

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
Klinik für Unfall und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss lokaler Applikation von rekombinantem humanem Insulin-like
growth factor-I (rh-IGF-I) auf die Anastomosenwundheilung im Darm**

- eine biomechanische Studie am Rattenmodell -

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christine Haebler

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Schmidmaier
2. Priv.-Doz. Dr. med. M. Heise
3. Prof. Dr. A. Nüssler

Datum der Promotion: 17.12.2007

Meinen Eltern

1. Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Inhaltsverzeichnis</u>	4
2. <u>Einleitung</u>	7
2.1 Problemstellung	7
2.2 Verschiedene Einflussfaktoren auf die Anastomose	7
2.3 Phasen der Wundheilung	8
2.4 Wachstumsfaktoren	9
2.5 Insulin like Growth Factor	10
2.6 Applikationsformen von IGF-I und Nebenwirkungen	11
2.7 Lokale Applikation von Wirkstoffen	12
2.8 Beschreibung des Projekts und Zielstellung	12
3. <u>Material und Methoden</u>	14
3.1 Versuchstiere	14
3.2 Gruppeneinteilung	14
3.3 Wachstumsfaktor, Trägermaterial und Beschichtung	15
3.3.1 Wachstumsfaktor	15
3.3.2 Trägermaterial	15
3.3.3 Beschichtung	16
3.4 Vorversuche und Vorbereitung	17
3.4.1 Elutionsversuch	17
3.4.2 Spezialfutter vor der Operation	18
3.5 Operation und Untersuchung	19
3.5.1 Inhalationsnarkose	19
3.5.2 Injektionsnarkose	20
3.5.3 Temperatur- und Gewichtsbestimmung	20
3.5.4 Farbmarkierung	21
3.5.5 Blutentnahme	21
3.5.6 Enthaarung	22
3.5.7 Operation	22

3.5.8 Nachsorge	24
3.6 Biomechanische Testung und Vorbereitung	24
3.6.1 Präparation	24
3.6.2 Biomechanische Testung	25
3.6.3 Tötung	27
3.7 Auswertung der Computerdaten	28
3.8 Weitere Methoden	28
3.8.1 Histomorphometrische Auswertung	28
4. <u>Ergebnisse</u>	29
4.1 Vorversuche	29
4.1.1 Elutionsversuch	29
4.1.2 Zugversuch	30
4.2 Allgemeines	30
4.2.1 Temperatur und Gewicht	30
4.2.2 Wundverhältnisse, Anastomose und Perforationsstelle	32
4.3 Biomechanische Testung	32
4.3.1 Anastomosenstabilität in der Kontrollgruppe	33
4.3.2 Anastomosenstabilität in der PDLLA-Gruppe	34
4.3.3 Anastomosenstabilität in der IGF-I Gruppe	35
4.3.4 Vergleich über die Zeit	35
4.4 Histologische Ergebnisse im Überblick	37
5. <u>Diskussion</u>	40
5.1 Ziele und Ergebnisse	40
5.2 Heilung	41
5.3 Stimulation der Heilung	42
5.4 Modelldiskussion	45
5.5 Methodendiskussion	45
5.5.1 Lokale Applikation	48
5.6 Alternativen und klinische Relevanz	50
6. <u>Zusammenfassung</u>	52

7. <u>Literaturverzeichnis</u>	53
8. <u>Abbildungsverzeichnis</u>	61
9. <u>Danksagung</u>	63
10. <u>Lebenslauf</u>	64
11. <u>Erklärung</u>	65

2. Einleitung

2.1 Problemstellung:

Anastomoseninsuffizienzen stellen in der heutigen Zeit noch immer eine gefürchtete Komplikation in der Visceralchirurgie dar. Die Insuffizienzraten liegen je nach Literatur zwischen 3,4% und 12% [Rullier E 1998, Mann B 1996]. Die Werte variieren je nach Lage und Art der Anastomose. Liegt die Anastomose zum Beispiel im Ösophagus oder im distalen Rektum, so sind die Verläufe komplikationsträchtiger als in Colon und Dünndarm [Goligher JC 1970]. Dies ist vor allem auf die anatomischen Gegebenheiten zurückzuführen. Ösophagus und Rektum liegen extraperitoneal und sind somit nicht von einer Serosa geschützt. Die Serosa ist deshalb so wichtig, da diese eine bessere Durchblutung des Gewebes bewirkt.

Darüber hinaus stehen häufig Anastomosen des Ösophagus und im Bereich des distalen Rektum unter größerer Spannung und Dehnung des Gewebes. Beide Faktoren reduzieren die kapilläre Durchblutung im Anastomosenbereich und erhöhen damit die Insuffizienzrate.

Mindestens ein Drittel der Todesfälle nach kolorektaler Operation sind mit einer Anastomoseninsuffizienz verbunden [Schrock TR 1973, Debas HT 1972, Vandertoll DJ 1965].

