
	SK-N-SH	Gilbert LC, et al. Biochim. Biophys. Acta 704: 450-460 (1982)
Humane Hepatoblastome	Hep G2	Aden et al. Nature, 282: 615 (1979)
	Hep Huh6	Midorikawa Y, et al. Int. J. Cancer 103 : 455- 465 (2003)
Humane Lymphome	DAUDI	Klein et al. Cancer Res, 28: 1300 (1968)
	U 937	Sundström et al. Int. J. Cancer, 17: 565-577 (1976)
Humanes Rhabdomyosarkom	TE 671	McAllister et al. Int. J. Cancer, 20 : 206 (1977)
Humane myl. Leukemia	KG 1A	Koeffler et al. Blood, 56 : 265 (1980)

Tabelle 1

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

Die gesamte Arbeit mit Zellkulturen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Kulturmedium:

RPMI-1640-Medium wird supplementiert mit:

10% FCS

5% Penicillin/ Streptomycin (PS)

Dauerkulturmedium:

RPMI-1640-Medium wird supplementiert mit:

5% FCS

5% Penicillin/ Streptomycin (PS)

Einfriermedium:

90% Kulturmedium (siehe oben)

10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Bis zu ihrer Verwendung werden das RPMI-1640-Medium bei 4°C; FCS, PS und DMSO bei -20°C gelagert.

2.2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung der Tumorzellen

Die Tumorzelllinien werden in einem mit Wasserdampf gesättigten Brutschrank in 5% CO₂ bei 37°C in Dauerkultur gehalten. Ein Mediumwechsel mit Dauerkulturmedium sowie die Subkultivierung erfolgen einmal wöchentlich.

Bei den adhärent wachsenden Zellen wird dabei zuerst das verbrauchte Dauerkulturmedium abgezogen. Anschließend wird der Boden der Zellkulturflasche mit 10 ml frischem Dauerkulturmedium überspült, sodass sich ca. 50% der Zellen ablösen. Das Gemisch aus frischem Medium und abgelösten Zellen wird in eine neue Zellkulturflasche überführt (sog. Passagenwechsel). Zuletzt werden beide Zellkulturflaschen auf 20 ml mit frischem Dauerkulturmedium aufgefüllt.

Bei den in Lösung wachsenden Zelllinien entfällt der Schritt des Mediumabsaugens und des Bodenüberspülens. Von dem Gemisch aus Zellen und verbrauchtem Medium wird die Hälfte auf eine neue Zellkulturflasche überführt und beide Zellkulturflaschen anschließend auf 20 ml mit frischem Dauerkulturmedium aufgefüllt. Eine Woche vor Versuchsbeginn werden die adhärent wachsenden Zelllinien nach Passagenwechsel mit Kulturmedium kultiviert und auf mehrere Zellkulturflaschen expandiert. Vier Tage später erfolgt ein reiner Mediumwechsel ohne Subkultivierung. Die in Lösung wachsenden Tumorzelllinien werden eine Woche vor Versuchsbeginn einmal für 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert, um sie anschließend mit Kulturmedium zu resuspendieren und auf mehrere Zellkulturflaschen zu expandieren. Vier Tage später erfolgt wie oben beschrieben ein Passagenwechsel mit Kulturmedium.

2.2.1.2 Trypsinieren der Tumorzellen

Die adhärent wachsenden Tumorzellen werden nach folgendem Schema vorbereitet: Zuerst wird das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche abgezogen. Anschließend werden die Zellen einmal kurz mit 10 ml Phosphat-buffered-suline (PBS) überspült, um restliche Spuren von Medium und FCS auszuwaschen. Medium und FCS wirken inhibierend auf das Trypsin- EDTA. Das PBS wird sofort wieder abpipettiert. Die Zellen werden jetzt unter Sichtkontrolle solange mit 6 ml Trypsin- EDTA inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst haben. Zu dem Gemisch aus Zellen und Trypsin- EDTA wird, zur Inhibition des Trypsins, Kulturmedium im Verhältnis 1:3 hinzugegeben. Die Zellsuspension wird in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Die in Lösung wachsenden Tumorzellen werden ohne vorherige Trypsinierung zentrifugiert.

Nach Abziehen des Überstandes, kann mit den Zellen nach Bedarf weitergearbeitet werden.

2.2.1.3

Einfrieren und Auftauen der Tumorzellen

Um die Tumorzellen einfrieren zu können, müssen sie zunächst trypsinisiert und anschließend zentrifugiert werden (vgl. 2.2.1.2.). Die in Lösung wachsenden Zelllinien können direkt zentrifugiert werden.

Nach Abziehen des Überstandes wird das Zellsediment mit 1 ml Einfriermedium resuspendiert und anschließend in ein markiertes Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellsuspension erfolgt zunächst schonend mit Handwärme. Im zweiten Schritt werden 19 ml Kulturmedium bereitgestellt. Davon werden wenige ml zur Herauslösung der Zellen aus dem Einfrierröhrchen verwendet. Die gelösten Zellen werden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und das restliche Kulturmedium hinzugefügt. Um das zellschädigende DMSO zu entfernen wird nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen der Überstand abpipettiert, das Zellsediment mit 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturflasche überführt.

Am folgenden Tag sollte ein Mediumwechsel erfolgen, um verbleibende DMSO-Spuren zu entfernen.

2.2.2

Zellzahlbestimmung

Nach Trypsinierung und Zentrifugation der Tumorzellen (vgl. 2.2.1.2.) wird das Zellsediment mit einem Milliliter Kulturmedium resuspendiert. 20 μ l Zellsuspension werden mit 20 μ l Trypanblau gemischt und in eine Neubauer- Zählkammer gefüllt. Die Zellen werden unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei sich die toten Zellen blau anfärben, da das Trypanblau ihre Zellmembran durchdringen kann. Die Zellzahl in einem Quadranten (16 große Quadrate) multipliziert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

Die Zellen werden durch Zugabe der entsprechenden Menge Kulturmedium auf eine Zellzahl von 1×10^6 eingestellt.

2.2.3

Gasexposition

In diesem Versuch werden die Zelllinien mit vier unterschiedlichen Gasen bzw. Gasgemischen inkubiert:

- 1.) 5% Kohlenstoffdioxid [CO₂], 95% Raumluft (78,08% Stickstoff [N₂], 20,95% Sauerstoff [O₂], 0,93% Argon [Ar], 0,03% Kohlenstoffdioxid [CO₂): Dies entspricht dem im Standard- Zellkulturbrutschrank vorherrschendem Gasgemisch und dient in diesem Versuch als Kontrollansatz.
- 2.) 100% Kohlenstoffdioxid
- 3.) 100% Helium
- 4.) 100% Raumluft (Zusammensetzung: vgl.1.)

Die eigentliche Inkubation der Tumorzelllinien wird auf folgende Weise durchgeführt:

- 1.) Die 96-Loch-Mikrotiterplatten des Kontrollansatzes werden ohne weitere Veränderung in dem oben beschriebenen Standard- Zellkulturbrutschrank belassen.
- 2.) Die Gasexposition der entsprechenden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit 100% Kohlenstoffdioxid erfolgt innerhalb der obig beschriebenen eigens gebauten Gasinkubationskammer.
- 3.) Die Gasexposition der entsprechenden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit 100% Helium erfolgt in dem hierfür verwendeten Exikator.
- 4.) Die Gasexposition der entsprechenden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit Raumluft erfolgt in einem gesonderten Zellkulturbrutschrank.

Nach Einstellung der 100%-tigen Gaskonzentrationen werden die eigens angefertigte Gasinkubationskammer sowie der Exikator ebenfalls bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit werden die 96-Loch-Mikrotiterplatten aus den Zellkulturbrutschränken und Gasinkubationskammern entnommen.

Während der zweistündigen Gasexposition wurde eine ausreichende Luftfeuchtigkeit in den Expositionskammern durch Bedeckung des Kammerbodens mit Aqua dest. bzw. durch optimale Einstellung an den Zellkulturschränken gewährleistet. Auf ein zügiges Umsetzen der 96-Loch-Platten ohne relevante Temperaturverluste wurde geachtet.

Um das Entweichen von Kohlenstoffdioxid und Helium aus der Expositionskammer und dem Exikator zu vermeiden, wurden Zufluss- sowie Abflussweg nach der Gasexposition mehrfach abgeklemmt und die Kammerdeckel durch eine spezielle Abdichtungssilikonpaste sowie ein geeignetes Abklebeband (vgl. 2.1.2.) sicher abgedichtet.

Es wurde darauf geachtet alle 96- Loch- Platten während des Versuches gleich zu behandeln.

Bei allen Versuchen reproduzierbar konnte ein Farbumschlag des Mediums von rot-violett nach gelb-orange nach der Gasexposition beobachtet werden. Dies gilt nicht für die Ansätze mit alleiniger Raumluft, hier veränderte sich die Farbe des Mediums nicht.

2.2.4 Proliferationstest (MTT)

2.2.4.1 Ansetzten der Testreagenzien

MTT- Reagenz:

- 5 mg/ml in PBS lösen
- Lösung sterilfiltrieren
- bei 4°C dunkel aufbewahren
- vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmen

Abstoppreagenz:

- 500 ml Aqua dest.
- 500 ml DMF (N,N, Dimethylformamid)
- 5 % w/v (50 g/1000 ml) SDS (Sodium dodecyl sulfate)
- pH 4,7 durch Zugabe von 2% Essigsäure v/v einstellen
- bei 4 °C dunkel lagern
- vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmen

2.2.4.2 Methodik

Der MTT- Proliferationstest ist ein qualitativ kolorimetrischer Test. Er dient der Detektion der metabolischen Aktivität von vitalen Zellen.

Im MTT- Assay wird die Aktivität des Succinat- Dehydrogenase Komplexes gemessen, der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Das den Zellen angebotene MTT (3-[4,5- dimethylthiazol- 2- yl]-2,5- diphenyl tetrazolium bromid) dringt ohne toxische Effekte in die Zellen ein und wird von den Mitochondrien vitaler Zellen unter Reduktion der Energieträger NADH und NADPH zu wasserunlöslichen Formazankristallen umgebaut. Diese Reaktion wird nur von lebenden Zellen katalysiert und ist direkt proportional zur Zellzahl. Die Größe der Kristalle ist damit abhängig vom Zellmetabolismus bzw. der Zellaktivität und der Inkubationszeit.

Zur Detektion werden die Zellen lysiert, gleichzeitig bewirkt das Abstoppreagenz, dass die gebildeten Formazankristalle wieder in Lösung gehen. Es erfolgt dabei ein Farbumschlag nach blau-violett. Die resultierende Farblösung wird in einem Spektrophotometer (ELISER Reader) bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

In den Standardprotokollen wird eine Zellzahl von 1.000 bis 100.000 Zellen pro Loch empfohlen. In dieser Arbeit wurde für alle Zelllinien dieselbe Zellzahl von 50.000 Zellen (5×10^4) pro Loch gewählt, um sie bei Auswertung und Interpretation besser vergleichen zu können.

Reduktion von MTT zu Formazan

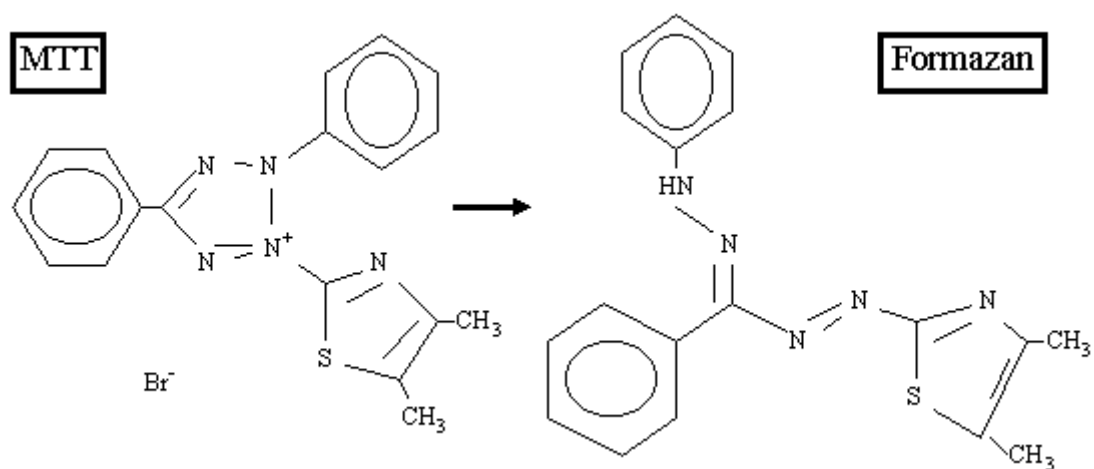


Abbildung 1

2.2.4.3

Durchführung

Für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens der einzelnen Tumorzelllinien wird jeweils vor der eigentlichen Gasexposition, direkt nach der Gasexposition sowie im Folgenden alle 24 Stunden der MTT Test durchgeführt.

Zeitschema:

Zellzahlbestimmung/ Zellaussaat - Kultivierung für 24 h - **t0** Messung - Gasexposition für 2 h - **t1** Messung - **t2** Messung - ... - **t7** Messung

Die Zellen werden mit einem Volumen von 200 µl und einer Zellzahl von 5x10⁴ pro well in sterile 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät.

Dies erfolgt für jede Zelllinie nach folgendem Schema in vierfacher Ausführung, da mit vier Gasen/Gasgemischen gearbeitet wird (vgl. 2.2.3.):

		direkt nach der Gasexposition (t1)	nach 24 h (t2)	nach 48 h (t3)	nach 72 h (t4)	nach 96 h (t5)	nach 120 h (t6)	nach 144 h (t7)			
		X	X	X	X	X	X	X			
		X	X	X	X	X	X	X			
		X	X	X	X	X	X	X			
		X	X	X	X	X	X	X			
		X	X	X	X	X	X	X			
		BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL			

Tabelle 2

X: Zellen [200 µl, 5x 10⁴ Zellen in 1640 Medium (10% FCS; 5% PS)]

BL: Blindwert [200 µl 1640 Medium (10% FCS; 5% PS)]

Hinzu kommt eine 96-Loch-Mikrotiterplatte für den MTT Ansatz zum Zeitpunkt t0 (= vor der Gasexposition):

Beispiel:

	Zelllinie A vor der Gasexposition (t0)	Zelllinie B vor der Gasexposition (t0)	Zelllinie C vor der Gasexposition (t0)	Zelllinie D vor der Gasexposition (t0)						
	X	X	X	X						
	X	X	X	X						
	X	X	X	X						
	X	X	X	X						
	X	X	X	X						
	BL	BL	BL	BL						

Tabelle 3

X: Zellen [200 μ l, 5x 10⁴ Zellen in 1640 Medium (10% FCS; 5% PS)]

BL: Blindwert [200 μ l 1640 Medium (10% FCS; 5% PS)]

Die nicht belegten Löcher der Mikrotiterplatten werden mit 200 μ l Aqua dest. befüllt.

Die Ansätze werden anschließend für 24 Stunden in dem oben beschriebenen Standard- Zellkulturbrutschrank bei 37°C kultiviert.

Nach Ablauf der 24 Stunden wird zunächst das MTT- Assay zum Zeitpunkt t0 gestartet. Hierfür werden die 96-Loch-Mikrotiterplatte mit den Ansätzen, die Zellen und Blindwerte zur Proliferationsmessung vor der Gasexposition enthalten, verwendet.

Bei den zu messenden Zellen und Blindwerten werden je Loch 100 μ l Medium, nach vorheriger fünfminütiger Zentrifugation der Mikrotiterplatte bei 1200 Umdrehungen, abgezogen und 10 μ l MTT- Lösung hinzupipettiert. Danach wird die Mikrotiterplatte für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l Abstoppreagenz je Loch wird der Test beendet.

Der Test wird an dieser Stelle unterbrochen, indem die Mikrotiterplatte direkt bei -20°C eingefroren wird.

Parallel erfolgt die Gasinkubation der Tumorzellen (vgl. Punkt 2.2.3.).

Nach Ablauf der zweistündigen Gasexposition wird unverzüglich der MTT- Test bei denjenigen Ansätzen gestartet, die Zellen und Blindwerte für die Messung direkt nach der Gasexposition enthalten. Es wird wie oben beschrieben vorgegangen:

Zentrifugation, Start durch Zugabe des MTT- Reagenzes, Zugabe des Abstoppreagenzes und Unterbrechung des Tests durch Einfrieren der Mikrotiterplatten bei -20°C.

