

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der lokalen Applikation von  
rekombinantem humanem Insulin-like Growth Factor-1  
(rh-IGF-1) auf die Kolonanastomosenheilung der Ratte

-  
Quantifizierung der Protein- und Genexpression

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Kapp

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.09.2020

MEINEN GUTEN GEISTERN

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	III
<b>Abstract</b> .....	IV
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. <b>Anastomoseninsuffizienz</b> .....	1
1.2. <b>Wundheilung des Darms</b> .....	2
1.3. <b>Wachstumsfaktoren</b> .....	5
1.3.1. <b>IGF-1</b> .....	6
1.3.2. <b>Applikationsformen und Nebenwirkungen des IGF-1</b> .....	8
1.3.3. <b>Lokale Applikation mittels Beschichtung</b> .....	9
1.4. <b>Beschreibung des Projektes und Fragestellung</b> .....	10
1.5. <b>Hypothese</b> .....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	12
2.1. <b>Versuchstiere</b> .....	12
2.2. <b>Gruppeneinteilung</b> .....	12
2.3. <b>Wachstumsfaktor, Trägermaterial und Beschichtung</b> .....	13
2.4. <b>Vorversuche zum Trägermaterial</b> .....	14
2.4.1. <b>Elutionsversuch</b> .....	15
2.4.2. <b>Coomassie-Test</b> .....	16
2.5. <b>Operation und Untersuchung</b> .....	16
2.6. <b>Proteinisolierung</b> .....	19
2.7. <b>ELISA-Testungen</b> .....	21
2.7.1. <b>IGF-1</b> .....	21
2.7.2. <b>TGF-<math>\beta</math>1</b> .....	21
2.7.3. <b>VEGF</b> .....	22
2.7.4. <b>GM-CSF</b> .....	22
2.8. <b>RNA Isolierung</b> .....	23
2.9. <b>Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)</b> .....	23
2.10. <b>Quantitative PCR (qPCR)</b> .....	24
2.11. <b>Statistik</b> .....	26
2.12. <b>Weitere Methoden</b> .....	26
2.12.1. <b>Biomechanik</b> .....	27
2.12.2. <b>Histologische/Immunhistochemische Auswertung</b> .....	27
<b>3. Ergebnisse</b> .....	28
3.1. <b>Vorversuche zum Trägermaterial</b> .....	28
3.2. <b>Klinischer Verlauf</b> .....	29

<b>3.3. Ergebnisse der ELISA-Versuche</b> .....	30
3.3.1. IGF-1-ELISA .....	31
3.3.2. VEGF-ELISA.....	32
3.3.3. TGF- $\beta$ 1-ELISA.....	34
3.3.4. GM-CSF-ELISA .....	35
<b>3.4. Ergebnisse der qPCR-Versuche</b> .....	37
3.4.1. IGF-1-PCR .....	37
3.4.2. VEGF-PCR.....	38
<b>3.5. Weitere Ergebnisse</b> .....	40
3.5.1. Biomechanische Untersuchungsergebnisse.....	40
3.5.2. Histologische/Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse .....	41
<b>4. Diskussion</b> .....	43
4.1. IGF-1 .....	44
4.2. VEGF.....	49
4.3. TGF- $\beta$ 1 .....	53
4.4. GM-CSF .....	56
4.5. Ergebnisse der biomechanischen und histologischen Untersuchungen .	59
4.6. Kritische Betrachtung .....	59
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	63
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	65
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	74
<b>Lebenslauf</b> .....	75
<b>Danksagung</b> .....	76

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dynamik der Zellinfiltration im Bereich der Darmanastomose .....	3
Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Fadens .....	28
Abbildung 3: Balkendiagramm IGF-1-ELISA .....	31
Abbildung 4: Balkendiagramm VEGF-ELISA.....	33
Abbildung 5: Balkendiagramm TGF- $\beta$ 1-ELISA .....	34
Abbildung 6: Balkendiagramm GM-CSF-ELISA .....	36
Abbildung 7: Balkendiagramm IGF-1-PCR .....	37
Abbildung 8: Balkendiagramm VEGF-PCR .....	39
Abbildung 9: Balkendiagramm „Bursting Pressure“ .....	41

## Abstract

Hintergrund: Die Anastomoseninsuffizienz (AI) ist eine gefürchtete Komplikation abdominalchirurgischer Eingriffe und geht mit einer gesteigerten postoperativen Morbidität und Mortalität einher. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) ist ein zentraler Regulator des Wundheilungsprozesses und stimuliert unter anderem Kollagensynthese sowie Fibroblasten- und Endothelproliferation. Untersucht wurde, ob die lokale Applikation von IGF-1 über beschichtetes Nahtmaterial die Wundheilung positiv beeinflusst.

Methodik: Mithilfe einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Trägersubstanz (PDLLA) wurde das Nahtmaterial unter sterilen Bedingungen mit biologisch aktivem IGF-1 beschichtet. An sechs Monate alten, weiblichen Sprague Dawley Ratten wurde eine Dissektion und Anastomosierung des Colon transversum durchgeführt. Für die Anastomosennaht wurden, je nach Gruppenzugehörigkeit, unbeschichtete, alleinig mit PDLLA beschichtete sowie PDLLA + IGF-1 beschichtete Fäden verwendet. Nach einer Standzeit von einem, drei oder sieben Tagen wurde die Proteinkonzentration von IGF-1, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) und Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) mittels ELISA sowie die IGF-1- und VEGF-Genexpression mittels quantitativer PCR (qPCR) im perianastomotischen Gewebe gemessen. Des Weiteren wurde die biomechanische Festigkeit der Anastomosen sowie die Anastomosenregion histologisch untersucht (beides nicht Teil der vorliegenden Promotionsarbeit).

Ergebnisse: In den ELISA-Untersuchungen konnte in der PDLLA + IGF-1 Gruppe an Tag 1 und Tag 7 eine statistisch signifikant erhöhte IGF-1-Konzentration gemessen werden ( $p < 0,05$ ). Die messbare VEGF-Konzentration lag in der PDLLA + IGF-1 Gruppe an Tag 1 tendenziell über beiden Vergleichsgruppen, an Tag 7 jedoch signifikant unterhalb jener der unbeschichteten Versuchsgruppe. In den TGF- $\beta$ 1- und GM-CSF-Proteinbestimmungen waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede messbar. Mittels qPCR konnte an Tag 1 und Tag 7 in der PDLLA + IGF-1 Gruppe eine signifikant höhere VEGF-Genexpression im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen bestimmt werden; die IGF-1-Expression dieser Gruppe lag nur an Tag 7 signifikant über jener der Vergleichsgruppen, an den vorhergegangenen Untersuchungszeitpunkten waren die Werte gruppenübergreifend vergleichbar. In den biomechanischen Untersuchungen konnte an Tag 3 in der PDLLA + IGF-1 Gruppe eine signifikant erhöhte

Stabilität der Anastomosenregion ermittelt werden, während sich histologisch eine gesteigerte bindegewebige Überbrückung des Anastomosenspaltes bei vergleichsweise reduzierter Zahl Entzündungszellen zeigte.

Zusammenfassung: Die lokale Applikation von IGF-1 hatte einen partiellen Einfluss auf die Protein- und Genexpression im Bereich der Anastomose. Durch das vermehrt vorliegende IGF-1 konnten Wundheilungsprozessen stimuliert werden, was die biomechanische Stabilität der Anastomose an Tag 3 verbesserte und auch histologisch nachvollziehbar war. Für VEGF waren zum Teil gegenläufige Werte in Proteinkonzentration und Genexpression messbar, die auf ein Vorliegen regulierender Feedbackmechanismen schließen lassen. Durch die verbesserte Heilung könnten postoperative Komplikationen vermieden und Morbidität und Mortalität gesenkt werden.

Background: Anastomotic leakages are a feared complication of visceral surgery, associated with increased postoperative morbidity and mortality. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a vital regulator of wound healing processes and stimulates, among others, collagen synthesis as well as proliferation of fibroblasts and endothelial tissue. It was investigated whether the local application of IGF-1 via coated suture material positively impacts the healing of colon anastomoses in rats.

Methods: Suture material was coated under sterile conditions with biologically active IGF-1 using a biodegradable layer of poly(D,L-lactide) (PDLLA) as carrier. Six-month old, female Sprague Dawley rats underwent dissection and anastomosis of the transverse colon. Anastomoses were performed with, depending on randomization, uncoated suture material, PDLLA alone, or coating with PDLLA + IGF-1. One, three, or seven days post-operatively, perianastomotic IGF-1, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), and Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) protein concentration was measured using ELISA, as well as IGF-1- and VEGF-gene expression via quantitative PCR (qPCR). In addition, anastomoses were tested biomechanically and histologically (not part of this doctoral thesis).

Results: The ELISA tests showed a significantly increased IGF-1 concentration in the PDLLA + IGF-1 group on day 1 and day 7 ( $p < 0.05$ ). On day 1, VEGF measurements were by trend higher in the PDLLA + IGF-1 group, while a significant reduction in this group was seen on day 7, compared to the uncoated group. The TGF- $\beta$ 1 and GM-CSF protein

measurements showed no significant differences between the groups at any point of time. The qPCR showed a significantly increased VEGF gene expression in the PDLLA + IGF-1 group on day 1 and day 7. A significant increase in IGF-1 expression in this group was only measurable on day 7; at the earlier investigation times the values had been comparable between all groups. The biomechanical tests showed a significantly increased stability of the anastomotic region in the PDLLA + IGF-1 group, with an increased collagen and fibroblast deposition in the perianastomotic region and less inflammatory cells seen histologically.

Conclusion: Local application of IGF-1 had a partial influence on perianastomotic protein and gene expression. The increased IGF-1 concentration stimulated healing processes which improved the biomechanical stability on day 3 and could also be seen histologically. For VEGF, the protein concentration and gene expression showed, in part, opposite trends, suggesting the presence of regulating feedback mechanisms. The improved healing could potentially reduce postoperative complications, directly affecting morbidity and mortality.



## 1. Einleitung

### 1.1. Anastomoseninsuffizienz

In der Chirurgie gehören visceralchirurgische Eingriffe im Bereich des Dickdarmes zu den häufigsten Operationen. Indikationen zur Durchführung dieser Eingriffe, insbesondere von Resektionen mit Anlage enterischer Anastomosen im Bereich des Kolons und Rektums, sind z.B. kolorektale Karzinome, Traumata, Divertikulitis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, benigne Polypen, Durchblutungsstörungen wie etwa die ischämische Kolitis und Strikturen nach Radiotherapie oder Bridenbildung nach Voroperationen im Bauchraum oder im kleinen Becken (1–3).

Eine der häufigsten Komplikationen nach enterischer Anastomosierung ist die Anastomoseninsuffizienz (AI), die aufgrund der mit ihr im Zusammenhang stehenden möglichen Komplikationen auch zu den gefürchtetsten zählt. Die Inzidenz der AI wird in der Literatur mit Werten zwischen 1% und 30% angegeben, liegt aber in der Regel bei erfahrenen Operateuren zwischen 2% und 6% (4). Das Auftreten einer AI ist mit einem deutlichen Anstieg der Morbidität und Mortalität verbunden; beträgt die postoperative Mortalität nach kolorektalen Eingriffen im problemlosen Verlauf noch zwischen 0% und 6% (3,5), so steigt sie nach Auftreten einer Leckage und der hiermit potentiell verbundenen schweren Peritonitis und Sepsis auf bis zu 40% (6,7).

Die Häufigkeit des Auftretens einer Insuffizienz ist u. a. abhängig von der Lokalisation der Anastomose. Je distaler am Colon operiert wird, desto wahrscheinlicher kommt es zu Insuffizienzen, mit dem absolut häufigsten Auftreten nach subtotaler Kolektomie und ileorektaler Anastomose (6,8). Diese Problematik hängt mit dem nach distal, zum kleinen Becken hin, schwieriger werdenden operativen Zugang und den erschwerten Bedingungen für das Setzen einer spannungsfreien Naht zusammen. Postoperativ kann dies einen erheblichen Einfluss auf die lokale Mikrozirkulation zur Folge haben, die für eine normale und komplikationslos ablaufende Wundheilung vonnöten ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Auftreten einer AI von multiplen begleitenden Faktoren abhängig ist. So können das Alter und Geschlecht (M>F) des Patienten, ein begleitender Diabetes mellitus sowie eine adjuvante Chemo-, Radio- oder Immunsuppressionstherapie die normale Wundheilung und Durchblutung des Darmes negativ beeinflussen (6,8). Weiterhin gelten lokale Entzündungen, Proteinmangel und Vitamindefizite, Alkoholabusus, Adipositas, Rauchen, sowie das Vorliegen einer

## Einleitung

Kontamination im Operationsbereich oder einer Sepsis zu den Risikofaktoren für eine AI (4,9,10).

Wie diverse Studien ergeben haben, hat die Art und Weise, wie die Anastomose angelegt wird, ob gestapelt oder genäht, mit einer mehrschichtigen Naht oder einer einschichtigen Naht, keinen Einfluss auf die Haltbarkeit der Dickdarznaht (9,11). Auch die mechanische Darmvorbereitung hat keinen Einfluss auf das Auftreten von Anastomoseleckagen, weder beim offen chirurgischen noch beim laparoskopischen Vorgehen (12). Insgesamt scheinen laparoskopisch durchgeführte Darmoperationen im Vergleich zu den offenkonventionellen Eingriffen Vorteile hinsichtlich der Morbidität zu haben sowie eine schnellere Mobilisierung und verkürzte Dauer des Krankenhausaufenthaltes zu ermöglichen; eine durchgehend reproduzierbare verringerte Inzidenz von Anastomoseninsuffizienzen konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden (13,14).

Eine der wichtigsten Voraussetzungen zur adäquaten und erfolgreichen Behandlung einer AI ist deren rechtzeitige Erkennung. Zunächst sind die klinischen Zeichen einer AI nur schwer von einem leicht protrahierten postoperativen Verlauf zu unterscheiden. Fieber unklarer Genese, oft assoziiert mit Tachykardie, ist ein erster Hinweis auf eine Malfunktion der Anastomose. Bei extraperitoneal angelegten Anastomosen können abdominelle Auffälligkeiten zunächst fehlen, die formierten Abszesse perforieren dann in die Peritonealhöhle und verursachen eine generalisierte Peritonitis (15,16). Alves et al. konnten zeigen, dass Fieber am zweiten postoperativen Tag, Flüssigkeitsansammlungen über 400 ml in den Drainagen zwischen Tag 1 und 3 post-OP, Nierenversagen ab dem dritten postoperativen Tag, fehlende Darmbewegungen ab dem vierten postoperativen Tag, Diarrhoe vor dem siebten Tag, und der Nachweis einer Leukozytose nach einer Woche bei Patienten mit einer Anastomosendehiszenz statistisch häufiger auftreten als bei Patienten, die einen unkomplizierten postoperativen Verlauf nehmen (17).

### **1.2. Wundheilung des Darms**

Die normale Wundheilung besteht aus mehreren gut regulierten und aufeinander abgestimmten Prozessen, deren Aufgabe es ist, schnellstmöglich eine Abdichtung der Wunde und nachfolgend einen kompletten und stabilen Wiederaufbau des Gewebes zu erreichen. Die Anastomosenheilung im Intestinaltrakt entspricht im Wesentlichen den Mechanismen der allgemeinen Wundheilung, verläuft aber schneller (18). Sie durchläuft hierbei drei sich überschneidende Phasen: die exsudative Phase, die proliferative Phase und die reparative Phase.

## Einleitung

Bereits mit dem Schnitt des Skalpells werden die ersten Reparatursprozesse eingeleitet, dies ist der Beginn der exsudativen, oder auch inflammatorischen, Phase. Sie ist charakterisiert durch die Ausbildung eines lokalen Gewebeödems, der Thrombozytenaggregation und der Aktivierung des Gerinnungssystems. Weiterhin kommt es zur Exsudation von Fibrin und zur Einwanderung von Entzündungszellen. (18,19). Die Interaktion zwischen inflammatorischen und reparativen Zellen wird zu einem großen Teil durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst (18). Diese Proteine haben aber nicht nur eine wichtige Funktion bei der Steuerung der Reparaturvorgänge, sondern (18) „kontrollieren den Kollagenabbau und die Kollagensynthese, die Rekrutierung und Proliferation neuer Fibroblasten und Endothelzellen sowie von Makrophagen“ im Wundgebiet (18).

Die nachfolgende Abbildung 1 von Witte et al. veranschaulicht den zeitlichen Ablauf der Einwanderung von Zellen der Wundheilung in die Anastomose im Rahmen der ersten 14 Tage (19).

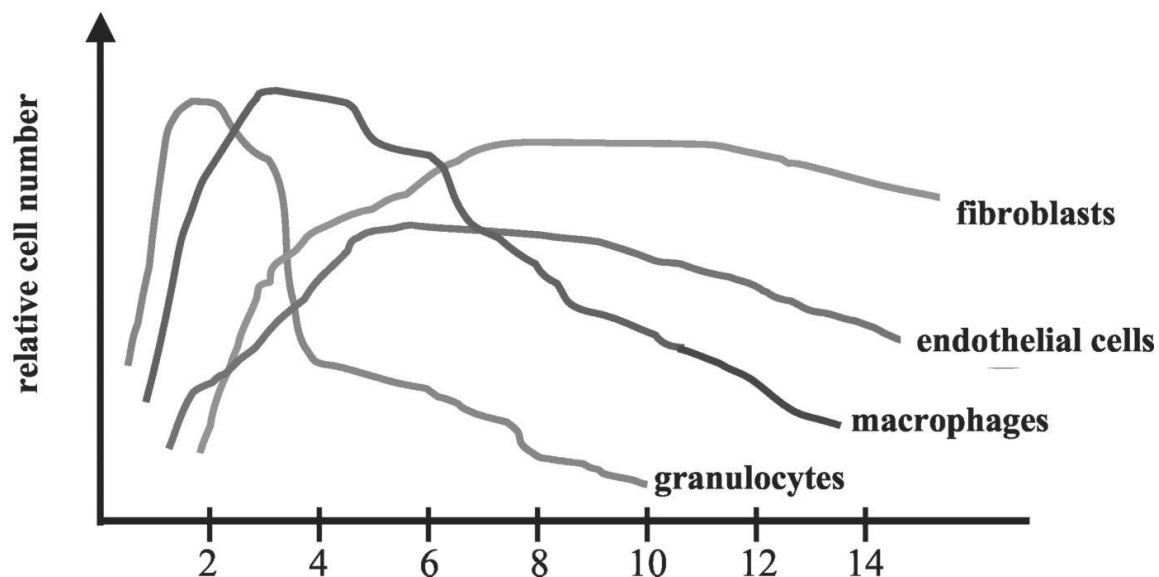


Abbildung 1 © Witte MG, 2003; Lippincott Williams & Wilkins (19)  
Dynamik der Zellinfiltration im Bereich der Darmanastomose. Vergleichbar mit der dermalen Wundheilung, wandern Entzündungszellen sehr früh in die Wunde ein, gefolgt von Endothelzellen und Fibroblasten, die verantwortlich sind für die Matrixsynthese

Unmittelbar nach Wundsetzung kommt es neben der Hemmung der fibrinolytischen Aktivität zum Aufbau eines Fibringerüsts, das als Leitstruktur für die Migration von inflammatorischen Zellen, Fibroblasten und Blutgefäßen wirkt (20). Diese Vorgänge sind wesentlich für die mechanische Frühbelastbarkeit der Anastomose.

## Einleitung

Bedingt durch die lokale Entzündungsreaktion kommt es zu einer vermehrten Bildung von gewebständigen Kollagenasen, den Matrixmetalloproteinasen. Diese Kollagenasen, sowie die aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten sezernierten Proteasen, sind Teil der Reaktion des gesamten betroffenen Darms mit gesteigerter Kollagenolyse und Kollagensynthese (18,21,22). Dies führt in den ersten Tagen im Bereich der Anastomose zu einer Schwächung der Darmwand und beeinflusst hierdurch die Nahthaltekapazität. Untersuchungen haben gezeigt, dass der beeinträchtigte Bereich im Dickdarm mit 2,5 cm proximal und 0,5 cm distal der Anastomose um ein Vielfaches größer ist als im Dünndarm (22,23). Innerhalb der ersten drei bis vier postoperativen Tage verlieren Kolonanastomosen so einen Großteil ihrer initialen Festigkeit; in dieser Zeit sorgen vor allem die Anastomosennähte für eine ausreichende Stabilität (21,22,24).

Die proliferative Phase ist geprägt durch eine Zunahme der Zelldichte, insbesondere an Fibroblasten, das Einsprossen neuer Gefäße und die Bildung einer neuen Bindegewebsschicht; diese Vorgänge stehen unter der regulierenden Funktion der Makrophagen mittels Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (18,19). Es kommt zur Formierung des stark vaskularisierten Granulationsgewebes und dem Beginn des Wundverschlusses unter Rückbildung von Ödem und Entzündungszeichen (18).

Stellen die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten/Makrophagen in den ersten Tagen den Großteil der Zellen im Bereich der Anastomose, sind ab Tag 4 die Fibroblasten der häufigste Zelltyp (18,24). Im Magen-Darmtrakt wird die Kollagenproduktion nicht nur durch Fibroblasten sondern zusätzlich auch von glatten Muskelzellen durchgeführt (18,19,24). In der frühen Phase der Wundheilung des Gastrointestinaltrakts verschiebt sich das Verhältnis der normalen Kollagenzusammensetzung der Submucosa dahingehend, dass nun das Typ III-Kollagen 30% bis 40% Prozent des Kollagenanteils im Granulationsgewebe stellt (im Vergleich zu den sonst 20%) und so eine ausreichende Elastizität ermöglicht wird (24). Das Maximum der Kollagensyntheserate wird in der Kolonanastomose nach einer Woche erreicht (23,25). Der Abbau des nicht mehr benötigten Fibrins parallel zur gesteigerten Kollagensynthese führt zu einem Anstieg des Kollagengehaltes in der Darmwand und zu einer Zunahme der Anastomosenfestigkeit und der Nahthaltekapazität bis zum 14. postoperativen Tag (18,19,24). Während die Anastomosenfestigkeit in den ersten postoperativen Tag deutlich abnimmt und nur etwa 10% der Festigkeit des intakten Darmes beträgt (18), erreicht die Anastomose durch die beschriebenen Vorgänge nach ca. einer Woche wieder die initiale postoperative

## Einleitung

Festigkeit, ist aber noch vulnerabler als nicht operierter Darm (18,24). Etwa ab dem 12. Tag sind die Nähte für die Haltbarkeit und Festigkeit der Anastomose nur noch von untergeordneter Bedeutung (18).

Die Neubildung von Blutgefäßen beginnt ab dem zweiten bis dritten postoperativen Tag (19), und entwickelt ihr volles Ausmaß mit der proliferativen Wundheilungsphase und der Ausbildung des Granulationsgewebes und hat am Ende dieser Phase auch ihren weitgehenden Abschluss gefunden (18,24), nach etwa 14 Tagen kommt es zur vaskulären Vereinigung beider Seiten der Anastomose (26).

Die reparative Phase ist durch die Stabilisierung des Kollagens mit Reorganisation der Darmwandschichten charakterisiert und kann mehrere Monate bis zu zwei Jahren dauern (18). Das Granulationsgewebe der Proliferationsphase reift zu Narbengewebe aus, die Anastomosenregion ist vollständig bindegewebig durchbaut und reepithelialisiert (19). (18) „Aus klinischer Sicht ist die dritte Phase der Anastomosenheilung vergleichsweise am wenigsten wichtig, da die Anastomosen bereits am Ende der proliferativen Phase eine ausreichende Festigkeit erreicht haben (18).“ Über die Zeit erfolgt eine kontinuierliche Reduktion der Narbengröße und -dicke, die jedoch nicht mit einem Rückgang der Wundfestigkeit verbunden ist. Ferner kommt es zur Reorganisation der dünnen Kollagenfibrillen, die nun zu dickeren und dichteren Kollagenfasern zusammengefügt werden (18). Granulationsgewebe besteht zu 30% aus Typ-III Kollagen, das Narbengewebe beinhaltet dagegen nur noch weniger als 20% Typ-III Kollagen (18,24). Am Ende der Wundheilung steht immer faserreiches, zellarmes Narbengewebe (18).

### **1.3. Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktoren gehören zu der Gruppe der Zytokine und sind extrazellulär vorkommende Signalproteine. Über parakrine, autokrine und z.T. endokrine Funktionen nehmen sie Einfluss auf Prozesse wie Wachstum, Zellfunktion und -differenzierung.

Diese Funktionen spielen sowohl in der Embryonalentwicklung als auch in der postnatalen Entwicklung und im Erwachsenenalter für die Körperhomöostase eine zentrale Rolle. So regulieren sie die Zellproliferation und die Differenzierung neu gebildeter Zellen, z.B. die Erneuerung des Darmepithels oder die Bildung von Blutzellen. Auch für die Koordinierung von Regenerationsprozessen nach Gewebsverletzungen sind Wachstumsfaktoren unerlässlich (27,28).