2.2 Verschiedene Einflussfaktoren auf die Anastomose:

Verschiedene Faktoren können das Risiko einer Anastomoseninsuffizienz fördern. Generell ist das Auftreten einer Insuffizienz multifaktoriell bedingt. Die Angaben in der Literatur hierüber variieren stark, da häufig nur ein Risikofaktor untersucht wird. In einer Arbeit nimmt beispielsweise nur der Faktor Rauchen signifikant Einfluss als Risikofaktor auf eine Anastomoseninsuffizienz unter mehreren Faktoren (Alkohol, Alter, Geschlecht, Gewicht etc.) [Kasperk R 2000], während in anderen Arbeiten Faktoren wie intra- bzw. postoperative Bluttransfusionen [Tadros T 1992, 1993] eine Rolle spielen. Als weitere Risikofaktoren sind Diabetes mellitus [Seyer-Hansen M 1999, Verhofstad MH 1996, Thornton FJ 1997], Hypertonie [Fawcett A 1996], Kortikosteroidtherapie [Furst MB 1994, Del Rio JV 1996, Miller SK 1996], Ischämie [Garcia JG 1998, Kologlu M 2000, Thornton FJ 1997] und Sepsis [Thornton FJ 1997, Ishimura K 1998] zu nennen. Auch Infektionen [Hesp FL 1984, Irvin TT 1976], Dehydratation [Hartmann M 1992], Unterernährung [Koruda MJ 1990, Ward MW 1982], proteinarme Nahrung

[Ward MW 1982] und ein erhöhter intraabdominaler Druck [Kologlu M 1999] nehmen negativen Einfluss auf die Wundheilung an der Anastomose.

Weitere Studien zeigen, dass es auch Faktoren gibt, welche die Anastomose in der Heilungsphase positiv beeinflussen. Zu diesen gehören zum Beispiel eine intraoperative Colonlavage [Aguilar-Nascimento JE 1995, 1997, Erbil Y 2000], intraoperative Darmspülung [Duraker N 1998], postoperativ parenterale Ernährung [Law NW 1990], Gabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren [Egger B 1998, 2001] und Vitaminen [Winsey K 1987] und eine moderate Nahtspannung [Waninger J 1992]. Ebenso kann die Anlage eines protektiven Anus praeter die Anastomose in der Heilungsphase durch Entlastung schützen.

2.3 Phasen der Wundheilung:

Die Anastomosenheilung kann entsprechend der Wundheilung in drei Phasen eingeteilt werden: eine entzündliche bzw. exsudative Phase, eine proliferative Phase und schliesslich eine Phase der Differenzierung [Sedlarik KM 1997].

Die erste Phase (entzündliche Phase) dient vor allem dem schnellen Wundverschluss. Es setzen sofort Blutung und Gerinnung ein, Fibrin wird ausgefällt und die Thrombozyten aggregieren. Eine Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, Serotonin, Leukotriene, Prostaglandine, Bradikinin, TNF (tumor necrosis factor) und IL-1 (Interleukin) bewirkt eine Steigerung der Permeabilität, Exsudation und Emigration von Zellen. Eingewanderte Granulozyten zerfallen, und so werden hydrolytische Enzyme freigesetzt, welche den Abbau untergegangenen Gewebes bewirken. Phagozyten werden chemotaktisch angelockt und räumen untergegangenes Gewebe ab.

Die proliferative Phase ist geprägt durch Proliferation von Kapillarsprossen und Gefäßen. Die Durchblutung verbessert sich, gleichzeitig wird ein Granulationsgewebe gebildet. Die Kollagensynthese beginnt, wobei die Kollagenvorstufen von Fibroblasten und Myofibroblasten exprimiert werden. Fibrillen entstehen extrazellulär durch Vernetzung der Kollagenvorstufen mit Mukopolysacchariden, welche zu Kollagenfasern umgewandelt werden.

Je höher initial die Durchblutung ist, desto höher ist später der Kollagenfasergehalt und somit die Wundfestigkeit.

In der Differenzierungsphase nimmt der Zellgehalt ab. Der Kollagenfasergehalt nimmt zu und deren Ausreifung findet statt. Vor allem Kollagen Typ I ist mit 68% vorherrschend, gefolgt von Kollagen Typ III (20%) und Kollagen Typ V (12%) [Graham MF 1988]. Der Wassergehalt im

Gewebe nimmt ab, und es kommt zur Kontraktion der Wunde, wodurch sie belastungsfähiger wird.

In allen genannten Phasen der Wundheilung sind Wachstumsfaktoren von großer Bedeutung.

