
1 Einleitung

1.1 Anastomoseninsuffizienz in der Kolonchirurgie

Neben Nachblutungen und dem Ileus stellt die Anastomoseninsuffizienz noch immer die schwerwiegendste spezifische Komplikation nach Anlage von Enteroanastomosen in der Viszeralchirurgie dar. Trotz ausgefeilter Nahttechniken, Nahtklammerapparaten und verbesserter perioperativer Vorbereitung, einschließlich der orthograden Darmspülung und der systemischen Antibiotikaphylaxe ist die Rate der Nahtinsuffizienzen nach wie vor hoch und trägt wesentlich zur Operationsletalität bei (16, 18, 34, 54).

ZIRNGIBL und SCHMIDT (54) errechnen in ihrer Literaturübersicht von 1989 bis 1995 eine durchschnittliche Insuffizienzrate für handgenähte Kolonanastomosen von 5-10 % und einer durch diese Insuffizienzen bedingten Letalität zwischen 12 und 20 %. Einen signifikanten Unterschied zu maschinengenähten Anastomosen konnten sie nicht nachweisen. Ähnliches beschreiben MANN et al. (30) bei kolorektalen Anastomosen und geben eine Insuffizienzrate speziell für kolorektale Anastomosen mit 3,4 % an. In dem Übersichtsartikel von ZIRNGIBL und SCHMIDT wird für kolorektale Anastomosen eine Rate zwischen 2 und 10% angegeben. Die Operationsletalität bei bereits klinisch manifester Anastomoseninsuffizienz in Kolon und Rektum steigt laut HERMANEK (16) von 17 % bei unter 60jährigen auf 34 % bei einem Alter von 60 bis 69 Jahren und ab 70 Jahren sogar auf 45 %. Komplikationen wie Ileus oder Blutung zeigen in jeder Altersgruppe dagegen eine geringere Letalität.

Ungeachtet der Nahtmethode oder des Alters ist es also noch immer von größtem Interesse, Strategien zu entwickeln, die der Verhinderung von Anastomoseninsuffizienzen dienen.

Man muß dazu zwischen Frühinsuffizienzen innerhalb der ersten 5-7 Tage nach der Operation mit lokaler oder diffuser Peritonitis und sofortigem operativem Handlungsbedarf und Spätinsuffizienzen nach ein bis zwei Wochen ohne wesentliche Allgemeinbeeinträchtigung unterscheiden. Bei letzteren reichen in der Regel Nulldiät, vollparenterale Ernährung und suffiziente Drainierung aus (54). Die Frühinsuffizienz ist daher von vorrangigem Interesse, wenn es darum geht, die Insuffizienzrate und die dadurch bedingte Mortalität zu senken.

Um den Grund für diese Frühinsuffizienzen verständlich zu machen, ist es nötig, im folgenden auf einige Aspekte der Wundheilung im Allgemeinen einzugehen.

1.2 Wundheilung

Die Wundheilung am Gastrointestinaltrakt folgt grundsätzlich den gleichen Prinzipien wie im übrigen Organismus. Sie verläuft in vier verschiedenen Phasen, deren Übergänge fließend und sehr von Faktoren wie z.B Größe der Wunde, Durchblutung, Ausmaß der bakteriellen Besiedlung oder Wundheilungsstörungen abhängig sind (28, 33, 34, 36, 47, 49).

1. exsudative Phase
2. resorptive Phase
3. proliferative Phase
4. reparative Phase

In den ersten Stunden nach Verletzung kommt es zu einem provisorischen Wundverschluß durch austretende Blutbestandteile und Plasma (exsudative Phase). Die Gerinnungskaskade und Thrombozytenaggregation werden ausgelöst und ein Netzwerk aus unlöslichem Fibrin führt zur Blutstillung und Verklebung der Wunde. Es kommt zu Gewebhypoxie und -azidose. Durch Mastzell- und Thrombozytendegranulation werden vasoaktive Substanzen wie Histamin, Serotonin und Wachstumsfaktoren freigesetzt. Vasodilatation im Wundgebiet mit Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit und Erhöhung der Gefäßpermeabilität sowie die chemotaktische Wirkung der freigesetzten Stoffe bewirken eine Einwanderung von Granulozyten und Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen umwandeln.