Die verbleibenden Testansätze werden für den weiteren Versuchsablauf bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Von nun an wird alle 24 Stunden die Proliferation mit Hilfe des MTT- Assays bei den hierfür vorgesehenen Ansätzen nach obig beschriebenem Schema gemessen.

Nach Durchführung der gesamten Proliferations- Assays, werden alle 96-Loch-Mikrotiterplatten über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ zum Auftauen inkubiert und anschließend mit dem ELISA- Reader gemessen.

Die mit dem Spektrophotomer gemessenen Werte werden direkt in Microsoft Excel® übertragen, mit dessen Hilfe der erste Schritt der Auswertung vorgenommen wird.

Für jede Zelllinie wurden für jedes Gas/Gasgemisch und für jeden Zeitpunkt (vor der Gasexposition, nach der Gasexposition, nach 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden, 96 Stunden, 120 Stunden sowie nach 144 Stunden) jeweils fünf Werte sowie ein Blindwert bestimmt (vgl. obige Tabellen und Zeitschema).

Berechnung der Ergebnisse:

1. Bestimmung des Mittelwertes aller Blindwerte
2. Subtraktion dieses Mittelwertes von allen anderen gemessenen Werten
3. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (siehe unten).

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover mit Hilfe der Software SPSS Version 14.0 (SPSS Inc., Chicago / IL)¹⁹.

Zur Berechnung wurden Kennwerte der deskriptiven Datenanalyse (Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler, 95%- Konfidenzintervall, Minimum, Maximum) berechnet.

Im nächsten Schritt wurden die Varianzanalyse (ANOVA) für jeden Messzeitpunkt mit anschließendem paarweisen Gruppenvergleich (Scheffé-Test) und die Multivariate Analyse des Zeit- und Gruppeneffekts im Allgemeinen Linearen Modell unter Berücksichtigung von Wilks' Lambda durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die Normalverteilung der Werte nach GAUSS wird bei allen Berechnungen vorausgesetzt bzw. liegt der Modellannahme zugrunde (Gaußsche Fehlerverteilung).

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Zelllinien, nach Tumorspezies gebündelt, getrennt von einander besprochen. Jede Zelllinie wurde zweimal anhand desselben Versuchsaufbaus untersucht. Zur Darstellung kommt hier exemplarisch die jeweilige zweite Versuchsreihe einer jeden Zelllinie.

In den abgebildeten Graphiken sind die acht Messzeitpunkte auf der X- Achse und die Extinktionswerte auf der Y-Achse aufgeführt. Der Maßstab der Extinktionswerte wurde bewusst nicht einheitlich gewählt, um eine optisch bessere Darstellung für jede einzelne Zelllinie zu gewährleisten.

3.1 Neuroblastomzelllinien

Direkt nach der zweistündigen Gasexposition weisen alle Neuroblastomzelllinien eine deutliche Verminderung der mitochondrialen Aktivität sowohl des Kontrollansatzes als auch der weiteren drei Testgase auf.

Die Zelllinien SK-N-BE 2, SK-N-BE 2c, SK-N-SH sowie SH-IN zeigen bereits nach 24 Stunden einen Aktivitätsanstieg aller vier Ansätze, wohingegen bei den Zelllinien SH-SY-5Y, SK-N-AS, SK-N-BE M17 und IMR 32 erst nach 48 Stunden eine vermehrte mitochondriale Aktivität nachweisbar ist. Bei allen acht Zelllinien verläuft der Graph des Kontrollansatzes nahezu parallel zu denen der drei Testgase.

SH-SY5Y

MW
OD (570 nm)

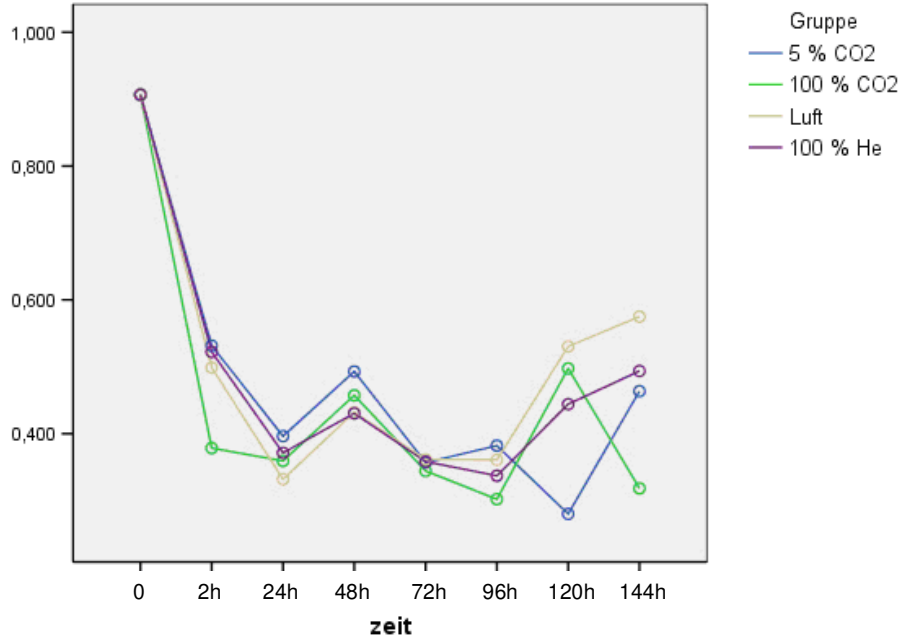


Abbildung 2

SK-N-AS

MW
OD (570 nm)