2.4 Wachstumsfaktoren:

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, welche lokal der Zellregulation dienen. Sie werden im Körper in spezifischen Geweben in kleinen Mengen synthetisiert und meist als hochmolekulare Vorstufen freigesetzt. Erst durch proteolytische Spaltung werden sie in ihre aktive Form überführt. Zur Veranschaulichung ihrer Wirkungsweise dient Abbildung 1.

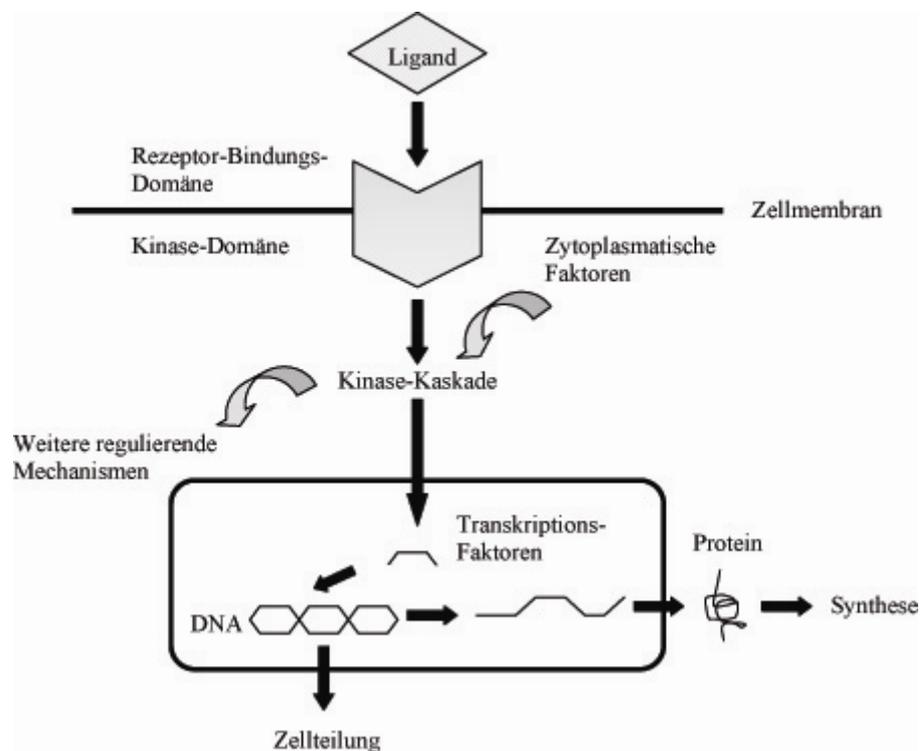


Abb. 1: Wachstumsfaktor und zelluläre Mechanismen; modifiziert nach Trippel et al.

Der Wachstumsfaktor (Ligand) bindet an den extrazellulären Teil der Rezeptor-Bindungs-Domäne und aktiviert damit die intrazelluläre Domäne. Verschiedene Vorgänge werden in der Zelle in Gang gesetzt. Über die enzymatische Kinaseaktivität werden Kinase-Domäne-Phosphatgruppen auf Proteine übertragen. Die Kinase-Kaskade wird über den aktivierten

Rezeptor und andere regulierende Faktoren in Gang gesetzt. Es handelt sich hierbei um mehrere Phosphorylierungsschritte. Im Nukleolus der Zelle endet diese Kaskade mit Bindung von Transkriptionsfaktoren; es handelt sich bei diesen Faktoren um Proteine, welche die Fähigkeit besitzen an spezifische Regulationssequenzen der DNA zu binden. Die Transkriptionsfaktoren aktivieren dann die Gentranskription in messenger RNA (mRNA). Diese mRNA wird in Proteine translatiert, welche wiederum verschiedene Funktionen in der Zelle oder aber nach Ausschleusung im Gewebe erfüllen [Trippel S 1996].

Als Beispiele für Wachstumsfaktoren seien hier IGF-I (Insulin like Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) genannt. In dieser Arbeit wird speziell auf IGF-I eingegangen.

2.5 Insulin like Growth Factor:

IGF-I ist ein polypeptider Wachstumsfaktor, welcher strukturell mit Insulin verwandt ist. Er wird in der Leber sowie auch in anderen Zelltypen z.B. in Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen synthetisiert und besitzt einen trophischen Effekt auf das Zellwachstum und den Metabolismus der Zelle.

In tierexperimentellen Studien wurde die Wirkung von IGF-I untersucht. Nach systemischer Gabe von IGF-I zeigte sich eine Verbesserung der Wundheilung der Haut bei diabetischen Ratten [Bitar MS 1997].

