
2. Material und Methoden

2.1 Die Versuchstiere

Für die Experimente wurden männliche, adulte Sprague-Dawley-Ratten verwandt. Die Tiere wogen zu Beginn der Versuche zwischen 300 und 490g. Sie wurden in einem klimatisierten Raum (Raumtemperatur 18°C; Luftfeuchtigkeit ca. 60%) bei natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus einzeln in Standardkäfigen gehalten. Sie erhielten Altromin Standardfutter für Ratten und Mäuse (Firma ALTROGGE, Lage) und Wasser ad libitum.

2.2 Anatomie des Dickdarms der Ratte

Das Colon der Ratte gliedert sich zwar in die gleichen Abschnitte wie beim Menschen, zeigt aber einen etwas anderen Verlauf. Das Colon ascendens ist relativ variabel in seinem Verlauf durch das sehr mobile Caecum. Meist findet sich das Caecum aber ventral im unteren linken Quadranten. Von dort zieht das Colon ascendens auf die rechte Seite des Abdomens, um dann nach cranial bis zur Duodenalregion aufzusteigen. Es geht dort ins Colon transversum über, welches am duodenojejunalen Übergang am Dünndarm fixiert ist und nach dorsal zieht. Hier geht es in das Colon descendens über, das von der cranio-dorsalen Seite der linken Niere beinahe in der Medianlinie an der Hinterwand des Bauchraumes fixiert nach caudal zieht.

Das Colon descendens ist also durch Eventrierung des Dünndarmes gut darstellbar und für eine Operation zugänglich. Durch die fixierte Lage läßt sich leicht ein standardisierter Operationsort wählen und außerdem hat das Colon descendens den Vorteil hauptsächlich feste Kotbestandteile zu enthalten, was das Risiko, den Bauchraum durch Faeces zu kontaminieren, entscheidend verringert.

2.3 Wachstumsfaktoren

Es wurden folgende Wachstumsfaktoren in den angegebenen Konzentrationen benutzt:

	Abkürzung	Konzentration
Recombinant Human Transforming Growth Factor-alpha	TGF α	10 μ g/ml
Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-basic	FGF	5 μ g/ml
Recombinant Human Platelet Derived Growth Factor-BB	PDGF	10 μ g/ml

Tab.2.1 Die verwendeten Wachstumsfaktoren

Alle Wachstumsfaktoren wurden über die Firma BIOMOL, Hamburg bezogen.

2.4 Behandlungsgruppen und Nachbeobachtungszeitraum

Die Tiere nach dem folgenden Schema randomisiert in die genannten Gruppen verteilt:

Gruppe 1: Anastomose mit lokaler Applikation von Kochsalzlösung
 Gruppe 2: Anastomose mit lokaler Applikation von TGF α
 Gruppe 3: Anastomose mit lokaler Applikation von TGF α und PDGF
 Gruppe 4: Anastomose mit lokaler Applikation von TGF α und FGF

Diese 4 Gruppen wurden nochmals nach dem Zeitpunkt der Relaparotomie (5, 7 und 14 Tage nach der Operation) in Untergruppen unterteilt.

Zur Gruppe 1 (Kontrollgruppe) gehörten insgesamt 15 Tiere, wovon jeweils 5 am 5. postoperativen Tag (Gruppe 1.1), 5 am 7. postoperativen Tag (Gruppe 1.2) und 5 am 14. postoperativen Tag (Gruppe 1.3) relaparotomiert wurden.

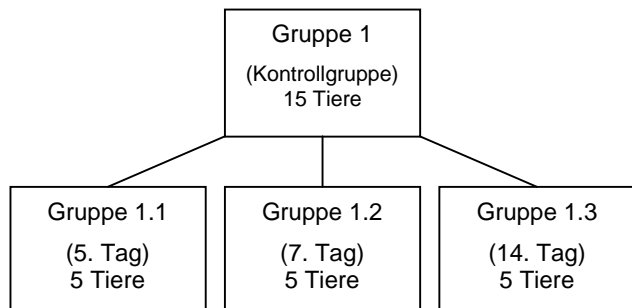


Abb.2.1 Aufteilung der Gruppe 1

Die Gruppe 2 (Injektion v. TGF α) bestand ebenfalls aus insgesamt 15 Tieren, von denen 5 am 5. postoperativen Tag (Gruppe 2.1), 5 am 7. postoperativen Tag (Gruppe 2.2) und 5 am 14. postoperativen Tag (Gruppe 2.3) relaparotomiert wurden.