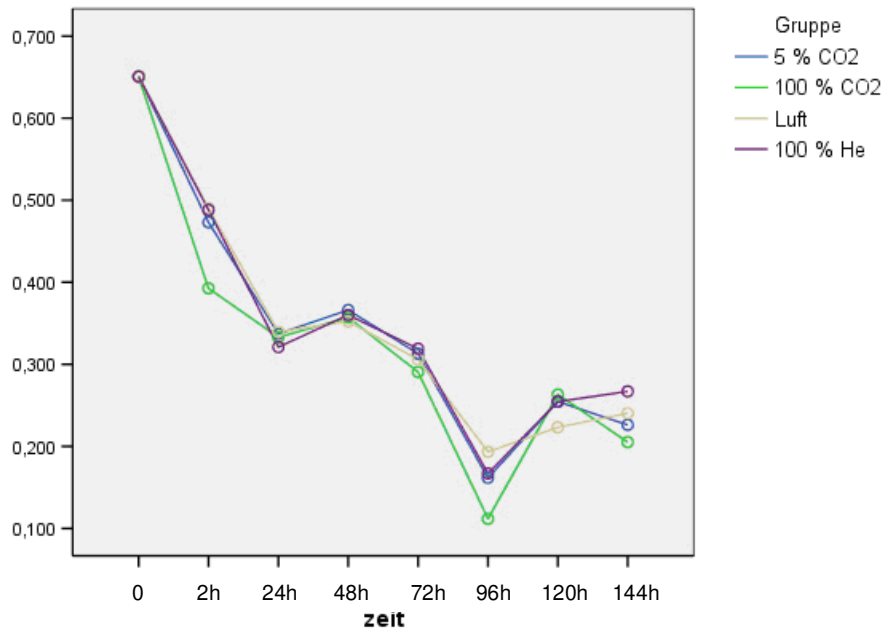


Abbildung 3

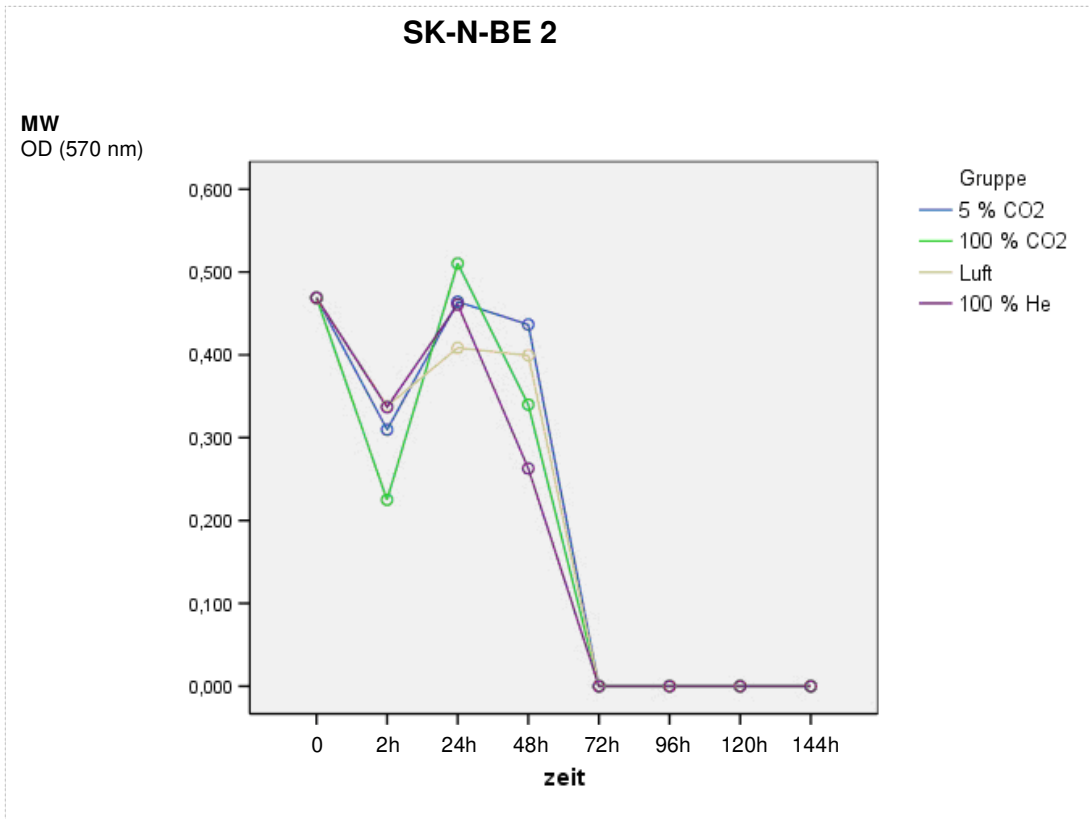


Abbildung 4

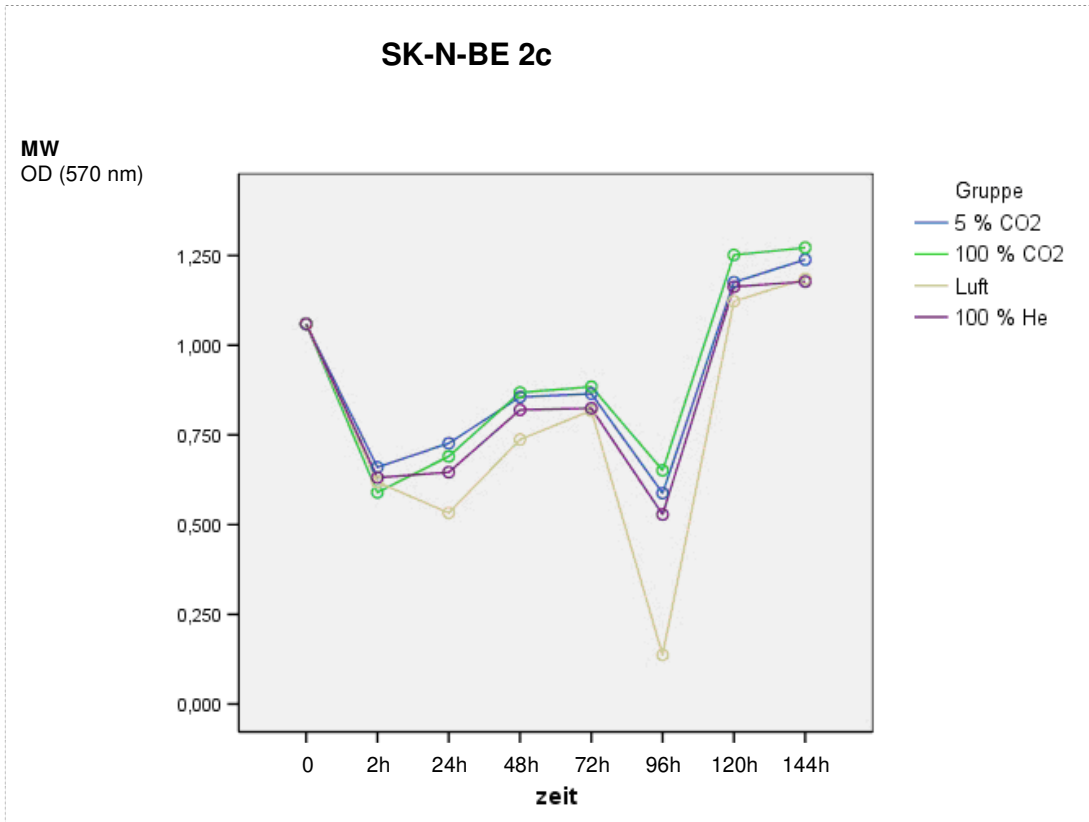


Abbildung 5

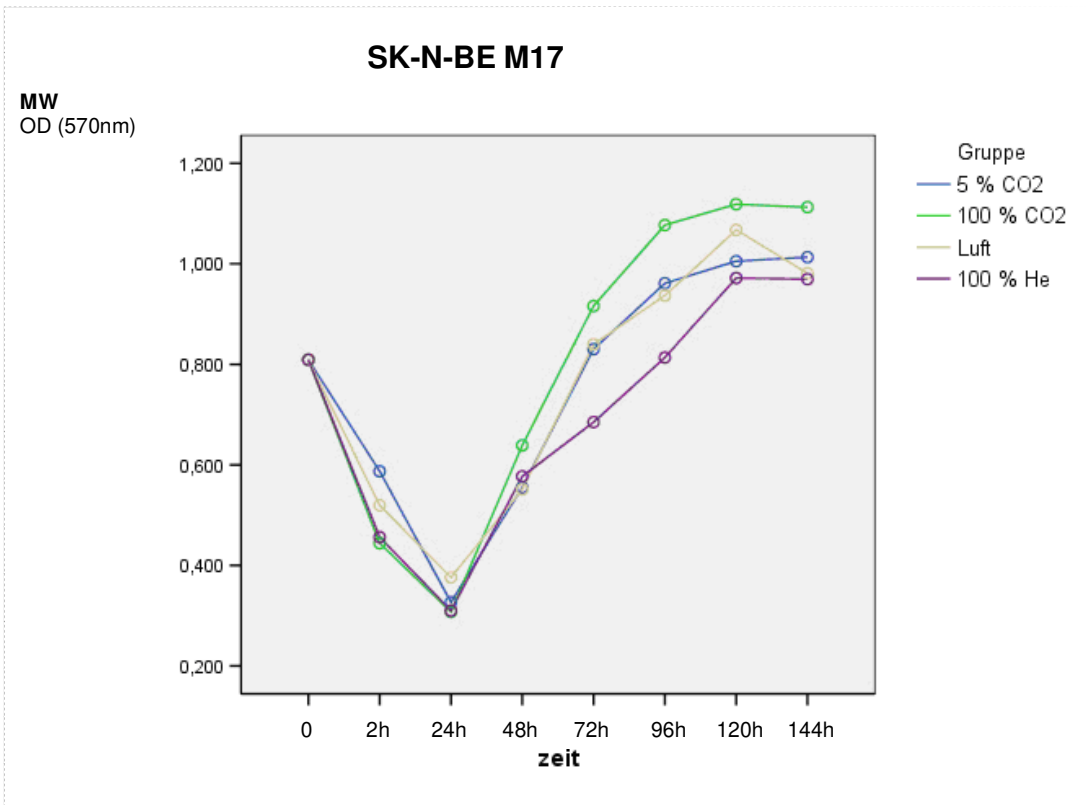


Abbildung 6

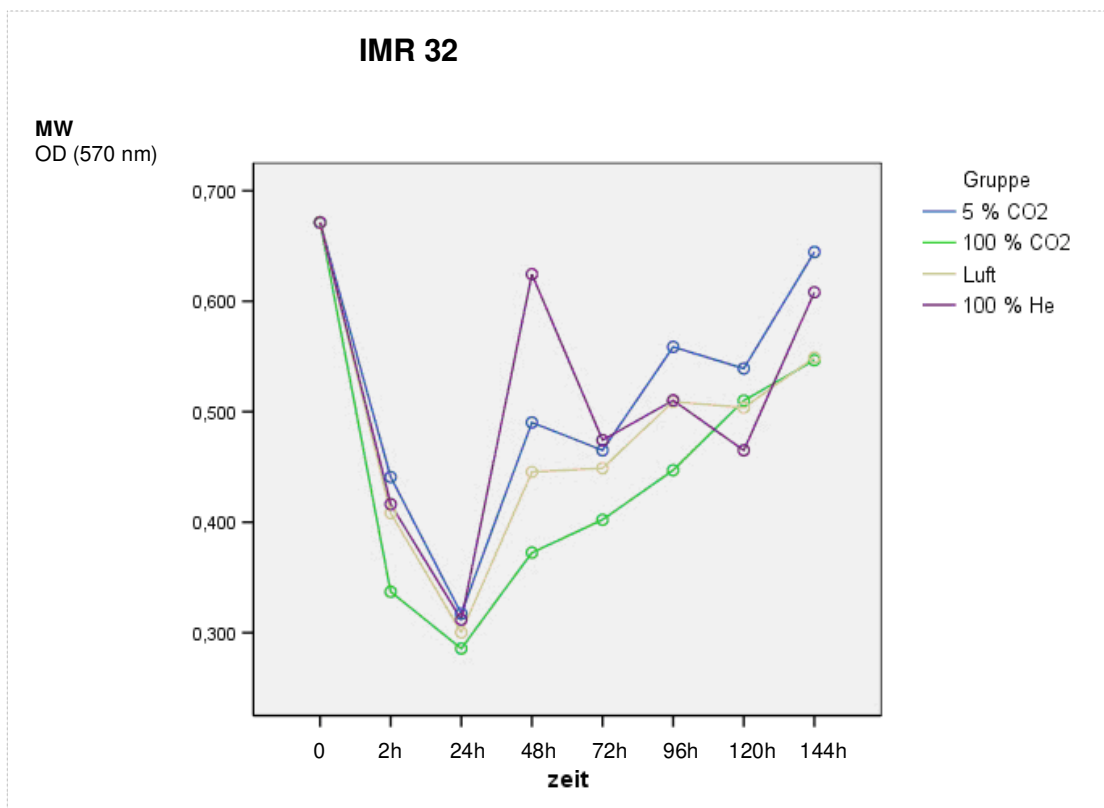


Abbildung 7

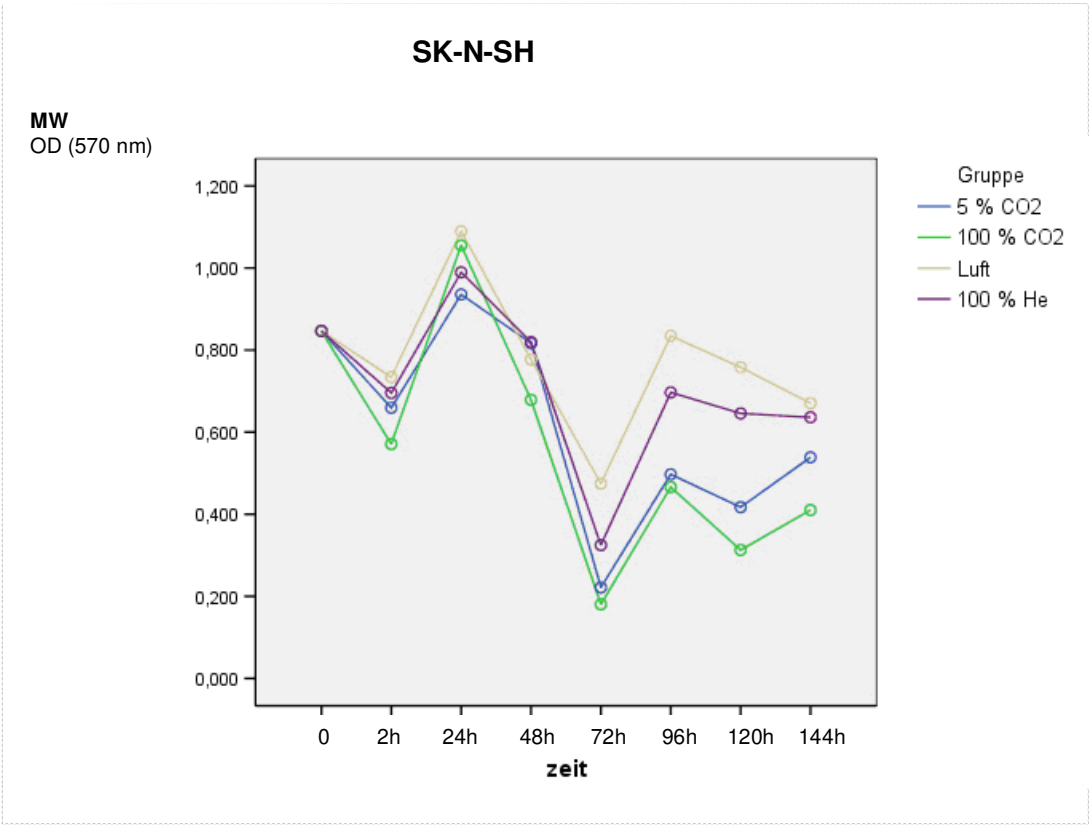


Abbildung 8

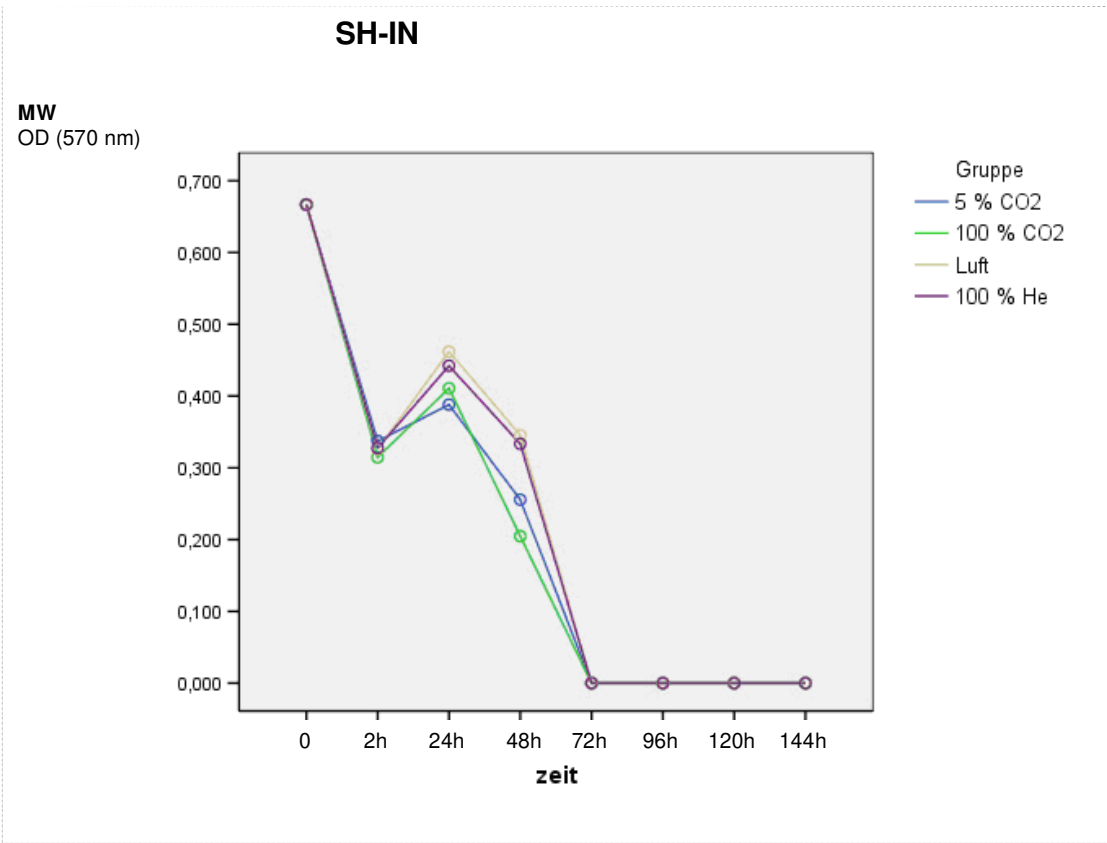


Abbildung 9

Im weiteren Verlauf erreichen SK-N-BE 2c, SK-N-BE M17, IMR 32 und SK-N-SH in allen vier Ansätzen den Ausgangswert oder überschreiten diesen.

Die Zelllinien SK-N-BE 2c, SK-N-BE M17 sowie IMR 32 zeigen ausgehend von ihrem Aktivitätsminimum nach 24 bzw. 48 Stunden eine kontinuierliche Aktivitätszunahme bis zum Ende des Versuches. Im Gegensatz dazu ist bei SK-N-BE 2 und SH-IN nach 72 Stunden keine mitochondriale Aktivität mehr nachweisbar.

Die Diagramme zeigen, dass die Graphen aller Testansätze inklusive des Kontrollansatzes, von einigen Ausreißern abgesehen, parallel verlaufen. Dies ist bei allen acht Zelllinien der Fall.

Die Wahl des Gases besitzt bei der Exposition keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität der Zellen dieser acht Neuroblastomzelllinien.

3.2 Hepatoblastomzelllinien

Die Hepatoblastomzelllinien Hep G2 und Hep Huh6 zeigen ebenfalls direkt nach der zweistündigen Gasexposition eine deutliche Verminderung der mitochondrialen Aktivität aller vier Ansätze; bei Hep Huh6 noch stärker und homogener ausgeprägt, als bei Hep G2.

Nach 24 Stunden hat die Aktivität bei Hep G2 nahezu und bei Hep Huh6 vollständig das Ausgangsniveau erreicht. Beide Zelllinien durchlaufen ihr Aktivitätsmaximum 48 Stunden nach der Gasexposition. Im weiteren Verlauf, nimmt, sowohl bei Hep G2 als auch bei Hep Huh6, die mitochondriale Aktivität, nach einem geringen Wideranstieg zum Messpunkt 96 Stunden, bis zum Versuchende stetig ab.

Die untersuchten Hepatoblastomzelllinien weisen, wie bei den oben beschriebenen Neuroblastomen, einen tendenziell ähnlichen, wenn nicht sogar parallelen Verlauf der Graphen sowohl des Kontrollansatzes als auch der drei Testansätze auf.

Auch bei den beiden Hepatoblastomzelllinien besitzt die Wahl des Gases bei der Exposition keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität der Zellen.

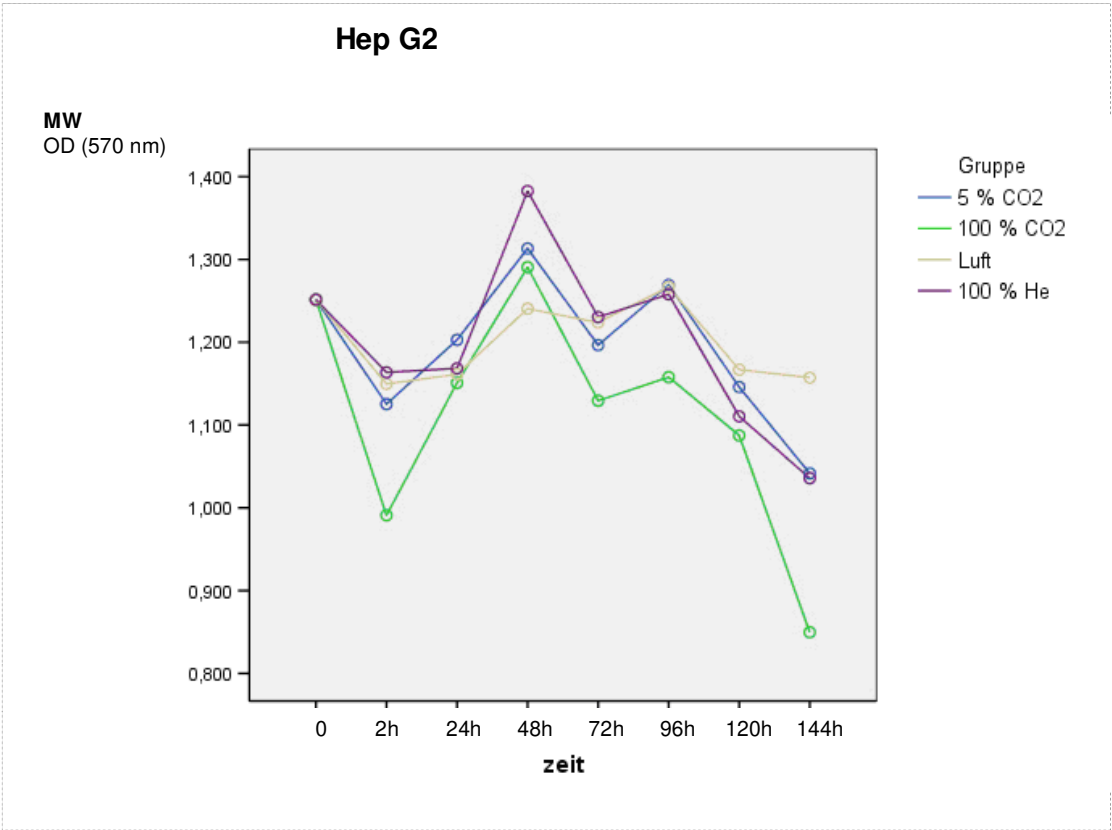


Abbildung 10

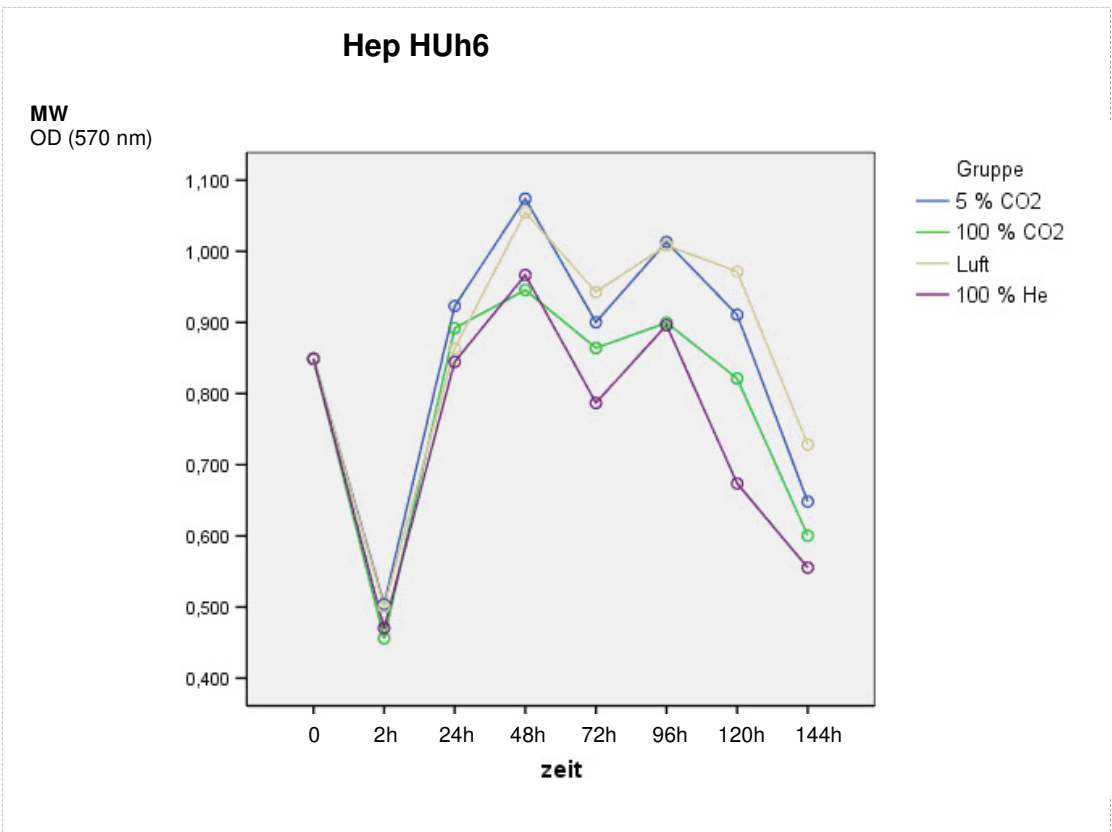


Abbildung 11

3.3

Lymphomzelllinien

Sowohl bei DAUDI als auch bei U 937 besteht ein annähernd paralleler Verlauf der Graphen des Kontrollansatzes und der drei Testgase.