Die IGF-I Rezeptoren konnten im Gastrointestinaltrakt verschiedener Spezies nachgewiesen werden [Guo Y-S 1992]. Bei induzierter Colitis bei Ratten waren die Rezeptorbindungsstellen für IGF-I vermehrt zu finden [Zeeh JM 1995]. Teilweise konnte eine Kolitis durch IGF-I Gabe positiv beeinflusst werden; die Entzündung wurde nicht beseitigt, jedoch die epithelialen Bedingungen verbessert [Howarth GS 1998]. Es konnte außerdem ein starkes intestinales Wachstum bei mit Dexamethason behandelten Ratten festgestellt werden [Read LC 1992]. Hierbei handelte es sich nicht um ein Längenwachstum, sondern um eine Zunahme von Protein und DNA-Gehalt der Mukosa- und Muskularisschicht.

In einigen Studien zur Anastomosenwundheilung wurde IGF-I ebenfalls systemisch (iv. oder parenteral) verabreicht, um die Effekte auf den Darm bzw. die Anastomose zu untersuchen. Es zeigte sich eine schnellere Schleimhautadaption nach jejunioilealer Resektion. [Vanderhoof JA

1992]. Die schnellere Schleimhautadaptation wurde nachgewiesen über Bestimmung der Zottenhöhe, der Kryptentiefe und über biochemische Messungen des DNA- und Proteingehaltes. Die Zottenhöhe war signifikant größer im duodenojejunalen Segment, und die Kryptentiefe war vergrößert im Ileum. Über die DNA- und Proteinbestimmung wurde eine Hyperplasie im duodenojejunalen Segment gezeigt. Petersen et al. konnten einen signifikant höheren Kollagengehalt im Bereich der Anastomose nachweisen [Petersen TI 1996]. B. Egger et al. testeten die intraluminale Druckbelastbarkeit der Anastomose nach intraperitonealer IGF-I Gabe [Egger B 2001]. Es zeigte sich eine signifikant höhere „Bursting Pressure“ im Vergleich zur Kontrollgruppe am postoperativen Tag 2, 4 und Tag 6. Bei dem „Bursting Pressure“ handelt es sich um den maximalen Druckwert, dem das Darmgewebe bei intraluminaler Belastung standhalten kann. In der gleichen Arbeit zeigte die histologische Auswertung weniger Entzündungszeichen, mehr Gehalt an Mucinsäure, eine höhere Proliferationsrate der Kryptenzellen und eine Verdickung der mukosalen Schicht.

2.6 Applikationsformen von IGF-I und Nebenwirkungen:

In bisher durchgeführten Studien wurde IGF-I primär systemisch verabreicht. Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass für IGF-I spezifische Nebenwirkungen bei systemischer Applikation existieren. Bei systemischer IGF-I-Gabe konnten Elektrolytverschiebungen und veränderte Serumkonzentrationen von Insulin und Wachstumshormonen gezeigt werden [Guevara-Aquirre J 1969, Vasconez O 1994, Wilton P 1992]. Außerdem wurden Hypoglykämie, Hypokaliämie, Konvulsionen, Pseudotumor Cerebri, Papillenödem, Facialisparese, Parotisschwellung, Tachykardie, vorübergehend veränderte Leber-Funktionstests, Bildung von Anti-IGF-I-Antikörpern, Haarausfall und vermehrt Infektionen des oberen Respirationstraktes beobachtet [Guevara-Aquirre J 1969, Vasconez O 1994, Wilton P 1992].

Wachstumsfaktoren haben eine relativ kurze biologische Halbwertszeit im Minutenbereich [Linkhart TA 1996], so werden größere systemische Mengen benötigt, um an den gewünschten Wirkort in ausreichender Konzentration zu gelangen. Zusätzlich wurde eine Beeinflussung der Nierenfunktion durch IGF-I nachgewiesen und bei experimentell erzeugtem Diabetes eine erhöhte Konzentration festgestellt [Flyvbjerg A 1990, 1999].

Die genannten Nebenwirkungen könnten durch eine lokale und kontrollierte Applikationsform verringert und die lokale Wirksamkeit erhöht werden. Ein weiterer Vorteil wäre die Kosteneinsparung, da weniger des kostenaufwendigen Wachstumsfaktors für eine lokale

Applikation benötigt würde. Mit weniger Wachstumsfaktor könnten höhere Konzentrationen am Zielort erlangt werden, ohne den Organismus in der kritischen Wundheilungsphase nach der Operation mit hohen systemischen Konzentrationen zu belasten.

2.7 Lokale Applikation von Wirkstoffen:

Lokale Applikationssysteme, welche das zusätzliche Einbringen von Wirkstoffträgern erfordern können Entzündungen, Infektionen oder Fremdkörperreaktionen hervorrufen und scheinen deshalb für die klinische Anwendung unpraktikabel. Es wurden beispielsweise Kollagenschwämme [Welch RD 1998, Sakallioğlu AE 2004] und Katheter [Schwartz MZ 2000] untersucht.