## Einleitung

Über die Bindung der Proteine an ihre spezifischen Rezeptoren kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Kaskaden, die über die Phosphorylierung weiterer Kinasen und Proteine letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, die auf die Expression bestimmter Gene Einfluss nehmen. Abhängig vom Zelltyp, an dessen Rezeptor der Wachstumsfaktor bindet, der vorliegenden Konzentration des Proteins und weiteren vorliegenden Zytokinen, kann die letztliche Reaktion der Zelle unterschiedlich ausfallen (27–29).

Auch im Bereich der Wundheilung des Gastrointestinaltraktes spielen mehrere Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle. Unter anderem sind dies der Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) sowie der hämatopoetische Wachstumsfaktor Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF).

### **1.3.1. IGF-1**

Der Insulin-like Growth Factor-1, auch Somatomedin C genannt, ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 7,65 kDa. Gebildet wird er vor allem in der Leber, jedoch auch in weiteren Organen und von verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen (30–32). Die Struktur zeigt eine große Homologie zu Proinsulin und ähnelt der des Insulins, wodurch sich der Name des Zytokins ableiten lässt (31). Der Wachstumsfaktor geht im Serum mit IGF-Bindungsproteinen eine hochaffine Bindung ein und ist dadurch inaktiviert. In Situationen, wie z.B. bei der Wundheilung, in denen ein vermehrt aktiv vorliegendes Protein von Vorteil ist, kann durch Verschiebung des Verhältnisses von gebundenem zu freiem IGF-1 der Prozess verstärkt unterstützt werden (31). Die Wirkweise des Proteins wird als anabolisch und antikatabolisch beschrieben (33,34). Teil der anabolischen Effekte von IGF-1 sind die Stimulation von DNA-Synthese, Zellproliferation, Proteinsynthese und Glukosetransport. Auch in verschiedenen Prozessen der Wundheilung nimmt das Zytokin eine wichtige Funktion ein (31,35). So ist IGF-1 ein zentraler Regulator des Wundheilungsprozesses indem er die Kollagensynthese (36,37), die Fibroblastenproliferation (29) und die Endothelproliferation stimuliert (38). Im Verlauf der Wundheilung wird IGF-1 von Makrophagen, Fibroblasten, Thrombozyten und Endothelzellen produziert und freigesetzt (31,39). Im Rahmen seiner antikatabolen Wirkung verbessert IGF-1 die Stickstoffbilanz; bei Patienten mit reduzierter

## Einleitung

Kalorienaufnahme führt die Gabe des Wachstumsfaktors zu einem reduzierten Proteinabbau und somit zu einem verminderten Verlust an Muskelmasse (33,40).

Der Nachweis von IGF-1 Rezeptoren im gesamten Gastrointestinaltrakt lässt erahnen, dass der Wachstumsfaktor für die normale Funktion des Intestinums eine wichtige Rolle spielt (36,41). Im Zuge von Entzündungs- und Heilungsprozessen kann sowohl eine ansteigende Zahl an IGF-1-Rezeptoren, als auch eine Zunahme an IGF-1-mRNA nachgewiesen werden, was die Bedeutung des Wachstumsfaktors im Rahmen der Wundheilung unterstreicht (42). Dieser Effekt wurde näher untersucht, und Krishnan et al. konnten zeigen, dass durch IGF-1 eine Epithelproliferation, eine Vermehrung der Extrazellulärmatrix und somit eine Zunahme des Intestinalgewichtes erreicht wird (43). Die Effekte der systemischen IGF-1-Applikation wurden in verschiedenen Untersuchungen mit unterschiedlichem Versuchsaufbau nachgewiesen, so z.B. bei Verabreichung von Glukokortikoiden (44), nach Darmresektion (45), bei experimentell-induzierter Kolitis (46) oder in Zusammenhang mit der darmschädigenden Wirkung von Bestrahlung und Chemotherapeutika (47,48).

Auch die Auswirkungen des IGF-1 auf die Darmanastomosenheilung sind näher untersucht worden. Hierfür wurde der Wachstumsfaktor in den meisten Studien systemisch appliziert. Petersen et al. untersuchten als eine der ersten Arbeitsgruppen die Effekte des IGF-1 auf die Kolonanastomose bei der Ratte (49). Hier wurde das Protein über subkutan implantierte miniosmotische Pumpen verabreicht. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich die Konzentration an Kollagen (gemessen wurde Hydroxyprolin als Indikator der Kollagenumsatzes) in der Versuchsgruppe zwar signifikant erhöht hatte, dies jedoch ohne Auswirkung auf die messbare Stabilität der Anastomose im Vergleich zur Kontrollgruppe blieb. Egger et al. untersuchten den Effekt von täglich intraperitoneal verabreichtem IGF-1 und konnten histologisch eine vermehrte Kollagensynthese nachweisen (37). Darüber hinaus sahen sie aber auch schon zu den früh-postoperativen Zeitpunkten eine Zunahme der Epithelzellproliferation. Dies wurde so interpretiert, dass der Wachstumsfaktor nicht nur die Matrixsynthese fördert, sondern auch direkten Einfluss auf die Epithelproliferation nehmen kann. In den Versuchsgruppen konnte zu allen postoperativen Zeitpunkten eine höhere Belastbarkeit der Anastomose nachgewiesen werden. Rijcken et al. verwendeten das in dieser Arbeit vorgestellte Beschichtungsverfahren, um die Effekte der IGF-1-Beschichtung auf die Anastomosenheilung bei Vorliegen einer experimentell induzierten Colitis zu untersuchen

## Einleitung

(50). Neben einer signifikant geringeren Zahl an Perforationen im Bereich der Anastomose konnte in der Histologie eine deutlich höherer „healing score“ ermittelt werden, mit signifikant höherer Kollagenablagerung und Neoangiogenese. Vergleichbar mit den Ergebnissen von Petersen et al. waren in der Wachstumsfaktorgruppe erhöhte Hydroxyprolinwerte messbar.

### **1.3.2. Applikationsformen und Nebenwirkungen des IGF-1**

Die Auswirkungen einer Verabreichung von Wachstumsfaktoren im Rahmen eines therapeutischen Behandlungsversuches wurden seit den 1990er Jahren in den verschiedensten Indikationen untersucht. Auch im Bereich der Wundheilungsforschung war dieser Ansatz von Interesse, und schnell zeigte sich, dass IGF-1 durch seine anabolen und antikatabolen Eigenschaften einen wirkungsvollen und für die Forschung interessanten Faktor darstellt.

So konnte im Tierversuch bei der Behandlung von Brandverletzungen, die eine sehr komplexe Schädigung des Körpers und seiner Funktionen darstellen, durch subkutane Injektionen von IGF-1 über insgesamt acht Wochen eine Verbesserung der Wundheilung erreicht werden (51). Durch liposomalen IGF-1-cDNA Gentransfer konnte nicht nur der mit der Verbrennung in Zusammenhang stehende Gewichtsverlust verhindert werden, sondern es wurden auch eine signifikant vermehrte Keratinozytenproliferation und eine beschleunigte Reepithelialisierung und dermale Regeneration beobachtet (52–54).

Zur Untersuchung des Einflusses auf die Wundheilung im Intestinaltrakt sowie der Möglichkeiten zur Verbesserung der Resorptionsleistung wurden Wachstumsfaktoren wie IGF-1, Epidermal Growth Factor (EGF) oder Keratinocyte Growth Factor (KGF) i.v. (55) oder subkutan über miniosmotische Pumpen (49,56) appliziert, intraperitoneal verabreicht (37,57), in Gelatineschwämmchen inkorporiert und hierüber freigesetzt (58) und über Jejunalkatheter intraluminal appliziert (59).

Im Zusammenhang mit diesen Applikationsformen besteht jedoch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten unerwünschter Wirkungen, wobei gezeigt werden konnte, dass die im Zusammenhang mit einer systemischen Gabe oder subkutanen Applikation von IGF-1 hervorgerufenen Nebenwirkungen konzentrationsabhängig sind (60). Neben zahlreicher Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme oder Hypoglykämien werden zudem Veränderungen der Nierenfunktion beobachtet und es wird ein Zusammenhang mit dem experimentell erzeugten Diabetes mellitus vermutet (55,56,61).



## Einleitung

Durch die durch IGF-1 bedingte Flüssigkeits- und Natriumretention könnte es bei Patienten mit einer vorbestehenden kardialen Funktionsstörung unter IGF-1-Therapie schneller zu einer pulmonalen Flüssigkeitsüberladung und Dyspnoe kommen; weitere mögliche Nebenwirkungen aus dem kardiovaskulären Bereich sind Tachykardie und orthostatische Hypotension (62,63).

Wenn IGF-1 im Plasma nicht an eines der sechs Bindungsproteine gebunden ist, liegt seine Halbwertszeit zwischen vier und 20 Minuten, beim Menschen geht man von einer Halbwertszeit von etwa zehn Minuten aus (64). Diese verlängert sich durch Bindung an die spezifischen Proteine bis auf 18 Stunden. Dies bedeutet, dass eine Wirksamkeit des Wachstumsfaktors nach systemischer Gabe nur durch hohe Dosen erreicht werden kann und somit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer der o.g. Nebenwirkungen deutlich ansteigen würde (65).

### **1.3.3. Lokale Applikation mittels Beschichtung**

Um die erwähnten Nebenwirkungen zu vermeiden und die Therapie bei vergleichbarer Wirksamkeit und dabei gezielterer Applikationsmöglichkeit des Wirkstoffes für den Patienten noch besser verträglich zu gestalten, werden lokale Applikationsmöglichkeiten erforscht. Hierbei stellen subkutan implantierte Pumpsysteme (49) oder über eine Jejunostomie eingeführte Katheter (59) aufgrund Ihres Mangels an Praktikabilität keinen wirklich zufriedenstellenden Lösungsansatz für die klinische Anwendung dar.

Es sind jedoch andere Ansätze denkbar: so könnte eine Inkorporierung des Wirkstoffes in seiner aktiven und stabilen Form in eine Trägersubstanz und die nachfolgende Administration über lokale Lösung des Faktors aus dieser Beschichtung eine geeignetere Alternative darstellen. Hier erfüllt das Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) als biodegradierbare Trägersubstanz alle Anforderungen, bei dem es sich um ein inertes, amorphes PLA-Stereo-Co-Polymer handelt (66). Dieses Milchsäurepolymer wird vom Körper in Monomere gespalten, die dann im Citratzyklus weiter verstoffwechselt werden können, ohne dass toxische Metabolite entstehen (66). In der Anwendung am Knochen konnten Schmidmaier et al. keine Fremdkörperreaktion auf die PDLLA-Beschichtung von Tibianägeln im Sinne von Bildung von Resorptionszonen oder vermehrter Einwanderung von Makrophagen beobachten (67,68).

Die Anwendung der biodegradierbaren Beschichtung wie z.B. mittels PDLLA ist im Tierversuch vielfach untersucht worden (67,69–71) und wird auch schon im klinischen

## Einleitung

Alltag verwendet, so im Bereich der Stenttechnik in der Kardiologie (72) sowie in der Unfallchirurgie bei der Verwendung Gentamicin-beschichteter Nägel zur Vorbeugung von Infektionen bei offenen Tibiaschaftfrakturen (73,74).

In präklinischen Studien konnte durch die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren die Heilung von Tibiafrakturen und die intervertebrale cervikale Fusion positiv beeinflusst werden (67,71). Schmidmaier et al. und Kandziorra et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass die Verwendung beschichteter Implantate zwar zu einer lokalen und wirksamen Freisetzung von Wachstumsfaktoren führt, die jedoch nicht mit Nebenwirkungen verbunden ist.

Durch ein sogenanntes „kaltes“ Beschichtungsverfahren, bei dem der Wachstumsfaktor bei Raumtemperatur mit der PDLLA-Lösung vermischt wird, ist es gelungen, den Wachstumsfaktor IGF-1 in seiner biologisch aktiven Form in die Polylaktid-Beschichtung zu inkorporieren. Aus dieser Beschichtung wird das Protein dann kontinuierlich freigesetzt und biomechanische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Stabilität der Beschichtung bei mechanischer Belastung nicht beeinträchtigt wird (69).

### **1.4. Beschreibung des Projektes und Fragestellung**

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, den Einfluss des humanen IGF-1 auf die Wundheilung im Rattenkolon zu untersuchen und bestand aus mehreren Themenbereichen: den biomechanischen Untersuchungen zur Reißfestigkeit des anastomosierten Darmabschnittes; den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen; und den biochemischen Analysen. Die Ergebnisse der biomechanischen und histologischen Versuche wurden in zwei weiteren Promotionsarbeiten veröffentlicht (75,76), die vorliegende Arbeit war der Analyse der Protein- und Genexpression gewidmet.

Bei der Anlage der End-zu-End-Anastomose im Colon transversum der Ratte wurde abhängig von der Gruppenzugehörigkeit einer der folgenden Fäden verwendet: ein unbeschichteter Faden, ein nur mit dem Trägermaterial PDLLA beschichteter Faden oder ein mit PDLLA und IGF-1 beschichteter Faden. Die postoperative Standzeit der Tiere betrug 24 Stunden, drei oder sieben Tage; nach Abschluss der biomechanischen Untersuchung der Anastomosenfestigkeit wurde die Anastomosenregion für die anschließenden Untersuchungen entnommen. Hierbei wurden die Auswirkungen des IGF-1 auf die Proteinkonzentration des IGF-1 sowie anderer Wachstumsfaktoren (VEGF, GM-CSF und TGF- $\beta$ 1) und die Genexpression von IGF-1 und von VEGF untersucht.

## Einleitung

### **Fragestellung**

Beschleunigt die lokale Applikation von IGF-1 aus einer PDLLA-Beschichtung des Nahtmaterials die Anastomosenheilung des Rattenkolons und hat dies Auswirkung auf die Protein- und Genexpression verschiedener Wachstumsfaktoren?

### **1.5. Hypothese**

Die lokale Freisetzung von IGF-1 aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung fördert die Wundheilung der Kolonanastomose der Ratte und hat Einfluss auf die messbare Proteinkonzentration und Genexpression verschiedener Wachstumsfaktoren.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

Für die Versuche wurden ca. sechs Monate alte, weibliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 250g-300g verwendet (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland). Ratten werden häufig für Studien zur Heilung von Darmanastomosen eingesetzt; somit können die Ergebnisse mit einer Vielzahl von Daten zur normalen und pathologischen Wundheilung verglichen werden (37,48–50,55,57,58,77–80).

Die Tiere wurden zu viert in Typ3-Käfigen bei einem künstlichen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und artgerechter Umgebungstemperatur mit freiem Zugang zu Trockenfutter (V-Alleinfutter für Ratten-/Mäusehaltung, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser gehalten. Nach einer Gewöhnungszeit von etwa zwei Wochen wurden die Ratten ab dem dritten präoperativen Tag auf eine Spezialnahrung (Spezialfutter, Co 193 Hochverdauliche fettangereicherte Diät, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) umgestellt, um, bei Erhaltung einer gehaltvollen und hochverdaulichen Diät, einen weichen Stuhl zu gewährleisten, der die Operation und die anschließende Wundheilung erleichtern sollte. Hierzu wurden 0,6 g Agarose (Agarose Ultra Pure, GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland) in 100 ml Wasser gelöst und zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung auf 40°C wurden 30 g des Spezialfutters dazugegeben und verrührt. 24 Stunden vor dem Eingriff standen die Tiere unter Nahrungskarenz; nach der Operation hatten die Tiere wieder freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser.

Die Durchführung dieser Studie wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der Nummer G 0045/01 genehmigt.

### **2.2. Gruppeneinteilung**

Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss von lokal appliziertem IGF-1 auf die Wundheilung von Darmanastomosen der Ratte zu untersuchen. Hierfür wurden drei Gruppen gebildet: Eine Gruppe, deren Versuchstiere mit einem handelsüblichen, unbehandelten PDS®II 6-0 Faden operiert wurden, eine Gruppe, deren Nahtmaterial nur mit dem PDLLA-Trägermaterial beschichtet war und eine Gruppe, die mit in PDLLA inkorporiertem IGF-1 beschichtetem Nahtmaterial versorgt wurde; die Tiere der

## Material und Methoden

jeweiligen Gruppen wurden 24 Stunden, drei oder sieben Tage nach dem operativen Eingriff untersucht.

Die einzelnen Gruppen hatten eine Gruppenstärke von jeweils 18 Ratten, wobei 8 Tiere für die histologischen Untersuchungen verwendet wurden und 10 Tiere für die biomechanischen Versuche. Nach Abschluss der biomechanischen Testungen wurde der Anastomosenbereich dieser Tiere entfernt und für die proteinanalytischen Versuche und Messungen der Genexpression verwendet. Als Referenz diente eine Gruppe nicht operierter Ratten (n=8).

### **2.3. Wachstumsfaktor, Trägermaterial und Beschichtung**

#### **Wachstumsfaktor**

Rekombinanter humaner Insulin-like Growth Factor-1 (rh-IGF-1); (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

#### Spezifikation

Ursprung: Die das IGF-1 Protein kodierende DNA-Sequenz wird in E.coli exprimiert

Molekulargewicht: Das gereinigte rekombinante Protein enthält 70 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 7,5 kDa

Reinheit: >97%, bestimmt durch SDS-PAGE und Silberfärbung

Endotoxin-Level: <1.0 EU pro 1 µg des Cytokins, bestimmt durch LAL

Kreuzreaktivität zur Ratte: 96%

(R&D Systems, „Specification and Use“, rh-IGF-1, Cataloguenumber 291-G1-050)

#### **Trägermaterial**

- PDS®II 6-0-Fäden; (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- Poly(D,L-Laktid) R 203; (Boehringer Ingelheim, Mannheim, Deutschland)
- Ethylacetat (UN 1173); (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Sterilfilter (0,2 µl); (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Der Faden diente bei den oben beschriebenen Versuchen sowohl als Nahtmaterial der End-zu-End-Anastomosen am Colon transversum sowie, bei den entsprechenden Gruppen, als Trägermaterial für den Wachstumsfaktor, um die direkte lokale Applikation von IGF-1 zu gewährleisten.

### **Beschichtung**

Die Fäden wurden unter sterilen Bedingungen mittels einer „kalten“ Beschichtungstechnik (69) mit dem Trägermaterial Poly(D,L-Laktid) (PDLLA), einem Milchsäurepolymer, beschichtet. Diese Methode ermöglicht, das Protein in biologisch aktiver Form in die Beschichtung einzuarbeiten. Der Wachstumsfaktor IGF-1 wurde dabei in 2,5%iger Konzentration inkorporiert.

Es wurden zunächst 100 mg des PDLLA in 1,5 ml Ethylacetat gelöst und durch einen sterilen Filter in ein ebenfalls steriles Behältnis gefüllt. Um die gewünschte Konzentration von 2,5% IGF-1 in der Beschichtungsmasse zu erreichen wurden 1 mg IGF-1 in 0,6 ml des gelösten PDLLA gegeben. Nun erfolgte die Kürzung des PDS®II 6-0 Fadens auf 30 cm und das Auffädeln auf eine 0,4 mm Kanüle; 10 µl des PDLLA-Wachstumsfaktorgemisches wurden mit einer Pipette in den Trichter der Kanüle gegeben. Durch langsames Auf- und Abbewegen der Kanüle entlang des Fadens konnte dieser gleichmäßig benetzt werden. Nach vollständigem Verbrauch des Beschichtungsgemisches wurde dieses trocknen gelassen und der Vorgang in gleicher Art und Weise wiederholt, so dass die Fäden mit insgesamt 20 µl beschichtet wurden. Nach erneutem Trocknen wurden die Fäden trocken und steril verpackt und bis zum Gebrauch kühl gelagert. Die Fäden der PDLLA-Gruppen wurden ebenfalls durch das oben beschriebene Verfahren beschichtet, wobei hierfür nur das in Ethylacetat gelöste PDLLA verwendet wurde.

### **2.4. Vorversuche zum Trägermaterial**

Die für die lokale Applikation verwendete Polylaktid-Beschichtung wurde in Vorversuchen auf ihre mechanischen Eigenschaften und die Freisetzungskinetik der eingearbeiteten Wachstumsfaktoren untersucht. Die mechanischen Tests und die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen sind nicht Teil dieser Promotionsarbeit; auf sie wird jedoch der Vollständigkeit halber kurz eingegangen.

Die Auswirkung der Beschichtung auf die biomechanischen Eigenschaften der Fäden wurde durch Zugversuche getestet, ebenso die Stabilität der Beschichtung durch wiederholtes Knoten.

Um eine Aussage über die Oberflächenstruktur der beschichteten Fäden und Homogenität der Beschichtung treffen zu können, wurden beschichtete und unbeschichtete Fäden unter einem Rasterelektronenmikroskop bei 500-facher bis 5000-facher Vergrößerung untersucht.

### 2.4.1. Elutionsversuch

- PDS®II 6-0 -Fäden; (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- Aprotinin „A3886“; (SIGMA; München, Deutschland)
- 1x Phosphatpuffer-Lösung (pH 7,2); (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland)
- Costar® 6 Well Microplate, Clear Flat Bottom Ultra Low Attachment; (Corning, NY, USA)
- CERTOMAT Inkubationshaube; (Sartorius BBI Systems; Melsungen, Deutschland)
- Schüttler LS10; (C. Gerhardt, Königswinter, Deutschland)
- Parafilm “M” Laboratory Film; (American Can Company, Greenwich, USA)
- Safe-Lock Tubes (1,5 ml); (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipette 100-1000 µl; ep T.I.P.S.- Pipettenspitzen 50-1000 µl; (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Für den Elutionsversuch wurden die PDS®II 6-0 Fäden in der oben beschriebenen Art und Weise beschichtet; hierbei wurde anstelle von IGF-1 jedoch Aprotinin verwendet, das ein dem Wachstumsfaktor ähnliches molekulares Gewicht hat. Die gesamte Länge des Fadens (90 cm) wurde beschichtet, wobei das Protein, anders als in der 2,5%-igen Beschichtung des Wachstumsfaktors, hier in der Gesamtbeschichtungsmasse in einer 7,5%-igen Lösung vorlag. Die Konzentration des während des Versuches gelösten Proteins wurde mit Hilfe eines Coomassie-Tests bestimmt, um die Freisetzungskinetik des inkorporierten Aprotinins aus der PDLLA-Beschichtung zu ermitteln. Die höherprozentige Beschichtung im Rahmen dieses Versuches wurde gewählt, um zu gewährleisten, dass auch die geringen Aprotininkonzentrationen an den frühen Messzeitpunkten zuverlässig erfasst werden konnten. Während die höhere Konzentration an Aprotinin in der Beschichtung Einfluss auf die Menge an freigesetztem Protein pro Zeitpunkt hat, sollte der eigentliche Verlauf der eluierten Proteinmenge weiterhin vergleichbar mit der 2,5%-igen Beschichtung bleiben.

Fünfundvierzig Fadenstücke mit einer Länge von je 2 cm wurden zugeschnitten und auf drei Wells verteilt. Die Wells wurden mit 3 ml 1x Phosphatpuffer-Lösung gefüllt und die Mikroplatte wurde mit Parafilm umspannt, um die Verdunstung zu minimieren. Die Platte wurde in eine Box mit feuchten Tüchern gelegt und auf einen Schüttler gestellt, der sich unter der Inkubationshaube befand, um eine konstante Umgebungstemperatur zu ermöglichen. Während der Versuchszeit lief der Schüttler auf der niedrigsten Stufe.

## Material und Methoden

Zu den Zeitpunkten 6h, 12h, 1 Tag, 3 Tage, 7 Tage, 14 Tage wurden jeweils 310 µl aus den Wells abgenommen und für den sich nach Versuchsende anschließenden Coomassie-Test eingefroren.

### 2.4.2. Coomassie-Test

Der Coomassie Plus Reagent Assay (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) ist eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung. Grundlage des Versuches ist folgende Reaktion:

Protein + Coomassie G-250 in saurem Milieu → Protein-Farbstoff-Komplex  
(blau, absorbiert bei 595 nm)

Die Proben des Elutionsversuches wurden doppelt bestimmt und mit dem BSA-Standard korreliert. Der BSA-Standard (2,0 mg/ml) wurde nach einem vom Hersteller vorgegebenen Schema verdünnt, um die geeigneten Standardkonzentrationen für die Proteinbestimmung zu erhalten.

Die Proteinbestimmung wurde gemäß Herstellervorschrift durchgeführt. Die Absorption der Standards und Proben wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Microplate Reader (Model 680, Bio-Rad, USA) gemessen und nachfolgend die Konzentrationsbestimmung mit dem Program Microplate Manager (Bio-Rad, USA) durchgeführt.