Sie zeigen beide direkt nach der zweistündigen Gasexposition eine verminderte mitochondriale Aktivität aller vier Ansätze. Allein der Kontrollansatz von U 937 weist eine leichte Aktivitätssteigerung auf.

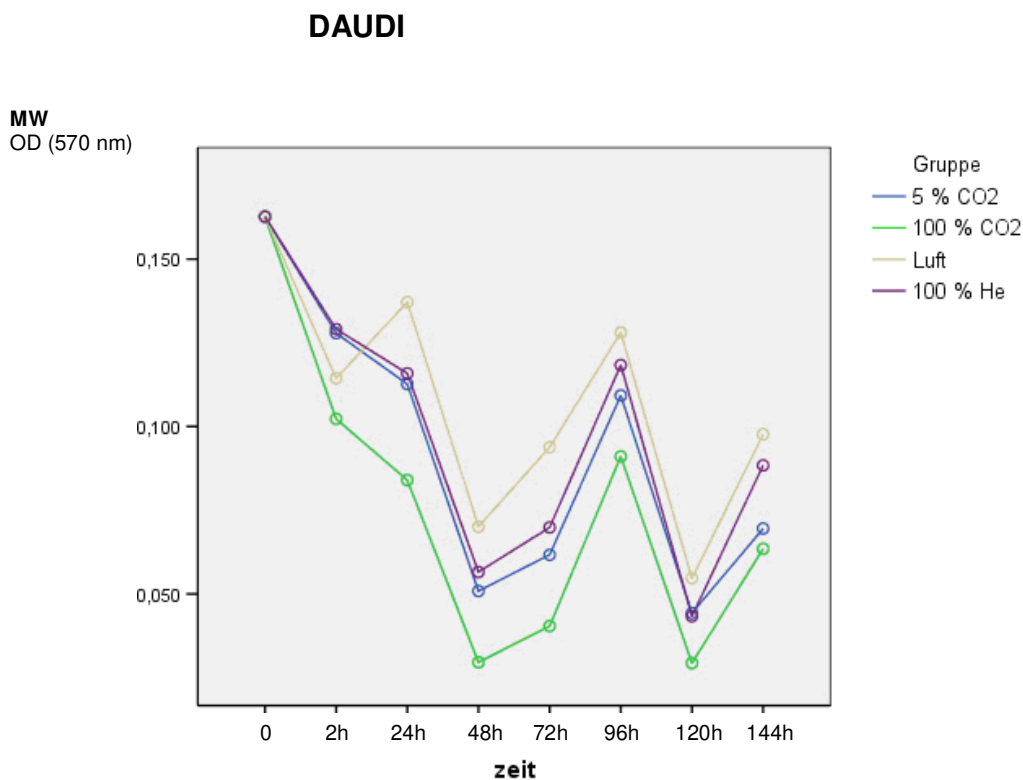


Abbildung 12

Die Zelllinie DAUDI zeigt einen stetigen Aktivitätsabfall bis 48 Stunden nach der Gasexposition und weist ein Aktivitätsmaximum nach 96 Stunden auf, bevor die mitochondriale Aktivität nach 120 Stunden erneut abfällt. Am letzten Messpunkt nach 144 Stunden steigt sie noch einmal an.

U 937 zeigt nach dem Aktivitätsknick direkt nach der zweistündigen Gasexposition eine stetige Aktivitätszunahme bis zum Messpunkt nach 72 Stunden. Im weiteren Verlauf sinkt die mitochondriale Aktivität bis zum Messpunkt nach 120 Stunden ab und steigt, ähnlich wie bei DAUDI, nach 144 Stunden noch einmal an.

Der annähernd parallele Verlauf der Graphen im Laufe des Versuches zeigt, dass die mitochondriale Aktivität der beiden Lymphomzelllinien, wie bei den Neuro- und Hepatoblastomen, nicht von der Wahl des Gases bei der Exposition beeinflusst wird.

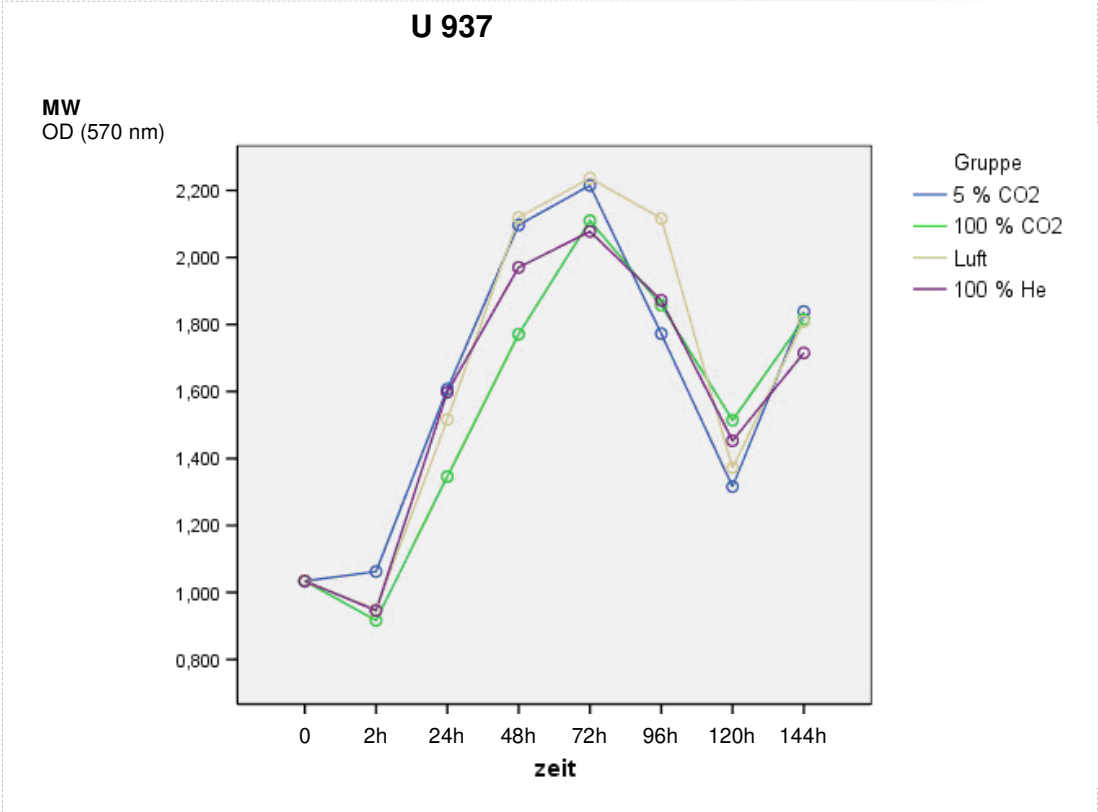


Abbildung 13

3.4

Rhabdomyosarkomzelllinie

Die Rhabdomyosarkomzelllinie TE 671 weist, im Gegensatz zu den bisher besprochenen Zelllinien, eine stetig steigende mitochondriale Aktivität aller vier Ansätze bis 96 Stunden nach der Gasexposition auf. Allein der Ansatz 100% Helium zeigt direkt nach der Gasexposition eine verminderte Aktivität.

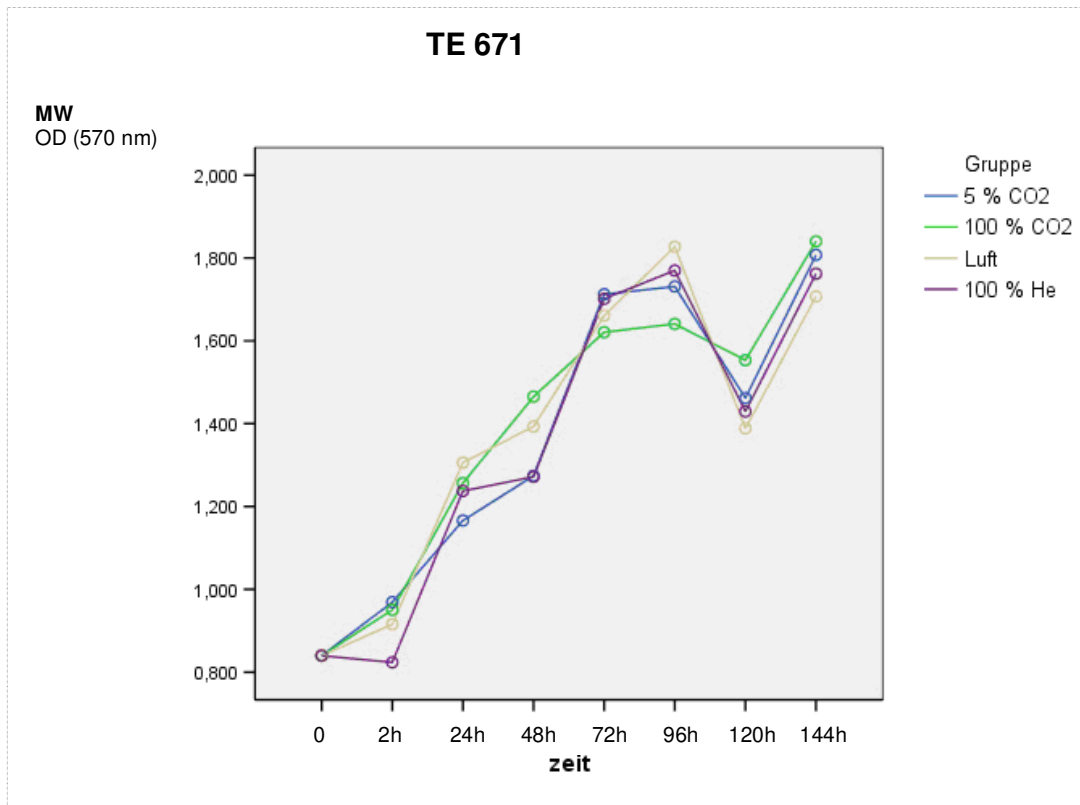


Abbildung 14

Ähnlich wie bei den Lymphomen besteht ein Aktivitätsknick nach 120 Stunden mit einem Wideranstieg zum letzten Messzeitpunkt nach 144 Stunden.

Auffällig ist der nahezu deckungsgleiche Verlauf von Kontrollansatz und Testgasen. Dies zeigt erneut, dass die Wahl des Gases keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität dieser Zelllinie nimmt.

3.5

Akute myeloische Leukämiezelllinie

Die Leukämiezelllinie KG 1A weist direkt nach zweistündiger Gasexposition lediglich eine verminderte mitochondriale Aktivität bei dem Testgas 100% Kohlenstoffdioxid auf.

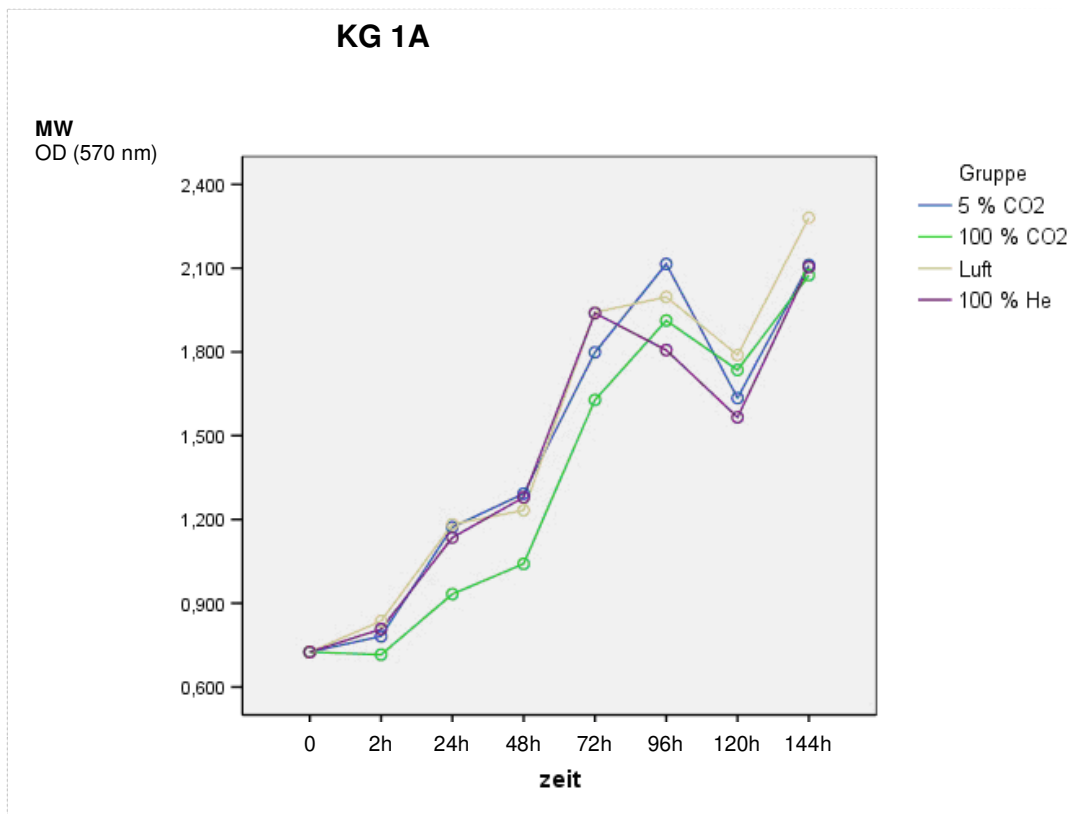


Abbildung 15

Im weiteren Verlauf, steigt die Aktivität aller Ansätze bis auf ein Maximum zum Messpunkt nach 96 Stunden, bzw. bei 100% Helium schon nach 72 Stunden, an.

Wie auch schon bei den Lymphomen und dem Rhabdomyosarkom zeigen sich ein Aktivitätsknick nach 120 Stunden und ein Wideranstieg am letzten Messzeitpunkt nach 144 Stunden gleichmäßig bei Kontrollansatz und Testansätzen.

Auffallend ist erneut der parallele Verlauf aller vier Graphen, der ein Hinweis darauf ist, dass die Wahl des Gases die mitochondriale Aktivität der Zellen nicht beeinflusst.

Nach Betrachtung der Zelllinien im Einzelnen fällt auf, dass alle Zelllinien direkt nach der zweistündigen Gasexposition eine Verminderung der mitochondrialen Aktivität vom Ausgangswert bei allen Testgasen und dem Kontrollansatz aufweisen (gilt mit Einschränkungen für U 397, TE 671 und KG 1A; siehe oben). Dies ließ sich auch in der, hier graphisch nicht dargestellten, ersten Versuchreihe einer jeden Zelllinie nachweisen.

Des Weiteren verlaufen die Graphen der Mittelwerte in allen Fällen, auch die der ersten Versuchreihe, annähernd parallel. Wie oben bereits mehrfach erwähnt, zeigt dieses Verhalten, dass die Wahl des Gases keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität aller in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien nimmt.

Die nach der Berechnung zu beobachtenden Unterschiede einzelner Gase untereinander erlauben keine Aussage über ein spezifisches Verhalten der jeweiligen Zelllinie. Diese Unterschiede lassen sich weder reproduzierbar einem Messzeitpunkt noch einem der Testgase zuordnen; ein weiterer Hinweis darauf, dass die Wahl des Gases für die mitochondriale Aktivität unerheblich ist.

Auffällig ist lediglich, dass bei den Zelllinien SH-SY-5Y, SK-N-AS, SK-N-BE 2, IMR 32 und Hep G2 direkt nach der zweistündigen Gasexposition sowie bei KG 1A und DAUDI 24 Stunden nach der Gasexposition der Messwert von 100% Kohlenstoffdioxid signifikant ($p < 0,05$) unter denen des Kontrollansatzes, 100% Helium und Raumluft liegt. Bereits 24 Stunden später zeigt sich jedoch keine signifikante Abweichung der Werte mehr. Es besteht zudem keine Einheit hinsichtlich der Tumorspezies: Nur vier von acht Neuroblastom-, eine von zwei Hepatoblastom- und eine von zwei Lymphomzelllinien sowie die Rhabdomyosarkom- und die Leukämiezelllinie zeigen die statistisch errechnete Verminderung der Proliferation zu Beginn des Versuches.