Deshalb ist es denkbar die gewünschten Substanzen lokal über das Nahtmaterial zu applizieren. Es wurde eine Beschichtung von Biomaterialien entwickelt [Schmidmaier G 2001]. Hierbei dient eine biodegradierbare Poly(D,L-laktid) (PDLLA) Beschichtung als Wirkstoffträger. Sie besteht aus einem Milchsäurepolymer, wird hydrolytisch zu Laktat abgebaut und vollständig vom Organismus metabolisiert. In die dünne, lackartige Poly(D,L-laktid)-Beschichtung ist es durch ein kaltes Beschichtungsverfahren möglich IGF-I unter sterilen Bedingungen in seiner biologisch aktiven Form zu inkorporieren.

In einem Frakturmodell an der Ratte wurde IGF-I lokal aus der PDLLA-Beschichtung von intramedullären Kraftträgern freigesetzt und zeigte eine signifikante Verbesserung der Frakturheilung gemessen an der torsionalen Stabilität und der histologischen Kalluszusammensetzung [Schmidmaier G 2001]. In einer anderen Studie konnte durch eine lokale Applikation von Wachstumsfaktoren über mit PDLLA-beschichteten Cages eine signifikante Verbesserung der intervertebralen Fusionsergebnisse im Vergleich zu autologem Knochenmaterial gezeigt werden [Kandziora F 2002, 2003]. Darüber hinaus erwiesen sich PDLLA-Carrier im Vergleich zu Kollagen-Carrier als deutlich Überlegen [Kandziora F 2003]. Mit PDLLA und antithrombogenen Wirksubstanzen beschichtete Coronar-Stents reduzierten die Thrombogenität und Re-Stenoserate in experimentellen und humanen Studien [Schmidmaier G 1997].

2.8 Beschreibung des Projekts und Zielstellung:

Für diese Studie wurde ein Beschichtungsverfahren für Nahtmaterial entwickelt, um die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren (IGF-I) für Darmanastomosen zu ermöglichen.

Als Vorversuche wurden ein Zugversuch und ein Elutionsversuch durchgeführt, um die Stabilität der Beschichtung und die Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors aus den beschichteten Fäden zu überprüfen. Der Zugversuch zeigte keine signifikanten Unterschiede in der mechanischen Belastbarkeit der Fäden (Poly(D,L-laktid)-beschichtet vs. unbeschichtet). Der Elutionsversuch spiegelt die Freisetzungskinetik von IGF-I wider. Nach einem initialen Peak wurde der Wachstumsfaktor kontinuierlich freigesetzt.

Es wurden an 6 Monate alten weiblichen Sprague Dawley Ratten im Colon Transversum nahe der linken Flexur Anastomosen angefertigt, ohne einen Darmabschnitt zu resezieren.

Nach 24 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen wurden biomechanische Versuche, histologische und proteinanalytische Auswertung durchgeführt bezüglich der Anastomosenheilung und -stabilität. Im biomechanischen Teil wurde die mechanische Belastbarkeit über einen intraluminalen Druckaufbau und -messung bis zum Nachgeben des Gewebes bestimmt. In der histologischen Auswertung wurden über Erstellung von Scores verschiedene Parameter beurteilt wie Gefäßdicke, Fibroblastenzahl und Endothelzellzahl. Die Proteinanalyse bediente sich der Elisa-methode und der PCR, um vorhandene Veränderungen in der Proteinkonzentration und mRNA-Synthese zu bestimmen. Verglichen wurden drei Gruppen: Anastomosen, die mit unbeschichteten, nur mit Poly(D,L-Laktid)-beschichteten oder mit Poly(D,L-Laktid) und IGF-I-beschichteten Fäden genäht wurden.

Ziel dieser Studie ist es, die Wirkung von IGF-I auf die Heilung von Anastomosen zu untersuchen.

Hypothese:

Die lokale und kontrollierte Freisetzung von IGF-I aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Nahtmaterial verbessert die Heilung von Darm.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere:

Bei den Tieren in diesem Versuch handelt es sich um 6 Monate alte, weibliche Sprague Dawley Ratten (Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland). Sie wurden in Vierergruppen in jeweils einem Käfig Typ 3 gehalten, bei freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter (V-Alleinfutter für Ratten-/ Mäusehaltung, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soes, Deutschland). Das Gewicht der Ratten betrug zwischen 250 und 300 g.

Die Labortiere hatten vor Versuchsbeginn eine Standzeit von 2 Wochen, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen.

Das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigte dieses Projekt unter der Nummer G 0045/01.

3.2 Gruppeneinteilung:

Verglichen wurden Gruppen die mit unbeschichteten, mit Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) beschichteten oder mit PDLLA und Wachstumsfaktor (IGF-1) beschichteten Fäden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24h, 3d, 7d) behandelt wurden:

Gruppe I: unbeschichtet

Gruppe II: PDLLA

Gruppe III: Wachstumsfaktor + PDLLA

n=18

Pro Gruppe und Zeitpunkt wurden 18 Tiere operiert.