### 2.5. Operation und Untersuchung

Die Operationsvorbereitungen, die Voruntersuchungen und die Operation erfolgten unter standardisierten Bedingungen. Die Operationen wurden allesamt vom gleichen Operateur durchgeführt, und die Ratten in einer zufälligen Reihenfolge den Gruppen zugeordnet.

#### Inhalationsnarkose

- Narkosegerät Artec Typ Vet; (F. Stephan GmbH, Gackenbach, Deutschland)
- Narkosebox (durchsichtiger Plastikbehälter mit Deckel, 2 l) mit Schlauchsystem und Inhalationsmaske
- Isofluran (Forene®) [WS: 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether]; (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland)



## Material und Methoden

Zur Sedierung wurden die Ratten in eine speziell angefertigte, transparente Narkosebox gesetzt, in die ein Gemisch aus Stickstoffmonoxyd (1,5 l/min), Sauerstoff (0,7 l/min) und Isofluran (5 Vol.%) eingeleitet wurde. Ein zweiter Zugang an der Box diente der Ableitung des Narkosegemisches.

### **Injektionsnarkose**

- Ketavet® [WS: Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml]; (Pharmacia & Upjohn GmbH, Wien, Österreich)
- Rompun® [WS: Xylacinhydrochlorid]; (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)
- 1 ml Einmalspritzen
- Kanülen

Nachdem die Ratten in der Narkosebox ausreichend sediert worden waren, wurden sie aus dieser entnommen und durch eine intraperitoneale Injektionsnarkose mit ca. 1,2 ml (80 mg/kg KG) Ketavet und ca. 0,9 ml (12 mg/kg KG) Rompun gewichtsadaptiert anästhesiert.

### OP-Vorbereitung

- Elektrolanghaarschneider: Aesculap, Typ GT104
- Enthaarungscreme: Pilca® [Thioglykolsäure]; (Schwarzkopf & Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
- Digitales Thermometer; (Paul Hartmann AG, Steinheim, Deutschland)
- Waage: Kilomat-Präzisionswaage, Typ 2106; (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Gleitmittel: Lidocainhydrochlorid, Xylocain Gel 2%; (Astra GmbH, Wedel, Deutschland)
- Softasept® N [Ethanol 100%]; (B.Braun, Melsungen, Deutschland)
- Edding Farbstifte: schwarz, blau, rot, grün

Mit dem Elektrolanghaarschneider und der Enthaarungscreme wurde eine vollständige Enthaarung des Abdomens vom Sternum zum Os pubis vorgenommen. Anschließend wurde der Bereich mit Softasept desinfiziert, um das Infektionsrisiko zu minimieren.

Nach der Bestimmung des Gewichts und der Körperkerntemperatur erfolgte zur weiteren Identifizierung der Ratten eine fortlaufende Nummerierung durch eine standardisierte farbige Markierung am Schwanz.

## Material und Methoden

### Operation

- Sterile Einmalhandschuhe
- Mundschutz
- Sterile Kompressen
- Sterile OP-Tücher
- Sprühpflaster
- Leukoplast® Pflaster; (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland)
- Natriumchlorid-Lösung 0,9%; (Delta-Pharm GmbH, Pfullingen, Deutschland)
- 2 ml Einmalspritzen
- Prolene® 4-0, nichtresorbierbar; (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- PDS®II 6-0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland); unbeschichtet, PDLLA, oder PDLLA+IGF-1

Steriles OP-Besteck bestehend aus:

- Einmalskalpell Nr.15
- Präparationsschere, Fadenschere
- Nadelhalter
- Pinzette, anatomisch und chirurgisch
- Kanülen zum Aufspannen der Faszien
- Klemmchen

Geräte:

- Operationsmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Narkosegerät Artec Typ Vet; (F. Stephan GmbH, Gackenbach, Deutschland)

Für die Operation wurden sterile Tücher auf dem Operationstisch ausgelegt, die Tiere auf dem Rücken gelagert und das Operationsfeld nach Ethanol-Desinfektion mit Lochtüchern abgedeckt.

Nach einer Stichinzision erfolgte die Durchführung einer medianen Laparotomie von ungefähr 5 cm Länge. Um eine optimale Einsicht in den Operationssitus zu erhalten, wurde die Bauchwand mit jeweils einer Kanüle seitlich aufgespannt. Unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskops wurde nun das Colon transversum dargestellt und im Bereich der linken Kolon-Flexur durchtrennt. Nach Säuberung der beiden Kolonenden wurden diese nun wieder durch eine fortlaufende Naht End-zu-End anastomosiert. Hierfür wurden, je nach Gruppen-Zugehörigkeit, die unbeschichteten, PDLLA-beschichteten

## Material und Methoden

oder PDLLA-IGF-1-beschichteten PDS®II 6-0-Fäden verwendet. Während der Operation wurde der Bauchraum regelmäßig mit isotoner Kochsalzlösung benetzt, um ein Austrocknen der Eingeweide zu verhindern.

Im Anschluss wurde die Anastomose auf Kontinuität und suffizienten Verschluss überprüft, der Dick- und Dünndarm reponiert und die Muskelwand sowie die Haut mit dem Prolene® 4-0 Faden durch eine fortlaufende Naht verschlossen.

Nach dem Erwachen aus der Narkose wurden die Ratten wieder in Gruppen zu je vier Tieren in einem neuen Käfig gehalten, und hatten freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser. Zur Nachsorge wurden die Tiere täglich kontrolliert, wobei der Allgemeinzustand und die Wunde beobachtet und beurteilt wurden.

### **2.6. Proteinisolierung**

#### **Gewebeaufbereitung**

- Skalpell
- Pinzette
- Plastikkassetten
- Flüssiger Stickstoff
- Sterile Schere und Pinzette
- Eppendorf Safe-Lock Tubes
- Waage
- Potter
- Eis in Kühlbehälter

Nach Abschluss der biomechanischen Versuche, die nicht Teil der vorliegenden Arbeit waren, wurde die Anastomosenregion entnommen. Hierbei wurde der Darmabschnitt mit einem Abstand von jeweils 1 cm proximal und distal zur Anastomose reseziert, das Nahtmaterial entfernt und die Probe in die gekennzeichneten Plastikkassetten gelegt. Die Kassetten wurden dann in flüssigen Stickstoff gegeben, um den zellulären Stoffwechsel zu stoppen und die postmortale Autolyse zu verhindern. Im Anschluss wurden die Darmabschnitte bei -20°C im Tiefkühlraum bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die biomechanischen Untersuchungen sowie die Entnahme der Proben wurden am lebenden, narkotisierten Tier durchgeführt, um eine kontinuierliche Blutversorgung zu gewährleisten; die Tiere wurden nach Resektion des Anastomosenbereichs durch eine

## Material und Methoden

intrakardiale Kaliumchlorid-Injektion getötet. Insgesamt wurden für die Durchführung der biomechanischen Versuche pro Ratte maximal 30 Minuten benötigt.

Um Gewebe der kompletten Anastomosenregion (proximal und distal) für die Protein- und RNA-Isolierung zur Verfügung zu haben, wurde der resezierte Darmabschnitt querverlaufend halbiert. Zur Vorbereitung der Proteinisolierung wurden dann die Anastomosenregionen im Tiefkühlraum in kleine Stücke geschnitten, in Safe-Lock Tubes transferiert und gewogen (Zielgewicht von 30 mg, mit einer Toleranz von +/- 5% [=1,5 mg]). Die Proben wurden auf Eis gelagert, um die Protease-Aktivität auf ein Minimum zu reduzieren. Das Gefäß wurde dann in flüssigen Stickstoff gehalten, um die Temperatur zu senken; selbiges wurde mit dem Potter durchgeführt. Im Anschluss wurde vorsichtig flüssiger Stickstoff zugefügt, um die Darmstücke tiefzugefrieren. Bei einer Füllmenge von 0,5 ml wurde das Gefäß leicht schräg gehalten und das Gewebe mit dem Potter in Dreh- und Auf-/Abwärtsbewegungen zerkleinert. Dieser Ablauf wurde so oft wiederholt, bis eine gründliche Zerkleinerung des Gewebes erreicht wurde.

### Complete-Proteaseninhibitor (PI) Ansatz

- Complete Proteaseinhibitor; (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
- Aqua ad iniectabiliam (a.i.)
- Eppendorf Safe-Lock Tubes
- Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Eine Tablette Complete-PI wurde in 2 ml Aqua a.i. aufgelöst und in 5 Aliquots à 400 µl eingefroren. Ein Aliquot wurde nun in 4,6 ml PBS gegeben und vermischt. Hiermit wurde die Konzentration erreicht, die in der Herstellerangabe als die mit der stärksten protektiven Fähigkeit angegeben ist (1 Tablette in 25 ml PBS gelöst).

### Proteinisolierung

10 µl des PBS-Proteaseinhibitors wurden zu je 1 mg des aufbereiteten Gewebes hinzugegeben und die Proben für zwei Stunden in den Kühlschrank gestellt, um eine Eluierung der Proteine zu erreichen. Danach erfolgte die Zentrifugierung der Proben bei 12.000 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten. Nachfolgend wurden 10 µl zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge entnommen und der Überstand in Aliquots zu je 100 µl in neuen sterilen Eppendorf Safe-Lock Tubes tiefgefroren.

## **2.7. ELISA-Testungen**

Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen, wurde, wie unter 2.6 beschrieben, bei der Aufarbeitung des Anastomosengewebes auf ein Zielgewicht von 30 mg geachtet, mit einer Toleranz von +/- 5% (1,5 mg).

### **2.7.1. IGF-1**

Der IGF-1-ELISA wurde mit einem Kit der Firma Brenzel Bio-Analytik (Marburg, Deutschland) durchgeführt. Dies ist ein kompetitiver ELISA bei dem keine Kreuzreaktivität mit IGF-2 oder Insulin besteht.

Die vom Händler angegebene Sensitivität beträgt 0,15 ng IGF-1/ml, die Intraassay-Abweichung liegt bei einem CV von 1,73%, die Interassay-Abweichung wird mit einem CV von 4,43% angegeben.

Die Proben wurden aufgetaut, verdünnt und mit den IGF-1-Standards korreliert, die Standards betragen 0, 1, 5, 10, 50, 150 und 300 ng/ml.

Die Durchführung erfolgte nach dem von der Firma Brenzel vorgegebenen Protokoll.

Im Anschluss wurde mit dem Microplate Reader (Model 680, Bio-Rad, USA) bei 450nm die Extinktion gemessen. Die Extinktion war in diesem Fall umgekehrt proportional zur IGF-1-Konzentration der Proben. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Microplate Manager (Bio-Rad, USA).

### **2.7.2. TGF- $\beta$ 1**

Es wurde ein ELISA-Kit der Firma Brenzel Bio-Analytik verwendet. Es handelt sich hierbei um einen auf dem „Sandwich-Prinzip“ basierenden ELISA, bei dem die zum Schluss gemessene Farbintensität proportional zur TGF- $\beta$ 1-Konzentration der Proben ist.

Es besteht keine Kreuzreaktivität mit TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3, die Sensitivität beträgt nach Händlerangabe 1,9 pg/ml, die Intraassay-Abweichung liegt bei einem CV von 1,0%, die Interassay-Abweichung wird mit einem CV von 7,5% angegeben.

Die Proben wurden aufgetaut und zusammen mit dem Stock-Standard verdünnt, angesäuert und neutralisiert. Die Überprüfung des pH-Wertes (Richtwert: pH 7 - 8) wurde mit einem Universal-Indikatorpapier durchgeführt, die Standards betragen 600, 300, 150, 75, 38, 19 und 0 pg/ml.

Der ELISA wurde nach dem von der Firma Brenzel vorgegebenen Protokoll durchgeführt, die nachfolgenden Messungen mit dem Microplate Reader; die Ergebnisse wurden mit dem Program Microplate Manager ausgewertet.

### **2.7.3. VEGF**

Der VEGF-ELISA wurde mit einem Kit der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) durchgeführt, der nach dem „Sandwich-Prinzip“ funktioniert. Es wird sowohl die VEGF<sub>164</sub>-Isoform als auch die VEGF<sub>120</sub>-Isoform erkannt, eine Kreuzreaktivität mit rmVEGF R1 besteht erst ab einer Konzentration größer als 2500 pg/ml. Bei diesem Assay betrug die Sensitivität nach Händlerangabe 3,0 pg/ml, die Intraassay-Abweichung lag bei einem CV von 4,7%, die Interassay-Abweichung wurde mit einem CV von 6,4% angegeben.

Die Proben wurden aufgetaut und fünffach verdünnt; die verwendeten Standards betragen 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 und 7.8 pg/ml.

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll der Firma R&D Systems. Innerhalb 30 Minuten nach Durchführung erfolgte die Messung der optischen Dichte mit dem Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm; eine Wellenlängenkorrektur wurde bei 540 oder 570 nm durchgeführt, um ein genaueres Ergebnis zu erhalten.

### **2.7.4. GM-CSF**

Der GM-CSF-ELISA wurde ebenfalls mit einem Sandwich-ELISA-Kit der Firma R&D Systems durchgeführt. Der Test erkennt sowohl die natürliche als auch die rekombinante Form des GM-CSF, die Sensitivität beträgt nach Händlerangabe 1,8 pg/ml. Die Intraassay-Abweichung liegt bei einem CV von 8,4%, die Interassay-Abweichung wird mit einem CV von 9,8% angegeben. Eine signifikante Kreuzreaktivität oder Beeinflussung durch andere Faktoren liegt nicht vor.

Als Standards dienten 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 und 15.6 pg/ml.

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll der Firma R&D Systems. Im Anschluss Messen der optischen Dichte innerhalb von 30 Minuten mit dem Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 450nm und Wellenlängenkorrektur bei 540 oder 570nm.

### **2.8. RNA Isolierung**

#### **Gewebeaufbereitung und RNA-Isolierung**

- Flüssiger Stickstoff
- Eis in Kühlbehälter
- Potter
- Sterile Schere und Pinzette
- Waage
- RNeasy-mini-Kit; (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Eppendorf Safe-Lock Tubes
- Zentrifuge
- Spectral Photometer GeneQuant II; (Pharmacia Biotech, München, Deutschland)

Vergleichbar mit der Gewebeaufbereitung für die Proteinisolierung wurden die Proben im Tiefkühlraum im Bereich der Anastomose in kleine Stücke geschnitten und unter Stickstoffkühlung aufgeschlossen. Nachfolgend wurden 600 µl Buffer RLT des RNeasy-Kits dazugegeben, mehrfach resuspendiert und dann wiederholt durch eine 20G-Spritze (0,9 mm) gezogen und anschließend gemäß dem Protokoll des Qiagen RNeasy-Mini-Kits fortgeföhren. Die isolierte mRNA wurde im Anschluss mit dem Spectrophotometer auf Konzentration und Reinheit geprüft und dann bei bis zur weiteren Verwendung tiefgeföhren.

### **2.9. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Nach der Extraktion der mRNA aus den Gewebezellen erfolgte nun das enzymatische Umschreiben in cDNA, die komplementäre DNA. Diese cDNA ist erforderlich, um die Expression der für spezifische Proteine kodierenden Gene in den Zellen per quantitativer PCR (qPCR) messen zu können. Anhand der Ergebnisse der Konzentrationstestung konnten die mRNA-Proben vor dem Umschreiben so verdünnt werden, dass in allen Proben die gleiche Menge an mRNA verwendet wurde.

- mRNA (80 ng)
- 10mM dNTP-Mix; (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
- Randomprimer; (Promega, Mannheim, Deutschland)
- dH<sub>2</sub>O

## Material und Methoden

Es erfolgte ein kurzes Zentrifugieren des Probenansatzes und danach ein Inkubieren für 5 Minuten bei 65°C. Anschließend Kühlung auf Eis.

- M-MLV RT 5x Reaktionspuffer; (Promega, Mannheim, Deutschland)
- RNase-Inhibitor, 40 U/µl; (Promega, Mannheim, Deutschland)
- dH<sub>2</sub>O

Vom angegebenen Reaktions-Mix wurden 9,5 µl zu der die mRNA-enthaltende Probe dazugegeben, dann kurz zentrifugiert und 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach wurde 200U/µl M-MLV RT(H-) dazu pipettiert, zentrifugiert und für weitere 50 Minuten bei 42°C inkubiert mit anschließender Inkubation bei 70°C für 15 Minuten und nachfolgender Kühlung auf Eis. Ein RNA-Verdau mit RNase H, 250 U/µl, wurde für 20 Minuten bei 37°C durchgeführt, um die restliche RNA zu entfernen. Im Anschluss wurde die Probe bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren aufbewahrt.

### **2.10. Quantitative PCR (qPCR)**

#### **Primer**

Für die qPCR-Versuche wurden Primer für den Insulin-like-Growth Factor-1 und den Vascular Endothelial Growth Factor verwendet.

Für die relative Quantifizierung der cDNA wird die Genexpression des Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes, „Housekeeping Gene“ bezogen, in diesem Falle GAPDH. Hierdurch ist es möglich, Veränderungen in der Expression einzelner Gene auch gruppenübergreifend vergleichen zu können.

- IGF-1  
Sequenz: Igf1 F, 25 Basen: 5'-3' ATgCCCAAgACTCAgAAggAAgTAC  
Igf1 R, 20 Basen: 5'-3' gCAggTgTTCCgATgTTTTg
- VEGF  
Sequenz: Vegf F, 22 Basen: 5'-3' CCTggCTTTACTgCTgTACCTC  
Vegf R, 17 Basen: 5'-3' ggACggCAATAgCTgCg
- GAPDH  
Sequenz: ratGAPDH F, 23 Basen: 5'-3' gTCAgATCCACAACggATACATT  
ratGAPDH R, 20 Basen: 5'-3' TgTCAgCAATgCATCCTgCA

#### **iCycler – qPCR**

- Primer (je 10 µM); (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)



## Material und Methoden

- iQ Supermix; (BioRad, München, Deutschland)
- SYBR Green I (1:5000); (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
- dH<sub>2</sub>O
- cDNA
- Eis
- iCycler; (BioRad, München, Deutschland)

Für die qPCR wurde ein Mastermix zusammengestellt, der pro Probe 12,5 µl iQ Supermix, 9,5 µl dH<sub>2</sub>O, 1 µl SYBR Green I und jeweils 0,5 µl des Forward- und Backward-Primers, in einer Gesamtmenge von 24 µl enthielt. Dieser Mastermix wurde nun zu jeder cDNA-Probe, die mit 1 µl vorgelegt wurde, zupipettiert. Um eine ausreichende Durchmischung des Ansatzes zu gewährleisten, wurde dieser vorsichtig geschüttelt und danach für 30 Sekunden zentrifugiert.

Ziel der qPCR war es, die Genexpression von IGF-1 und VEGF über die Bestimmung der exprimierten mRNA zu messen und deren Veränderung über die Zeit zu beobachten.

Die Primer wurden mit einer molaren Konzentration von 10 µM/µl eingesetzt. Um die PCR-Produkte quantifizieren zu können, wurde der Farbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet doppelsträngige DNA und die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet in jedem Zyklus am Ende der Elongation statt.

Um die Spezifität der Amplifikate zu bestimmen, wurde nach Beendigung des Versuches eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei denaturiert der Doppelstrang bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur in zwei einzelsträngige Moleküle. Dabei wird der eingesetzte Farbstoff SYBR Green I freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, war somit eine Unterscheidung anhand der Schmelzkurven möglich.

Die RT-PCR im iCycler verlief nach folgendem Programm:

1. 3 Minuten bei 94°C
2. 30 Sekunden bei 94°C
3. 30 Sekunden bei 65°C, dieser Zyklus wiederholt sich insgesamt 35-mal
4. 30 Sekunden bei 72°C, hierbei erfolgt die Signalaufnahme
5. 60 Sekunden bei 95°C

## Material und Methoden

6. 60 Sekunden bei 55°C
7. alle 10 Sekunden Erhöhung der Temperatur um 0,5°C bis zum Erreichen der Endtemperatur von 94°C zur Erstellung einer Schmelzkurve

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte dann mittels eines Programms der Firma BioRad.

Um nach Beendigung der PCR ein aussagefähiges Ergebnis zu erreichen, waren mehrere Rechenschritte notwendig.

Zum einen wurde in der PCR der Ct-Wert (Cycle Threshold) bestimmt, der angibt, wie viele PCR Zyklen notwendig waren, um ein fest definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Da bei der PCR Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden, wurde hiervon der Mittelwert gebildet.

Dieser Mittelwert wurde dann mit dem Ct-Wert des dazugehörigen Housekeeping-Genes ins Verhältnis gesetzt:  $MW_{Ct-Probe} - MW_{Ct-GAPDH}$ . Hiermit erhält man den  $\Delta Ct$ -Wert.

Mit diesem  $\Delta Ct$ -Wert und dem  $\Delta Ct$ -Wert der Referenz (nicht operiertes Kolon), lässt sich der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert errechnen:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Kontrolle}$

Das endgültige Ergebnis, der sog. Relative, wird durch die Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  erreicht. Hinzu kommen der upper und lower Relative, die dazugehörigen Standardabweichungen ( $2^{-(\Delta\Delta Ct + SD\Delta Ct)}$ , bzw.  $2^{-(\Delta\Delta Ct - SD\Delta Ct)}$ ).  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  beschreibt die Expression im Vergleich zu einer Referenzgruppe nach Normalisierung mit einem nicht-regulierten Housekeeping-Gen.

### **2.11. Statistik**

Für die ELISA und qPCR Daten wurden jeweils gruppenweise Mittelwerte und Standardabweichungen (STABWN) ermittelt. Diese Ergebnisse wurden dann Software gestützt (SPSS, Version 14.0.1, Chicago, USA) mithilfe einer Univariat Varianzanalyse (ANOVA) und einer anschließenden Bonferroni-Testung analysiert und auf Signifikanzen getestet. Das Signifikanzniveau lag hierbei bei  $p < 0,05$ .

Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité Berlin (Frau Dr. Ramona Scheufele).

### **2.12. Weitere Methoden**

Folgende Methoden waren nicht Teil der vorliegenden Promotionsarbeit.

### **2.12.1. Biomechanik**

Hierbei wurde mittels einer Pump- und Druckmessvorrichtung standardisiert Druck an der Anastomosenregion aufgebaut (75). Ziel war es, zu überprüfen, in wie weit auf die mechanische Stabilität der Anastomose Einfluss genommen werden kann und wann das Gewebe der Anastomose dem zunehmenden Druck nachgibt. Dieser Wert wurde dann als „Bursting Pressure“ definiert

### **2.12.2. Histologische/Immunhistochemische Auswertung**

Ziel dieser Untersuchungen war es, den Einfluss des Wachstumsfaktors IGF-1 auf die Anastomose mithilfe verschiedener histologischer Untersuchungsmethoden zu analysieren (76). Dabei war es von Interesse, in wieweit Einfluss auf Entzündung und Nekrosebildung, auf Aktivierung der Fibroblasten und bindegewebige Überbrückung der Anastomose sowie auf die Neubildung von Blutgefäßen genommen werden konnte.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vorversuche zum Trägermaterial

Vor Beginn der tierexperimentellen Untersuchungen wurde das für die Versuche verwendete PDS®II 6-0 Nahtmaterial nach der Polylaktid-Beschichtung auf mögliche Veränderungen in seinen mechanischen Eigenschaften sowie die Freisetzungskinetik des eingearbeiteten Proteins Aprotinin untersucht.

Die biomechanischen und rasterelektronenmikroskopischen Versuche wurden im Rahmen der Studie von allen Doktoranden gemeinsam durchgeführt.

#### Biomechanische Vorversuche

In den Zugversuchen konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung des Nahtmaterials die mechanischen Eigenschaften hinsichtlich der Belastbarkeit nicht verändert hatte und die Beschichtung den Belastungen durch Zug und Knoten des Nahtmaterials ohne Beschädigung standhalten konnte.

#### Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Anhand der Rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen (Abbildung 2) der unbeschichteten Fäden (a, c) im Vergleich zu den PDLLA-beschichteten Fäden (b, d) ist erkennbar, dass durch die Beschichtungstechnik eine vollständige und gleichmäßige Beschichtung und eine glatte Fadenoberfläche erreicht werden konnte (81).