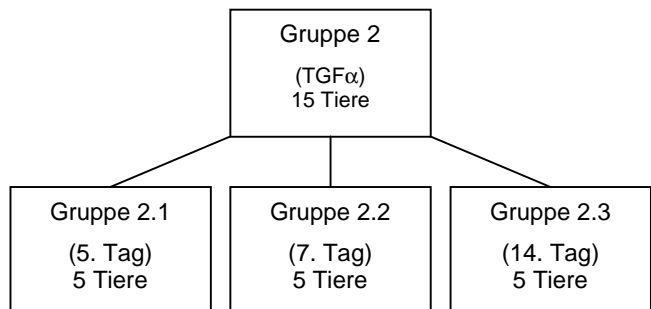


Abb.2.2 Aufteilung der Gruppe 2

Die Gruppe 3 (Injektion v. TGF α u. PDGF) enthielt 15 Tiere, von denen 5 am 5. postoperativen Tag (Gruppe 3.1), 5 am 7. postoperativen Tag (Gruppe 3.2) und 5 am 14. postoperativen Tag (Gruppe 3.3) relaparotomiert wurden.

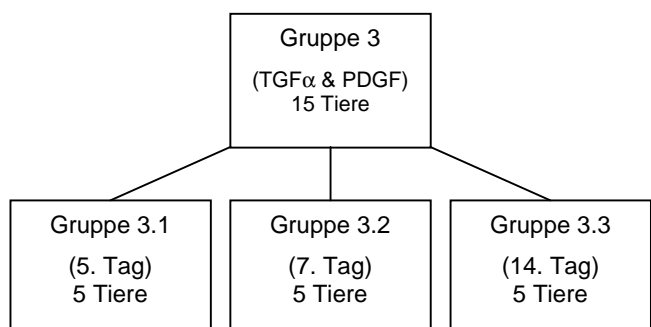


Abb.2.3 Aufteilung der Gruppe 3

Der Gruppe 4 (Injektion v. TGF α u. FGF) wurden 15 Tiere zugeordnet, wovon 5 am 5. postoperativen Tag (Gruppe 4.1), 5 am 7. postoperativen Tag (Gruppe 4.2) und 5 am 14. postoperativen Tag (Gruppe 4.3) relaparotomiert wurden.

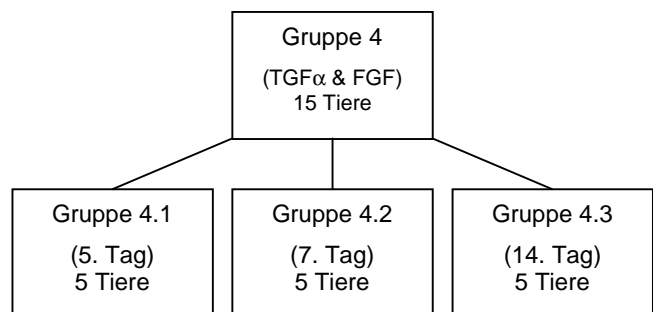


Abb.2.4 Aufteilung der Gruppe 4

Insgesamt ergab sich also folgendes Schema:

	Tag 5	Tag 7	Tag 14	Summe
Gruppe 1	5	5	5	15
Gruppe 2	5	5	5	15
Gruppe 3	5	5	5	15
Gruppe 4	5	5	5	15

Tab.2.2 Verteilung der Versuchstiere auf die Gruppen und Relaparotomietage

2.5 Operation

2.5.1 Vorbereitung der Tiere

Die zu operierenden Ratten erhielten bis zum Eingriff Futter und Wasser ad libitum, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß trotz Nahrungsentzug am Vortag der Operation, das Kolon noch Kot enthielt. Außerdem ist der Faeces im Colon descendens bereits von sehr fester Konsistenz, so daß sich solche Kotballen leicht aus dem Operationsgebiet weg- bzw. aus dem eröffneten Darm herausdrücken lassen.