Für die biomechanische Untersuchung wurden 10 Tiere pro Gruppe untersucht. Für die histologische Auswertung wurden 8 Tiere pro Gruppe verwendet. Die Därme der Versuchstiere der biomechanischen Testung wurden nach dem Versuch für die proteomanalytische Auswertung konserviert. Die Histologie und Proteinanalyse sind nicht Teil dieser Promotionsarbeit. Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip nummeriert und randomisiert den verschiedenen Gruppen zugeteilt.

3.3 Wachstumsfaktor, Trägermaterial und Beschichtung:

Durch eine Beschichtung von Fäden (PDS II 6/0 Ethicon®) mit Wachstumsfaktoren, dienen die Fäden sowohl zur Naht (End-zu-End-Anastomose im Colon Transversum), als auch zur lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren.

3.3.1 Wachstumsfaktor:

In dieser Studie wurde der Insulin-like Growth Factor verwendet.

- Rekombinanter humaner Insulin-like Growth Factor I (rh-IGF-I) in 2,5% der Gesamtbeschichtungsmasse (PDLLA-IGF-I-Gemisch); (R&D Systems Wiesbaden, Deutschland)

Spezifikation:

Ursprung: In E.-Coli exprimiert, IGF-I kodierende DNA Sequenz (Humbel, R.E. 1984, Jin Li Ch (ed.) Hormonal proteins and peptides, vol. 12, Academic, NY. p. 57)

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: <0,1 ng pro µg des Cytokins bestimmt durch LAL

Kreuzreaktivität zur Ratte: 96%

[R&D Systems, recombinant human IGF-I Catalognumber 291-G1-050; Specification and use].

3.3.2 Trägermaterial:

Material

- Fäden (PDS II 6/0 Ethicon®)
- Poly(D,L-Laktid) (PDLLA), MW 30kD; (Boehringer Ingelheim, Mannheim, Deutschland)

Weiteres Material zur Beschichtung:

- Lösungsmittel: Ethylacetat (UN 1173); (Merck, Deutschland)
- Sterilfilter, Porengröße 0,2 μm , (Sartorius, Deutschland)

3.3.3 Beschichtung:

Der Wachstumsfaktor wurde durch ein „kaltes Beschichtungsverfahren“ in eine biodegradierbare Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung eingearbeitet. Bei diesem Verfahren ist es möglich, den Wachstumsfaktor in seiner biologisch aktiven Form in das PDLLA einzubetten.

Zur Herstellung der Beschichtung wurde zunächst 100 mg Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) in 1,5 ml Lösungsmittel gelöst. Um nun steril weiterarbeiten zu können, wurde die Lösung durch einen Sterilfilter in ein steriles Behältnis gefüllt. 1 mg IGF-I wurde in 0,6 ml des gelösten PDLLA`'s gegeben. Bei einer Beschichtungsmenge von 20 μl / Faden reichte die Beschichtung für 30 Fäden bei einer WF Konzentration von 2,5 % in der Gesamtbeschichtungsmasse. Es wurde eine sterile 0,4mm Kanüle über einen 6/0 PDS Faden gezogen. 10 μl des PDLLA-Wachstumsfaktor-Gemisches wurden mit einer sterilen Pipette in den Trichter der Kanüle am Faden gefüllt, welcher durch eine langsame Auf- und Abbewegung benetzt wurde. Nach Trocknen des Fadens wurde dieser Vorgang wiederholt. Der Faden wurde über jeweils 30 cm beschichtet, wobei die Endstücke abgetrennt, und der Faden im Anschluss steril verpackt wurde.

In den Abbildungen 2 bis 5 ist über Rasterelektronenmikroskopaufnahmen die PDLLA – Beschichtung im Vergleich zu unbeschichteten Fäden zu sehen.

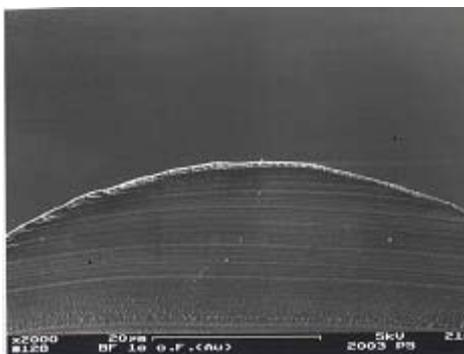


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskop. Aufnahme in 2000 facher Vergrößerung eines unbeschichteten Fadens.