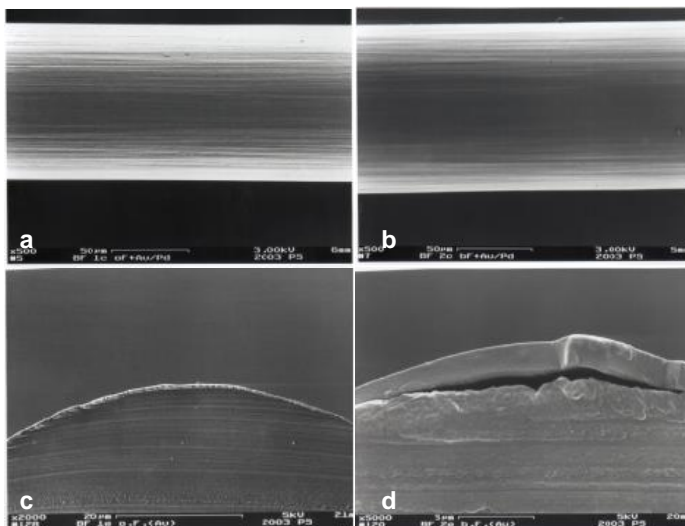


Abbildung 2: © Fuchs T, 2012; The Scientific World Journal (81)

In Aufnahme a) und b) ist erkennbar, dass die PDLLA-Beschichtung gleichmäßig aufgetragen ist, die Oberfläche sich somit nicht von den unbeschichteten Fäden unterscheidet. In Aufnahme c) und d) sieht man den Querschnitt der Fäden und auch hier ist die homogene Beschichtung gut zu erkennen. a und b: je 500-fache Vergrößerung, c: 2000-fache Vergrößerung, d: 5000-fache Vergrößerung

## Ergebnisse

### **Elutionsversuch**

Durch einen Elutionsversuch können die Freisetzungskarakteristika von Substanzen ermittelt werden. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass durch die Beschichtung des Nahtmaterials mit PDLLA (als Carrier für die inkorporierten Wachstumsfaktoren) eine gleichmäßige lokale Freisetzung der Wirkstoffe erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse des Versuches ergaben, dass es in den ersten sechs Stunden zu einer schnellen initialen Freisetzung von Aprotinin gekommen war. Nach diesem frühen Peak ließ sich über den Rest der Versuchszeit eine gleichmäßige weitere Aprotinin-Freisetzung beobachten.

### **3.2. Klinischer Verlauf**

Der operative Verlauf gestaltete sich in der Regel komplikationslos. Postoperativ begannen die Ratten zügig, sich zu bewegen sowie Nahrung und Wasser zu sich zu nehmen. Von den insgesamt 162 operierten Tieren verstarben 6 Tiere (3,7%) während der Narkoseeinleitung oder intraoperativ und 4 Tiere (2,5%) innerhalb der ersten drei postoperativen Tage. Eine Ursache für das vorzeitige Versterben der Tiere konnte nicht gefunden werden; die verstorbenen Tiere wurden der Versuchsgruppenzugehörigkeit entsprechend ersetzt.

Die übrigen Tiere konnten geplant zum jeweiligen Zeitpunkt getötet werden. Die Inspektion der Wundverhältnisse sowie des Bauchraumes zeigte in einigen Fällen pathologische Auffälligkeiten. So zeigten sich Hämatome im Bereich der Bauchwand bei fünf Tieren (3,1%), außerdem konnten Hautnekrosen bei sechs Versuchstieren (3,7%) nachgewiesen werden. Zwei Tiere (1,2%) zeigten Zeichen einer Peritonitis ohne Abszessformation. Hinsichtlich der pathologischen Befunde aus dem Bereich der Anastomosen waren einige Auffälligkeiten erkennbar. Stenosen (eingeschränkte Passagemöglichkeit) wurden v.a. an den ersten beiden Versuchszeitpunkten erfasst, mit einer deutlichen Abnahme zum siebten postoperativen Tag. Die Inzidenz war hierbei in der Kontroll- und der PDLLA-Gruppe vergleichbar, in der IGF-1-Gruppe an allen Versuchszeitpunkten am niedrigsten. Darmverschlüsse (vollständige Beeinträchtigung der Darmpassage) konnten nur am dritten Untersuchungszeitpunkt nachgewiesen werden und zwar bei vier Tieren der Kontrollgruppe (22% der insgesamt in dieser Gruppe operierten Tiere, n=18), zwei Tieren der PDLLA-Gruppe, inklusive einer Darmperforation (11%, respektive 6%) sowie einer Ratte aus der IGF-1-Gruppe (6%). Eine einzelne

## Ergebnisse

Nahtinsuffizienz konnte an Tag 3 in einem Tier der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (6%).

Die Verteilung der Befunde zwischen den einzelnen Versuchsgruppen war unauffällig, statistisch signifikante Unterschiede bestanden zu keinem Zeitpunkt, unabhängig vom erfassten pathologischen Befund.

Des Weiteren wurden jeweils prä- und postoperativ bei allen Ratten das Gewicht sowie die Körpertemperatur rektal gemessen. Hierbei konnten zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten sowohl im Verlauf des Körpergewichtes als auch hinsichtlich der Körpertemperatur keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen werden.

### **3.3. Ergebnisse der ELISA-Versuche**

Für die ELISA-Versuche wurden in den meisten Fällen pro Gruppe und Zeitpunkt Proben von je 8 Ratten verwendet. Im Rahmen der ELISA-Testungen kam es an einzelnen Versuchszeitpunkten bei einigen Proben zu unterschiedlichen methodischen Problemen oder Fehlern bei der Messung einzelner Werte. Daher konnten für diese Gruppen und Zeitpunkte z.T. nur 6 oder 7 Proben ausgewertet werden; die betroffenen Gruppen werden bei der Präsentation der Untersuchungsergebnisse separat erwähnt.

Der Mittelwert der Ergebnisse des nicht operierten Rattenkolons der Referenzgruppe dient nachfolgend als Vergleichswert für die physiologische Ausgangssituation im Darm und ist als Referenzlinie in den Grafiken kenntlich gemacht.

Folgende Versuchsgruppeneinteilung wurde vorgenommen, mit jeweils drei Untersuchungszeitpunkten (postoperativer Tag 1, 3, 7):

- Kontrollgruppe (Unbeschichtetes Nahtmaterial)
- PDLLA-Gruppe (PDLLA-beschichtetes Nahtmaterial)
- IGF-1-Wachstumsfaktorgruppe (PDLLA + 2,5% (w/w) IGF-1)

In den Kontrollgruppen wurde ein unbeschichteter Faden für die Naht der Darmanastomose verwendet, um so Informationen über die Wundheilung des Darmes und die IGF-1-Konzentration unter normalen physiologischen Bedingungen zu erhalten und diese mit der beeinflussten Wundheilung vergleichen zu können. Im Vergleich hierzu stehen die Ergebnisse der PDLLA-Gruppen, bei denen das Nahtmaterial nur mit PDLLA

## Ergebnisse

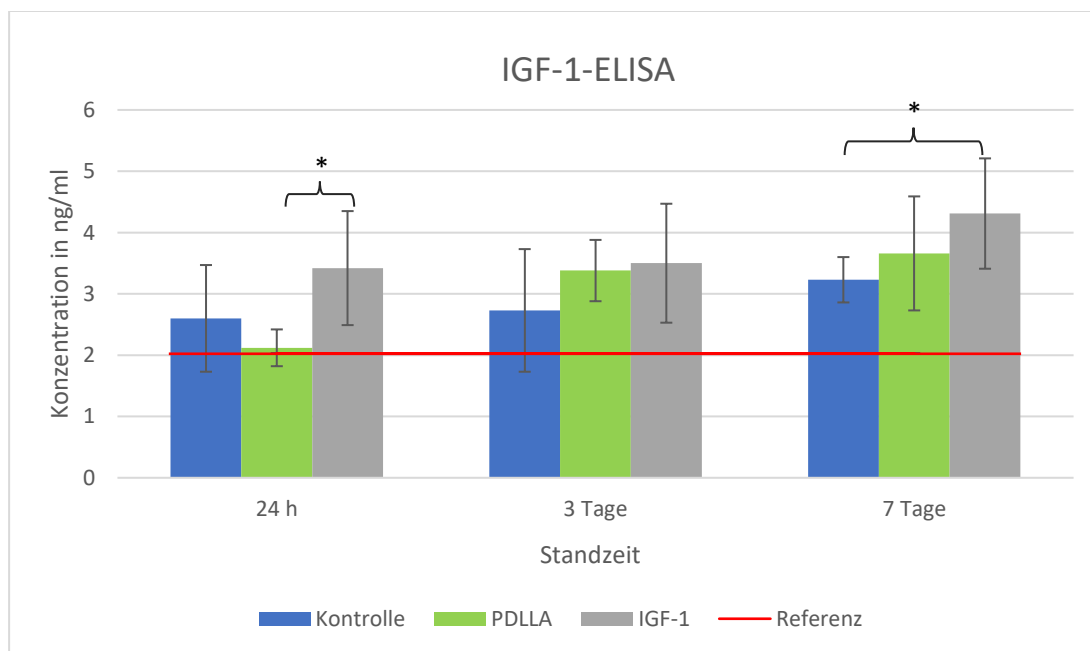
beschichtet wurde und der Einfluss des Trägermaterials auf die Anastomosenheilung untersucht werden sollte; sowie jene der IGF-1-Gruppen, in denen sich die Auswirkungen des Wachstumsfaktors auf die untersuchten Parameter zeigen.

Die Darstellung der ermittelten Signifikanzen erklärt sich wie folgt:

- <sup>1</sup> = Signifikanter Unterschied zwischen unbeschichtetem Nahtmaterial und PDLLA-Beschichtung
- <sup>2</sup> = Signifikanter Unterschied zwischen unbeschichtetem Nahtmaterial und PDLLA-IGF-1-Beschichtung
- <sup>3</sup> = Signifikanter Unterschied zwischen PDLLA und PDLLA-IGF-1-Beschichtung

### 3.3.1. IGF-1-ELISA

Die IGF-1-Konzentration der Referenzgruppe betrug im Mittel 2,03 ng/ml. In den Versuchsgruppen, sowohl physiologisch als auch beeinflusst, ließ sich zu jedem Zeitpunkt eine höhere Menge an IGF-1 bestimmen (Abbildung 3); an Tag 7 waren in der PDLLA-Gruppe aufgrund methodischer Probleme nur 7 der 8 Proben auswertbar.



Kontrolle	2,6 ± 0,87	2,7 ± 1	3,2 ± 0,37
PDLLA	2,1 ± 0,3	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,93
IGF-1	3,4 ± 0,93 <sup>3</sup>	3,5 ± 0,97	4,3 ± 0,9 <sup>2</sup>

Abbildung 3: IGF-1-Konzentrationen in ng/ml, mit Standardabweichungen und statistischen Signifikanzen (\*), Referenz bei 2,03 ng/ml (rote Markierung).

## Ergebnisse

### **Erster postoperativer Tag**

Während die gemessenen IGF-1-Mengen am ersten postoperativen Tag in der Kontroll- sowie der PDLLA-Gruppe in etwa auf dem Niveau der nicht operierten Referenz blieben (128% und 104% des Referenzwertes), zeigte sich in der Wachstumsfaktorengruppe eine deutliche Erhöhung des gemessenen IGF-1 Wertes (3,4 ng/ml, 168%). Dieser Wert lag statistisch signifikant über jenem der PDLLA-Gruppe ( $p=0,008$ ).

### **Dritter postoperativer Tag**

An Tag 3 zeigte sich in allen drei Versuchsgruppen eine weitere Zunahme der gemessenen IGF-1-Konzentrationen. Während diese in der Kontroll- sowie der IGF-1-Gruppe nur marginal war, konnte in der PDLLA-Gruppe eine Zunahme um 60% im Vergleich zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt gemessen werden; statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht.

### **Siebter postoperative Tag**

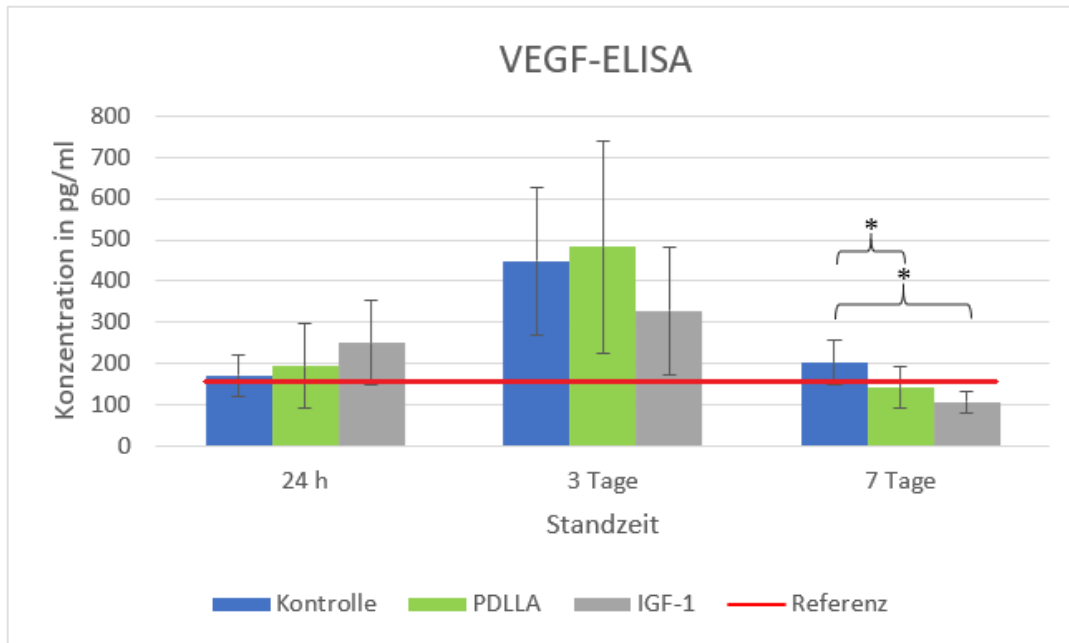
Auch zu diesem Untersuchungszeitpunkt war in allen drei Gruppen ein weiterer Anstieg der IGF-1-Werte messbar. Während es in der PDLLA-Gruppe hierbei nur zu einer 8%igen Zunahme im Vergleich zu Tag 3 kam, konnte in der Kontrollgruppe ein Anstieg um 18%, in der Wachstumsfaktorgruppe sogar um 23% gemessen werden; insgesamt war der IGF-1-Wert zu diesem Zeitpunkt in der IGF-1-Gruppe mehr als doppelt so hoch wie jener der nicht operierten Referenzgruppe (212%). Der Unterschied zwischen den Werten der Wachstumsfaktorgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe war hierbei statistisch signifikant ( $p=0,02$ ) und auch zwischen der IGF-1- und PDLLA-Gruppe ließ sich eine tendenzielle Erhöhung erkennen.

### **3.3.2. VEGF-ELISA**

Die im ELISA ermittelten Konzentrationen an VEGF wurden in pg/ml gemessen, der Mittelwert der VEGF-Konzentration der Referenzgruppe lag bei 153,7 pg/ml; Abbildung 4 listet die gemessenen VEGF-Mengen auf. Am zweiten Untersuchungszeitpunkt konnte in der Kontrollgruppe eine der 8 Proben aufgrund methodischer Probleme nicht ausgewertet werden.



## Ergebnisse



Standzeit	Kontrolle	PDLLA	IGF-1
24 h	170,9 ± 49,3	194,2 ± 103,4	249,9 ± 102,5
3 Tage	448,6 ± 180,2	483,7 ± 258	327,8 ± 154,7
7 Tage	202,6 ± 54,6 <sup>1,2</sup>	141,8 ± 49,6	108 ± 26,2

Abbildung 4: VEGF-Konzentrationen in pg/ml, mit Standardabweichungen und statistischen Signifikanzen (\*), Referenz bei 153,7 pg/ml (rote Markierung).

### Erster postoperativer Tag

Vergleichbar mit dem IGF-1-ELISA konnten auch beim VEGF-ELISA am ersten postoperativen Tag in der Kontroll- sowie der PDLLA-Gruppe VEGF-Konzentrationen im Bereich des Referenzwertes gemessen werden (111% und 126%), während sich in der IGF-1-Gruppe eine deutliche Erhöhung des VEGF-Wertes zeigte. Aufgrund der z.T. deutlichen Standardabweichungen lagen zwischen den Gruppen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

### Dritter postoperativer Tag

Am dritten postoperativen Tag waren in der Kontroll- sowie der PDLLA-Gruppe deutliche Zunahmen der VEGF-Werte messbar; in beiden Gruppen kam es zu mehr als einer Verdopplung der Werte des vorherigen Untersuchungszeitpunktes. Auch in der IGF-1-Gruppe war ein weiterer Anstieg der Proteinkonzentration erkennbar, wobei diese jedoch deutlich unter den Werten der anderen Gruppen lag; statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

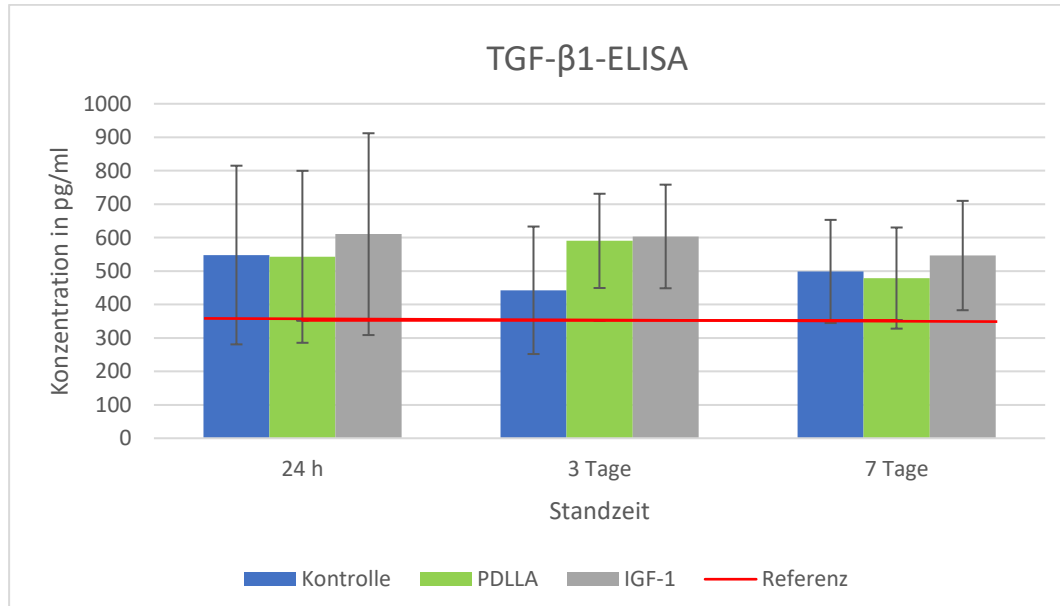
## Ergebnisse

### Siebter postoperativer Tag

Zu Tag 7 kam es in allen drei Gruppen zu einer deutlichen Abnahme der VEGF-Konzentrationen; die gemessene Proteinmenge in der Kontrollgruppe lag bei etwa der Hälfte des Wertes von Tag 3 und mit 202,6 pg/ml noch knapp 30% über dem Vergleichswert der nicht operierten Referenz. In der PDLLA- und IGF-1-Gruppe war es zu einem noch deutlicheren Rückgang gekommen, die Werte lagen nur noch bei ca. 1/3 derer des dritten postoperativen Tages und waren nun unter den Richtwert der Referenzgruppe gesunken (92%, beziehungsweise 70%); der Unterschied zwischen diesen Werten und dem der Kontrollgruppe war statistisch signifikant ( $p=0,041$ ,  $p=0,001$ ).

### 3.3.3. TGF- $\beta$ 1-ELISA

Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration wurden in pg/ml gemessen, der Mittelwert der Referenzgruppe lag bei 352,3 pg/ml (roter Strich in Abbildung 5). Im Rahmen der ELISA-Versuche konnten aufgrund methodischer Probleme in der PDLLA-Gruppe an Tag 1 nur 7 der 8 Proben bestimmt werden sowie nur 6 Proben der IGF-1-Gruppe; von den Proben des dritten postoperative Tages waren in der Kontrollgruppe nur 6, in der IGF-1-Gruppe nur 7 auswertbar.



Standzeit	Kontrolle	PDLLA	IGF-1
24 h	547,8 ± 267,1	542,5 ± 257,1	610,2 ± 301,7
3 Tage	442,4 ± 190,6	590,1 ± 140,9	603,3 ± 154,9
7 Tage	498,7 ± 154,2	478,9 ± 151,2	546,3 ± 163,5

Abbildung 5: TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen in pg/ml, mit Standardabweichungen, Referenz bei 352,3 pg/ml (rote Markierung).

## Ergebnisse

### **Erster postoperativer Tag**

In allen drei Versuchsgruppen konnten TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen bestimmt werden, die deutlich über dem Mittelwert der Referenzgruppe lagen. Hierbei waren die Werte der Kontroll- und der PDLLA-Gruppe annähernd gleich; die TGF- $\beta$ 1-Konzentration in der Wachstumsfaktorgruppe war im Vergleich marginal höher und lag knapp 70% über dem Referenzwert. Bemerkenswert waren die deutlich ausgeprägten Standardabweichungen, die in allen drei Gruppen um 50% lagen.

### **Dritter postoperativer Tag**

Während die Werte der PDLLA-Gruppe und der IGF-1-Gruppe annähernd auf dem Stand des vorherigen Untersuchungszeitpunktes verblieben, war in der Kontrollgruppe ein Rückgang der TGF- $\beta$ 1-Konzentration um 20% messbar, wobei in dieser Gruppe erneut eine ausgeprägte Standardabweichung von über 40% vorlag.

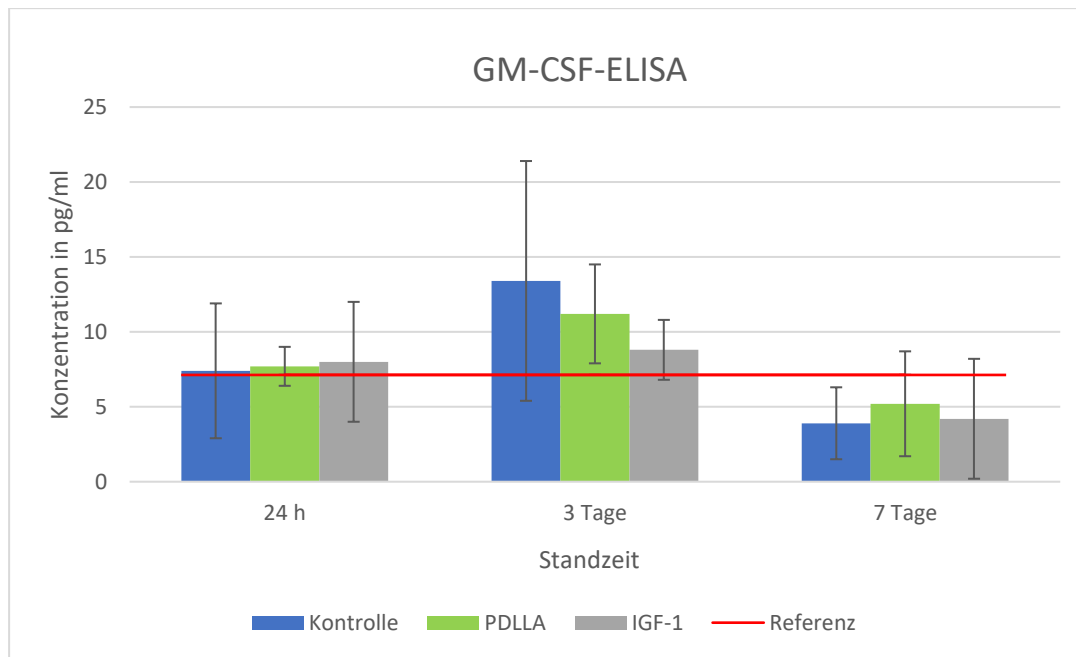
### **Siebter postoperativer Tag**

Zu Tag 7 lagen die gemessenen TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen aller drei Gruppen wieder nah beieinander, vergleichbar mit dem ersten Untersuchungszeitpunkt, jedoch leicht unterhalb jener Werte; die ermittelten Proteinmengen lagen zwischen 35% und 55% über den Werten der Referenzgruppe.

#### **3.3.4. GM-CSF-ELISA**

Die GM-CSF-Konzentration wurden ebenfalls in pg/ml gemessen, der Mittelwert der Referenzgruppe befand sich bei 7,1 pg/ml (siehe rote Linie zur Orientierung in nachfolgender Abbildung 6). Im Rahmen dieser Versuchsreihe kam es am siebten postoperativen Tag bei einer Probe der IGF-1-Gruppe zu Problemen bei der Durchführung des Tests, so dass für dieses Tier kein Ergebnis bestimmt werden konnte. Auffällig waren hier die innerhalb einzelner Gruppen sehr stark ausgeprägten Unterschiede in den bestimmbar GM-CSF-Proteinkonzentrationen, die so eine z.T. sehr breite Standardabweichung bewirkten.