2.5.2 Anästhesie

Die Tiere wurden in einem Ether enthaltenden Standzylinder (Aether zur Narkose, Firma ASID BONZ, Böblingen) in Narkose versetzt. Anschließend wurden sie gewogen und das Ausgangsgewicht protokolliert.

Nun wurde ihnen 0,05g Urethan (Firma SIGMA-ALDRICH, Steinheim) pro 100g Körpergewicht intraperitoneal und 2,5 mg Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Firma PARKE-DAVIS, Berlin) pro 100g Körpergewicht intramuskulär appliziert. Während der Operation wurde die Narkose mit intermittierenden Aetherapplikationen aufrechterhalten.

2.5.3 Operationstechnik

Die Tiere wurden zur Operation auf einer Korkplatte fixiert, das Abdomen in der Medianlinie rasiert und eine mediane Laparotomie durchgeführt.

Als nächstes wurde der Dünndarm nach rechts eventriert und in eine feuchte Kompresse gehüllt, so daß das Colon descendens an der Hinterwand des Bauchraumes freilag (Abb.2.5). Eventuell vorhandene Kotballen wurden nach distal weggedrückt.



Abb.2.5 intraoperative Darstellung des Colon descendens

Nun wurde das Colon an der für die Anastomose vorgesehenen Stelle unter Schonung der Arkadengefäße durchtrennt. Eventuell noch vorhandene Kotreste wurden mit körperwarmer 0.9%-iger Kochsalzlösung weggespült.

Zu Beginn der Anastomosennaht wurden die beiden Ecknähte gestochen und der Darm dazwischen aufgespannt. Zur besseren Übersicht wurde noch je ein Haltefaden an den proximalen und distalen Abschnitt der Vorderwand gelegt (Abb.2.6).