Innerhalb von 3 bis 4 Tagen wird das nekrotische Gewebe durch die Makrophagen und Granulozyten phagozytiert und abgebaut. Die vorwiegend aus Fibroblasten und Epithelzellen stammende Kollagenase greift das freigewordene Kollagen an, so daß dieses durch unspezifische Proteasen weiter abgebaut werden kann. In dieser Phase kommt es also zu einem verstärkten Abbau von Kollagen und Grundsubstanz in der Wunde (resorptive Phase). CRONIN et al. waren die ersten (1968), die diese, besonders in Kolonanastomosen verstärkte Kollagenolyse, beschrieben (6).

Je nach Umfang der Gewebsverletzung, der Durchblutung, der allgemeinen Stoffwechsellage, der Adaptation der Wundränder und zahlreicher weiterer Faktoren kommt es nach etwa 4 Tagen zu einem Überwiegen der proliferativen Vorgänge im Wundgebiet (proliferative Phase). Der Gewebe-pH normalisiert sich, der aerobe Stoffwechsel stellt sich wieder ein. Durch die von Thrombozyten, Makrophagen und anderen Zellen sezernierten Wachstumsfaktoren werden Fibroblasten chemotaktisch angelockt und zur Proliferation und Synthese angeregt. Desweiteren können im Darm auch glatte Muskelzellen angeregt werden Kollagen zu produzieren. In dieser Phase wird vorwiegend Typ-III-Kollagen produziert. Die Angioneogenese wird ebenso stimuliert und es kommt zur Einsprossung von Kapillaren.

Das Geschehen geht nun in eine Phase mit über die Norm verstärktem Syntheseanstieg von Glykosaminoglykanen und Kollagen über (reparative Phase). Es kommt zu einer stetig steigenden Wundkontraktion und Festigkeitszunahme im Rahmen der Kollagenreifung und

-stabilisierung. Dabei kommt es zu einer Relationsverschiebung von Typ-III-Kollagen zu Typ-I-Kollagen. Die überschießenden Syntheseprozesse beginnen sich nach etwa 10 bis 14 Tagen wieder zu normalisieren.

1.3 Kollagen-Turnover und Frühinsuffizienzen

Der hier beschriebene Kollagen-Turnover und seine Veränderung während der Wundheilung birgt die Erklärung für die zuvor beschriebenen Frühinsuffizienzen. Wie erwähnt kommt es in der resorptiven Phase zu einer Verstärkung der Kollagenaseaktivität, während die Neusynthese von Kollagen noch nicht voll in Gang gekommen ist (1, 4, 20, 22, 49) (Abb.1.1).