Wie bereits erwähnt, zeigen alle untersuchten Zelllinien (mit Ausnahme U 397, TE 671 und KG 1A) direkt nach der zweistündigen Gasexposition eine Verminderung der mitochondrialen Aktivität. Die einmalige signifikante Verminderung der genannten Werte von 100% Kohlenstoffdioxid bei den entsprechenden Zelllinien ändert daher nichts an der Aussage der Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Wahl des exponierten Gases keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien nimmt.

4 Diskussion

Das Ziel der Arbeit ist es, das Proliferationsverhalten maligner, gehäuft im Kindesalter auftretender Tumore nach Exposition mit Kohlenstoffdioxid, Helium und Raumluft innerhalb eines vorgegebenen in vitro Modells anhand eines Parameters, der mitochondrialen Aktivität der Zellen, zu untersuchen.

Die Fragestellung, in wie weit die Exposition der pädiatrischen Tumorzellen mit den genannten Gasen die Zellproliferation beeinflusst, ergibt sich vor dem Hintergrund, dass die minimal invasive Chirurgie in der Onkologie zunehmend zum Einsatz kommt, ohne ihre Auswirkungen auf den Organismus und die Tumorzellbiologie detailliert zu kennen.

Auf die Operationsmethode zurückzuführende Probleme sind beispielsweise Störungen des kardiovaskulären⁶ und respiratorischen⁷ Systems sowie Störungen der zerebralen⁸, gastrointestinalen⁹ und renalen¹⁰ Durchblutung.

Eine weitere schwerwiegende Problematik der minimal invasiven Chirurgie beruht auf Berichten zum postoperativen Auftreten von Metastasen und von Tumorrezidiven nach Operationen onkologischer Patienten.²⁰ Beides findet bislang noch keine ausreichende Erklärung.

Rückblickend standen zu Beginn der wissenschaftlich orientierten Chirurgie zunächst technische Neuerungen im Vordergrund. Die pathophysiologischen Auswirkungen dieser Neuerungen auf den Gesamtorganismus blieben sekundär.

Mit der Entwicklung und Ausführung der Narkose 1846 durch Morton und der Einführung der antiseptischen und aseptischen Disziplin, vorangetrieben vor allem durch Semmelweis und Lister, Ende des 19. Jahrhunderts, wurde das Risiko der postoperativen Morbidität und Mortalität in bemerkenswerter Weise verringert und die letzten Hindernisse hinsichtlich einer systematischen Entwicklung der operativen Chirurgie aus dem Weg geräumt.²¹

Besonders hervorzuheben sind auch die operationsspezifischen Erkenntnisse in der Thorax- und Neurochirurgie. Die speziellen Druckverhältnisse im Brustkorb verlangten zuerst einmal die Ausschaltung des operativen Pneumothorax, dessen Lösung in Form der Intubationsnarkose und der Heberdrainage dem Verdienst von

Sauerbruch zuzuschreiben ist, wohingegen die operativ-technischen Fortschritte der Neurochirurgie vor allem durch Cushing mit seinen Experimenten über den Hirndruck vorangetrieben wurden.²²

Es entstand eine disziplinierte Organisation des operativen Aktes mit einer wachsenden Anzahl technischer Möglichkeiten. Die Anfänge physiologischer Betrachtung operativer Probleme wurden im ersten Jahrzehnt des vorherigen Jahrhunderts nur zögernd und zunächst ohne stärkere Resonanz gemacht.²³ Es war jedoch ein großer Fortschritt die funktionellen Rückwirkungen der Operation einer wissenschaftlichen Analyse zu unterziehen. Die Entwicklungsphase technisch chirurgischer Eingriffsmöglichkeiten findet um 1920 einen vorläufigen Abschluss. Neue Errungenschaften lagen nicht mehr auf operativ-technischem Gebiet. Das Interesse chirurgischer wissenschaftlicher Forschung bewegte sich mehr in das weite Feld der Grundlagenforschung, die für das Verständnis der Auswirkungen operativer Eingriffe von immenser Bedeutung gewesen ist.

Zunächst noch gegenstandsbezogen, d.h. an einer wahrnehmbaren gegebenen Problemstellung orientiert, ist die medizinische Forschung, wie in der Einleitung bereits erwähnt, heute zunehmend durch die Fortschritte der Technologien bestimmt.⁵ Es entsteht der Eindruck, als würden die Erkenntnismöglichkeiten das Erkenntnisinteresse bestimmen und nicht umgekehrt.

Minimal invasive Eingriffe stellen eine der jüngsten großen technischen Veränderungen chirurgischer Operationsmöglichkeiten dar.

Dabei lässt sich die Idee der Laparoskopie bereits bis auf den Araber Albulassim im 10. Jh. zurückführen. Dieser versuchte durch die Reflexion des Sonnenlichtes Körperhöhlen auszuleuchten. Auf der Weiterentwicklung des Lichtleiters` 1805 durch Philip Bozzini²⁴ baute schließlich der französische Chirurg Antoine Jean Désormeaux²⁵ auf, der auch als Vater der Endoskopie angesehen wird.

1874 stellte Stein²⁶ das Photoendoskop` vor, wodurch Befunde dokumentiert und mit Kollegen besprochen werden konnten. Zur gleichen Zeit entwickelte Maximilian Nitze²⁷ in Dresden ein Endoskop mit Glühbirne an der Spitze. Bis zu diesem Zeitpunkt dienten all diese endoskopischen Neuentwicklungen ausschließlich der Diagnostik urologischer Krankheitsbilder. Erst später etablierte sich die Laparoskopie auch in der Inneren Medizin als diagnostische Methode. Verfechter und Vorreiter war

hier der deutsche Gastroenterologe Heinz Kalk²⁸, welcher die 135°-Optik entwickelte und das Verfahren mit zwei Trokarzugängen standardisierte.

Veress²⁹ entwickelte 1938 die noch heute in modifizierter Art eingesetzte Punktionsnadel.

1933 erfolgte schließlich der erste therapeutische Eingriff mit dem Ziel der Adhäsiole durch Fervers³⁰, der auch erstmals Kohlenstoffdioxid anstelle von Raumluft in die Bauchhöhle insufflierte. In den folgenden Jahrzehnten diente die therapeutische Laparoskopie hauptsächlich der Gynäkologie zur Tubensterilisation, während die Viszeral- und Thorakalchirurgen dieses Verfahren als unsicher und unchirurgisch bezeichneten.

In Deutschland wurde die gynäkologische Laparoskopie 1955 auf Universitätsebene vorgestellt, doch aufgrund einiger schwerer Komplikationen noch als ungeeignet abgetan. Entscheidend an der Weiterentwicklung beteiligt war der deutsche Gynäkologe Kurt Semm³¹, welcher 1964 zunächst den automatisierten Kohlenstoffdioxid-Insufflator einführte und 1980 schließlich auch die erste vollständige laparoskopische Appendektomie am Menschen durchführte. Bis Ende der 70er Jahre war die Laparoskopie soweit etabliert, dass sie 1981 in den USA in das Ausbildungsprogramm für Gynäkologen aufgenommen wurde.

Die laparoskopische Cholezystektomie wurde erstmals 1986 durch E. Mühe³² in Deutschland durchgeführt. Es folgten 1988 Périssat³³ in Bordeaux, Philippe Mouret³⁴ in Lyon, Dubois^{35, 36} in Paris sowie McKernan³⁷ und Saye³⁸ in den USA. Mit dem Erscheinen erster Publikationen 1989 wurde die laparoskopische Cholezystektomie schließlich standardisiert.

Besonders in der Abdominalchirurgie waren bis dahin grundsätzliche Neuerungen technischer Natur kaum zu verzeichnen. Erstmals steht in der Chirurgie und somit auch in der chirurgischen Onkologie mit der minimal invasiven Technik wieder eine überwiegend methodische Fragestellung im Vordergrund. Wie schon zu Beginn der chirurgischen Forschung kommt dabei eine neuartige Technik zum Einsatz, ohne ihre physiologischen Auswirkungen im Detail zu kennen.

In der Tumorchirurgie wurde nach laparoskopischen Eingriffen gehäuft das Auftreten von Tumorrezidiven und Metastasen beobachtet.

Hinsichtlich der postoperativen Tumorausbreitung werden die Auswirkungen der Operationstechnik und des Pneumoperitoneums, wie beispielsweise die verstärkte Verstreuung von Tumorzellen durch Manipulation am Tumorgewebe und anschließender Aerosolisierung der Zellen durch das eingebrachte Gas, die Größe des Operationstraumas und das Einführen sowie die Anzahl der Arbeitstrokare oder die direkte Kontamination der chirurgischen Instrumente mit Tumorzellen diskutiert.¹¹ Des Weiteren stehen die metabolischen Eigenschaften des verwendeten Gases, die unter anderem zu einer intraabdominellen bzw. intrathorakalen pH- Verschiebung führen können, in der Diskussion.³⁹

Wie eingangs bereits berichtet, sind die Pathomechanismen der postoperativen Tumorrezidive noch nicht aufgeklärt, dennoch kann bereits der Einsatz der minimal invasiven Chirurgie bei onkologischen Patienten beobachtet werden.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Auswirkungen des verwendeten Gases hinsichtlich der mitochondrialen Aktivität der Tumorzellen. Diese spiegelt die Aktivität der Tumorzellen wieder und ist somit ein Parameter für das Tumorstadium. Die mitochondriale Aktivität lässt sich mit dem international anerkannten MTT- Proliferationstest^{17,18} standardisiert messen und eignet sich durch die Reproduzierbarkeit der Messwerte (siehe auch Ergebnisse dieser Arbeit) gut für vergleichende Studien.

Bisherige Studien untersuchten in vivo wie in vitro die Auswirkungen einer Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid, Helium, Raumluft oder auch Xenon und Argon auf das Proliferationsverhalten maligner Zellen ausschließlich von Tumoren erwachsener Patienten. Die Ergebnisse dieser Studien sind uneinheitlich und lassen keine Aussage über die Wahl eines bestimmten Gases in der minimal invasiven Chirurgie onkologischer Patienten zu (s.u.).

Das in vitro Modell bietet gegenüber den in vivo Versuchen die Vorteile, den gesuchten Parameter unabhängig von anderen äußeren Einflussfaktoren zu untersuchen sowie für alle Versuchsansätze vergleichbare Bedingungen zu schaffen. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde der qualitativ kolorimetrische MTT- Proliferationstest^{17,18} eingesetzt. Dieser Test ermöglicht die photometrisch erfassbare Umwandlung eines Tetrazoliumfarbstoffes. Die zelluläre Reduktion der

Tetrazoliums Salze korreliert mit der Glykolyserate und der NADH-Produktion und ist somit ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen. Nicht nur bei dem Ablauf zellphysiologischer Vorgänge und dem Proliferationsvermögen der Zellen ist die mitochondriale Aktivität für die Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels funktionell bedeutsam, sondern auch für die maligne Entwicklung von Zellen. Der MTT Test stellt ein anerkanntes und etabliertes Verfahren dar, welches durch die standardisierte Auswertung mit dem Photospektrometer unabhängig vom Untersucher ist und damit vergleichbare Ergebnisse liefert.

In der Untersuchung wurde eine zweistündige Gasexpositionszeit gewählt, da dies realistisch der Dauer eines intraoperativ angelegten Pneumoperitoneum oder ggf. Pneumothorax entspricht.

In dieser Arbeit wurde für alle Zelllinien dieselbe Zellzahl von 50.000 Zellen (5×10^4) pro Loch gewählt, um sie bei Auswertung und Interpretation besser vergleichen zu können. Zu beachten ist deswegen, dass die stetige Proliferationsabnahme einiger Zelllinien gegen Ende des Versuches möglicherweise dadurch bedingt sein kann, dass die Zellen zu dicht gewachsen sind. Dadurch werden sie an der weiteren Proliferation gehindert; in diesem Fall wird sogar, bedingt durch den Nährstoffmangel, ein höheres Absterben der Zellen beobachtet. Eine Zellzahl von 50.000 pro Loch bietet in der Regel jedoch genügend Expansionsmöglichkeiten auch für schnell proliferierende Zelllinien. Dies konnte in eigenen Vorversuchen durch Aussaat unterschiedlicher Zellzahlen in die 96-Loch-Mikrotiterplatten bestätigt werden.

In Bezug auf die Fragestellung, in wie weit die Exposition der untersuchten Neuroblastom-, Hepatoblastom-, Rhabdomyosarkom-, Lymphom- und myeloischen Leukämiezelllinien mit den oben genannten Gasen das Proliferationsverhalten der Zellen beeinflusst, zeigen die Ergebnisse über die Dauer des Versuches weder eine veränderte mitochondriale Aktivität nach der Exposition mit Kohlenstoffdioxid noch mit Helium im Vergleich zu dem Kontrollansatz. Auch nach der Exposition mit Raumluft konnten keine signifikanten Veränderungen verglichen mit dem Kontrollansatz nachgewiesen werden (vgl. 3.). Auffällig ist vielmehr der nahezu parallele Verlauf der in den Diagrammen dargestellten Graphen der mitochondrialen Aktivität aller vier Ansätze, als ein Zeichen dafür, dass die mitochondriale Aktivität

unabhängig vom exponierten Gas ist. Dies gilt für alle 14 Zelllinien, unabhängig der Tumorspezies, in beiden Versuchsserien.

Errechnete Unterschiede zwischen den einzelnen Gasen (vgl. 3.) ließen sich weder reproduzieren, noch einer Tumorspezies oder einem Messzeitpunkt zuordnen. Gründe für eine veränderte mitochondriale Aktivität über die Dauer des Versuches hinweg, die wie gezeigt immer in nahezu synchroner Weise sowohl bei den drei Testgasen als auch bei dem Kontrollansatz zu beobachten sind, können zum einen auf den exogenen Stress, der durch das Verfahren der Gasexposition auf die Zellen einwirkt, zurück zu führen sein. Dies erklärt die Verminderung der mitochondrialen Aktivität direkt nach der zweistündigen Gasexposition bei nahezu allen Zelllinien (vgl. 3.). Zum anderen wirkt sich auch wie bereits oben beschrieben die Zelldichte in den Löchern der Versuchsplatten auf die mitochondriale Aktivität aus. An den letzten Messzeitpunkten der Untersuchungen zeigen einige Zelllinien eine stetige Abnahme der mitochondrialen Aktivität, die auf eine mögliche zu große Zelldichte und damit einen zunehmenden Mangel an Nährmedium hin deuten kann. Wieder ist diese Abnahme bei allen vier Ansätzen zu beobachten, also unabhängig von der Art des zugeführten Gases. Dies zeigt, dass das Proliferationsverhalten über die Dauer des Versuches nicht durch die Wahl des eingebrachten Gases beeinflusst wird, sondern durch die unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien.

Um die Ergebnisse im Kontext hinreichend diskutieren zu können, soll an dieser Stelle zunächst auf den derzeitigen Einsatz der minimal invasiven Chirurgie im Kindes- und Säuglingsalter eingegangen werden.

Ure et al⁴ berichten, dass bereits bis zu 60% aller abdominalen Eingriffe minimal invasiv durchführbar sind.

Zahlreiche Analysen^{40,41,42,43} zeigen eine geringere Schmerzintensität, eine Verminderung der postoperativen Symptome und eine raschere Erholung der Patienten nach minimal invasiven Eingriffen. Diese aufgeführten Vorteile sind bisher nicht durch randomisierte Studien belegt worden. Bis heute gibt es zudem noch keine Übereinkunft darüber, ob laparoskopische Operationen in der Kinderchirurgie empfohlen werden sollen.¹ Dennoch gibt es bereits grundsätzliche Literatur für beispielsweise die laparoskopische Durchführung der Fundoplicatio, Pyloromyotomie, Splenektomie, Cholezystektomie, Appendektomie und der Rektosigmoidresektion bei Morbus Hirschsprung.³

Besonders die Vor- und Nachteile der laparoskopischen Appendektomie stehen bis heute in der Diskussion. Es gibt Studien^{44,45}, die bei diesem Eingriff keinen signifikanten Vorteil beispielsweise hinsichtlich der Krankenhausaufenthaltsdauer oder dem Auftreten postoperativer Symptome nach Laparoskopie im Vergleich zur Laparotomie nachweisen konnten.