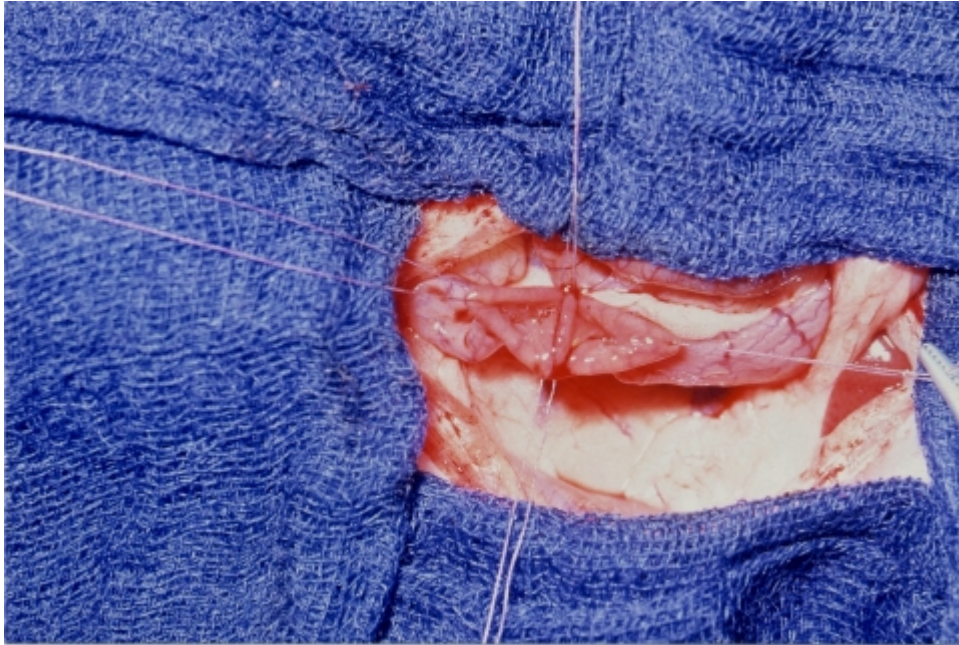


Abb.2.6 Durch Haltefäden aufgespannte Darmenden

Nun erfolgte zunächst die Naht der Hinterwand mit der einreihigen Nahttechnik nach GAMBEE (Abb.2.7). Dabei kommen die Knoten bei der Naht der Hinterwand intraluminär zu liegen (Abb.2.8).

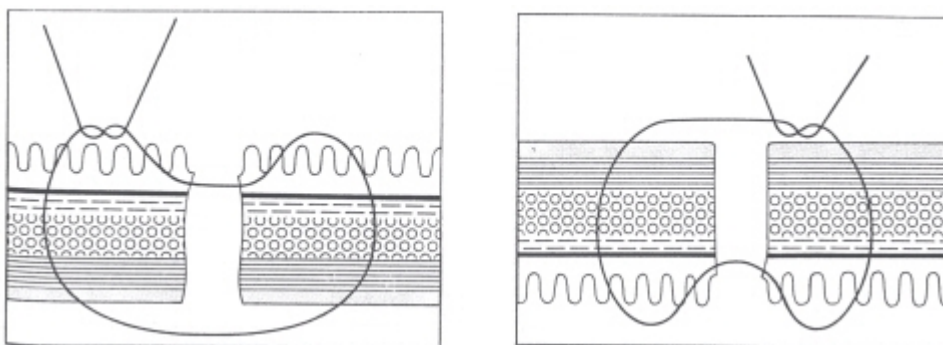


Abb.2.7 schematische Darstellung der Nahttechnik nach GAMBEE für Hinter- und Vorderwand
(aus: Chirurgische Gastroenterologie; hrsg. von S.R.Siewert et al. (95))

Dann wurde die Vorderwand in derselben Nahttechnik genäht. Dabei kommen nun die Knoten extraluminär zu liegen (Abb.2.9). Als Nahtmaterial wurden dabei resorbierbare Polyglactinfäden (Vicryl 6/0, P-1 Nadel, Firma ETHICON, Norderstedt) verwendet.