## Ergebnisse



Standzeit	Kontrolle	PDLLA	IGF-1
24 h	7,4 ± 4,5	7,7 ± 1,3	8 ± 4
3 Tage	13,4 ± 8	11,2 ± 3,3	8,8 ± 2
7 Tage	3,9 ± 2,4	5,2 ± 3,5	4,2 ± 4

Abbildung 6: GM-CSF-Konzentrationen in pg/ml, mit Standardabweichungen, Referenz bei 7,1 pg/ml (rote Markierung).

### Erster postoperativer Tag

Am ersten postoperativen Tag waren in allen drei Gruppen GM-CSF-Konzentrationen messbar, die nur wenig über der Referenzgruppe lagen; die Proteinmenge der IGF-1-Gruppe war hierbei am höchsten. Die Standardabweichungen der Kontrollgruppe sowie der Wachstumsfaktorgruppe waren zu diesem Untersuchungszeitpunkt deutlich ausgeprägt ( $\geq 50\%$ ).

### Dritter postoperativer Tag

Während in der Kontrollgruppe eine deutliche Zunahme der Konzentration um mehr als 75% im Vergleich zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt messbar war (bei erneut sehr großer Standardabweichung), war in der PDLLA-Gruppe zwar auch eine ansteigende Tendenz zu erkennen, jedoch weniger deutlich ausgeprägt (Zuwachs von 45%). Die GM-CSF-Konzentration in der IGF-1-Versuchsgruppe nahm lediglich um 10% zu und war mit 8,8 pg/ml am niedrigsten. Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht gemessen werden.

## Ergebnisse

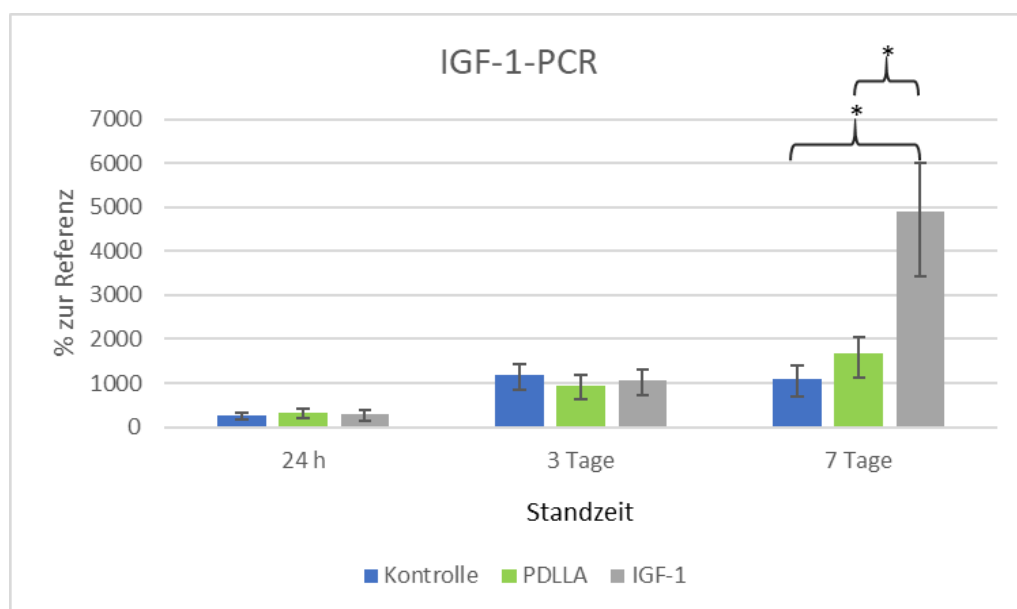
### Siebter postoperativer Tag

In allen drei Versuchsgruppen kam es zu einer deutlichen Reduktion der messbaren Proteinkonzentrationen. Diese war erneut am ausgeprägtesten in der Kontrollgruppe, bei der nun noch knapp ein Drittel der vorherig messbaren GM-CSF-Menge vorlag. In der PDLLA-Gruppe konnte der höchste Wert ermittelt werden, aber auch hier war es zu einem Rückgang um mehr als die Hälfte gekommen, die Konzentration lag bei ca. 70% des Wertes der nicht operierten Referenz. Auch in der Wachstumsfaktorgruppe war es zu einem Rückgang um knapp 50% zum Vorwert gekommen, die messbare Proteinmenge lag in etwa im Bereich der Kontrollgruppe; auffallend war auch zu diesem Versuchszeitpunkt die deutlichen Standardabweichungen in den einzelnen Gruppen.

### 3.4. Ergebnisse der qPCR-Versuche

#### 3.4.1. IGF-1-PCR

In der IGF-1-PCR wurde im Rahmen der unter 2.10 beschriebenen Berechnungen an den drei Untersuchungszeitpunkten die Expression des Wachstumsfaktors ermittelt und mit der Referenzgruppe verglichen. Hierfür wurde die IGF-1-Expression der Referenzgruppe als 100% gesetzt, die prozentuellen Veränderungen sind in Abbildung 7 veranschaulicht.



Kontrolle	262%	1183%	1102%
PDLLA	336%	945%	1672%
IGF-1	285%	1054%	4904% <sup>2,3</sup>

Abbildung 7: IGF-1-Genexpression in prozentuellem Verhältnis zur Referenzgruppe (100%), mit Upper und Lower relative und statistischen Signifikanzen (\*).

## Ergebnisse

### **Erster postoperativer Tag**

In allen drei Gruppen konnte zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher Anstieg der Genexpression gemessen werden. Während diese in der Kontroll- und der IGF-1-Gruppe annähernd gleich ausgeprägt war (2,6-fach und 2,8-fach erhöht), lag die Expression in der PDLLA-Gruppe leicht, jedoch nicht statistisch signifikant über diesen Werten (336%).

### **Dritter postoperativer Tag**

Im Vergleich zum ersten Untersuchungszeitpunkt kam es in allen drei Versuchsgruppen zu einer deutlichen Zunahme der IGF-1-Expression. Diese war in der PDLLA-Gruppe am wenigsten stark ausgeprägt, es kam hier zu einer Zunahme um zirka das Dreifache des Vorwertes, während in den anderen beiden Gruppen Steigerungen der IGF-1-Expression im Bereich des Vierfachen zu ermitteln waren.

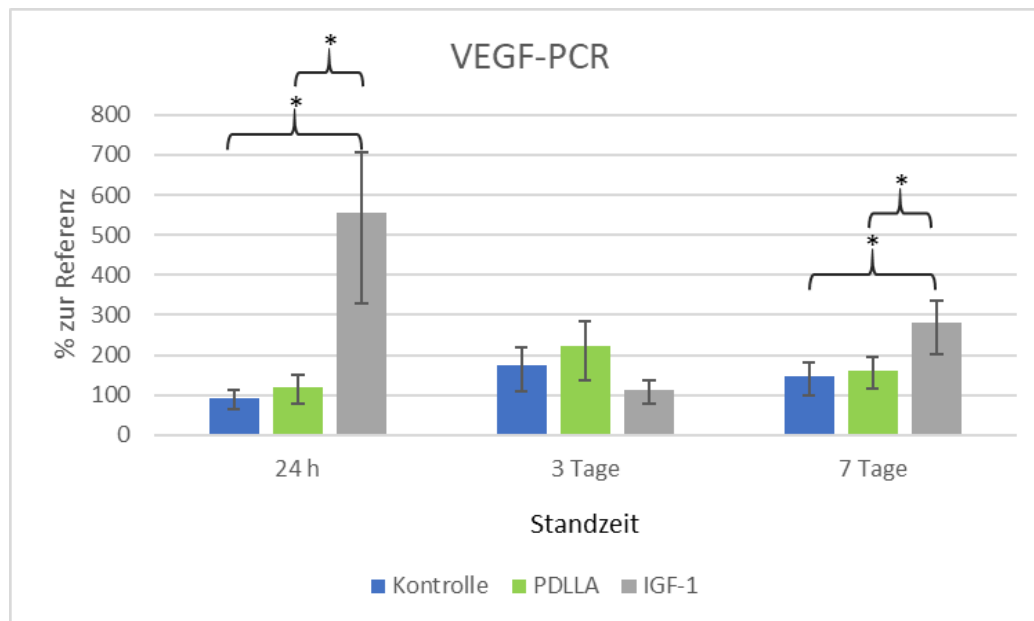
### **Siebter postoperativer Tag**

Während in der Kontrollgruppe eine nahezu gleichbleibende Expression an IGF-1 im Vergleich zu Tag 3 gemessen werden konnte, war diese in der PDLLA-Gruppe beinahe doppelt so hoch wie zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt. In der Wachstumsfaktorgruppe war jedoch erneut eine mehr als vierfache Erhöhung der Genexpression messbar, die sich auch statistisch signifikant von den anderen beiden Gruppen unterschied ( $p=0,011$ ,  $p=0,034$ ); zu diesem Zeitpunkt wurde eine fast 50-fache Erhöhung im Vergleich zur Referenzgruppe bestimmt (4904%).

#### **3.4.2. VEGF-PCR**

Vergleichbar mit der IGF-1 PCR wurde die Expression von VEGF zu den drei Untersuchungszeitpunkten ermittelt und direkt mit der Referenzgruppe verglichen, deren Expression als 100% gesetzt wurde (siehe Abbildung 8).

## Ergebnisse



Kontrolle	93%	174%	146%
PDLLA	121%	223%	161%
IGF-1	556% <sup>2,3</sup>	112%	282% <sup>2,3</sup>

Abbildung 8: VEGF-1-Genexpression in prozentalem Verhältnis zur Referenzgruppe (100%), mit Upper und Lower relative und statistischen Signifikanzen (\*).

### Erster postoperativer Tag

Schon zum ersten Versuchszeitpunkt konnte in der Wachstumsfaktorgruppe eine statistisch signifikante Erhöhung sowohl im Vergleich zur Kontroll- als auch zur PDLLA-Gruppe gemessen werden ( $p=0,000$  für beide). Während sich die Genexpression in jenen beiden Gruppen noch im Bereich der Referenzgruppe befand (in der Kontrollgruppe mit 93% sogar leicht unterhalb dieser), war die VEGF-Expression in der IGF-1-Gruppe zu diesem Zeitpunkt schon um mehr als das Fünffache angestiegen.

### Dritter postoperativer Tag

Interessanterweise konnte in der Kontrollgruppe sowie der PDLLA-Gruppe am dritten postoperativen Tag in etwa eine Verdopplung der Werte von Tag 1 gemessen werden, während die VEGF-Expression in der IGF-1-Gruppe deutlich ruckläufig war und sich nun wiederum in etwa auf dem Niveau der Referenz befand (112%).

### Siebter postoperativer Tag

Auch zu diesem Zeitpunkt war die messbare Genexpression – vergleichbar mit den vorherigen Untersuchungszeitpunkten – in den Gruppen gegenläufig. Während diese in

## Ergebnisse

den Vergleichsgruppen (Kontrolle und PDLLA) nun wieder rückläufig war und nun mit 146% und 161% leicht über den Werten von Tag 1 lag, kam es in der IGF-1-Gruppe zu einem erneuten Anstieg auf fast das Dreifache des Referenzniveaus; dieser Wert lag erneut statistisch signifikant über den Werten der beiden anderen Gruppen ( $p=0,023$ ,  $p=0,044$ ).

### **3.5. Weitere Ergebnisse**

Die nachfolgenden Ergebnisse aus den biomechanischen und histologischen Untersuchungen sind nicht Teil dieser Promotionsarbeit, sondern wurden im Rahmen zweier weiterer, zu dieser Studie gehörender Promotionen veröffentlicht (75,76). Der Vollständigkeit halber, und um sie im Rahmen der Diskussion mit in die Bewertung der klinischen Auswirkungen einfließen lassen zu können, werden sie jedoch kurz zusammengefasst dargestellt.

#### **3.5.1. Biomechanische Untersuchungsergebnisse**

In den biomechanischen Versuchen sollte geprüft werden, welcher Druck vonnöten ist, um die Darmwand zum Bersten zu bringen („Bursting Pressure“). Hierbei ist in der postoperativen Phase besonders die Anastomosenregion als Schwachstelle anzusehen; der Referenzwert des nicht operierten Rattendarmes lag bei ca. 270 mmHg (75).

Wie in der nachfolgenden Abbildung 9 aus der Veröffentlichung von Fuchs et al. zu sehen ist (81), lag der Bursting Pressure am ersten postoperativen Tag in allen drei Versuchsgruppen eng beieinander. Am dritten postoperativen Tag war ein Abfall der Stabilität in der Kontroll- und PDLLA-Gruppe zu verzeichnen, während in der IGF-1-Gruppe der Wert des ersten Versuchszeitpunktes gehalten werden konnte. Die Druckunterschiede zwischen der Wachstumsfaktorgruppe und der beiden Vergleichsgruppen (Kontrolle und PDLLA) waren hierbei signifikant ( $p=0,027$ ,  $p=0,003$ ). Am siebten postoperativen Tag hatten die Werte des Bursting Pressure in der Kontroll- und PDLLA-Gruppe deutlich zugenommen, der Wert in der IGF-1-Gruppe war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch tendenziell größer.



## Ergebnisse

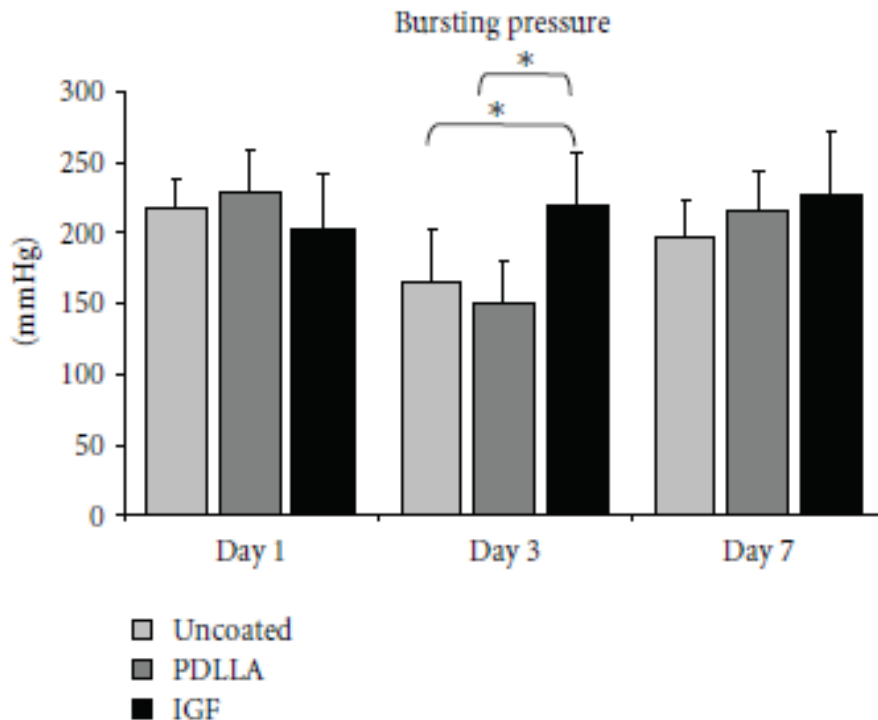


Abbildung 9: © Fuchs T, 2012; The Scientific World Journal (81)  
Balkendiagramm „Bursting Pressure“; x-Achse mit Versuchsgruppen (hellgrau = Kontrollgruppe, dunkelgrau = PDLLA-Gruppe, schwarz = IGF-1-Gruppe) zu den jeweiligen Standzeiten (24 h [Day 1], 3 Tage [Day 3], 7 Tage [Day 7]); y-Achse zeigt den gemessenen Mittelwert des Druckes in mmHg; erkennbar ist der an Tag 3 bestehende signifikante Unterschied zwischen der IGF-1-Gruppe und der Kontroll- und PDLLA-Gruppe

### 3.5.2. Histologische/Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse

Bei der Durchführung der histologischen Untersuchungen kamen verschiedene Färbungen zur Anwendung. Zur allgemeinen Darstellung der einzelnen Darmwandschichten sowie der eingewanderten Entzündungszellen, der Fibroblastenreaktion und der Nekrosenbildung diente eine HE-Färbung; die Van-Gieson-Färbung erfolgte zur Veranschaulichung des kollagenen Bindegewebes und der bindegewebigen Überbrückung der Anastomosenenden; die Beobachtungen wurden anhand eines semiquantitativen Scores ausgewertet (76).

In der HE-Färbung zeigte sich am ersten postoperativen Tag im Bereich des Fadens eine signifikant geringer ausgeprägte Granulozyteninfiltration im Vergleich zwischen der Wachstumsfaktor- und der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Auch an den übrigen Versuchszeitpunkten war der Wert der Granulozyteninfiltration in der IGF-1-Gruppe tendenziell niedriger als in den anderen beiden Versuchsgruppen.

Auch die Nekrosenbildung im Anastomosenbereich fiel an Tag 3 und 7 in der PDLLA- und IGF-1-Gruppe wesentlich geringer aus als in der unbeschichteten Kontrollgruppe;

## Ergebnisse

am dritten postoperativen Tag konnte in diesen beiden Gruppen signifikant weniger Nekrosegewebe im Anastomosenbereich nachgewiesen werden als in der Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Bezüglich der Fibroblastenreaktion im Fadenbereich war am ersten postoperativen Tag kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar. An Tag 3 war der Score in der IGF-1-Gruppe tendenziell höher als in den anderen Gruppen, an Tag 7 war der Unterschied zwischen der IGF-1-Gruppe und der PDLLA-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die in der Van-Gieson-Färbung dargestellte bindegewebige Überbrückung der Anastomosenregion zeigte am siebten postoperativen Tag einen signifikanten Unterschied zwischen der IGF-1- und der Kontrollgruppe. Diese gesteigerte Bindegewebeaktivität war auch schon am dritten postoperativen Tag tendenziell zu erkennen gewesen.

#### 4. Diskussion

Die Anastomosensuffizienz (AI) ist eine häufige Komplikation in der Abdominalchirurgie. Mit ihr ist die Gefahr einer generalisierten Peritonitis verbunden, die schnell in eine Sepsis und ein Multiorganversagen übergehen kann, so dass eine zügige Diagnose und Intervention für das Überleben des Patienten von unbedingter Notwendigkeit sind. Um die Entstehung einer Nahtinsuffizienz zu verstehen und potentielle therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren, ist es wichtig, die Wundheilung im Bereich des Intestinaltraktes näher zu betrachten. Diese durchläuft, wie in der Einleitung dieser Promotionsarbeit dargelegt, nach der Anastomosierung drei Phasen: die exsudative, die proliferative und die reparative Phase, an deren Ende die Defektheilung mit Narbenbildung steht. In dem Zusammenspiel der für die Wundheilung wichtigen Zelltypen haben verschiedene Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle in der Steuerung der Reparaturvorgänge. So fördert der Insulin-like Growth Factor-1 u. a. die Kollagensynthese durch Fibroblasten und nimmt Einfluss auf die Entstehung des Granulationsgewebes im Bereich der Anastomose. Der Vascular Endothelial Growth Factor regt die Bindegewebsproliferation und die Bildung von Mikrogefäßen an. Der Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor fördert die Migration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in das verletzte Gewebe. Diese Zellen unterstützen die Neoangiogenese und sind Teil verschiedener Phasen der Entzündungsreaktion im Rahmen der Wundheilung. Der Transforming Growth Factor-beta 1 spielt eine komplexe Rolle bei Gewebeheilungsprozessen, insbesondere über Stimulation der Synthese und Proliferation von Fibroblasten, wobei gezeigt werden konnte, dass der Faktor einerseits die Wundheilung fördern, andererseits aber auch hemmend wirken kann (28,82).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde mit IGF-1 beschichtetes Nahtmaterial für die Anastomosierung von Rattenkolon verwendet, um die Wirkung der lokalen Freisetzung des Proteins auf die Wundheilung und die Konzentration der genannten Wachstumsfaktoren im Wundbereich sowie die Genexpression von IGF-1 und VEGF zu untersuchen.

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten biomechanischen und histologisch/immunhistochemischen Versuche sind nicht Teil der vorliegenden Arbeit, sondern wurden im Rahmen zweier weiterer Promotionsarbeiten und einer Publikation veröffentlicht (75,76,81). Ihre Ergebnisse werden jedoch in die Diskussion

## Diskussion

miteinbezogen, um eine bessere Gesamtbewertung des Einflusses des IGF-1 auf die Wundheilung der Darmanastomose treffen zu können und die Bewertung der vorliegenden Ergebnisse zu komplettieren.

### **4.1.IGF-1**

Der Insulin-like Growth Factor-1 ist ein für die Wundheilung im Bereich des Darmes wichtiger Faktor, Rezeptoren für das Protein sind im gesamten Intestinaltrakt nachweisbar (36). IGF-1 wird vornehmlich in der Leber synthetisiert, aber verschiedene Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, Granulozyten sowie Epithel- und Mesenchymalzellen sind in der Lage, IGF-1 zu produzieren; im Rahmen der Wundheilung der Anastomose erfolgt die initiale Freisetzung von IGF-1 aus Thrombozyten (31,39). Über endokrine, parakrine und autokrine Mechanismen beeinflusst der Wachstumsfaktor u. a. die Heilung und Proliferation der Mukosa, stimuliert die Kollagensynthese, nimmt Einfluss auf die Neoangiogenese und steigert die Proliferation und Migration von Myofibroblasten (29,36–39). Die zentrale Rolle von IGF-1 im Rahmen der physiologischen intestinalen Wundheilung und eine zusätzliche positive Beeinflussung dieser über eine zusätzliche Gabe des Wachstumsfaktors wurde mittels verschiedener Ansätze untersucht. So konnte von Mantell et al. gezeigt werden, dass die intestinale Administration von IGF-1 nach partieller Darmresektion in Ratten zu einer gesteigerten adaptiven Proliferation der Dickarmmucosa führt (83). Eine intraperitoneale Injektion von IGF-1 nach Anlage von Kolonanastomosen, mit und ohne partieller Kolonresektion, führte in mehreren Versuchen zu einer deutlichen Stimulation der Wundheilung mit Erhöhung der Hydroxyprolinwerte (als Marker für Kollagensynthese), des Kollagengehalts sowie zum Teil auch zu einer erhöhten Stabilität der Anastomose (gemessen anhand des Bursting Pressures) (37,49,77).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Gabe des Wachstumsfaktors die Wundheilung unter gestörten Wundheilungsbedingungen deutlich verbessern konnte. In Ratten, deren Wundheilung durch Cortison (44), Dextran-Natrium-Sulfat-induzierte Colitis (50) oder 5-Fluorouracil (5-FU) (77) beeinträchtigt war, führte die intraperitoneale Gabe von IGF-1 (44,77) sowie die lokale Gabe mittels eines IGF-1-beschichteten Nahtmaterials (50) zu einer Reduktion der Inzidenz von Anastomoseninsuffizienzen, einer Erhöhung des Bursting Pressures sowie einer gesteigerten Hydroxyprolinkonzentration. Die negativen Grundvoraussetzungen konnten über eine durch IGF-1 scheinbar gesteigerte Proliferation und Aktivität von Fibroblasten mit

## Diskussion

nachfolgender Zunahme der Kollagenproduktion, Epithelregeneration und Neoangiogenese positiv beeinflusst werden konnten, mit letztlich Zunahme der Anastomosenstabilität und -beschaffenheit.

Die in den ELISA-Untersuchungen gemessenen IGF-1 Werte lagen in allen Versuchsgruppen und an allen drei Untersuchungszeitpunkten über dem Wert dem Vergleichswert der nicht operierten Tiere. Dies bestätigt die beschriebene wichtige Rolle von IGF-1 im Rahmen der physiologischen Wundheilung des Darms, auch wenn die Proteinkonzentrationen der Kontrollgruppe und der PDLLA-Gruppe am ersten postoperativen Tag nur geringfügig größer als die der Referenzgruppe war. Zu diesem Zeitpunkt war die Proteinkonzentration in der IGF-1-Gruppe höher als die der anderen beiden Gruppen, im Vergleich mit der PDLLA-Gruppe statistisch signifikant. Diese Tendenz ließ sich auch am dritten und siebten postoperativen Tag erkennen: während es in allen Gruppen zu einem kontinuierlichen Anstieg der IGF-1-Konzentrationen kam, waren die Werte in der IGF-1-Gruppe jeweils am höchsten, an Tag 7 statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Unterschiede lassen sich zum einen mit der kontinuierlichen Eluierung des Wachstumsfaktors aus der Beschichtung des Nahtmaterials in den Anastomosenbereich erklären, was im Umkehrschluss bestätigt, dass sich das Protein durch die Beschichtungstechnik nicht nur in seiner aktiven Form auf den Faden auftragen lässt, sondern auch über Tage im Anastomosenbereich zur Verfügung steht.

Zum anderen ist es wahrscheinlich, dass die zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt höchsten Konzentrationen an IGF-1 in den IGF-1-Gruppen nicht nur eine vermehrte Stimulation und Aktivität von Fibroblasten und Myofibroblasten bewirkt, sondern diese Zellen wiederum IGF-1 in den Wundbereich sezernieren.