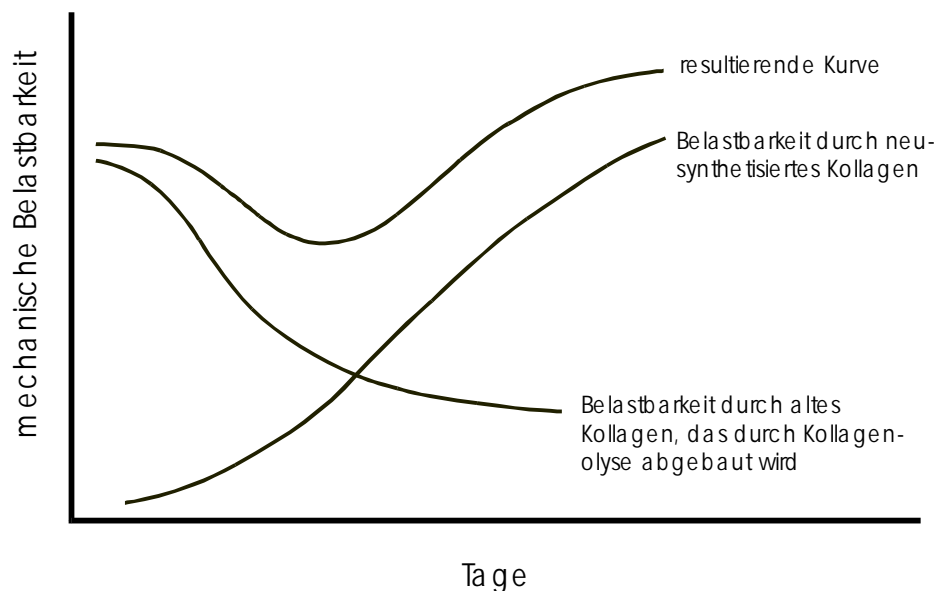


Abb.1.1 Darstellung der Wundheilung als Balance zwischen Kollagensynthese und Kollagenolyse. Die Wundheilung wird anhand der mechanischen Belastbarkeit der Wunde dargestellt. (nach THORNTON und BARBUL (49))

Damit ist die Anastomose also am Übergang von der resorptiven zur proliferativen Phase am wenigsten belastbar, da zu dieser Zeit am meisten altes Kollagen abgebaut ist und noch nicht annähernd gleichviel neues synthetisiert worden ist (Abb.1.2).

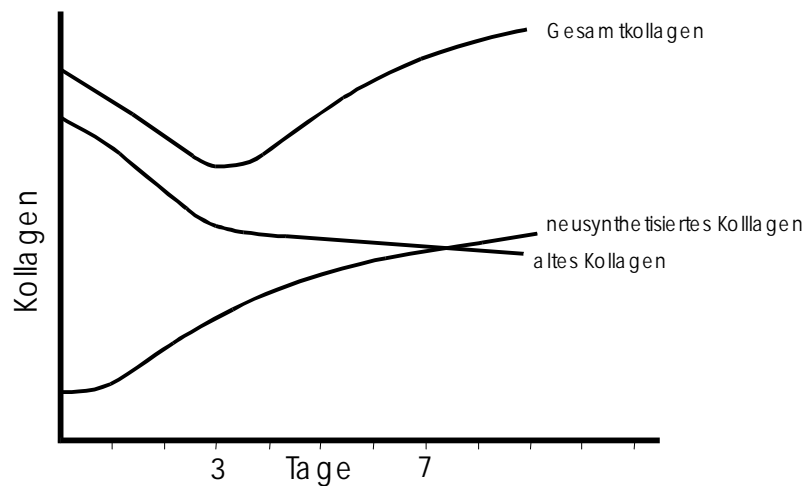


Abb.1.2 Kollagengehalt in experimentellen Colonanastomosen bei Tieren (nach HUNT et al. (20)).

Die erfolgreiche Heilung der Anastomose wird also zu einem Wettlauf zwischen Kollagenolyse und Kollagenneusynthese. Je früher die Synthese von neuem Kollagen einsetzt, desto kürzer müßte die vulnerable Phase der Heilung sein und desto eher gewinnt die Anastomose an mechanischer Belastbarkeit.

1.4 Wachstumsfaktoren

Wie oben beschrieben wird die Wundheilung von lokal wirkenden Wachstumsfaktoren beeinflusst. Mittlerweile sind die einzelnen Funktionen der Wachstumsfaktoren relativ gut erforscht, und man kann daher versuchen, einzelne davon gezielt für bestimmte Zwecke im Bereich der Wundheilung einzusetzen.