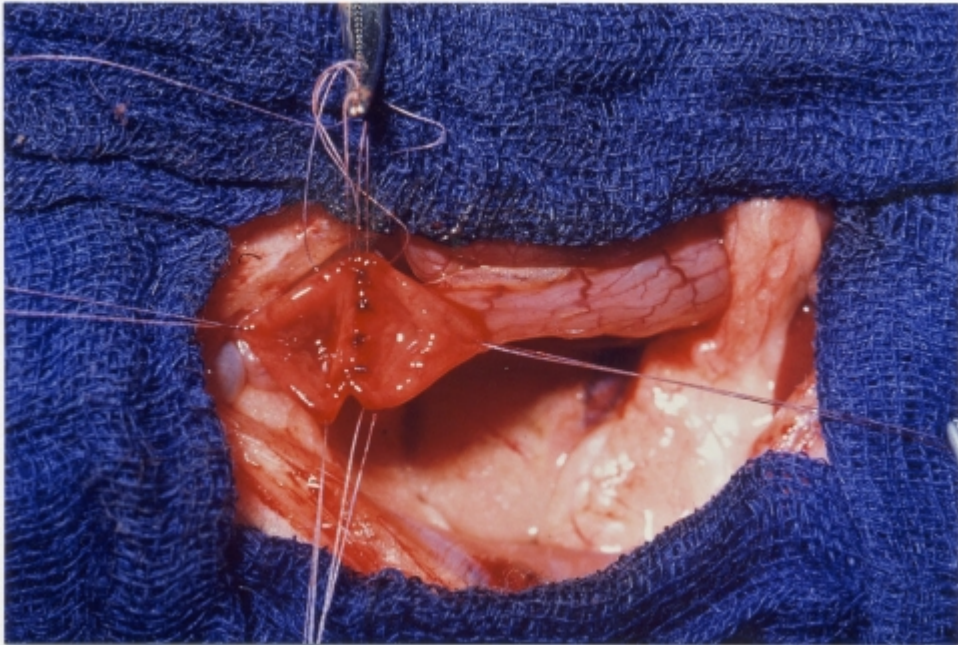


Abb.2.8 Naht der Hinterwand



Abb.2.9 Naht der Vorderwand

Nach Fertigstellung der Anastomose wurden 0,1 ml der jeweiligen Wachstumsfaktoren bzw. 0.9%-ige Kochsalzlösung in die Darmwand um die Anastomose herum injiziert (Abb.2.10).



Abb.2.10 intramurale Injektion der Wachstumsfaktoren

Nun wurde der eventrierte Dünndarm sorgfältig wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert und Peritoneum und Muskulatur mit einer fortlaufenden, allschichtigen Naht (Vicryl 5/0, RB-1-plus Nadel, Firma ETHICON, Norderstedt) versorgt.

Die Haut wurde anschließend ebenfalls mit einer fortlaufenden Naht (Suturamid 3/0, FSL Nadel, Firma ETHICON, Norderstedt) verschlossen.

2.6 Relaparatomie

2.6.1 Bergung und Fixierung der Anastomose

Die Tiere wurden nach den zuvor festgelegten und oben beschriebenen Intervallen (vgl. S. 9 f.) erneut laparotomiert. Dabei wurden sie auf die gleiche Weise wie zuvor in Narkose versetzt und gewogen. Sie wurden auf der Korkplatte fixiert und das Abdomen über die alte Laparotomiewunde erneut eröffnet.

Nach Eröffnung des Abdomens wurde als erstes der Grad der Verwachsungen festgehalten und nach dem in Kapitel 2.6.2 beschriebenen Schema bewertet.

Das Tier wurde nun durch intrakardiale Injektion von T61 für Tiere (Firma HOECHST ROUSSEL VET, Wiesbaden) getötet. Dann wurde die Anastomose geborgen, indem der Darm jeweils 2-3 cm proximal und distal der Anastomose durchtrennt und Verwachsungen gelöst wurden. Eventuell vorhandene Kotreste wurden mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung ausgespült. Die Darmstücke wurden dann in einer gepufferten Formalinlösung nach LILLY fixiert.

2.6.2 Beurteilungskriterien bei Relaparotomie

Nach Eröffnung des Abdomens bei Relaparotomie wurde der Verwachsungsgrad semiquantitativ klassifiziert. Je nach Schweregrad wurden bis zu 3 Punkte nach dem folgenden Schema vergeben :

Keine Verwachsungen	0 Punkte
Geringgradige Verwachsungen, d.h. schmale, strangförmige Adhäsionen	1 Punkt
Mittelgradige Verwachsungen, d.h. maximal die Hälfte der Zirkumferenz der Anastomose ist in Adhäsionen eingeschleidet	2 Punkte
Schwere Verwachsungen, d.h. die Anastomosenregion ist vollkommen mit Netz oder anderen Organen abgedeckt	3 Punkte

Abb.2.11 Schema der Punkteverteilung für den Verwachsungsgrad der Anastomosen

2.7 Zerreißkraftmessungen

Zur Prüfung der Belastbarkeit von Anastomosen und chirurgischen Nähten und damit auch zur Prüfung der Wundheilung in solchen Bereichen kommt seit längerem die Zerreißkraft- oder auch Höchstkraftmessung zur Anwendung. Diese - im anglo-amerikanischen Schrifttum „breaking strength“ bezeichnete - mechanische Prüfung ist definiert als die zum Zerreißen einer Gewebprobe benötigte Kraft (1). Eingeführt wurde diese Methode 1929 von HOWES (19). Später wurde sie insbesondere für Versuche am Tierdarm etabliert: SEIFERT (44) und JAHNSON (21) wendeten sie z.B an bestrahlten Anastomosen an, WEIBER (51) und DE WAARD (8) untersuchten damit den Effekt von 5-Fluorouracil auf die intestinale Wundheilung. Schließlich bedienten sich auch SLAVIN (45) und MUSTOE (32) dieser Methode,

um den Effekt von Wachstumsfaktoren auf die gastrointestinale Wundheilung bei Schweinen bzw. Kaninchen zu beurteilen.