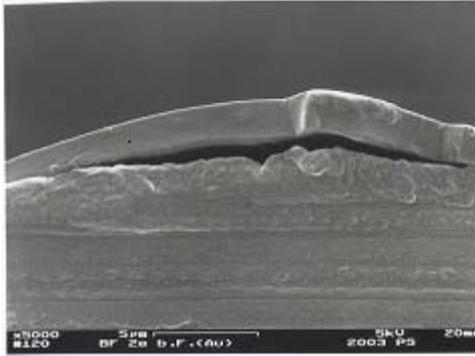


Abb. 3: Rasterelektronenmikroskop. Aufnahme in 5000 facher Vergrößerung, zu sehen ist ein mit PDLLA beschichteter Faden.

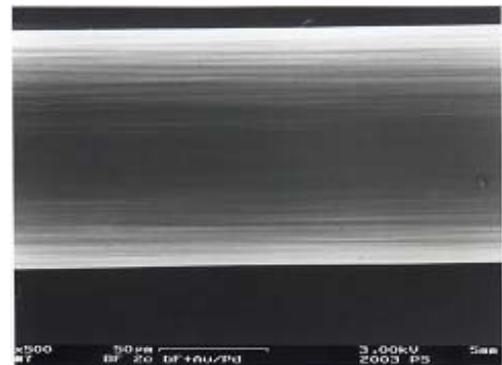
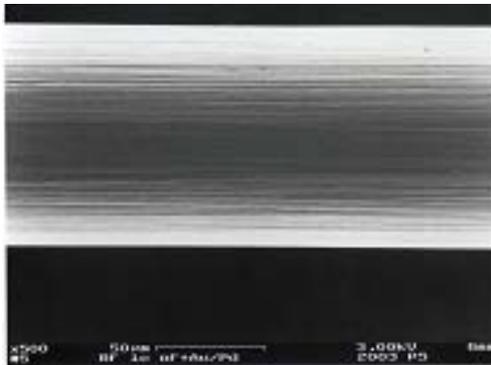


Abb. 4 und 5: REM- Aufnahmen in 500facher Vergrößerung. Links ist ein unbeschichteter Faden und rechts ein mit PDLLA-beschichteter Faden zu sehen.

3.4 Vorversuche und Vorbereitung:

3.4.1 Elutionsversuch:

Im Vorfeld fand ein Elutionsversuch statt. Hier wurde die Freisetzungskinetik überprüft, um zu untersuchen, wie viel Wachstumsfaktor pro Zeiteinheit an das umliegende Gewebe abgegeben wird. Statt des Wachstumsfaktors wurde im Elutionsversuch Aprotinin verwendet, welches vergleichbare molekulare Eigenschaften besitzt.

Material:

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

Methoden:

Von den Fäden wurden insgesamt fünfzehn 2 cm lange Stücke abgeschnitten und in ein Well gelegt. In das Well wurden 2,7ml 1x Phosphatpuffer-Lösung gegeben, und die Platte wurde mit Parafilm umspannt, um die Verdunstung zu minimieren und auf den Schüttler gestellt. Dieser befand sich unter der Inkubationshaube, die eine konstante Umgebungstemperatur von 37°C ermöglichte. Während der gesamten Versuchszeit lief der Schüttler auf der niedrigsten Stufe. Zu den Zeitpunkten 6h, 12h, 1 Tag, 3 Tage, 7 Tage, 14 Tage wurden jeweils 210µl abgenommen und für den sich nach Versuchsende anschließenden Coomassie-Test bei -80°C eingefroren.

3.4.2 Spezialfutter vor der Operation:

Die Ratten bekamen ab dem dritten Tag vor der Operation eine Spezialdiät (Co 193 Hochverdauliche Diät– mit Fett, Chargennummer 598, Altromin GmbH, Lage, Deutschland). Um diese zur leichteren Fütterung in einen festen Zustand zu bringen, wurden 0,6 g Agarose (Ultra Pure 15510-027, GIBCO BRL, Life Technologies, Paisly, Schottland) in 100 ml Wasser gelöst, zum Kochen gebracht und nach Abkühlung auf 40° mit 30g Sondermischung verrührt. Zu

dieser Nahrung hatten die Tiere freien Zugang bis 24h vor der OP. Ab diesem Zeitpunkt setzte eine Nahrungskarenz ein. Postoperativ hatten die Tiere sofort wieder ihr normales Trockenfutter (V-Alleinfutter für Ratten-/ Mäusehaltung, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) verfügbar. Die oben aufgeführte Spezialdiät begünstigte die Operationsbedingungen durch einen weichen, sehr gut resorbierbaren Stuhl und gewährleistete trotzdem eine gehaltvolle Ernährung der Tiere.

3.5 Operation und Untersuchung:

Operation und Untersuchungen erfolgten unter standardisierten Bedingungen. Die Operation wurde immer vom gleichen Operateur durchgeführt und die Ratten in einer zufälligen Reihenfolge verwendet.