In der Thorakoskopie fehlen bislang ebenfalls systematische Untersuchungen über die Auswirkungen der minimal invasiven Technik.¹

Das wachsende Interesse der Operateure an der Laparoskopie ist nicht nur durch die ehrgeizige Suche nach neuen und sichereren Operationsmethoden sowie durch den Fortschritt der Computer- und Videotechnologie bedingt, sondern auch durch die Nachfrage der Patienten. Die Patienten erhoffen sich durch minimierte Zugangswege und Traumatisierungen Vorteile, die ihnen in Berichten, Publikationen und Medien aufgezeigt werden. Dazu gehören eine verminderte Morbidität, ein kürzerer Krankenhausaufenthalt, eine niedrigere postoperative Schmerzintensität und Schmerzmittelbedarf oder bessere kosmetische Ergebnisse. Die genannten Vorteile sind jedoch erst noch zu beweisen.^{1,46} Dies gilt ebenfalls für die vom Gesundheitssystem geforderten niedrigeren Kosten einer laparoskopischen Operation im Vergleich zur Laparotomie.

Kein einheitlicher Konsens besteht derzeit über den Einsatz der Laparoskopie bei malignen Erkrankungen. Dies gilt sowohl im Bereich der Erwachsenen- als auch der Kinderonkologie.^{1, 11}

Eins der häufig genannten Probleme bei der minimal invasiven Operation maligner Erkrankungen ist, wie bereits mehrfach erwähnt, das Auftreten von Zellverschleppung und von Metastasen.^{47, 48, 49} Berichte über darüber gab es schon sehr früh nach Entwicklung der Laparoskopie. Bereits 1985 publizierten Stockdale et al⁵⁰ eine Arbeit über Peritonealmetastasen nach der laparoskopischen Behandlung maligner Ovarialtumoren. Andere Studien zeigen, dass nach Einhalten präventiver Maßnahmen das Auftreten von Wundmetastasen nach laparoskopischen Eingriffen nicht häufiger ist als nach der konventionellen Laparotomie^{51, 52, 53, 54}.

In der Kinderchirurgie führten Warmann et al⁵⁵ 2003 eine prospektive jedoch nicht randomisierte Studie über den Einsatz der minimal invasiven Chirurgie bei der

Behandlung von Kindern mit malignen Erkrankungen durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Laparoskopie bei jedem vierten Kind mit abdominellen oder thorakalen Tumoren durchführbar war und ein exzellenter Weg bei diagnostischen Interventionen und Tumorbiopsien darstellte obwohl die Wirksamkeit in der Tumorresektion eingeschränkt erschien. In dieser Studie wurden keine Langzeitfolgen wie Tumorwiederkehr, Trokar- bedingte Metastasen, postoperatives Tumorwachstum oder Tumordissemination nach Kohlenstoffdioxidinsufflation berücksichtigt.

Im Folgenden zeigten Iwanaka et al⁵⁶ in einer retrospektiven Studie, dass nach Biopsie und Resektion von malignen Neuroblastomen und Ovarialtumoren die Krankenhausaufenthaltsdauer und Beginn der postoperativen Nahrungsaufnahme signifikant kürzer bei den Kindern waren, die man laparoskopisch operierte als bei denen, die konventionell operiert wurden. In einer vorausgegangenen Studie zeigte der Autor⁵⁷, dass die laparoskopisch gewonnene Biopsie und Exzision abdomineller Neuroblastome eine effektive und effiziente Methode bei Kindern ist. Auch Metzelder et al⁵⁸ zeigten in einer prospektiven Studie, dass die Laparoskopie eine zuverlässige Methode in der Diagnostik maligner abdomineller und thorakaler Tumore bei Kindern darstellt und wiesen darauf hin, dass nach einem Beobachtungszeitraum von 39 Monaten keine Metastasen auftraten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Waldhausen et al⁵⁹ und Seanz et al⁶⁰, die zeigten, dass die Laparoskopie eine sichere Option bei der Gewinnung von Gewebe in der Kinderonkologie darstellt und zudem einen früheren Beginn adjuvanter Therapiemaßnahmen ermöglicht.

Bei all diesem Enthusiasmus im Einsatz der minimal invasiven Operationsmethode in der pädiatrischen Onkologie dürfen nicht die auf den kindlichen Organismus wirkenden, eingangs aufgeführten, belastenden Faktoren einer laparoskopischen Operation sowie deren bisher nicht sicher zu beherrschenden Problemen wie die postoperative Tumorwiederkehr, beim Abwägen über den Nutzen der Technik, in Vergessenheit geraten.

Besonders deutlich werden die grundsätzlichen Auswirkungen der Laparoskopie auf den Gesamtorganismus in der Früh- und Neugeborenenchirurgie, trotz Fortschritte in der Verkleinerung der Instrumente und Zuwachs an chirurgischer Erfahrung.^{61,62}

Die Diskussion über den Einsatz der minimal invasiven Chirurgie in der pädiatrischen Onkologie, muss zusätzlich die qualitativen Unterschiede des verwendeten Gases mit einschließen.

Bisherige Studien untersuchten diesbezüglich ausschließlich die bei den Erwachsenen häufig vorkommenden Tumore.

In den in vitro und in vivo durchgeführten Studien werden unterschiedliche Parameter zum Nachweis von Veränderungen der Zellen herangezogen. Dementsprechend gegensätzlich und kontrovers sind die Ergebnisse und Aussagen der Arbeiten (vgl folgende Literaturangaben).

Einige Studien wiesen einen signifikanten Vorteil von Helium in Bezug auf die postoperative Metastasierung gegenüber den anderen zur Anwendung kommenden Gasen nach.

So zeigten beispielsweise die bereits eingangs zitierten Arbeiten von Dähn et al^{13, 14} mehrfach ein vermindertes Tumorstadium nach Insufflation von Helium im Vergleich zu Kohlenstoffdioxid anhand des hepatozellulären Karzinoms in einem Rattenmodell. In einem ähnlichen Modell wiesen Schmeding et al¹⁵ eine signifikant geringere Tumorstadium und postoperatives Auftreten von Metastasen nach der Laparoskopie mit Helium im Vergleich mit Raumluft nach. Neuhaus et al⁶³ beobachteten in ihrem Rattenmodell ein signifikant geringeres Wachstum der Mammakarzinomzellen nach Exposition mit Helium im Vergleich mit Kohlenstoffdioxid und auch Jakobi et al⁶⁴ zeigten in ihrer Arbeit ein vermindertes Wachstum der Kolonkarzinomzellen im Rattenmodell nach Einstellung eines Pneumoperitoneums mit Helium gegenüber Kohlenstoffdioxid.

Andere Studien hingegen wiesen auf ein signifikant gesteigertes Auftreten von Metastasen nach Insufflation von Kohlenstoffdioxid hin. So zeigten beispielsweise Smidt et al⁶⁵ in einem in vitro Modell ein vermehrtes Wachstum von epithelialen Ovarialkarzinomzellen nach der Gasexposition mit Kohlenstoffdioxid im Vergleich zu Stickstoff.

Im Gegensatz zu den bisher zitierten Studien weisen folgende Studien auf einen hemmenden Einfluss von Kohlenstoffdioxid auf das Tumorstadium hin. So zeigten Takiguchi et al⁶⁶ anhand von Kolonkarzinomzellen in einem Mausmodell,

dass Kohlenstoffdioxid im Vergleich zum Kontrollansatz zu keiner verstärkten Zellproliferation führt sondern einen toxischen Effekt auf die Tumorzellen besitzt. Ähnlich weisen Gutt et al⁶⁷ in ihrer Arbeit darauf hin, dass Kohlenstoffdioxid in vitro zu einer erhöhten Nekroserate der von ihnen untersuchten Kolon- und Pankreaskarzinomzellen führte.

Entgegen aller bisherigen Aussagen zeigten Schmeding et al¹⁵ in derselben bereits oben zitierten Studie anhand von Leberkarzinomzellen in einem Rattenmodell, dass Raumluft einen stimulierenden Einfluss auf Tumorwiederkehr und Metastasierung im Vergleich zu Kohlenstoffdioxid besitzt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Art des Gases keinen Einfluss auf die Zellen in vitro besitzt (vgl. 3.).

Zu demselben Ergebnis kamen ebenfalls Hopkins et al⁶⁸, die keine Unterschiede im Proliferationsverhalten von Mammakarzinomzellen in einem Rattenmodell nach Exposition mit Helium im Vergleich zu Kohlenstoffdioxid nachweisen konnten. Darüber hinaus konnte diese Studie das in vorherigen Arbeiten oft postulierte verstärkte Tumorwachstum nach Verwendung von Kohlenstoffdioxid für die minimal invasiven Operationen nicht bestätigen. Allerdings verwendeten Hopkins et al in ihrer Studie Tumore, die in der Klinik nicht minimal invasiv operiert werden.

Die hier nur in einer Auswahl aufgezeigten unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkungen des gewählten Gases auf die Tumorzellen machen es schwierig zu entscheiden, welches der genannten Gase das Sicherste bei minimal invasiven Eingriffen maligner Tumoren hinsichtlich des postoperativen Auftretens von Tumorrezidiven ist.

Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung Studien dieser Art für den therapeutischen Nutzen in der Klinik besitzen und ob sie allein geeignet sind die Auswirkungen minimal invasiver Eingriffe zu beurteilen.

Bei denen in dieser Arbeit insgesamt zitierten Studien wurden nicht nur verschiedene Tumorarten miteinander verglichen, sondern auch unterschiedliche Parameter der Zellen oder ihrer Umgebung mit Hilfe sehr spezieller Methoden untersucht. Hier wird deutlich, dass der Zuwachs an verfügbaren technischen Methoden zunehmend den

Indikationsbereich gegenwärtiger Studien beeinflusst. IDamit ist das Wissen nicht länger eine Frage der durch Wahrnehmung vermittelten, experimentell überprüften empirischen Evidenz in einem disziplinär akzeptierten Kontext, sondern es ist die durch die Technologie eines Forschungsfeldes erzeugte Information.⁵

Die zitierten Studien machen deutlich, dass in der Vergangenheit bereits vielfältige Studien zu dieser Fragestellung durchgeführt wurden, ohne zu einem einheitlichen Ergebnis zu kommen. Die minimal invasive Chirurgie kommt in der Behandlung maligner Tumoren zum Einsatz, ohne detaillierte Kenntnisse über die Auswirkungen der Technik auf die Tumorzellbiologie zu besitzen. Die Auswirkungen des exponierten Gases auf die Zellen maligner pädiatrischer Tumore sind bisher nicht untersucht worden.

Die vorliegende Arbeit untersucht vor diesem Hintergrund innerhalb eines einfachen und standardisiertem Grundlagenmodelles die Auswirkungen des exponierten Gases auf die mitochondriale Aktivität, der Energiequelle sämtlicher zellulärer benigner wie maligner Vorgänge, ausschließlich pädiatrischer Tumorzelllinien.

Es konnte gezeigt werden, dass die Wahl des exponierten Gases keinen Einfluss auf die Tumorzellproliferation besitzt. Dieses Ergebnis ist u.a. dadurch von Bedeutung, dass die Ergebnisse in zwei getrennt voneinander durchgeführten Untersuchungsreihen bei 14 verschiedenen Tumorzelllinien reproduziert werden konnten.

Die gegensätzlichen Aussagen bisheriger Studien zeigen, dass oftmals das Ergebnis einer Arbeit von den unterschiedlichen Erkenntnisintressen der Untersucher abhängig ist. Zudem kann in der Literatur beobachtet werden, dass aus den Ergebnissen einer Arbeit zwei unterschiedliche Aussagen entstehen.

Nach Lektüre der vorliegenden und hier zitierten Arbeiten muss man überlegen, ob die Ergebnisse der Arbeiten wirklich Aussagen über die klinischen Verhältnisse erlauben.

Mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit und denen voraus gegangener Studien können wir allein aussagen, dass bei Betrachtung der mitochondrialen Aktivität, die Wahl des eingesetzten Gases keinen Einfluss auf die Tumorzellaktivität der unterschiedlichen Tumorspezies nimmt.

Die Problematik der Tumorzellverschleppung, Tumorrezidive und Metastasen kann daher noch nicht als gelöst betrachtet werden.

In der Folge müssen weitere Studien durchgeführt werden, die mit einem geeigneten Design und geeigneten Methoden die Veränderungen der Tumorbiologie verfolgen, um die minimal invasive operative Versorgung onkologischer Patienten zu einer sicheren Operationsmethode zu machen.

Zusammenfassend wird deutlich, dass wir im Grunde noch sehr wenig über die Auswirkungen der minimal invasiven Chirurgie bei der Versorgung maligner Tumoren wissen.

Aus den bekannten Studien wird ersichtlich, dass die minimal invasive Chirurgie eine interessante Alternative für Kinder mit malignen abdominellen und thorakalen Tumoren zu den bisherigen Techniken darstellt, die, nach heutigen Erkenntnissen, aber durchaus kritisch betrachtet werden muss.

Die derzeitigen Erfahrungen reichen nicht aus, um Empfehlungen auszusprechen.

Bis heute mangelt es an guten kontrollierten randomisierten Studien mit einem adäquaten experimentellen Design über die Folgen der laparoskopischen Behandlung von Kindern mit malignen Erkrankungen, die als Voraussetzung für den Einsatz der minimal invasiven Technik bei Tumoren gelten müssen.

5 Zusammenfassung

Die minimal invasive Chirurgie stellt eine der neusten großen Entwicklungen der operativ technischen Methodik dar. Bis heute sind jedoch die pathophysiologischen Auswirkungen der Technik auf den Organismus noch nicht vollständig erkannt.

Dies gilt insbesondere für die Risiken der minimal invasiven Technik bei der laparoskopischen Behandlung maligner Tumore, wie beispielsweise das postoperative Tumorwachstum. Studien diskutieren in diesem Zusammenhang unter anderem die metabolischen Eigenschaften des in die Körperhöhle eingebrachten Gases und dessen Einfluss auf das tumorzellspezifische Verhalten. Bisher wurden in vitro jedoch ausschließlich Zellen maligner Tumore der Erwachsenen untersucht.

Diese Arbeit hat zum Ziel, die Auswirkungen des gewählten Gases auf Neuroblastom-, Hepatoblastom-, Rhabdomyosarkom-, Lymphom- und myeloische Leukämiezelllinien, die Gruppe der häufigsten pädiatrischen Tumoren, zu untersuchen. Für das Experiment wurde ein in vitro Modell eingesetzt, in dem die ausgewählten 14 Zelllinien zwei Stunden lang, einer realistischen Operationsdauer entsprechend, mit jeweils 100% Kohlenstoffdioxid, 100% Helium und Raumluft exponiert wurden. Zum Vergleich diente ein Kontrollansatz. Jede Zelllinie wurde zwei getrennt von einander durchgeführten Versuchsdurchgängen unterzogen. Als intrazellulärer Parameter wurde die mitochondriale Aktivität mittels des quantitativen kolorimetrischen MTT- Proliferationstests gemessen. Dabei handelt es sich um einen international anerkannten Test, der durch die standardisierte Auswertung mit dem Photospektrometer vergleichbare und unabhängige Ergebnisse liefert. Die Berechnung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wahl des exponierten Gases im gewählten Modell keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität der untersuchten Zelllinien besitzt. Über die gesamte Versuchsdauer hinweg verhielten sich die Messwerte von Kohlenstoffdioxid, Helium und Raumluft der exponierten Zellen in nahezu paralleler Weise zu denen des Kontrollansatzes. Dies konnte in beiden Versuchsdurchgängen unabhängig voneinander bestätigt werden. Vereinzelt Abweichungen der

Messwerte von diesem parallelen Verlauf bleiben in der Gesamtbetrachtung ohne Relevanz, da eine rasche Angleichung der Werte erfolgt. Grundsätzlich konnte eine adäquate Relevanz des gegebenen Gases für das Proliferationsverhalten hier nicht gezeigt werden.

Bei der Diskussion der Ergebnisse zeigte sich, dass die in der Literatur beschriebenen in vitro und in vivo Studien hinsichtlich der Auswirkungen des gewählten Gases auf die Tumorzellen deutlich gegensätzliche Ergebnisse hervorbringen.

Allgemein lässt sich feststellen, dass es noch bedeutend zu wenige gute randomisierte kontrollierte Studien über die Folgen der laparoskopischen Behandlung maligner Tumoren bei Kindern und Jugendlichen gibt. Einige retro- und prospektive Arbeiten weisen auf die Durchführbarkeit minimal invasiver Biopsieentnahmen und Staginguntersuchungen bei onkologischen Patienten dieser Altersgruppe hin und betonen gleichzeitig, dass die Tumorresektion mit Hilfe der Laparoskopie jedoch noch intensiver Erforschung bedarf.