Die Messungen wurden in der BUNDESANSTALT FÜR MATERIALFORSCHUNG UND -PRÜFUNG, Berlin durchgeführt. Die Proben wurden in einen Tensiometer (Universalprüfgerät entsprechend DIN 527-1; Firma ZWICK; Abb.2.13) mittels pneumatischen Klemmbacken bei einem Anpreßdruck von 2,2 bar eingespannt, so daß die Anastomose in der Mitte zwischen den Klemmbacken zu liegen kam (Abb.2.14).

Nun wurden, nach Aufbau einer Vorkraft von 0,05 N, die Klemmen kontinuierlich bei einer Prüfgeschwindigkeit von 20 mm/min auseinandergezogen. Auf einem Computer (ZWICK PC-Software Z1001) wurden gleichzeitig die Kraft in N und die Längenzunahme in mm erfaßt und in einer Graphik (Abb.2.12) gegeneinander aufgetragen. Bei starkem Kraftabfall unterbrach das Programm den Meßvorgang automatisch.

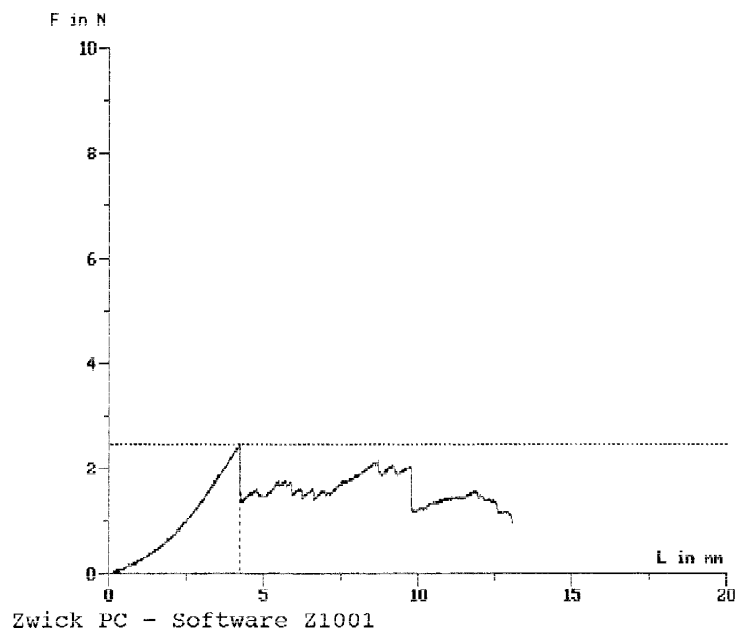


Abb.2.12 Computerausdruck der Reißkurve eines am 5. postop. Tag relaparotomierten Tieres (Tier Nr.35); auf der Abszisse ist die Längenzunahme L in mm und auf der Ordinate die aufgewendete Reißkraft F in N dargestellt; die gestrichelte Linie markiert die maximal erreichte Kraft und gleichzeitig den Moment des entscheidenden Risses der Darmwand