Es handelt sich bei diesen Wachstumsfaktoren um Polypeptide, die die Proliferation, Migration und Transformation von Zellen, die am Vorgang der Wundheilung beteiligt sind, beeinflussen. Sie wirken physiologischerweise parakrin, also auf benachbarte Zellen, oder autokrin, auf sich selbst. Bei der Verletzung von Gewebe werden sie zuerst von aggregierten Thrombozyten aus den α -Granula freigesetzt und bewirken die Migration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen ins Gewebe (Chemotaxis). Außerdem stimulieren sie die Zellen zur Proliferation. Die angelockten Zellen können wiederum eigene Wachstumsfaktoren sezernieren und sich so selbst und benachbarte Zellen stimulieren.

Besonders wichtig für das Entstehen einer belastbaren Narbe ist auch die Fähigkeit bestimmter Wachstumsfaktoren, Fibroblasten zur Synthese von Kollagen und Glykosaminoglykanen anzuregen. Im folgenden werden die in diesen Versuchen erprobten Wachstumsfaktoren näher beschrieben.

1.5 Die benutzten Wachstumsfaktoren

1.5.1 Transforming-Growth-Factor-alpha (TGF α)

1978 isolierten DE LARCO und TODARO (7) die ersten TGF-Gemische aus Kulturen von Sarkom-Virus-transformierten Mäusefibroblasten und nannten diese Sarcoma Growth Factors. 1981 dann entdeckte ROBERTS (37), daß es darunter einen TGF gab, dessen Wirkung durch Epidermal Growth Factor (EGF) verstärkt wurde und der auch aus nicht-neoplastischen Zellen zu isolieren war. Dieser wurde TGF α genannt.

Das TGF α -Molekül besteht sowohl bei Menschen, als auch bei Nagetieren aus einer Kette mit 50 Aminosäuren, die zusätzlich noch durch drei Disulfidbrücken querverbunden sind. Mittlerweile ist bekannt, daß es sich dabei nicht um einen ausschließlich tumorassoziierten Wachstumsfaktor, sondern um ein physiologischerweise von vielen Körperzellen produziertes Molekül handelt. TGF α konkurriert mit EGF um den EGF-Rezeptor, der auf fast allen Körperzellen gefunden wird. TGF α ist dabei wahrscheinlich einfach ein weiterer physiologischer Ligand an diesem Rezeptor. Ein spezifischer TGF α -Rezeptor ist bisher nicht gefunden worden. TGF α bewirkt allerdings eine effektivere Stimulation als EGF (9, 12, 38, 43, 52).

TGF α wird u.a. in Darmepithelien und in besonders hoher Konzentration in Thrombozyten und Makrophagen gefunden, was auf eine spezielle Aufgabe bei der Wundheilung hindeutet. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, der Bildung von Granulationsgewebe und der Erneuerung von Epithelien. Dieser Faktor aktiviert neutrophile Granulozyten, wirkt mitogen auf Fibroblasten und besitzt eine angiogene und reepithelialisierende Wirkung (9, 12, 35, 38, 46, 52).

1.5.2 Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF)

1974 fand ROSS (42) einen von Thrombozyten freigesetzten Faktor, der die Proliferation glatter Muskelzellen stimulierte. Er, DEUEL (10) und andere isolierten und erforschten diesen Faktor, der fortan PDGF genannt wurde.

PDGF besteht aus zwei Polypeptidketten, A und B, die durch Disulfidbrücken verbunden werden. Das Molekül kommt daher in drei Isoformen vor: PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB. Fast 70% des PDGF aus menschlichen Thrombozyten bestehen aus dem Heterodimer PDGF-AB, der Rest ist PDGF-BB und zu einem ganz geringen Anteil PDGF-AA (41, 52). PDGF wird aber nicht nur von zirkulierenden Zellen, wie Thrombozyten und mononukleären Phagozyten, produziert, sondern auch von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen (27, 41).

PDGF setzt den Wundheilungsprozess in Gang, indem es die DNA-Synthese und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen stimuliert und dadurch die Kollagen-, Glykosaminoglykan- und Kollagenaseproduktion fördert. Außerdem ist PDGF ein noch stärkerer Vasokonstriktor als Angiotensin II (3, 5, 41, 46, 52).