In der IGF-1 qPCR ließ sich in allen drei Gruppen schon am ersten postoperativen Tag eine Hochregulierung der IGF-1-Genexpression auf fast das Dreifache des Referenzniveaus erkennen. Dass diese in allen Gruppen vergleichbar ausfiel, könnte erneut als Bestätigung der zentralen Funktion des Wachstumsfaktors in der normalen Wundheilung am Darm gesehen werden und ein Hinweis dafür sein, dass die Genexpression an diesem frühen postoperativen Zeitpunkt noch nicht relevant durch den lokalen Wachstumsfaktor stimuliert wird. An Tag 3 war dann eine deutliche Steigerung auf das in etwa 10- bis 11-fache des Referenzniveaus feststellbar, wobei die Genexpression zwischen den einzelnen Gruppen immer noch vergleichbar war und keine

## Diskussion

relevanten Unterschiede bestanden. Interessanterweise kam es an Tag 7 dann zu einer deutlichen Zunahme der Genexpression in der IGF-1-Gruppe, die nun nicht nur fast 50-fach über der nicht operierten Referenz lag, sondern sich auch statistisch signifikant von den beiden Vergleichsgruppen unterschied. Während die IGF-1-Werte in der PDLLA-Gruppe auch zugenommen hatten (ca. 80% im Vergleich zum dritten postoperativen Tag), war die Expression in der Kontrollgruppe auf dem Stand des vorherigen Untersuchungszeitpunktes verblieben. Dass die in der IGF-1-ELISA gemessene Proteinkonzentration in der IGF-1-Gruppe am ersten postoperativen Tag zum Teil signifikant über jener der Vergleichsgruppen lag – bei zwischen den Gruppen vergleichbarer Genexpression –, könnte die oben genannte Annahme unterstützen, dass das vermehrt messbare Protein zumindest zum Teil auf aus dem Nahtmaterial eluiertes IGF-1 zurückzuführen ist.

Während in den oben erwähnten Studien zur Wirkung von IGF-1 auf die Darmanastomosenheilung keine Proteinbestimmungen mittels ELISA durchgeführt wurden, so ließen sich nach Administration des Wachstumsfaktors positive Effekte nachweisen, die mit dem gesteigerten Einfluss von IGF-1 auf die Wundheilung erklärt werden können. Sowohl Zacharakis als auch Petersen und Rijcken et al. fanden einen signifikant erhöhten Hydroxyprolinegehalt in den Anastomosensegmenten der IGF-1-Gruppe (49,50,84). Die Menge an Hydroxyprolin korreliert mit dem Ausmaß an Kollagensynthese und lässt so Rückschlüsse auf die Neubildung von Bindegewebe und darüber auf eine Stimulierung der Anastomosenheilung zu. Die erhöhte Kollagenproduktion könnte u. a. auf eine geringer ausgebildete Entzündungsreaktion zurückgeführt werden (49), die auch in den histologischen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte und in einer separaten Promotionsarbeit veröffentlicht wurde (76). Ferner könnte IGF-1 aber auch einen direkten, positiven Effekt auf den Kollagengehalt der Anastomose haben (50,84). Eine Untersuchung des Hydroxyprolinegehaltes in der Anastomosenregion zur Bestimmung der Aktivität des Kollagenstoffwechsels wurde in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt. Die in den histologischen Untersuchungen gesehene vermehrte Fibroblastenreaktion im Fadenbereich sowie die kompakter erscheinende bindegewebige Überbrückung könnten jedoch einen vergleichbaren Effekt beschreiben (76).

Petersen et al. konnten auch zeigen, dass durch die kontinuierliche systemische Applikation von IGF-1 das Gewicht der Versuchstiere aus der Wachstumsfaktorgruppe

## Diskussion

um 3% zunahm, während die Tiere der Kontrollgruppe im gleichen Zeitrahmen 5% ihres Gewichtes verloren (49). Auch in der Veröffentlichung von Zacharakis et al. konnten signifikante Gewichtszunahmen in der IGF-1-Gruppe gemessen werden (77). In der vorliegenden Promotionsarbeit war lediglich in den PDLLA- und IGF-1-Gruppen an Tag 1 eine nicht signifikante Gewichtszunahme der Versuchstiere von weniger als 2% festzustellen, in den übrigen Gruppen war nur eine leichte Gewichtsabnahme zu beobachten, die im Durchschnitt nicht mehr als 10 g (- 4%) betrug. Dieser Unterschied im Vergleich zu den Ergebnissen von Petersen und Zacharakis ist mit der systemischen Verabreichung des Wachstumsfaktors zu erklären: IGF-1 besitzt einen trophischen Effekt auf alle Zellen, womit eine Gewichtszunahme bei systemischer Applikation erwartet werden kann. Durch die lokale Applikation lassen sich am Zielort hohe Konzentrationen des Wachstumsfaktors erzielen, gleichzeitig wird jedoch der Gesamtorganismus nicht beeinflusst, und das Risiko potentieller Nebenwirkungen wird somit reduziert.

Einen interessanten Ansatz beschreiben auch Jeschke et al. in ihren Versuchen zur Wirkung von liposomal transferierter, IGF-1 cDNA-codierender Plasmide bei der Wundheilung von großflächigen thermal induzierten Wunden (52–54). Die Lipoplexe wurden nach dem Setzen der Wunden subkutan injiziert, sowie jeweils wöchentlich über die Dauer von vier Wochen; nachfolgend wurden die Veränderungen der Proteinkonzentrationen verschiedener Wachstumsfaktoren, inklusive IGF-1, untersucht. Die Messung erfolgte immunhistochemisch über Bestimmung Peptid-spezifischer Antikörper. Die Konzentration von IGF-1 im Bereich der Wunde war im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant gestiegen, ebenso die Konzentration an IGF-BP-3, dem Hauptbindungsprotein, welches vermehrt bei gesteigerter endogener IGF-1-Synthese gebildet wird. Dies wurde so interpretiert, dass das transferierte Gen von den Zielzellen angenommen wurde und nun aktiv die zellulären Transkriptions- und Translationsprozesse beeinflussen konnte. Die Autoren gehen davon aus, dass die durch das IGF-1 vermehrt aktivierten Fibroblasten, Epithel- und Mesenchymalzellen wiederum die IGF-1-Genexpression hochregulieren, was die Erhöhung dieser am siebten postoperativen Tag im Rahmen der vorliegenden Arbeit erklären könnte.

Einen konstanten Anstieg der IGF-1-Genexpression sahen auch Gartner et al. in ihrer Untersuchung verschiedener Hautwunden bei der Ratte (85). Der Versuchsansatz sowie die Methodik zur Isolierung der RNA und DNA-Quantifizierung unterschieden sich zwar

## Diskussion

deutlich von denen der vorliegenden Arbeit, Gartner et al. konnten aber auch in ihren Untersuchungen eine leichte Erhöhung der messbaren mRNA-Konzentration am Tag 1, einen weiteren Anstieg zum Tag 3 und vor allem noch eine weitere Zunahme an Tag 5 und 10 bestimmen. In der Diskussion der Ergebnisse wurde dies zum Teil auf die durch IGF-1 aktivierten und rekrutierten Fibroblasten zurückgeführt, die, im Sinne eines autokrinen Zyklus, wiederum eine gesteigerte Sezernierung von IGF-1 bewirken. Ebenso könnte die durch IGF-1 stimulierte Neoangiogenese durch die proliferierenden Endothelzellen der sich neubildenden Blutgefäße zusätzlich zu einer Verstärkung der Expression führen; dies deckt sich mit der Annahme Jeschkes sowie den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit.

Costa et al. untersuchten den Einfluss von Teduglutide, einem Analogon des Glucagon-like Peptide-2 (GLP-2) auf die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren nach Darmoperationen an Ratten (86). GLP-2 wird in enteroendokrinen Zellen produziert und es wurde gezeigt, dass IGF-1 ein entscheidender Mediator der trophischen Effekte von GLP-2 im Darm ist (87), im Sinne eines „downstream mediators“ (86). Die Tiere wurden entweder einer Ileumresektion oder lediglich einer Laparotomie ohne Darmresektion unterzogen, und erhielten ab dem Operationstag 200 µg/kg Teduglutide pro Tag, subkutan appliziert; die Untersuchungszeitpunkte waren der dritte und siebte postoperative Tag. Hinsichtlich der IGF-1-Genexpression konnte gezeigt werden, dass es am dritten sowie am siebten postoperativen Tag im Anastomosenbereich, beziehungsweise der perianastomotischen Region, im Ileum zu einer Hochregulierung gekommen war; diese war am ersten Untersuchungszeitpunkt deutlicher ausgeprägt und zum Tag 7 wieder rückläufig. Dieser Rückgang unterscheidet sich deutlich von den im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelten Expressionswerten; die Expression war mit dem ersten postoperativen Tag hochreguliert, stieg kontinuierlich an und lag vor allem in der IGF-1-Gruppe an Tag 7 deutlich über dem Wert der Referenz. Die mit der Zufuhr von GLP-2 beschriebene Erhöhung der IGF-1-Expression an Tag 3 könnte mit der Rolle des Wachstumsfaktors als „downstream mediator“ von GLP-2 erklärt werden, was bedeutet, dass GLP-2 im Rahmen der normalen Signaltransduktionsprozesse eine erhöhte IGF-1-Produktion bewirkt hat. Dass diese zum zweiten Untersuchungszeitpunkt zwar noch erhöht, jedoch wieder rückläufig war, könnte bedeuten, dass es zu einer deutlich weniger ausgeprägten vermehrten Produktion und Freisetzung von IGF-1 aus den Wachstumsfaktor-produzierenden Zellen gekommen war.



Letztlich bestätigen die vorliegenden Ergebnisse, dass IGF-1 auch im normalen, nicht stimulierten Ablauf der Wundheilung am Darm ein physiologisch relevanter Faktor ist. Die zusätzliche lokale Zuführung von IGF-1 in die Anastomosenregion durch beschichtetes Nahtmaterial führt darüber hinaus zu einer weiteren Steigerung der Protein- und Genexpression, was zu einer Beeinflussung zellulärer Prozesse führt und über die Aktivierung von für die Wundheilung essentieller Zellen die Heilung der Darmanastomose positiv beeinflussen kann. Es wäre interessant, zu untersuchen, inwieweit sich der ausgeprägte Anstieg der IGF-1-Genexpression vor allem in der IGF-1 -Gruppe auf die Proteinkonzentration im weiteren Verlauf auswirkt. Hierfür wäre ein zusätzlicher Versuchszeitpunkt um den zehnten postoperativen Tag in Erwägung zu ziehen.

### **4.2. VEGF**

Der Vascular Endothelial Growth Factor spielt eine wichtige Rolle bei der Neubildung von Blutgefäßen, sowohl während der Wundheilung, aber z.B. auch im Zusammenhang mit Tumor-assoziiertes mikrovaskulärer Neoangiogenese oder der Ausbildung von Kollateralen in ischämischen Organen (88). Die Bildung neuer Blutgefäße ist eine der Hauptkomponenten der Wund- und Anastomosenheilung. Eine gute Blutversorgung und die damit verbundene gute Sauerstoffversorgung sind hierbei wichtig, sowohl für die Kollagensynthese als auch zur Vermeidung von Wundinfektionen (22,24). VEGF ist entscheidend für die Angiogenese im Rahmen einer normalen Wundheilung, vor allem während der Proliferationsphase des Granulationsgewebes (18,29). So nimmt der Faktor Einfluss auf Endothelzellen, wobei er zum großen Teil die endotheliale Zellmigration und -aussprossung reguliert und die Permeabilität von Mikrogefäßen erhöht. Viele Zelltypen können VEGF produzieren, so z.B. Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Keratinozyten, und die Expression in Keratinozyten wird während der Wundheilung stark hochreguliert (89).

Mittels VEGF-ELISA konnten am ersten postoperativen Tag tendenzielle Unterschiede erfasst werden. Während die Werte in der Kontroll- und PDLLA-Gruppe in etwa auf dem Niveau der nicht operierten Referenz lagen, konnte in der IGF-1-Gruppe eine im Vergleich hierzu deutliche Erhöhung der Proteinkonzentration gemessen werden; aufgrund der Standardabweichung waren diese Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant. An Tag 3 kam es in allen Gruppen zu einem weiteren Anstieg, der in der

## Diskussion

PDLLA-Gruppe und Kontrollgruppe besonders ausgeprägt war; die messbare VEGF-Konzentration dieser beiden Gruppen lag deutlich, aber erneut nicht statistisch signifikant über dem Wert der IGF-1-Gruppe. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass VEGF zu diesem Zeitpunkt im Rahmen der physiologischen Wundheilung eine wichtige Rolle spielt und dies für die deutliche Hochregulierung verantwortlich ist. Während der frühe Anstieg an gemessenem VEGF auf das lokal freigesetzte IGF-1 und einem hierdurch gesteigerte VEGF-Produktion zurückgeführt werden könnte, ließe sich die in der IGF-1-Gruppe weniger deutliche Zunahme am zweiten Untersuchungszeitpunkt möglicherweise durch die schon an Tag 1 stattgefundenene Erhöhung erklären und könnte mit einer negativen Rückkopplung zusammenhängen, die eine weitere Erhöhung zu diesem Zeitpunkt verhinderte. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen aus den VEGF-qPCR-Untersuchungen, wo in der IGF-1-Gruppe am ersten postoperativen Tag eine, im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen, signifikant erhöhte Genexpression messbar war, die dann aber an Tag 3 rückläufig war.

Am siebten postoperativen Tag war in allen Versuchsgruppen ein Rückgang der VEGF-Proteinkonzentration festzustellen, die z.T. sogar unter Referenzniveau fiel und in der IGF-1 Gruppe am deutlichsten zu beobachten war. Dass die VEGF-Genexpression sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 in allen Gruppen anhaltend über Referenzniveau lag, zeigt, dass die Genexpression nicht direkt mit dem effektiven Protein-Endprodukt korrelieren muss, direkte Rückschlüsse also nicht möglich sind. Es ist wahrscheinlich, dass in diesem Zusammenhang Feedbackmechanismen beteiligt sind, die die Proteinproduktion anpassen. Ob der erneute Anstieg der Genexpression in der IGF-1 Gruppe an Tag 7 in diesem Zusammenhang als erneute Gegenregulation auf ein zu starkes Absinken der Proteinkonzentration zu werten ist, oder ein direkter Einfluss des IGF-1 ist (dessen Genexpression zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöhte war), kann im Rahmen dieser Untersuchung nicht abschließend geklärt werden; auch in diesem Zusammenhang wäre es interessant, die weiteren Veränderungen auf Protein- und Genexpressionsebene mithilfe von weiteren Untersuchungszeitpunkten zu analysieren.

Der Einfluss von VEGF auf die Heilung von Darmanastomosen ist in einigen Publikationen beschrieben worden, ein Zusammenhang mit einer IGF-1 Behandlung wie in der vorliegenden Promotion jedoch noch nicht. So untersuchten Ishii et al. den Effekt von in die Muscularis propria injiziertem VEGF bei Kolonanastomosen am Kaninchen (90). Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich der „Bursting Pressure“ der

## Diskussion

Anastomosenregion am vierten postoperativen Tag signifikant in der VEGF-Gruppe erhöhte, während er am dritten postoperativen Tag nur tendenziell über dem der Kontrollgruppe lag. Auch die Hydroxyprolinwerte in der VEGF-Gruppe des vierten postoperativen Tages waren signifikant höher als in der Vergleichsgruppe. Hinsichtlich der histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse ließen sich signifikante Unterschiede im Bereich des „capillary vascular count“, der Mikroangiographie sowie der Fibroblastenproliferation nachweisen.

Enestvedt et al. untersuchten die Wirkung eines nichtviralen VEGF Plasmid-Vektors auf die Anastomosenheilung einer Ösophagogastrostomie (78). Hierfür wurden Opossums mittels eines tubulierten Magenhochzugs operiert und im Bereich der Anastomose der VEGF-Vektor injiziert. Anders als im Bereich des Dickdarms neigen Ösophagusanastomosen zwischen dem siebten bis zehnten postoperativen Tag zur Insuffizienz (78). Daher wurden in der Studie die Untersuchungen erst am zehnten postoperativen Tag durchgeführt. In der VEGF-Gruppe zeigte sich zum einen ein signifikant gesteigerter Bursting Pressure. Auch die Neovaskularisation war in dieser Gruppe zum Untersuchungszeitpunkt deutlich vorangeschritten, wobei eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl neugebildeter Mikrogefäße und des Bursting Pressure gesehen wurde. Vergleichbar mit der vorliegenden Promotionsarbeit untersuchten Enestvedt et al. auch die Auswirkungen des Vektors auf die VEGF-Genexpression mittels qPCR. Hier zeigten sich Erhöhungen im Vergleich zur Referenz um das vier- bis fünffache, signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. Auch wenn sich die verwendete Methodik von der in dieser Arbeit beschriebenen Beschichtung unterscheidet, sind die Hochregulierungen der Genexpression in beiden Versuchen und die damit im Zusammenhang stehenden positiven Effekte auf die Haltbarkeit der Anastomosen im Ansatz vergleichbar. Auf eine zusätzliche Bestimmung der VEGF-Konzentration im Gewebe wurde verzichtet.

In einem ähnlichen Versuchsaufbau, jedoch bei der Ratte, untersuchten Adas et al. den Effekt von intraoperativer VEGF- und/oder Fibroblast Growth Factor (FGF)-Plasmid-Applikation bei der ischämischen linksseitigen Kolonanastomose (91), wobei jedoch nur ein einzelner Untersuchungszeitpunkt am vierten postoperativen Tag gewählt wurde. Hier erfolgte die Tötung der Tiere, mit nachfolgender Bestimmung des Bursting Pressure, des Hydroxyprolingehaltes, der VEGF- und FGF-Konzentrationen mittels ELISA sowie die histologische Aufarbeitung und Beurteilung der Anastomosen.

## Diskussion

In den ELISA-Bestimmungen wurde für VEGF eine signifikante Erhöhung in der VEGF-Plasmid-Gruppe gemessen sowie in der Gruppe, die das VEGF-/FGF-haltige Plasmid injiziert bekommen hatten. Die Werte lagen in allen Gruppen leicht über denen der hier beschriebenen Versuche, sind jedoch tendenziell mit denen des dritten postoperativen Tages vergleichbar.

Dass IGF-1 Einfluss auf die Angiogenese nimmt, konnte in unterschiedlichen Studien gezeigt werden. So führte die subkutane Injektion von IGF-1 cDNA zu einer Erhöhung der lokal messbaren VEGF-Konzentration und einer ausgeprägteren Neoangiogenese (52–54). In diesem Versuchsaufbau konnte jedoch nicht geklärt werden, auf welchen Mechanismus diese Wirkungen zurückzuführen sind. Entweder geschieht dies auf Grundlage einer direkten Stimulation des VEGF durch IGF-1, oder die VEGF-Erhöhung resultiert aus einer durch IGF-1 beeinflussten gesteigerten Produktion an Granulationsgewebe sowie aktivierter Endothelzellen und Fibroblasten.

Die Induktion von VEGF durch IGF-1 ist im Zusammenhang mit der Wachstumsfaktor-stimulierten Wundheilung des Darmes noch nicht beschrieben worden, der direkte Einfluss von IGF-1 auf die VEGF-Expression konnte jedoch u. a. in Zellkulturen nachgewiesen werden. So untersuchten die Arbeitsgruppen um Warren und Bermont jeweils den Einfluss von IGF-1 auf die Regulierung der VEGF-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien (92,93). Warren et al. verwendeten hierbei Kolorektalkarzinom-Zelllinien, die für 72 Stunden mit IGF-1 stimuliert und deren VEGF-Expression nachfolgend mittels Northern Blot bestimmt wurde. Hierbei konnte im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle nicht nur eine 2,3- bis 12-fache Erhöhung der VEGF-mRNA, sondern auch eine bis zu dreifach erhöhte Konzentration von VEGF-Protein im Überstand gemessen werden (92). Dieser Effekt wurde auf zwei verschiedene IGF-1-vermittelte Mechanismen zurückgeführt: die Fähigkeit, die Transkriptionsrate der VEGF-mRNA hochzuregulieren sowie die Stabilisierung der VEGF-mRNA und damit deren zelluläre Halbwertszeit. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Bermont et al., die in ihren Versuchen den Einfluss von IGF-1 auf die VEGF-Expression in Endometrium-Adenokarzinomzellen untersuchten (93). Hierzu wurden die Zelllinien über 24 Stunden mit IGF-1 inkubiert und danach zu verschiedenen Zeitpunkten die isolierte RNA-Menge mittels Northern Blot gemessen. Auch hier war eine signifikant erhöhte VEGF-mRNA-Expression in den IGF-1-stimulierten Zellen messbar, wobei das Maximum nach 48 Stunden erreicht wurde. Vergleichbar mit Warren et al., wurde dieser Effekt auf

## Diskussion

eine erhöhte Transkriptionsrate zurückgeführt, aber vor allem auf post-transkriptionelle Prozesse, insbesondere auf eine erhöhte Stabilität der mRNA.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche sind nicht direkt mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar, da sich zum einen der Versuchsansatz deutlich unterscheidet und vor allem Tumorzellen verwendet wurden, die sich in ihrer Biologie und den Zellfunktionen von Intestinalzellen unterscheiden; auch wurde nur ein Versuchszeitpunkt gewählt, weshalb der Verlauf über die Zeit fehlt. Im Vergleich zur Zellkultur sind die Abläufe innerhalb eines Systems wie der Wundheilung einer Darmanastomose deutlich komplexer und weiteren Kontrollsystemen ausgesetzt, aber tendenziell lassen sich die Ergebnisse mit denen der beschriebenen Versuche vergleichen und bestätigen die Befunde, dass IGF-1 in die Expression von VEGF eingreift und auch auf diese Weise die Wundheilung, insbesondere die Neoangiogenese, fördert.

Auch Costa et al. konnten in ihrer Studie zur Auswirkung von GLP-2 auf die Heilung von Darmanastomosen zeigen, dass die subkutane Gabe des Wachstumsfaktors sowohl am dritten als auch am siebten postoperativen Tag eine Hochregulierung der VEGF-Genexpression bewirkt (86). Vor allem die anhaltende Erhöhung am zweiten Untersuchungszeitpunkt wurde auf „downstream“ Aktivität des Wachstumsfaktors zurückgeführt. Da IGF-1 als ein wichtiger Mediator der enterotropen Effekte des GLP-2 gilt, und auch die Expression dieses Faktors gesteigert war, könnte die Hochregulierung von VEGF auch hier zumindest indirekt durch IGF-1 bedingt gewesen sein.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass lokal appliziertes IGF-1 allein oder im Zusammenspiel mit anderen Faktoren die Expression und Produktion von VEGF schnell und deutlich stimuliert, gefolgt von Feed-back Mechanismen, durch die die Konzentration von VEGF am Ort der Wundheilung reguliert wurde.

### **4.3. TGF- $\beta$ 1**

TGF- $\beta$ 1 ist ein für die Wundheilung wichtiger Faktor, der von verschiedenen Zellen (z.B. Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten, und Keratinozyten) freigesetzt wird und in allen Phasen der Wundheilung eingreift (28,35,94). Schon zu Beginn der exsudativen Phase wird er von Thrombozyten sezerniert und fördert nachfolgend die Einwanderung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten (35); Steenfoss spricht in diesem Zusammenhang auch von der „Gerinnungsphase“ der Wundheilung (35). Mit Beginn der Ausbildung des Granulationsgewebes und dem Übergang in die proliferative

## Diskussion

Phase der Wundheilung beginnt die Einwanderung und Proliferation von Zellen, die für die Reepithelialisierung, Neoangiogenese und Kollagenproduktion wichtig sind; vor allem die Migration von Fibroblasten und die Produktion und Organisation der Extrazellulärmatrix wird durch TGF- $\beta$ 1 stimuliert (35,95). Im Rahmen dieser Prozesse spielt der Wachstumsfaktor jedoch auch eine zentrale Rolle in der Bildung von hypertrophem Narbengewebe und Keloiden; wichtig scheint in diesem Zusammenhang die Konzentration des Wachstumsfaktors im Gewebe zu sein. So wurde gezeigt, dass eine hohe Proteinexpression zu einer vermehrten Narbenbildung führt (95), ebenso wie eine vermehrte Expression des Peptids in Keratinozyten im Rahmen chronischer Entzündungsreaktionen gemessen werden konnte (96).