Abb.2.13 Prüfgerät

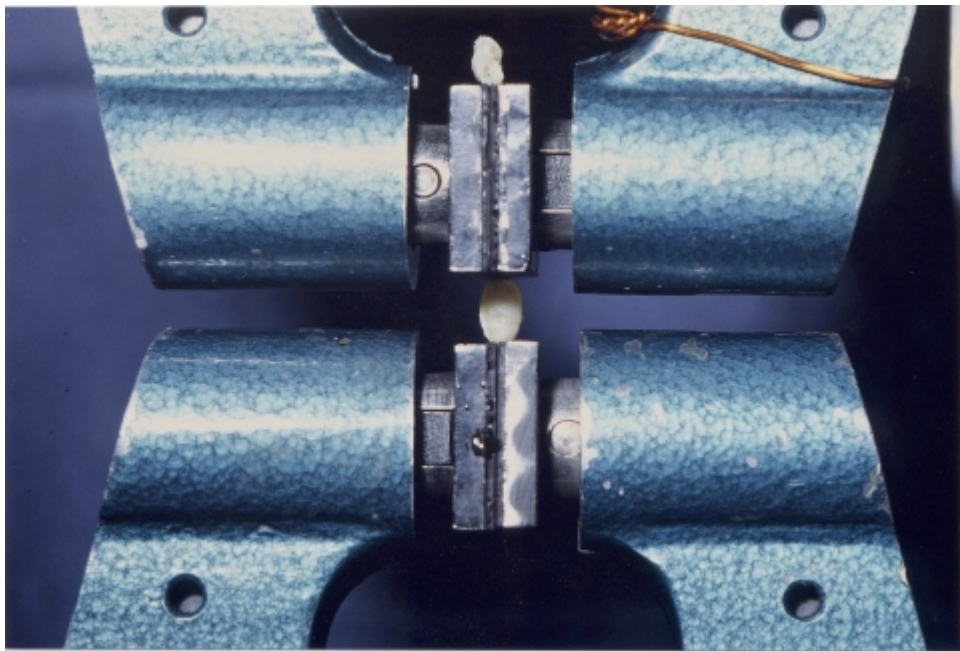


Abb.2.14 zwischen den Klemmbacken eingespannter Darm

Desweiteren wurde noch der Ort des Rißes protokolliert. Das gerissene Darmstück wurde wieder in Formalin asserviert.

2.8 Histologie

Die getesteten, anastomosentragenden Darmstücken wurden soweit noch möglich histologisch aufgearbeitet. Da bei einigen Proben die Gewebedefekte, bedingt durch die Zerreißkraftmessung, zu groß waren, konnten nicht von allen histologische Schnitte angefertigt werden und somit auch keine semiquantitativ-statistische Auswertung erfolgen. Daher sollte diese zusätzliche Aufarbeitung nur als Test für geplante primär histologische Studien dienen.

Die Darmstücke wurden in dünne Streifen geschnitten und auf der Seite stehend in Parafin eingebettet, so daß die Schnitte alle Wandschichten darstellten.

Die Präparate wurden anschließend sowohl mit Hämatoxylin-Eosin zur Übersicht als auch mit Azokarmin, Anilinblau und Orange G, der sogenannten Azan-Färbung nach HEIDENHAIN, zur Kollagenbeurteilung angefärbt. Hierbei werden durch Beizung des Bindegewebes mit Phosphorwolframsäure kollagene Fasern scharf blau gefärbt und können so gut beurteilt werden. Zellkerne und Zytoplasma sind eher rötlich (25, 40). Die bewährte Hämatoxylin-Eosin Färbung stellt Kerne blau und Zytoplasma sowie kollagene Fasern und Muskelgewebe rot dar.

Die gefärbten Schnitte wurden dann hinsichtlich der Menge im Wundgebiet enthaltener kollagener Fasern beurteilt, wobei insbesondere auch auf den Grad der Vernetzung der Fasern, auf parallele Anordnung und Ausrichtung entlang bestimmter Zugrichtungen geachtet wurde. Weiterhin wurden der Zellgehalt der Wunde bzw. Narbe und das entzündliche Infiltrat und Ödem verglichen.

Die Beurteilung der gefärbten Schnitte erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Menge kollagener Faserzüge im Wund- bzw. Narbengebiet
2. Anordnung, Ausrichtung und Vernetzung dieser Fasern
3. entzündliches zelluläres Infiltrat
4. Ödem

Abb.2.15 Beurteilungskriterien für histologische Präparate