1.5.3 Fibroblast-Growth-Factor (FGF)

Dieses Mitogen wurde in den späten sechziger und frühen siebziger Jahren entdeckt. FGF kommt in zwei Formen vor: als saures (acidic) FGF und als basisches (basic) FGF. Saures FGF ist nicht so weit verbreitet wie das basische. Man findet es vor allem im Gehirn. Das basische FGF scheint ubiquitär verteilt zu sein und wurde z.B. aus Organen wie der Nebenniere, der Niere, der Retina und dem Corpus luteum sowie aus Makrophagen isoliert (15).

FGF wirkt hauptsächlich auf Zellen mesodermalen Ursprungs, wie die Muskulatur und das Bindegewebe des Magen-Darm-Traktes oder die Blutgefäße: Es induziert also Blutgefäßwachstum und wirkt mitogen auf die meisten nicht vollständig differenzierten Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Weiterhin kann FGF die Zellwanderung beeinflussen, da es chemotaktisch an Gefäßendothelien wirkt (5, 12, 46, 48, 52).

Das saure FGF ist als Mitogen in vitro ca. 100fach schwächer wirksam als das basische. Außerdem zeigt sich FGF potenter als andere Wachstumsfaktoren, da eine wesentlich niedrigere Konzentration nötig ist, um in vitro vergleichbare Wirkungen wie bei TGF α , PDGF oder EGF zu erzielen (15, 52).

TGFα	PDGF	FGF
mitogen auf Epithelzellen und Fibroblasten, aktivierend auf Neutrophile und angiogen	mitogen und chemotaktisch auf Fibroblasten, gl. Muskelzellen und Neutrophile und vasokonstriktorisch	mitogen und chemotaktisch auf Fibroblasten, gl. Muskelzellen und Endothelzellen und angiogen

Tabelle 1.1 Zusammenfassung der Wirkungen der Wachstumsfaktoren auf die Wundheilung

1.6 Experimentelle Fragestellung

In der Kolonchirurgie ist noch immer die frühe Anastomoseninsuffizienz aufgrund der hohen Letalität die gefürchtetste Komplikation. Durch eine Beschleunigung der Wundheilungsvorgänge sollte die mechanisch wenig belastbare, vulnerable Frühphase der Darmheilung verkürzt werden können und somit der Darm schneller in einen belastbaren Zustand gebracht werden. Die Frühinsuffizienzen könnten somit verringert werden.

Eine solche Beschleunigung und Verstärkung der Wundheilung ist seit geraumer Zeit von einigen Polypeptiden aus der Gruppe der sogenannten Wachstumsfaktoren bekannt. Diese lokal wirksamen Moleküle wurden bereits vielfach in Experimenten zur Wundheilung, insbesondere der Haut, mit Erfolg eingesetzt. Nebenwirkungen wurden keine beschrieben.

Daher sollte in dieser Untersuchung der Transforming Growth Factor-alpha alleine und in Kombination mit zwei anderen Wachstumsfaktoren (Platelet-derived Growth Factor und Fibroblast Growth Factor) auf seine Wirksamkeit an Darmanastomosen bei Ratten untersucht werden.

Zur Beurteilung des Heilungsverlaufes wurde als Hauptkriterium die Zerreißkraft des anastomosierten Darmabschnittes als Indikator für die mechanische Belastbarkeit untersucht.

Außerdem sollte geprüft werden, ob durch die Applikation der Wachstumsfaktoren eine Zunahme der intraabdominellen Verwachsungen auftritt.

Diese Arbeit ist Teil eines Projektes, in dem noch andere Wachstumsfaktoren auf ihre Wirkung an Darmanastomosen getestet werden.

Die Tierversuche sind von der Senatsverwaltung für Gesundheit genehmigt worden (Geschäftszeichen: GO259/96).