In den ELISA-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die TGF- $\beta$ 1-Werte in allen Gruppen bereits am ersten Tag nach der Operation deutlich im Vergleich zur nicht operierten Gruppe angestiegen waren; während in der Kontroll- und PDLLA-Gruppe eine knapp 50% höhere Proteinkonzentrationen im Vergleich zur Referenz gemessen werden konnte, lag der Wert der IGF-1-Gruppe noch einmal mehr als 10% über diesen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Diese gruppenübergreifende Hochregulierung scheint die erwähnte Rolle des TGF- $\beta$ 1 in der frühen Wundheilung zu bestätigen. Ferner war in allen Gruppen zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Standardabweichung von etwa 50% messbar, was ein Hinweis auf interindividuelle Unterschiede in der Expression des Faktors im Rahmen der frühen Wundheilung sein könnte. Am dritten postoperativen Tag verblieben die Werte in der PDLLA- sowie der IGF-1-Gruppe auf dem Niveau des vorherigen Untersuchungszeitpunktes, während die messbare Proteinkonzentration der Kontrollgruppe deutlich abgenommen hatte (minus 20%) und nun nur noch 25% über der Referenz lag; erneut konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gemessen werden. Auch am dritten Untersuchungszeitpunkt lagen die Werte in allen Gruppen deutlich über der Referenz, die TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen der drei Gruppen befanden sich nun wieder auf einem ähnlichen Niveau (maximal 15% Unterschied).

Die Tatsache, dass in allen drei Gruppen vergleichbare Werte nachweisbar waren, bestätigt die Erkenntnis, dass TGF- $\beta$ 1 eine wichtige Rolle im Rahmen der Wundheilung einnimmt und auch bei der Heilung von Darmanastomosen an mehreren Stellen eingreifen kann. Dass sich die messbaren Proteinkonzentrationen innerhalb der einzelnen Gruppen über die Zeit nur geringfügig veränderte, lässt die Schlussfolgerung

## Diskussion

zu, dass diese Prozesse IGF-1-unabhängig sind, oder zumindest im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durch die zusätzliche Administration beeinflusst werden konnten.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, die Jeschke et al. im Rahmen ihrer Untersuchung machten. Auch hier zeigte sich, dass TGF- $\beta$ 1 einer der Wachstumsfaktoren ist, auf dessen Vorliegen im Wundgewebe die transferierte IGF-1-cDNA keinen Einfluss hatte (54). Costa et al. konnten in ihrer oben beschriebenen Studie zu GLP-2 sogar eine Herunterregulierung der TGF- $\beta$ 1-Genexpression an beiden Untersuchungszeitpunkten (dritter und siebter postoperative Tag) messen (86).

In der von Buckmire et al. durchgeführten Studie zur TGF- $\beta$ 1-Genexpression im Rahmen der unbeeinflussten Heilung von Kolonanastomosen konnte gezeigt werden, dass diese im Verlauf der ersten postoperativen Woche kontinuierlich zunimmt, mit statistisch signifikanten Unterschieden an Tag 6 und 7 im Vergleich zum Operationstag (82). Da die perianastomotische Proteinkonzentration nicht bestimmt wurde, ist jedoch kein Rückschluss auf das post-transkriptionelle Vorliegen von TGF- $\beta$ 1 möglich, ein direkter Vergleich mit den vorliegenden Daten erschwert. Letztlich unterstreichen die Ergebnisse jedoch die Rolle des Wachstumsfaktors im Rahmen der physiologischen Wundheilung.

Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 bei der Mukosarekonstruktion und Neovaskularisation im Rahmen der Heilung von Darmanastomosen wurde von Fukuda et al. untersucht (28). Um die Funktionen des Wachstumsfaktors genauer bestimmen zu können, wurde den Versuchstieren nach Anlegen einer Ileumanastomose ein anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörper intraperitoneal verabreicht; am fünften postoperativen Tag wurden Proben aus dem Anastomosengebiet für die histologische Untersuchung gewonnen. Die mit dem neutralisierenden Antikörper behandelten Tiere zeigten eine deutlich ausgeprägtere Epithelzellansiedlung und Vaskularisation im Anastomosengebiet als die Tiere der Kontrollgruppe, und unter dem Antikörper wurden EGF und VEGF signifikant stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe. Eine biomechanische Untersuchung der Anastomosenfestigkeit war nicht erfolgt, so dass eine abschließende Schlussfolgerung bezüglich der Auswirkung auf die effektive Heilung und Stabilität der Anastomose nach Auffassung der Autoren nicht gezogen werden konnte. Die Autoren schlussfolgerten jedoch, dass dies bedeuten würde, dass TGF- $\beta$ 1 per se einen negativen Einfluss auf die Darmanastomosenheilung haben müsste, da durch seine Blockade die Wundheilung angeregt worden zu sein scheint (28).

## Diskussion

Einen positiven Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Stabilität der Kolonanastomose konnten dafür Migaly et al. nachweisen, die eine Adenovirus-vermittelte Übertragung des Faktors in den Anastomosenbereich mittels eines Kolonkatheters etablierten (97). Hier zeigte sich, dass die Gruppen, die den TGF- $\beta$ 1-Vektor am dritten postoperativen Tag erhielten, zum einheitlichen Untersuchungszeitpunkt an Tag 6 einen signifikant höheren Bursting Pressure aufwiesen; ebenfalls konnte eine signifikant höhere TGF- $\beta$ 1-Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Gruppe, der noch am Tag der Operation der Vektor verabreicht worden war, wies zu diesem Zeitpunkt weder in der mechanischen Belastbarkeit des Darmes noch in der Proteinbestimmung erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Insgesamt konnte im Rahmen der vorliegenden Studie zum einen bestätigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 ein für die Wundheilung von Darmanastomosen wichtiger Faktor ist und sowohl früh postoperativ als auch anhaltend danach vermehrt als Protein im Anastomosenbereich vorliegt. Zum anderen scheint der Wachstumsfaktor hierbei unabhängig zu sein oder zumindest nicht von dem lokal applizierten IGF-1 beeinflusst zu werden.

### **4.4. GM-CSF**

Der Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor fördert die Proliferation und Freisetzung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark, die in das verletzte Gewebe einwandern und dort an dem Entzündungs- und Heilungsprozess teilnehmen. Im Rahmen lokaler Wundheilungsprozesse kann GM-CSF von verschiedenen Zellen synthetisiert werden, so z.B. von Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen oder auch Keratinozyten (98). Ferner haben verschiedene Untersuchungen ergeben, dass der Wachstumsfaktor die Proliferation, Migration und das Überleben sowohl von Keratinozyten als auch von Endothelzellen fördert, und so die Bildung von Granulationsgewebe sowie die Neoangiogenese stimuliert (98–101). Im Intestinalbereich konnte gezeigt werden, dass GM-CSF eine wichtige Rolle im Rahmen der frühen Wundheilungsprozesse spielt und hierbei vor allem die Epithelzellproliferation fördert (102).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass am ersten postoperativen Tag in allen Versuchsgruppen keine Erhöhung des GM-CSF im Vergleich zur nicht operierten Referenz gemessen werden konnte, und sich die Werte der drei Gruppen auch weniger als 10% voneinander unterschieden. Im Vergleich hierzu kam es an Tag 3 zu einer



## Diskussion

Steigerung der Proteinkonzentration in allen Gruppen. Diese fiel in der IGF-1-Gruppe am geringsten aus (+10% im Vergleich zu Tag 1), während in der PDLLA-Gruppe eine Zunahme von etwa 50%, in der Kontrollgruppe sogar von 80% messbar war. Die Erhöhung der Proteinkonzentrationen in allen drei Gruppen zu diesem Zeitpunkt kann als Zeichen der voranschreitenden Wundheilung bei weiterhin bestehender Rekrutierung von Effektorzellen und beginnenden Ausbildung von Granulationsgewebe interpretiert werden. Auffällig hierbei ist die deutliche Standardabweichung der Kontrollgruppe, die zu diesem Zeitpunkt etwa 60% beträgt. Die deutlich niedrigere GM-CSF-Proteinkonzentration in der IGF-1-Gruppe könnte darauf zurückgeführt werden, dass der vermehrt vorliegende Wachstumsfaktor im Wundbereich zu diesem Zeitpunkt zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion führt. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in den histologischen Untersuchungen der im Rahmen dieser Studie durchgeführten weiteren Promotionsarbeit gesehen (76). Hier war in den IGF-1-Gruppen, v.a. im Vergleich zur Kontrollgruppe, deutlich und zum Teil statistisch signifikant weniger Granulozyteninfiltration und Nekrosenbildung im Anastomosenbereich nachweisbar gewesen.

Am Tag 7 kam es zu einem deutlichen Abfall der messbaren GM-CSF-Konzentration, wobei die Werte aller Gruppen deutlich unter den Wert der Referenzgruppe fielen. Dies könnte damit erklärt werden, dass hier im Rahmen der physiologischen Wundheilungsprozesse GM-CSF keine relevante Rolle mehr spielt und IGF-1 diese Abläufe nicht wesentlich beeinflusst oder zusätzlich stimuliert.

Egea et al. konnten in ihrer Studie zur Wirkung von GM-CSF auf die Wundheilung im Rahmen eines experimentellen Kolitis-Modells vergleichbare Ergebnisse bestimmen. Die messbare Proliferation der Kolonepithelzellen unter Einfluss von GM-CSF war an Tag 3 am stärksten, während am ersten postoperativen Tag noch keine Effekte erkennbar gewesen waren; auch im weiteren Verlauf der Heilung (hier etwas später an Tag 9 und 12) schien der Faktor für die Epithelregeneration nicht weiter von signifikanter Bedeutung zu sein (102).

Unter dem Eindruck, dass das Vorliegen einer Minderperfusion einer der häufigsten Gründe für eine Anastomoseninsuffizienz sei, untersuchten Dinc et al. die Anastomosenfestigkeit bei experimentell durch Unterbindung mesenterialer Blutgefäße gesetzter Ischämie unter dem Einfluss von GM-CSF (103). 50 µg GM-CSF wurden perioperativ in die Subserosa des Anastomosenbereichs injiziert und die Tiere wurden

## Diskussion

am dritten bzw. am siebten postoperativen Tag getötet, um die Reißfestigkeit der Anastomose, den Hydroxyprolinegehalt und die Histologie des Anastomosengewebes zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass mittels GM-CSF sowohl im Rahmen der normalen Anastomosenheilung des Dickdarmes, als auch unter ischämischen Bedingungen, eine bessere biomechanische Belastbarkeit hergestellt werden konnte, mit signifikant höheren Bursting Pressures im Vergleich zu den Referenzgruppen.

Weitere Studien haben den Einfluss von GM-CSF im Zusammenhang mit intraperitonealer Chemotherapie, so z.B. 5-Fluorouracil und Mitomycin-C, und der Langzeitgabe von Corticosteroiden untersucht (48,79,80). Dies ist eine für den klinischen Alltag relevante Fragestellung, da eine adjuvante Chemotherapie wie auch Kortikosteroide häufig prä- und perioperativ angewandt werden und zum Teil mit einem höheren Risiko für Anastomoseninsuffizienzen in Verbindung gebracht werden (5,7).

In den Versuchsansätzen wurde nun davon ausgegangen, dass die Gabe der Medikamente die Entzündungsreaktion unterdrücken und die Wundheilung hemmen müsste, GM-CSF aber diesem Mechanismus entgegenwirken und einen protektiven Effekt haben sollte. Der Wachstumsfaktor wurde in allen Untersuchungen mittels subserosaler Injektion in die perianastomotische Region appliziert, Dinc et al. untersuchten des Weiteren die Auswirkungen einer subkutanen Injektion in einer zusätzlichen Versuchsgruppe (79). Jeweils am dritten postoperativen Tag wurde die Anastomose histologisch sowie ihre Belastbarkeit biomechanisch untersucht und der Hydroxyprolinegehalt im Anastomosengebiet bestimmt. Es zeigte sich in allen Untersuchungen, dass die lokale Injektion von GM-CSF die Wundheilung der Anastomose unterstützte. Der Bursting Pressure der Gruppen, die zusätzlich zum Chemotherapeutikum oder Kortikosteroid GM-CSF erhalten hatten, lag im Bereich oder sogar über der unbeeinflussten Referenz und auch die Hydroxyprolinwerte als Indikator für Kollagenneosynthese und -umsatz glichen denen der Referenzgruppen (48).

Interessanterweise beschreiben Dinc et al., dass diese Effekte bei der subkutanen Gabe nicht mehr nachweisbar war (79). Dies stimmt mit den Erkenntnissen von Fatouros et al. überein, die in ihrer Studie zum Einfluss von GM-CSF und Erythropoetin auf die Heilung der Darmanastomose bei einer subkutanen Gabe des Wachstumsfaktors keine Zunahme der Belastbarkeit der Anastomose feststellen konnten (104).

GM-CSF Proteinbestimmungen wurden in allen Studien nicht durchgeführt, so dass ein Vergleich der jeweiligen Proteinkonzentrationen nicht möglich ist. Das GM-CSF eine

## Diskussion

wichtige Rolle im Ablauf der Wundheilung spielt, ist offensichtlich; ob, und wenn ja, wie IGF-1 an dieser Stelle angreift, ist noch unklar.

### **4.5. Ergebnisse der biomechanischen und histologischen Untersuchungen**

In den biomechanischen Versuchen zum Bursting Pressure des Kolons zeigte sich am dritten postoperativen Tag in der IGF-1-Gruppe eine signifikant höhere Wandstabilität im Vergleich zur Kontroll- und PDLLA-Gruppe. Dies ist klinisch von Bedeutung, da es in diesem Zeitfenster aufgrund des im Vergleich zur Kollagensynthese gesteigerten Kollagenabbaus zur erhöhten Vulnerabilität der Anastomosenregion kommt (18,21,22). Die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Versuche unterstützen diese Erkenntnisse, vor allem am dritten postoperativen Tag konnte ein deutlicher Rückgang der Nekrosenbildung, sowie eine Förderung der Reepithelialisierung und Kollagensynthese nachgewiesen werden. Eine Steigerung der Vaskularisation konnte hingegen nur in unmittelbarer Fadenumgebung gezeigt werden. Die PDLLA-Beschichtung an sich führte zu keiner Heilungsstörung, es wurde keine Nekrosenbildung, Makrophageneinwanderung und Granulozyteninfiltration gesehen.

### **4.6. Kritische Betrachtung**

#### **Tiermodell**

Ratten werden häufig für Studien zur Heilung von Darmanastomosen eingesetzt (37,48–50,55,57,58,77–80). Während es somit zum einen möglich ist, die Ergebnisse mit Daten anderer Arbeitsgruppen zur normalen und pathologischen Wundheilung zu vergleichen, muss zum anderen berücksichtigt werden, dass sich die Wundheilungseigenschaften der Tiere im Vergleich zum Menschen zum Teil unterscheiden. Wie von Alvarenga et al. und Pommergaard et al. dargelegt (22,105), haben die meisten Tiermodelle zur Untersuchung von Anastomoseninsuffizienzen Limitationen, da es sich als schwierig herausgestellt hat, die Komplikationen, die beim Menschen im postoperativen Verlauf auftreten können (z.B. Minderperfusion, Peritonitis oder Sepsis), zu imitieren. Obwohl die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen an Tieren nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können, stellen sie doch eine wichtige Grundlage für die Erforschung verschiedenster Mechanismen dar (21). Ferner war es nicht Ziel dieser Studie, die Inzidenz von Anastomoseninsuffizienzen zu untersuchen, sondern die Anastomosenheilung als solche, mit dem Ziel histologische, biomechanische und

## Diskussion

biochemisch/molekularbiologische Unterschiede zu analysieren; hierfür sind Ratten geeignete Tiere (22).

Christensen et al. konnten zeigen, dass sich die Wachstumshormon- (GH-) Sekretion im Rahmen einer Reaktion auf Stress zwischen Menschen und Ratte unterscheidet (46); während diese im Menschen zunimmt, kommt es bei der Ratte zu einer reduzierten Sekretion an GH. Interessanterweise reagieren Mensch und Ratte in diesen Stresssituationen vergleichbar hinsichtlich der IGF-1-Sekretion, bei beiden können reduzierte Konzentrationen gemessen werden. Somit wäre es denkbar, dass das über die Beschichtung des Nahtmaterials zugeführte IGF-1 in beiden Systemen zu vergleichbaren Reaktionen führt; letztlich mag die Wundheilung der Ratte durch den zusätzlichen vorliegenden GH-Mangel hierbei stärker auf die exogene Zuführung des Proteins reagieren.

### **Applikation von Wachstumsfaktoren**

Die lokale Applikation von IGF-1 durch beschichtetes Nahtmaterial hat einen positiven Effekt auf die Wundheilung und Stabilität der Kolonanastomose, wie durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche sowie von Rijcken et al. in ihrer Untersuchung der Wirkung von IGF-1 auf die Anastomosenheilung bei ischämischer Kolitis gezeigt werden konnte (50). Eine positive Beeinflussung der Wundheilung am Darm durch Wachstumsfaktoren konnte auch durch andere Applikationsformen erreicht werden, ob über subkutan implantierte miniosmotische Pumpen (49), intraperitoneale Injektionen (perioperativ und nachfolgend täglich, beziehungsweise jeden zweiten Tag; (37,57,84), lokale Injektionen in den perianastomotischen Bereich (48,79,80) oder über Gelatineschwämmchen, die auf der Außenseite des Kolons (serosal) im Bereich der Anastomose fixiert werden (58). Im Vergleich zur Beschichtung des Nahtmaterials weisen diese Versuchsansätze jedoch wesentlich Nachteile auf. So geht eine systemische Applikation stets mit einem erhöhten Risiko für Nebenwirkungen einher, während die wiederholten Injektionen der Faktoren das Infektionsrisiko sowie die Wahrscheinlichkeit der Verletzung von Funktionsgewebe unnötig steigern. Die Implantation von Trägermaterialien birgt nicht nur ein Risiko für Infektionen und Fremdkörperreaktionen sondern würde ggf. auch eine Folgeoperation zur Entfernung des Systems nötig machen.

Vorteil der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren durch die Beschichtung ist die Möglichkeit, am eigentlichen Zielort einen hohen effektiven Wirkstoffspiegel zu erreichen,

## Diskussion

während die systemisch auf den Organismus wirkende Menge an Wachstumsfaktoren gering bleibt (67). Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass Wachstumsfaktoren, wenn ungebunden, nur über einen limitierten Zeitraum biologisch aktiv bleiben; IGF-1 hat im Menschen z.B. eine Halbwertszeit von unter 20 Minuten (64). Das hier beschriebene, sogenannte kalte Beschichtungsverfahren ermöglicht es jedoch, das Protein in der Trägersubstanz PDLLA zu binden und nachfolgend im Wundbereich über einen längeren Zeitraum in seiner aktiven Form freizusetzen. Hierbei kommt es, wie im Elutionsversuch beschrieben, zu einem initialen Freisetzungsmaximum mit nachfolgend kontinuierlicher weiterer Lösung. Schmidmaier et al. konnten nachweisen, dass die gebundenen Wachstumsfaktoren in beschichteten Metallimplantaten nach zwölfmonatiger Lagerung bei -20°C noch zu 96% stabil waren (69). Diese Untersuchungen wurden im Rahmen der vorliegenden Studie nicht durchgeführt, da sich die Methode der kalten Beschichtung jedoch in beiden Ansätzen gleicht, ist davon auszugehen, dass sich auch die Ergebnisse miteinander vergleichen lassen.

Anhand der biomechanischen Vorversuche und REM-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich der Wachstumsfaktor durch die gewählte Technik in einer gleichmäßigen Beschichtung auftragen lässt und die mechanischen Eigenschaften des Fadens hinsichtlich der Reißfestigkeit nicht beeinflusst werden; auch das Setzen mehrerer Knoten, vergleichbar mit dem intraoperativen Vorgehen, hatte keine negativen Auswirkungen auf die Stabilität der Beschichtung des Fadens. Eine negative Beeinflussung der Anastomosenheilung durch das PDLLA sowie eine Fremdkörperreaktion auf die Trägersubstanz konnte nicht nachgewiesen werden.

## Methodik

Im Rahmen weiterer Untersuchungen dieses Modells wäre es überlegenswert, die Entnahme der Anastomosenregion nicht nach Beendigung der biomechanischen Untersuchungen durchzuführen, sondern Ratten – vergleichbar mit den Tieren für die histologischen Untersuchungen – separat für diese Untersuchungen zu operieren. Auch wenn die Anastomosenregion nach den Druckmessungen am in Narkose befindlichen und lebendigen Tier entnommen wurde, ist nicht auszuschließen, dass die Manipulation des Darmgewebes und eine Verzögerung der Entnahme Auswirkungen auf die zelluläre Beschaffenheit im Bereich der Anastomosenregion hatte. Ferner wäre es wohlmöglich auch von Vorteil, die Anastomosenregion direkt nach der Entnahme weiter zu bearbeiten

## Diskussion

und das Gewebe direkt unter Stickstoffkühlung aufzuschließen, um eine möglichst optimale Beschaffenheit des Gewebes zu erreichen.

Wie im Rahmen der Diskussion schon erwähnt, würden sich weitere Untersuchungszeitpunkte anbieten, um so den weiteren Verlauf der IGF-1- und VEGF-Proteinkonzentration und -Genexpression beobachten zu können. In diesem Zusammenhang wäre es zum Beispiel von Interesse, zu untersuchen, wie sich die am siebten postoperativen Tag stark hochregulierten IGF-1- und VEGF-Expressionen auf den weiteren Verlauf der jeweiligen Proteinkonzentration im Gewebe auswirken.

Da bis dato keine Studien zur stimulierten Darmanastomosenheilung veröffentlicht wurden, in deren Rahmen die Protein- und Genexpression mittels ELISA und q-PCR untersucht wurde, sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur schwer mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar. In diesem Zusammenhang wäre die zusätzliche Bestimmung von Hydroxyprolin als Indikator für die Kollagensynthese eine Möglichkeit, die in mehreren der erwähnten Veröffentlichungen durchgeführt wurde (37,44,49,50,77,84).

Hinsichtlich der Beschichtung des Nahtmaterials wäre auch die Verwendung anderer Wachstumsfaktoren in Erwägung zu ziehen sowie die Kombination mehrerer Proteine. So konnten Wildemann et al. in einem Knochenheilungsmodell zeigen, dass die gleichzeitige Inkorporierung von IGF-1 und TGF- $\beta$ 1 in die PDLLA-Beschichtung von Titanplatten zu einer signifikant höheren biomechanischen Stabilität der Fraktur mit gesteigerter Kallusmineralisierung führte (70).

Wie auch von Rijcken et al. postuliert (39), wäre die Kombination aus einem die Zellproliferation und Kollagensynthese stimulierenden Wachstumsfaktor mit einem Kollagenase- oder Proteaseinhibitor denkbar, um gleichzeitig die vor allem im Rahmen der frühen, exsudativen Phase der Wundheilung stattfindende Kollagenolyse abzuschwächen, die für die Entstehung einer Anastomoseninsuffizienz mit verantwortlich sein könnte.

Die im Rahmen der ELISA-Versuche bestimmten Wachstumsfaktoren (VEGF, TGF- $\beta$ 1 und GM-CSF) waren schon Gegenstand von Untersuchungen zur beeinflussten Heilung von Darmanastomosen und würden sich ebenfalls für die PDLLA-Inkorporierung anbieten. Besonders VEGF als Stimulator der Neoangiogenese wäre in diesem Zusammenhang interessant, da die ausreichende Perfusion für die Stabilität und Haltbarkeit der Anastomose von essentieller Bedeutung ist (22,24).

## 5. Zusammenfassung

Die Anastomoseninsuffizienz stellt in der Abdominalchirurgie noch immer eine gefürchtete Komplikation dar, die mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität für die Patienten einhergeht (4,7). Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, inwiefern sich die Beschichtung des Nahtmaterials mit IGF-1 auf die Heilung der Kolonanastomose der Ratte auswirkt. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden hierbei die Proteinkonzentration von IGF-1, VEGF, TGF- $\beta$ 1 und GM-CSF mittels ELISA sowie die Genexpression von IGF-1 und VEGF mittels PCR bestimmt. In zwei weiteren Promotionsarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Stabilität der Anastomosen mittels biomechanischer Testungen sowie die Beschaffenheit und den zellulären Aufbau mittels Histologie/Immunhistochemie untersucht (75,76).

Es konnte gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss des lokal applizierten IGF-1 im Vergleich zu den Kontrollgruppen bereits am ersten postoperativen Tag zu einer Erhöhung von IGF-1 und von VEGF kam, zweier Faktoren, die über die Stimulierung multipler Faktoren (z.B. weiterer Wachstumsfaktoren sowie Funktion und Differenzierung verschiedener Zelltypen) bedeutend in die Wundheilung eingreifen und diese fördern können. Ferner konnte durch die IGF-1-Beschichtung die Genexpression von IGF-1 und VEGF statistisch signifikant erhöht werden; bei IGF-1 besonders ausgeprägt am siebten postoperativen Tag, bei VEGF sowohl am ersten als auch am siebten postoperativen Tag. Besonders für VEGF unterstützt dies die Annahme, dass IGF-1 die Expression des Wachstumsfaktors induzieren kann.