Für eine definitive Bewertung der Laparoskopie in der Behandlung maligner Tumoren bei Kindern ist es aufgrund des bisherigen Mangels an Erkenntnissen über die intra- und postoperativen Auswirkungen der Technik noch entschieden zu früh. Weitere Untersuchungen über das Tumorzellverhalten unter den Bedingungen einer minimal invasiven Operation sowie randomisierte kontrollierte Studien müssen sich anschließen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Ure BM, Jesch NK, Glüer S. What's new in minimally invasive paediatric surgery? *Eur J Pediatr Surg* 2002; 12: 361- 365.
- (2) Adzick NS, Nance ML. Medical progress: Pediatric surgery. *New Engl J Med* 2000; 342: 1651- 1657.
- (3) Bax NMA, Georgeson KE, Najmaldin AS, Valla JS. *Endoscopic Surgery in Children*. Berlin: Springer Verlag 1999.
- (4) Schulz S., Steigleder K., Fangerau H., Paul NW [Hrsg.] *Geschichte, Theorie und Ethik der Medizin. Eine Einführung*. STW 1791, Frank./M./2006. S. 268- 282.
- (5) Ure BM, Jesch NK, Glüer S, Nustede R. Endoscopic surgery in infants and children. *Monatszeitschrift Kinderchirurgie*, Springer Verlag Berlin/Heidelberg 2002; 150 (12): 1459- 1464.
- (6) Joris JL, Noirot DP, Legrand MJ, Jacquet NJ, Lamy ML. Hemodynamic changes during laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg* 1993; 76: 1067- 1071
- (7) Hardacre JM, Talamini MA. Pulmonary and hemodynamic changes during laparoscopy: Are they important? *Surgery* 2000; 127: 241- 244.
- (8) Fuji Y, Tanka H, Tsuruoko SA, Tooyaka H, Amaha K. Middle cerebral artery blood flow increases during laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg* 1994; 78: 80- 83.
- (9) Elfetheriadis E, Kotzampassi K, Botisos D, Tzartnoglou, Farmakis H, Dadoukis J. Splanchnic ischemia during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 1996; 10: 324- 326.
- (10) Chiu AW, Chang LS, Birkett DH, Babayan RK. The impact of pneumoperitoneum, pneumoretroperitoneum and gasless laparoscopy on the systemic and renal hemodynamics. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 397- 406.

- (11) Chandrakanth Are, Mark A. Talamini., Laparoscopy and Malignancy, Journal of laparoscopic and advanced surgical techniques. 2005; Volumen 15, Number 1, Mary Ann Liebert, Inc.
- (12) Volz J, Koster S, Schaeff B, Paolucci V. Laparoscopic surgery: the effects of insufflation gas on tumor-induced lethality in nude mice. Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 793- 795.
- (13) Dähn S, Schwalbach P, Maksan S, Wöhleke F, Benner A, Kuntz C. Influence of different gases used for laparoscopy (helium, carbon dioxide, room air, and xenon) on tumor volume, histomorphology, and leucocyt- tumor- endothelium interaction in intravital microscopy. Surg Endosc 2005; 19: 65- 70.
- (14) Dähn S, Schwalbach P, Wöhleke F, Benner A, Kuntz C. Influence of different gases used für laparoscopy (helium, carbon dioxide, room air, and xenon) on tumor volume, proliferation, and apoptosis. Surg Endosc 2003; 17: 1653- 1657.
- (15) Schmeding M, Schwalbach P, Reinshagen S, Autschbach F, Benner A, Kuntz C. Helium pneumoperitoneum reduces tumor recurrences after curative laparoscopic liver resection in rats in a tumor- bearing small animal model. Surg Endosc 2003; 17: 951- 959.
- (16) Gutt CN, Gessmann T, Schemmer P, Mehrabi A, Schmandra Th, Kim ZG. The impact of carbon dioxide and helium insufflation on experimental liver metastases, macrophages, and cell adhesion molecules. Surg Endosc 2003; 17: 1628- 1631.
- (17) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65 (1-2): 55- 63.
- (18) Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colometric assay to measure cell activation. J Immunol Methods 1986; 94: 57- 63.
- (19) A. Bühl: SPSS Version 14.0 . Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. Pearson Studium Verlag München. 2006 (10. Auflage). ISBN 3-8273-7203-8.
- (20) Curet MJ. Port site metastases. The American Journal of Surgery 2004; 187: 705- 712.

- (21) Nissen, Rudolf. Fünfzig Jahre erlebter Chirurgie: ausgewählte Vorträge und Schriften. 1. Aufl.. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1978. S. 30- 31.
- (22) Nissen, Rudolf. Fünfzig Jahre erlebter Chirurgie: ausgewählte Vorträge und Schriften. 1. Aufl.. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1978. S. 21.
- (23) Nissen, Rudolf. Fünfzig Jahre erlebter Chirurgie: ausgewählte Vorträge und Schriften. 1. Aufl.. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1978. S. 13 ff.
- (24) Bozzini P.H. Lichtleiter, eine Erfindung zur Anschauung innerer Teile und Krankheiten. J. Prakt. Heilk. 1806; 24: 107.
- (25) Desormeaux A.J. The endoscope and ist application to the diagnosis and treatment of affections of the genitourinary passages. Chicago Med J. 1867; 24:177- 194.
- (26) Stein TS. Das Photoendoskop. Berliner Klin Woeb 1874; 19
- (27) Nitze M. Beobachtungs- und Untersuchungsmethoden für Harnröhre, Harnblase und Rectum. Wien. Med. Wschr. 1897; 29: 649.
- (28) Kalk H. Erfahrungen mit der Laparoskopie. Zugleich mit Beschreibung eines neuen Instrumentes. Z. Klin. Med. 1929; 111:303- 348.
- (29) Veress J. Neues Instrument zur Ausführung von Brust- oder Bauchpunktionen und Pneumothoraxbehandlung. Dtsch. Med. Wschr. 1938; 64: 1480- 1481.
- (30) Fervers C. Die Laparoskopie mit dem Cystoskop. Ein Beitrag zur Vereinfachung der Technik und zur endoskopischen Strangdurchtrennung in der Bauchhöhle. Med. Klin. 1933; 29: 1042- 1045.
- (31) Semm K. Die endoskopische Appendektomie. Gynäkol. Praxis 1983; 7: 131- 140.
- (32) Mühe E. Die erste Cholezystektomie durch das Laparoskop. Langenbecks Arch. Chir. 396, Kongressbericht 1986; 69: 804- 807.

- (33) Perissat J, Collet D, Belliard R, Dost C, Bikandou G. Die laparoskopische Cholezystektomie. *Chirurg* 1990; 61: 723- 728.
- (34) Mouret P. From the first laparoscopic cholecystectomy to the frontiers of laparoscopic surgery: the future prospectives. *Dig. Surg.* 1991; 8: 124.
- (35) Dubois F, Berthelot G, Levard H. Cholecystectomy per coelioscopy. *Press. Med.* 1989; 18: 980- 982.
- (36) Dubois F, Berthelot G, Levard H. Coelioscopic cholecystectomy: experience with 2006 cases. *World J. Surg.* 1995; 19: 748- 752.
- (37) McKernan JB. Laparoscopic Cholecystectomy. *Am J Surgeon* 1991; 57: 309- 312
- (38) Saye B, Reddick EJ, Olsen D. Laparoscopic laser cholecystectomy. *Surg Endosc* 1989; 3: 131- 133.
- (39) Wong YT, Shah PC, Birkett DH, Brams DM. Peritoneal pH during laparoscopy is dependent on ambient gas environment. *Surg Endosc* 2005; 19: 60- 64.
- (40) Iwanaka T, Arai M, Kawashima H, Kudou S, et al. Endosurgical procedures for pediatric solid tumors. *Pediatr Surg Int* 2004; 20: 39- 42.
- (41) Stanford A, Upperman JS, Nguyen N, Barksdale E Jr, Wiener ES. Surgical management of open versus laparoscopic adrenalectomy: outcome analysis. *J Pediatr Surg* 2002; 37 (7): 1027- 1029.
- (42) Chen MK, Schropp KP, Lobe TE. Complications of minimal-access surgery in children. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 1161- 1165.
- (43) Stocchi L, Nelson H. Laparoscopic colectomy for colon cancer: trail update. *J Surg Oncol* 1998; 86: 255- 267.

(44) Canty TG Jr, Collins D, Losasso B, Lynch F, Brown C. Laparoscopic appendectomy for simple and perforated appendicitis in children: the procedure of choice? *J Pediatr Surg* 2000; 35: 1582- 1585.

(45) Lavonius MI, Liesjarvi S, Ovaska J, Pajulo O, Ristkari S, Alanen M. Laparoscopic versus open appendectomy in children: A prospective randomised study. *Eur J Pediatr Surg* 2001; 11: 235- 238.

(46) Ehrlich PF, Newman KD, Haase GM, Lobe TE, Wiener ES, Holcomb GW. Lessons learned from a failed multi- institutional randomized controlled study. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 431- 436.

(47) Cirocco WC, Schwartzman A, Golub RW. Abdominal wall recurrence after laparoscopic colectomy for colon cancer. *Surgery* 1994; 116: 842- 846.

(48) Cava A, Roman J, Gonzalez A, Martin F, Aramburo P. Subcutaneous metastasis following laparoscopy in gastric adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 1990; 16: 63- 67.

(49) Lavie O, Cross PA, Beller U, Dawlatly B, Lopes A, Monaghan JM. Laparoscopic port site metastasis of an early stage adenocarcinoma of the cervix with negative lymph nodes. *Gynaecol Obstet* 1999; 75: 155- 157.

(50) Stockdale AD, Pocock TJ. Abdominal wall metastasis following laparoscopy: a case report. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11: 373- 375.

(51) Vukasin P, Ortega AE, Greene FL, et al. Wound recurrence following laparoscopic colon cancer resection: Results of the American Society of Colon and Rectal Surgeons Laparoscopic Registry. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 20- 23.

(52) Childers JM, Aqua KA, Surwit EA, Hallum AV, Hatch KD. Abdominal wall tumor implantation after laparoscopy for malignant conditions. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 765- 769.

(53) Lacy AM, Delgado S, Garcia- Valdecasas JC, et al. Port site metastasis and recurrence after laparoscopic colectomy. *Surg Endosc* 1998; 12: 1039- 1042.

- (54) Champault G, Almargo Ruiz M, Panchana G, Barrat C, Catheline JM. Port site metastasis: A prospective study of 131 cases. *J Chr Paris* 1997; 134: 423- 428.
- (55) Warmann S, Fuchs J, Jesch NK, Schrappe M, Ure BM. A prospective study of minimally invasive techniques in pediatric surgical oncology: preliminary report. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40 (3): 155- 157.
- (56) Iwanaka T, Arai M, Kawashima H, Kudou S, et al. Endosurgical procedures for pediatric solid tumors. *Pediatr Surg Int* 2004; 20: 39- 42.
- (57) Iwanaka T, Arai M, Ito M, Kawashima H, Yamamoto K, Hanada R, Imaizumi S. Surgical treatment for abdominal neuroblastoma in the laparoscopic era. *Surg Endosc* 2001; 15 (7): 751- 754.
- (58) Metzelder ML, Kuebler JF, Shimotakahara A, Glueer S, Grigull L, Ure BM. Role of diagnostic and ablative minimally invasive surgery for pediatric malignancies. *Cancer* 2007; 109 (11): 2343- 8.
- (59) Waldhausen JHT, Tapper D, Sawin RS. Minimally invasive surgery and clinical decision-making for pediatric malignancy. *Surg Endosc* 2000; 14: 250- 253.
- (60) Saenz NC, Conlon KC, Aronson DC, La Quaglia MP. The application of minimal access procedures in infants, children and young adults with pediatric malignancies. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 1997; 7 (5): 289- 294.
- (61) Kalfa N, Allal H, Raux O, Lopez M, Forgues D, et al. Tolerance of laparoscopy and thoracoscopy in neonates. *Pediatrics* 2005; 116 (6): 785- 791.
- (62) Kalfa N, Allal H, Raux O, Lardy H, Varlet F, Reinberg O, et al. Multicentric assessment of the safety of neonatal videosurgery. *Surg Endosc* 2007; 21 (2): 303- 308.
- (63) Neuhaus SJ, Ellis TS, Barrett MW, Rofe AM, Jamieson GG, Watson DI. In vitro inhibition of tumor growth in a helium-rich environment: implications for laparoscopic surgery. *Aust N Z J Surg* 1999; 69 (1): 52- 55.

(64) Jacobi CA, Wenger F, Sabat R, Volk T, Ordemann J, Muller JM. The impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on immunologic function and tumor growth in a rat model. *Dig Surg* 1998; 15 (2): 110- 116.

(65) Smidt VJ, Singh DM, Hurteau JA, Hurd WW. Effect of carbon dioxide on human ovarian carcinoma cell growth. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185 (6): 1314- 1317.

(66) Takiguchi S, Matsuura N, Hamada Y, Taniguschi E, Sekimoto M, et al. Influence of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on cancer cell growth. *Surg Endosc* 2000; 14: 41- 44.

(67) Gutt CN, Bruttel T, Brier C, Paolucci V, Enecke A. Carbon dioxide pneumoperitoneum inhibits in vitro proliferation of human carcinoma cells. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998; 115 (Suppl I): 535- 540.

(68) Hopkins MP, von Gruenigen V, Haller NA, Holda S. The effect of various insufflation gases on tumor implantation in an animal model. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187 (4): 994- 996.

(69) Richard J. Andrassy, M.D.[Hrsg.] *Pediatric Surgical Oncology.* W.B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo 1998.

(70) Lau WY, Leow CK, Li AKC. *History of Endoscopic and Laparoscopic Surgery.* *World J Surg* 1997; 21: 444- 453.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reduktion von MTT zu Formazan	16
Abbildung 2: SH-SY 5Y	22
Abbildung 3: SK-N-AS	22
Abbildung 4: SK-N-BE 2	23
Abbildung 5: SK-N-BE 2c	23
Abbildung 6: SK-N-BE M17	24
Abbildung 7: IMR 32	24
Abbildung 8: SK-N-SH	25
Abbildung 9: SK-IN	25
Abbildung 10: Hep G2	27
Abbildung 11: Hep Huh6	27
Abbildung 12: DAUDI	28
Abbildung 13: U 937	29
Abbildung 14: TE 671	30
Abbildung 15: KG 1A	31
Tabelle 1: Übersicht über die Zelllinien	10
Tabelle 2: Aussaatschema der Zeitmessungen t1 bis t7	17
Tabelle 3: Aussaatschema der Zeitmessung t0	18

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Bangen
Vorname: Catherine
Geburtsdatum: 18.10.1982
Geburtsort: Göttingen
Eltern: Rüdiger Bangen, Dipl. Psychologe, Psychologischer
Psychotherapeut
Gabriele Bangen, Arzthelferin
Geschwister: Jan- Philip Bangen, BWL- Student
Konfession: römisch- katholisch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1989- 1993 Grundschule Hogenkamp, Oldenburg
1993- 1995 Orientierungsstufe, Paulus Schule Oldenburg
1995- 2002 Gymnasium, Cäcilienchule Oldenburg
Mai 2002 Abitur Gymnasium Cäcilienchule Oldenburg

Hochschulbildung:

10/2002 - 10/2008 Studium an der Medizinischen Hochschule Hannover
08/2004 Ärztliche Vorprüfung (jetzt: 1. Staatsexamen)
11/2008 Ärztliche Prüfung (jetzt 2. Staatsexamen)
10/2009 Promotion zum Dr. med. in der Abteilung für
Kinderchirurgie der Medizinischen Hochschule
Hannover

Hochschulbegleitende Tätigkeiten:

2002/2003 Studentische Hilfskraft im Krankenpflegedienst des
orthopädischen Fachkrankenhauses Annastift
Hannover
2004 - 2007 Vorsitz der Gruppe Erstsemesterarbeit der
Medizinischen Hochschule Hannover

Famulaturen:

04/2005	Auslandsfamulatur/ Praxisfamulatur: Allgemeinmedizinische Praxis Dr. med. Ernst Feussi; Luzern, Schweiz (4 Wochen)
08/2005	Psychiatrie, Landeskrankenhaus Wehnen (4 Wochen)
04/2006	Auslandsfamulatur: Neurologie am Centre Hospitalier de Luxembourg; Luxembourg (4 Wochen)
06/2006	Auslandsfamulatur: Allgemein- und Viszeralchirurgie am Centre Hospitalier Universitaire de Ouagadougou, Burkina Faso (9 Wochen)
07/2007	Auslandspraktikum: Neurologische Rehabilitation in der Rehabilitationsklinik Bellikon, Schweiz (2 Wochen)

Praktisches Jahr:

08/07 - 12/07	Neurologie, Nordstadtkrankenhaus Hannover (Prof. Dr. med. A. Schwartz)
12/07- 03/08	Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Leer - Gastroenterologie (Dr. med. BM Dürrfeld) - Kardiologie (Dr. med. E. Stammwitz)
03/08 - 06/08	Chirurgie, Kreiskrankenhaus Leer (Dr. med. R. Ulitzka)

Zusatzausbildung:	Traditionelle Chinesische Medizin und Akupunktur an der Akademie für Fachärztliche Akupunktur und Integrative Medizin in Hannover (Beginn der Weiterbildung zur Erlangung des A- Diploms)
--------------------------	---

Weitere Qualifikationen:

Sprachkenntnisse:	Englisch und Französisch fließend, Latein Grundkenntnisse
EDV Kenntnisse:	Word, Excel, SPSS, Internet- Kenntnisse
Freizeit:	Saxophon (Orchester, Big Band), Klavier, Afrika, Halbmarathon, Freunde und Familie, Reisen

Hannover, den 12.09.2009

Catherine Bangen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rainer Nustede für die Idee und die Überlassung des Themas, für seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie für seine zahlreichen konstruktiven Anregungen und Ratschläge, vor allem aber für seine große Geduld.

Ich danke Herrn Dr. Hoy von dem Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover für die Mitwirkung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herzlicher Dank gilt Frau Dr. Gertrud Vieten und Frau Birgit Teichmann für ihre Geduld und Zeit die sie aufgewendet haben mir das Durchführen der Versuche mit Zellkulturen beizubringen und dafür, dass sie mir oft mit Rat und Mut zur Seite standen.

Danken möchte ich meinen Eltern dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben, meine Arbeit mit großem Interesse verfolgten und zu jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Sorgen, Nöte und Freuden hatten.

Zuletzt möchte ich ganz besonders Holger und Hannah danken, die mich während der gesamten Zeit mit viel Verständnis in allen Bereichen unterstützt und mich immer wieder motiviert haben.

Vielen Dank.

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

In vitro Proliferationsverhalten pädiatrischer Tumorzelllinien nach zweistündiger Exposition mit Kohlenstoffdioxid, Helium und Raumluft.

in der Abteilung für Kinderchirurgie

unter Betreuung von Prof. Dr. med. R. Nustede

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe. Die Dissertation wurde bisher noch nicht veröffentlicht.

Hannover, den 24.06.2008

Catherine Bangen

Fußnoten

¹ Ure BM, Jesch NK, Glüer S. What's new in minimally invasive paediatric surgery? *Eur J Pediatr Surg* 2002; 12: 361- 365.

² Adzick NS, Nance ML. Medical progress: Pediatric surgery. *New Engl J Med* 2000; 342: 1651- 1657.

³ Bax NMA, Georgeson KE, Najmaldin AS, Valla JS. *Endoscopic Surgery in Children*. Berlin: Springer Verlag 1999.

⁴ Ure BM, Jesch NK, Glüer S, Nustede R. Endoscopic surgery in infants and children. *Monatsschrift Kinderchirurgie*, Springer Verlag Berlin/Heidelberg 2002; 150 (12): 1459- 1464.

⁵ Schulz S., Steigleder K., Fangerau H., Paul NW [Hrsg.] *Geschichte, Theorie und Ethik der Medizin. Eine Einführung*. STW 1791, Frank./M./2006. S. 268- 282.

⁶ Joris JL, Noirot DP, Legrand MJ, Jacquet NJ, Lamy ML. Hemodynamic changes during laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg* 1993; 76: 1067- 1071

⁷ Hardacre JM, Talamini MA. Pulmonary and hemodynamic changes during laparoscopy: Are they important? *Surgery* 2000; 127: 241- 244.

⁸ Fuji Y, Tanka H, Tsuruoko SA, Tooyaka H, Amaha K. Middle cerebral artery blood flow increases during laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg* 1994; 78: 80- 83.

⁹ Elfetheriadis E, Kotzampassi K, Botisos D, Tzartnoglou, Farmakis H, Dadoukis J. Splanchnic ischemia during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 1996; 10: 324- 326.

¹⁰ Chiu AW, Chang LS, Birkett DH, Babayan RK. The impact of pneumoperitoneum, pneumoretroperitoneum and gasless laparoscopy on the systemic and renal hemodynamics. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 397- 406.

-
- ¹¹ Chandrakanth Are, Mark A. Talamini., Laparoscopy and Malignancy, Journal of laparoscopic and advanced surgical techniques. 2005; Volumen 15, Number 1, Mary Ann Liebert, Inc.
- ¹² Volz J, Koster S, Schaeff B, Paolucci V. Laparoscopic surgery: the effects of insufflation gas on tumor-induced lethality in nude mice. Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 793- 795.
- ¹³ Dähn S, Schwalbach P, Maksan S, Wöhleke F, Benner A, Kuntz C. Influence of different gases used for laparoscopy (helium, carbon dioxide, room air, and xenon) on tumor volume, histomorphology, and leucocyt- tumor- endothelium interaction in intravital microscopy. Surg Endosc 2005; 19: 65- 70.
- ¹⁴ Dähn S, Schwalbach P, Wöhleke F, Benner A, Kuntz C. Influence of different gases used für laparoscopy (helium, carbon dioxide, room air, and xenon) on tumor volume, proliferation, and apoptosis. Surg Endosc 2003; 17: 1653- 1657.
- ¹⁵ Schmeding M, Schwalbach P, Reinshagen S, Autschbach F, Benner A, Kuntz C. Helium pneumoperitoneum reduces tumor recurrences after curative laparoscopic liver resection in rats in a tumor- bearing small animal model. Surg Endosc 2003; 17: 951- 959.
- ¹⁶ Gutt CN, Gessmann T, Schemmer P, Mehrabi A, Schmandra Th, Kim ZG. The impact of carbon dioxide and helium insufflation on experimental liver metastases, macrophages, and cell adhesion molecules. Surg Endosc 2003; 17: 1628- 1631.
- ¹⁷ J Immunol Methods 1983; 65 (1-2): 55- 63. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays
- ¹⁸ Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colometric assay to measure cell activation. J Immunol Methods 1986; 94: 57- 63.
- ¹⁹ A. Bühl: SPSS Version 14.0 . Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. Pearson Studium Verlag München. 2006 (10. Auflage). ISBN 3-8273-7203-8.
- ²⁰ Curet MJ. Port site metastases. The American Journal of Surgery 2004; 187: 705- 712.

²¹) Nissen, Rudolf. Fünfzig Jahre erlebter Chirurgie: ausgewählte Vorträge und Schriften. 1. Aufl.. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1978. S. 30- 31.

²² Nissen, Rudolf. Fünfzig Jahre erlebter Chirurgie: ausgewählte Vorträge und Schriften. 1. Aufl.. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1978. S. 21.

²³ Nissen, Rudolf. Fünfzig Jahre erlebter Chirurgie: ausgewählte Vorträge und Schriften. 1. Aufl.. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1978. S. 13 ff.

²⁴ Bozzini P.H. Lichtleiter, eine Erfindung zur Anschauung innerer Teile und Krankheiten. J. Prakt. Heilk. 1806; 24: 107.

²⁵ Desormeaux A.J. The endoscope and its application to the diagnosis and treatment of affections of the genitourinary passages. Chicago Med J. 1867; 24:177- 194.

²⁶ Stein TS. Das Photoendoskop. Berliner Klin Woch 1874; 19

²⁷ Nitze M. Beobachtungs- und Untersuchungsmethoden für Harnröhre, Harnblase und Rectum. Wien. Med. Wschr. 1897; 29: 649.

²⁸ Kalk H. Erfahrungen mit der Laparoskopie. Zugleich mit Beschreibung eines neuen Instrumentes. Z. Klin. Med. 1929; 111:303- 348.

²⁹ Veress J. Neues Instrument zur Ausführung von Brust- oder Bauchpunktionen und Pneumothoraxbehandlung. Dtsch. Med. Wschr. 1938; 64: 1480- 1481.

³⁰ Fervers C. Die Laparoskopie mit dem Cystoskop. Ein Beitrag zur Vereinfachung der Technik und zur endoskopischen Strangdurchtrennung in der Bauchhöhle. Med. Klin. 1933; 29: 1042- 1045.

³¹ Semm K. Die endoskopische Appendektomie. Gynäkol. Praxis 1983; 7: 131- 140.

³² Mühe E. Die erste Cholezystektomie durch das Laparoskop. Langenbecks Arch. Chir. 396, Kongressbericht 1986; 69: 804- 807.

-
- ³³ Perissat J, Collet D, Belliard R, Dost C, Bikandou G. Die laparoskopische Cholezystektomie. *Chirurg* 1990; 61: 723- 728.
- ³⁴ Mouret P. From the first laparoscopic cholecystectomy to the frontiers of laparoscopic surgery: the future prospectives. *Dig. Surg.* 1991; 8: 124.
- ³⁵ Dubois F, Berthelot G, Levard H. Cholecystectomy per coelioscopy. *Press. Med.* 1989; 18: 980- 982.
- ³⁶ Dubois F, Berthelot G, Levard H. Coelioscopic cholecystectomy: experience with 2006 cases. *World J. Surg.* 1995; 19: 748- 752.
- ³⁷ McKernan JB. Laparoscopic Cholecystectomy. *Am J Surgeon* 1991; 57: 309- 312
- ³⁸ Saye B, Reddick EJ, Olsen D. Laparoscopic laser cholecystectomy. *Surg Endosc* 1989; 3: 131- 133.
- ³⁹ Wong YT, Shah PC, Birkett DH, Brams DM. Peritoneal pH during laparoscopy is dependent on ambient gas environment. *Surg Endosc* 2005; 19: 60- 64.
- ⁴⁰ Iwanaka T, Arai M, Kawashima H, Kudou S, et al. Endosurgical procedures for pediatric solid tumors. *Pediatr Surg Int* 2004; 20: 39- 42.
- ⁴¹ Stanford A, Upperman JS, Nguyen N, Barksdale E Jr, Wiener ES. Surgical management of open versus laparoscopic adrenalectomy: outcome analysis. *J Pediatr Surg* 2002; 37 (7): 1027- 1029.
- ⁴² Chen MK, Schropp KP, Lobe TE. Complications of minimal-access surgery in children. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 1161- 1165.
- ⁴³ Stocchi L, Nelson H. Laparoscopic colectomy for colon cancer: trail update. *J Surg Oncol* 1998; 86: 255- 267.

-
- ⁴⁴ Canty TG Jr, Collins D, Losasso B, Lynch F, Brown C. Laparoscopic appendectomy for simple and perforated appendicitis in children: the procedure of choice? *J Pediatr Surg* 2000; 35: 1582- 1585.
- ⁴⁵ Lavonius MI, Liesjarvi S, Ovaska J, Pajulo O, Ristkari S, Alanen M. Laparoscopic versus open appendectomy in children: A prospective randomised study. *Eur J Pediatr Surg* 2001; 11: 235- 238.
- ⁴⁶ Ehrlich PF, Newman KD, Haase GM, Lobe TE, Wiener ES, Holcomb GW. Lessons learned from a failed multi- institutional randomized controlled study. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 431- 436.
- ⁴⁷ Cirocco WC, Schwartzman A, Golub RW. Abdominal wall recurrence after laparoscopic colectomy for colon cancer. *Surgery* 1994; 116: 842- 846.
- ⁴⁸ Cava A, Roman J, Gonzalez A, Martin F, Aramburo P. Subcutaneous metastasis following laparoscopy in gastric adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 1990; 16: 63- 67.
- ⁴⁹ Lavie O, Cross PA, Beller U, Dawlatly B, Lopes A, Monaghan JM. Laparoscopic port site metastasis of an early stage adenocarcinoma of the cervix with negative lymph nodes. *Gynaecol Obstet* 1999; 75: 155- 157.
- ⁵⁰ Stockdale AD, Pocock TJ. Abdominal wall metastasis following laparoscopy: a case report. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11: 373- 375.
- ⁵¹ Vukasin P, Ortega AE, Greene FL, et al. Wound recurrence following laparoscopic colon cancer resection: Results of the American Society of Colon and Rectal Surgeons Laparoscopic Registry. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 20- 23.
- ⁵² Childers JM, Aqua KA, Surwit EA, Hallum AV, Hatch KD. Abdominal wall tumor implantation after laparoscopy for malignant conditions. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 765- 769.
- ⁵³ Lacy AM, Delgado S, Garcia- Valdecasas JC, et al. Port site metastasis and recurrence after laparoscopic colectomy. *Surg Endosc* 1998; 12: 1039- 1042.

⁵⁴ Champault G, Almargo Ruiz M, Panchana G, Barrat C, Catheline JM. Port site metastasis: A prospective study of 131 cases. *J Chr Paris* 1997; 134: 423- 428.

⁵⁵ Warmann S, Fuchs J, Jesch NK, Schrappe M, Ure BM. A prospective study of minimally invasive techniques in pediatric surgical oncology: preliminary report. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40 (3): 155- 157.

⁵⁶ Iwanaka T, Arai M, Kawashima H, Kudou S, et al. Endosurgical procedures for pediatric solid tumors. *Pediatr Surg Int* 2004; 20: 39- 42.

⁵⁷ Iwanaka T, Arai M, Ito M, Kawashima H, Yamamoto K, Hanada R, Imaizumi S. Surgical treatment for abdominal neuroblastoma in the laparoscopic era. *Surg Endosc* 2001; 15 (7): 751- 754.

⁵⁸ Metzelder ML, Kuebler JF, Shimotakahara A, Glueer S, Grigull L, Ure BM. Role of diagnostic and ablative minimally invasive surgery for pediatric malignancies. *Cancer* 2007; 109 (11): 2343-8.

⁵⁹ Waldhausen JHT, Tapper D, Sawin RS. Minimally invasive surgery and clinical decision-making for pediatric malignancy. *Surg Endosc* 2000; 14: 250- 253.

⁶⁰ Saenz NC, Conlon KC, Aronson DC, La Quaglia MP. The application of minimal access procedures in infants, children and young adults with pediatric malignancies. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 1997; 7 (5): 289- 294.

⁶¹ Kalfa N, Allal H, Raux O, Lopez M, Forgues D, et al. Tolerance of laparoscopy and thoracoscopy in neonates. *Pediatrics* 2005; 116 (6): 785- 791.

⁶² Kalfa N, Allal H, Raux O, Lardy H, Varlet F, Reinberg O, et al. Multicentric assessment of the safety of neonatal videosurgery. *Surg Endosc* 2007; 21 (2): 303- 308.

⁶³ Neuhaus SJ, Ellis TS, Barrett MW, Rofe AM, Jamieson GG, Watson DI. In vitro inhibition of tumor growth in a helium-rich environment: implications for laparoscopic surgery. *Aust N Z J Surg* 1999; 69 (1): 52- 55.

⁶⁴ Jacobi CA, Wenger F, Sabat R, Volk T, Ordemann J, Muller JM. The impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on immunologic function and tumor growth in a rat model. *Dig Surg* 1998; 15 (2): 110- 116.

⁶⁵ Smidt VJ, Singh DM, Hurteau JA, Hurd WW. Effect of carbon dioxide on human ovarian carcinoma cell growth. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185 (6): 1314- 1317.

⁶⁶ Takiguchi S, Matsuura N, Hamada Y, Taniguschi E, Sekimoto M, et al. Influence of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on cancer cell growth. *Surg Endosc* 2000; 14: 41- 44.

⁶⁷ Gutt CN, Bruttel T, Brier C, Paolucci V, Enecke A. Carbon dioxide pneumoperitoneum inhibits in vitro proliferation of human carcinoma cells. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998; 115 (Suppl I): 535- 540.

⁶⁸ Hopkins MP, von Gruenigen V, Haller NA, Holda S. The effect of various insufflation gases on tumor implantation in an animal model. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187 (4): 994- 996.

Richard J. Andrassy, M.D.[Hrsg.] *Pediatric Surgical Oncology*. W.B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo 1998.

Lau WY, Leow CK, Li AKC. *History of Endoscopic and Laparoscopic Surgery*. *World J Surg* 1997; 21: 444- 453.