Für TGF- $\beta$ 1 und GM-CSF ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bestimmen; im Vergleich zur Referenzgruppe konnte jedoch zu fast allen Untersuchungszeitpunkten eine gesteigerte Proteinkonzentration ermittelt werden, wobei sich die Verläufe zwischen den einzelnen Gruppen stark ähnelten. Dies unterstreicht die Funktion der Faktoren im Rahmen der Wundheilung, eine direkte Beeinflussung der Proteinkonzentration durch IGF-1 ließ sich jedoch nicht nachweisen.

Im Rahmen der durchgeführten histologischen und immunhistochemischen Versuche konnte vor allem am dritten postoperativen Tag ein deutlicher Rückgang der Nekrosenbildung, sowie eine Förderung der Reepithelialisierung und Kollagensynthese nachgewiesen werden, während die PDLLA-Beschichtung an sich zu keiner Beeinträchtigung der Wundheilung führte. Auch in den biomechanischen Testungen

## Zusammenfassung

konnte am dritten postoperativen Tag, eine signifikante Erhöhung des Bursting Pressure in der IGF-1-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden; dies ist von klinischer Bedeutung, da vor allem zu diesem Zeitpunkt die Anastomose durch Umbauprozesse ihre Stabilität verlieren kann.

So konnte gezeigt werden, dass lokal mit dem Nahtmaterial eingebrachtes IGF-1 einen signifikant positiven Einfluss auf die Wundheilung und die Stabilität der Anastomose im Colon transversum der Ratte hatte.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Molenaar CB, Bijnen AB, de Ruitter P. Indications for laparoscopic colorectal surgery. Results from the Medical Centre Alkmaar, The Netherlands. *Surg Endosc.* Januar 1998;12(1):42–5.
2. Wahl P, Hahnloser D, Chanson C, Givel J-C. Laparoscopic and open colorectal surgery in everyday practice: retrospective study. *ANZ J Surg.* Februar 2006;76(1–2):20–7.
3. Harji DP, Griffiths B, Burke D, Sagar PM. Systematic review of emergency laparoscopic colorectal resection. *Br J Surg.* Januar 2014;101(1):e126-133.
4. Kingham TP, Pachter HL. Colonic Anastomotic Leak: Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Journal of the American College of Surgeons.* 1. Februar 2009;208(2):269–78.
5. Alves A, Panis Y, Mathieu P, Manton G, Kwiatkowski F, Slim K. Postoperative mortality and morbidity in French patients undergoing colorectal surgery: results of a prospective multicenter study. *Arch Surg.* März 2005;140(3):278–83, discussion 284.
6. Alves A, Panis Y, Trancart D, Regimbeau J-M, Pocard M, Valleur P. Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World J Surg.* April 2002;26(4):499–502.
7. Chambers WM, Mortensen NJM. Postoperative leakage and abscess formation after colorectal surgery. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* Oktober 2004;18(5):865–80.
8. Sciuto A, Merola G, De Palma GD, Sodo M, Pirozzi F, Bracale UM. Predictive factors for anastomotic leakage after laparoscopic colorectal surgery. *World J Gastroenterol.* 7. Juni 2018;24(21):2247–60.
9. McDermott FD, Heeney A, Kelly ME, Steele RJ, Carlson GL, Winter DC. Systematic review of preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for colorectal anastomotic leaks. *British Journal of Surgery.* 19. Februar 2015;102(5):462–79.
10. Bakker IS, Grossmann I, Henneman D, Havenga K, Wiggers T. Risk factors for anastomotic leakage and leak-related mortality after colonic cancer surgery in a nationwide audit. *British Journal of Surgery.* 17. Februar 2014;101(4):424–32.
11. Neutzling CB, Lustosa SAS, Proenca IM, da Silva EMK, Matos D. Stapled versus handsewn methods for colorectal anastomosis surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 15. Februar 2012;(2):CD003144.
12. Güenaga KF, Matos D, Wille-Jørgensen P. Mechanical bowel preparation for elective colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 7. September 2011;(9):CD001544.

## Literaturverzeichnis

13. Spanjersberg WR, van Sambeek JDP, Bremers A, Rosman C, van Laarhoven CJHM. Systematic review and meta-analysis for laparoscopic versus open colon surgery with or without an ERAS programme. *Surg Endosc.* 2015;29(12):3443–53.
14. van der Pas MH, Haglind E, Cuesta MA, Fürst A, Lacy AM, Hop WC, Bonjer HJ. Laparoscopic versus open surgery for rectal cancer (COLOR II): short-term outcomes of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* März 2013;14(3):210–8.
15. Blumetti J, Abcarian H. Management of low colorectal anastomotic leak: Preserving the anastomosis. *World J Gastrointest Surg.* 27. Dezember 2015;7(12):378–83.
16. Daams F, Luyer M, Lange JF. Colorectal anastomotic leakage: Aspects of prevention, detection and treatment. *World J Gastroenterol.* 21. April 2013;19(15):2293–7.
17. Alves A, Panis Y, Pocard M, Regimbeau JM, Valleur P. Management of anastomotic leakage after nondiverted large bowel resection. *J Am Coll Surg.* Dezember 1999;189(6):554–9.
18. Meyer G, Lang RA, Prodinger PM, Stier C. Grundlagen und Biologie der Anastomosenheilung. *Viszeralchirurgie.* Juni 2007;42(3):134–44.
19. Witte MB, Barbul A. Repair of full-thickness bowel injury. *Crit Care Med.* August 2003;31(8 Suppl):S538-546.
20. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, Van De Water L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med.* 1. November 1992;176(5):1375–9.
21. Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res.* Mai 1990;48(5):504–15.
22. Pommergaard H-C. Experimental evaluation of clinical colon anastomotic leakage. *Dan Med J.* März 2014;61(3):B4821.
23. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. *Am J Surg.* März 1980;139(3):406–13.
24. Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. *Microsurgery.* 2006;26(3):131–6.
25. Braskén P. Healing of experimental colon anastomosis. *Eur J Surg Suppl.* 1991;(566):1–51.
26. Schäfer K, Göller M, Stanka P, Ernst R, Zumtobel V. Revaskularisation von Kolonanastomosen. *Langenbecks Arch Chir.* 1. Mai 1991;376(3):163–71.

## Literaturverzeichnis

27. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* Juli 2003;83(3):835–70.
28. Fukuda H, Motohiro T, Nakai K, Yamamichi K, Nakane Y, Fujisawa J, Hioki K. Negative effect of transforming growth factor-beta-1 on intestinal anastomotic tissue regeneration. *Eur Surg Res.* Dezember 2001;33(5–6):388–94.
29. Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci.* 15. März 1999;4:D303-309.
30. Spencer EM, Skover G, Hunt TK. Somatomedins: do they play a pivotal role in wound healing? *Prog Clin Biol Res.* 1988;266:103–16.
31. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* Juni 1993;165(6):728–37.
32. Dunaiski V, Belford DA. Contribution of circulating IGF-I to wound repair in GH-treated rats. *Growth Horm IGF Res.* Dezember 2002;12(6):381–7.
33. Berneis K, Ninnis R, Girard J, Frey BM, Keller U. Effects of insulin-like growth factor I combined with growth hormone on glucocorticoid-induced whole-body protein catabolism in man. *J Clin Endocrinol Metab.* August 1997;82(8):2528–34.
34. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* Oktober 2011;469(10):2706–15.
35. Steenfoss HH. Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* Juni 1994;28(2):95–105.
36. Kuemmerle JF. Insulin-like Growth Factors in the Gastrointestinal Tract and Liver. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Juni 2012;41(2):409–23.
37. Egger B, Inglin R, Zeeh J, Dirsch O, Huang Y, Büchler MW. Insulin-like growth factor I and truncated keratinocyte growth factor accelerate healing of left-sided colonic anastomoses. *Br J Surg.* Januar 2001;88(1):90–8.
38. Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, Hashizume K. IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J.* März 1999;46 Suppl:S59-62.
39. Rijcken E, Sachs L, Fuchs T, Spiegel H-U, Neumann P-A. Growth factors and gastrointestinal anastomotic healing. *J Surg Res.* März 2014;187(1):202–10.
40. Clemmons DR, Smith-Banks A, Underwood LE. Reversal of diet-induced catabolism by infusion of recombinant insulin-like growth factor-I in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* Juli 1992;75(1):234–8.
41. Laburthe M, Rouyer-Fessard C, Gammeltoft S. Receptors for insulin-like growth factors I and II in rat gastrointestinal epithelium. *Am J Physiol.* März 1988;254(3 Pt 1):G457-462.

## Literaturverzeichnis

42. Zeeh JM, Riley NE, Hoffmann P, Reinshagen M, Goebell H, Gerken G. Expression of insulin-like growth factor binding proteins and collagen in experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Juli 2001;13(7):851–8.
43. Krishnan K, Arnone B, Buchman A. Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing. *Inflamm Bowel Dis*. Januar 2011;17(1):410–22.
44. Mantzoros I, Kanellos I, Angelopoulos S, Koliakos G, Pramateftakis MG, Kanellos D, Zacharakis E, Zaraboukas T, Betsis D. The effect of insulin-like growth factor I on healing of colonic anastomoses in cortisone-treated rats. *Dis Colon Rectum*. September 2006;49(9):1431–8.
45. Lemmey AB, Ballard FJ, Martin AA, Tomas FM, Howarth GS, Read LC. Treatment with IGF-I peptides improves function of the remnant gut following small bowel resection in rats. *Growth Factors*. 1994;10(4):243–52.
46. Christensen H, Flyvbjerg A, Orskov H, Laurberg S. Effect of growth hormone on the inflammatory activity of experimental colitis in rats. *Scand J Gastroenterol*. Juni 1993;28(6):503–11.
47. Howarth GS, Fraser R, Frisby CL, Schirmer MB, Yeoh EK. Effects of insulin-like growth factor-I administration on radiation enteritis in rats. *Scand J Gastroenterol*. November 1997;32(11):1118–24.
48. Erdem E, Dinç S, Erdem D, Ustün H, Caydere M, Alagöl H. Effects of intraperitoneal chemotherapy and GM-CSF on anastomotic healing: an experimental study in rats. *J Surg Res*. November 2002;108(1):1–6.
49. Petersen TI, Kissmeyer-Nielsen P, Flyvbjerg A, Laurberg S, Christensen H. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) administration on the healing of colonic anastomoses in rats. *Int J Colorectal Dis*. 1996;11(1):19–24.
50. Rijcken E, Fuchs T, Sachs L, Kersting CM, Bruewer M, Kriegelstein CF. Insulin-like growth factor 1-coated sutures improve anastomotic healing in an experimental model of colitis. *Br J Surg*. Februar 2010;97(2):258–65.
51. Meyer NA, Barrow RE, Herndon DN. Combined insulin-like growth factor-1 and growth hormone improves weight loss and wound healing in burned rats. *J Trauma*. Dezember 1996;41(6):1008–12.
52. Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, Yang K, Hayes RL, Lichtenbelt BJ, Perez-Polo JR, Herndon DN. IGF-I gene transfer in thermally injured rats. *Gene Ther*. Juni 1999;6(6):1015–20.
53. Jeschke MG, Schubert T, Klein D. Exogenous liposomal IGF-I cDNA gene transfer leads to endogenous cellular and physiological responses in an acute wound. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Mai 2004;286(5):R958-966.
54. Jeschke MG, Schubert T, Krickhahn M, Polykandriotis E, Klein D, Perez-Polo JR, Przkora R, Herndon DN. Interaction of exogenous liposomal insulin-like growth

- factor-I cDNA gene transfer with growth factors on collagen expression in acute wounds. *Wound Repair Regen.* Juni 2005;13(3):269–77.
55. Gillingham MB, Kritsch KR, Murali SG, Lund PK, Ney DM. Resection upregulates the IGF-I system of parenterally fed rats with jejunocolic anastomosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* November 2001;281(5):G1158-1168.
  56. Lemmey AB, Martin AA, Read LC, Tomas FM, Owens PC, Ballard FJ. IGF-I and the truncated analogue des-(1-3)IGF-I enhance growth in rats after gut resection. *Am J Physiol.* Februar 1991;260(2 Pt 1):E213-219.
  57. Inglin RA, Baumann G, Wagner OJ, Candinas D, Egger B. Insulin-like growth factor I improves aspects of mycophenolate mofetil-impaired anastomotic healing in an experimental model. *Br J Surg.* Juni 2008;95(6):793–8.
  58. Sakallioğlu AE, Yagmurlu A, Dindar H, Hasirci N, Renda N, Deveci MS. Sustained local application of low-dose epidermal growth factor on steroid-inhibited colonic wound healing. *J Pediatr Surg.* April 2004;39(4):591–5.
  59. Schwartz MZ, Kato Y, Yu D, Lukish JR. Growth-factor enhancement of compromised gut function following massive small-bowel resection. *Pediatr Surg Int.* 2000;16(3):174–5.
  60. Tomas FM, Knowles SE, Owens PC, Chandler CS, Francis GL, Read LC, Ballard FJ. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *Biochem J.* 15. Februar 1992;282 ( Pt 1):91–7.
  61. Flyvbjerg A, Grønbaek H, Bak M, Nielsen B, Christiansen T, Hill C, Logan A, Orskov H. Diabetic kidney disease: the role of growth factors. *Nephrol Dial Transplant.* Mai 1998;13(5):1104–7.
  62. Møller J, Jørgensen JO, Marqversen J, Frandsen E, Christiansen JS. Insulin-like growth factor I administration induces fluid and sodium retention in healthy adults: possible involvement of renin and atrial natriuretic factor. *Clin Endocrinol (Oxf).* Februar 2000;52(2):181–6.
  63. Sullivan DH, Carter WJ, Warr WR, Williams LH. Side effects resulting from the use of growth hormone and insulin-like growth factor-I as combined therapy to frail elderly patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* Mai 1998;53(3):M183-187.
  64. Frystyk J, Hussain M, Skjaerbaek C, Pørksen N, Froesch ER, Orskov H. The pharmacokinetics of free insulin-like growth factor-I in healthy subjects. *Growth Horm IGF Res.* April 1999;9(2):150–6.
  65. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone.* Juli 1996;19(1 Suppl):1S-12S.
  66. Kulkarni RK, Pani KC, Neuman C, Leonard F. Polylactic acid for surgical implants. *Arch Surg.* November 1966;93(5):839–43.
  67. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M. Local application of growth factors (insulin-like

- growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone*. April 2001;28(4):341–50.
68. Wildemann B, Sander A, Schwabe P, Lucke M, Stöckle U, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)--growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials*. Juni 2005;26(18):4035–40.
69. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(4):449–55.
70. Wildemann B, Bamdad P, Holmer C, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G. Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone*. Mai 2004;34(5):862–8.
71. Kandziora F, Schmidmaier G, Schollmeier G, Bail H, Pflugmacher R, Görke T, Wagner M, Raschke M, Mittlemeier T, Haas NP. IGF-I and TGF-beta1 application by a poly-(D,L-lactide)-coated cage promotes intervertebral bone matrix formation in the sheep cervical spine. *Spine*. 15. August 2002;27(16):1710–23.
72. Ormiston JA, Serruys PW, Regar E, Dudek D, Thuesen L, Webster MWI, Onuma Y, Garcia-Garcia HM, McGreevy R, Veldhof S. A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system for patients with single de-novo coronary artery lesions (ABSORB): a prospective open-label trial. *Lancet*. 15. März 2008;371(9616):899–907.
73. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*. Mai 2006;37 Suppl 2:S105-112.
74. Metsemakers WJ, Reul M, Nijs S. The use of gentamicin-coated nails in complex open tibia fracture and revision cases: A retrospective analysis of a single centre case series and review of the literature. *Injury*. Dezember 2015;46(12):2433–7.
75. Haebler C. Einfluss lokaler Applikation von rekombinantem humanem Insulin-like growth factor-I (rh-IGF-1) auf die Anastomosenwundheilung im Darm: eine biomechanische Studie am Rattenmodell. 2007 [zitiert 6. Oktober 2019]; Verfügbar unter: <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/7576>
76. Quandt S. Einfluss der lokalen Applikation von rekombinantem humanem Insulin-like growth factor-I (rh-IGF-I) auf die Heilung von Darmanastomosen - eine immunhistologische Studie am Rattenmodell -. 2006.
77. Zacharakis E, Demetriades H, Pramateftakis M-G, Lambrou I, Zacharakis E, Zaraboukas T, Koliakos G, Kanellos I, Bestsis D. Effect of IGF-I on healing of colonic anastomoses in rats under 5-FU treatment. *J Surg Res*. Januar 2008;144(1):138–44.
78. Enestvedt CK, Hosack L, Winn SR, Diggs BS, Uchida B, O'Rourke RW, Jobe BA. VEGF gene therapy augments localized angiogenesis and promotes anastomotic

- wound healing: a pilot study in a clinically relevant animal model. *J Gastrointest Surg.* Oktober 2008;12(10):1762–70; discussion 1771-1772.
79. Dinc S, Alagol H, Gulcelik MA, Ozbirecikli B, Kuru B, Renda N, Ustun H. Locally applied granulocyte-macrophage colony-stimulating factor improves the impaired bowel anastomoses in rats with long-term corticosteroid treatment. *World J Surg.* Oktober 2002;26(10):1208–13.
80. Cetinkaya K, Dinc S, Gulcelik MA, Renda N, Ustun H, Caydere M, Alagol H. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor improves impaired anastomotic wound healing in rats treated with intraperitoneal mitomycin-C. *Surg Today.* 2005;35(4):290–4.
81. Fuchs TF, Surke C, Stange R, Quandt S, Wildemann B, Raschke MJ, Schmidmaier G. Local Delivery of Growth Factors Using Coated Suture Material. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 15. Mai 2012 [zitiert 23. Oktober 2018];2012. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3362025/>
82. Buckmire MA, Parquet G, Greenway S, Rolandelli RH. Temporal expression of TGF-beta1, EGF, and PDGF-BB in a model of colonic wound healing. *J Surg Res.* November 1998;80(1):52–7.
83. Mantell MP, Ziegler TR, Adamson WT, Roth JA, Zhang W, Frankel W, Bain A, Chow JC, Smith RJ, Rombeau JL. Resection-induced colonic adaptation is augmented by IGF-I and associated with upregulation of colonic IGF-I mRNA. *Am J Physiol.* Dezember 1995;269(6 Pt 1):G974-980.
84. Zacharakis E, Demetriades H, Kanellos D, Sapidis N, Zacharakis E, Mantzoros I, Kanellos I, Koliakos G, Zaraboukas T, Topouridou K, Betsis D. Contribution of insulin-like growth factor I to the healing of colonic anastomoses in rats. *J Invest Surg.* Februar 2007;20(1):9–14.
85. Gartner MH, Benson JD, Caldwell MD. Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound. *J Surg Res.* April 1992;52(4):389–94.
86. Costa BP, Gonçalves AC, Abrantes AM, Alves R, Matafome P, Seiça R, Sarmiento-Ribeiro AB, Botelho MF, Castro-Sousa F. Tissular growth factors profile after teduglutide administration on an animal model of intestinal anastomosis. *Nutr Hosp.* 16. Januar 2018;35(1):185–93.
87. Dubé PE, Forse CL, Bahrami J, Brubaker PL. The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology.* August 2006;131(2):589–605.
88. Kroll J, Waltenberger J. [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z Kardiol.* März 2000;89(3):206–18.
89. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell.* Februar 1992;3(2):211–20.

## Literaturverzeichnis

90. Ishii M, Tanaka E, Imaizumi T, Sugio Y, Sekka T, Tanaka M, Yasuda M, Fukuyama N, Shinozaki Y, Hyodo K, Tanioka K, Mochizuki R, Kawai T, Mori H, Makuuchi H. Local VEGF administration enhances healing of colonic anastomoses in a rabbit model. *Eur Surg Res.* 2009;42(4):249–57.
91. Adas G, Percem A, Adas M, Kemik O, Arikan S, Ustek D, Cakiris A, Abaci N, Kemik AS, Kamali G, Karahan S, Akcakaya A, Karatepe O. VEGF-A and FGF gene therapy accelerate healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). *Int J Surg.* 2011;9(6):467–71.
92. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB. Induction of Vascular Endothelial Growth Factor by Insulin-like Growth Factor 1 in Colorectal Carcinoma. *J Biol Chem.* 15. November 1996;271(46):29483–8.
93. Bermont L, Lamielle F, Fauconnet S, Esumi H, Weisz A, Adessi GL. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells. *Int J Cancer.* 1. Januar 2000;85(1):117–23.
94. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* September 1987;105(3):1039–45.
95. Finnsen KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* Juni 2013;2(5):195–214.
96. Li AG, Wang D, Feng X-H, Wang X-J. Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J.* 21. April 2004;23(8):1770–81.
97. Migaly J, Lieberman J, Long W, Fisher C, Rolandelli RH. Effect of adenoviral-mediated transfer of transforming growth factor-beta1 on colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum.* Oktober 2004;47(10):1699–705.
98. Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, Blessing M. Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J Invest Dermatol.* Dezember 2001;117(6):1382–90.
99. Bussolino F, Ziche M, Wang JM, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O, Bosia A, Marchisio PC, Mantovani A. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest.* März 1991;87(3):986–95.
100. Breuhahn K, Mann A, Müller G, Wilhelmi A, Schirmacher P, Enk A, Blessing M. Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. *Cell Growth Differ.* Februar 2000;11(2):111–21.
101. Mann A, Niekisch K, Schirmacher P, Blessing M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is essential for normal wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc.* September 2006;11(1):87–92.



## Literaturverzeichnis

102. Egea L, McAllister CS, Lakhdari O, Minev I, Shenouda S, Kagnoff MF. GM-CSF produced by nonhematopoietic cells is required for early epithelial cell proliferation and repair of injured colonic mucosa. *J Immunol.* 15. Februar 2013;190(4):1702–13.
103. Dinc S, Gulcelik MA, Kuru B, Ergeneci D, Camlibel M, Caydere M, Alagol H. Effects of locally applied recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on ischemic bowel anastomoses in rat. *Eur Surg Res.* Februar 2004;36(1):59–63.
104. Fatouros MS, Vekinis G, Bourantas KL, Mylonakis EP, Scopelitou AS, Malamou-Mitsis VD, Kappas AM. Influence of growth factors erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on mechanical strength and healing of colonic anastomoses in rats. *Eur J Surg.* Oktober 1999;165(10):986–92.
105. Alvarenga Junior V, Ferraz ED, Rolim M, Carra AM, Silva PT da, Franco OB, Dias Cordeiro MM, Takya CM, Baetas-da-Cruz W, Ferreira Manso JE, Ferreira ML, Raso Eulalio JM, Silva PC, Pereira de Souza HS, Schanaider A. Rat models of high risk colorectal anastomoses 1. *Acta Cir Bras.* Oktober 2018;33(10):914–23.

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Moritz Kapp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss der lokalen Applikation von rekombinantem humanem Insulin-like Growth Factor-1 (rh-IGF-1) auf die Kolonanastomosenheilung der Ratte - Quantifizierung der Protein- und Genexpression“ / „Effect of local application of recombinant human insulin-like growth factor-1 (rh-IGF-1) on the healing of colon anastomosis – quantification of protein and gene expression“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe. Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

11.12.2019

Moritz Kapp

Lebenslauf

## **Lebenslauf**

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

## Widmung

Ich widme diese Arbeit meinen Kindern.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei dem ehemaligen Direktor des Zentrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin

*Herrn Universitätsprofessor Dr. med. N.P. Haas*

in dessen Klinik ich meine wissenschaftliche Arbeit durchführen durfte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter und Co-Leiterin des Projektes

*Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann.*

Nur durch Ihr unermüdliches Engagement und Ihre Fähigkeit zu motivieren, ist es mir gelungen, diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Ich danke *Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Thomas Fuchs* in Ihren Funktionen als Co-Leiter und Projektkoordinator dafür, den Stein ins Rollen gebracht zu haben sowie für die freundliche Anleitung und persönliche Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei *Herrn Dr. med. Carsten Surke, Frau Dr. med. Steffanie Quandt und Frau Dr. med. Christine Haebler* für die vielen gemeinsamen Stunden bedanken, in denen der Grundstein dieses Projektes gelegt wurde. Ihre Hilfe, Einsatzbereitschaft und Freundschaft bedeuten mir noch immer viel.

Weiterer Dank gilt folgenden Personen:

*Frau Dipl.-Ing. Anke Kadow-Romacker und Herrn Dipl.-Ing. Marc Lübberstedt*

*Frau Dr. Ramona Scheufele*

*Herrn Priv. Doz. Dr. med. C. Grosse Siesstrup*

und allen Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Campus Virchow.

Natürlich gilt mein großer Dank auch meiner Frau, meinen Kindern und meiner Familie für ihre Unterstützung, ihre Motivation und ihr Durchhaltevermögen in dieser langen Zeit.