3.5.1 Inhalationsnarkose:

Material:

- Narkosegerät Artec Typ Vet (Firma: Stephan GmbH, Medizintechnik Gadenbach, Deutschland)
- Narkosebox (durchsichtiger Plastikbehälter mit Deckel, 2 l), Schlauchsystem und Inhalationsmaske Wirkstoff: Isofluran (Forene®)[WS:1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether]; (Firma: Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland)

Methode:

Die Ratte wurde in eine speziell angefertigte, transparente Narkosebox gesetzt. Durch einen Zugang wurde ein Gemisch aus Stickstoffmonoxyd (1,5 l/min.), Sauerstoff (0,7 l/min.) und Isofluran (5 Vol.%) eingeleitet und die Ratte sediert. Der zweite Zugang an der Box diente der Ableitung des Narkosegemisches.

3.5.2 Injektionsnarkose:

Material:

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

Methode:

Nachdem die Ratte der Narkosebox entnommen wurde (nach ca. 3 min), bekam sie bis zur Injektion der Narkose weiterhin das Inhalationsgemisch über eine Maske zugeführt. Die Injektionsnarkose bestand aus einem Gemisch aus Ketavet (80mg /kg Körpergewicht) ca. 1,2ml und Rompun (12mg /kg Körpergewicht) ca. 0,9 ml. Dieses wurde der Ratte intraperitoneal injiziert und narkotisierte und anästhesierte das Tier bis zu einer Stunde.

3.5.3 Temperatur- und Gewichtsbestimmung:

Material:

- Digitales Thermometer (Paul Hartmann AG; Steinheim, Deutschland)
- Waage: Kilomat- Präzisionswaage Typ 2106 (Firma: Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Gleitmittel: Lidocainhydrochlorid, Xylocain® Gel 2% (Firma: Astra GmbH, Wedel, Deutschland)

Methode:

Die Temperaturmessung wurde noch während der Gabe des Injektionsanästhetikums durchgeführt. Dazu wurde ein mit Gleitcreme benetztes Digitalthermometer rektal eingeführt. Im Anschluss wurde jedes Tier gewogen und die Werte dokumentiert.

3.5.4 Farbmarkierung:

Material:

- Edding® Farbstifte: schwarz, blau, rot, grün.

Methode:

Zur späteren Identifizierung der einzelnen Tiere wurde eine farbige Strichcodierung der Schwänze durchgeführt.

3.5.5 Blutentnahme:

Material:

- Haematokrit-Glaskapillaren 75mm / 60µl; (Hirschmann Laborgeräte, Deutschland)
- Wirkstoff: Heparinnatrium, Liquemin® N25 000 (Firma: Roche, Grenzach– Wyhlen, Deutschland)
- Kunststoffcaps (Firma: Eppendorf– Gerätebau Heidelberg, Deutschland)
- Panthenol-Augensalbe, [WS: Dexpanthenol]; (Jenapharm, Biberach/ Riss, Deutschland)
- Mullkompressen 10 x 10 cm
- Zentrifuge-Einstellungen: 10.000 Umdrehungen, 10 min; (mini spin plus, 5417 R, Eppendorf)
- Einmalpipetten

Methode:

Eine Glaskapillare wurde mit Heparin benetzt, um dann mit dieser den retrobulbär gelegenen Venenplexus des rechten Auges der narkotisierten Ratte zu punktieren. Es wurden ca. 1,5 ml Blut in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und anschliessend zentrifugiert.

Das Serum wurde abpipettiert tiefgefroren. Die Bestimmung verschiedener Blut- und Entzündungsparameter ist nicht Teil dieser Arbeit.

Nach der Blutabnahme wurde sofort das Auge der Ratte mit einer Kompresse komprimiert, und danach beide Augen mit einer Panthenol®-Schutzcreme für die Operation vorbereitet, um ein Austrocknen zu verhindern.

3.5.6 Enthaarung:

Material:

- Elektrolanghaarschneider (Aesculap, Typ GT104)
- Enthaarungscreme Pilca® [Thioglykolsäure]; (Schwarzkopf & Henkel, Düsseldorf, Deutschland)

Methode:

Mit einem Elektrolanghaarschneider wurde das Abdomen des Tieres vorerst grossflächig von Haaren befreit und verbliebene Haare mit Enthaarungscreme entfernt, um ein Infektionsrisiko zu minimieren. Nach Entfernung der Creme wurde das Operationsfeld gereinigt und mit Ethanol desinfiziert.

3.5.7 Operation:

Material:

- Sterile Einmalhandschuhe
- Mundschutz
- Softasept® N [Ethanol 100%]; (B.Braun, Melsungen AG; Melsungen, Deutschland)
- Sterile Kompressen
- Steriles OP-Tuch
- Steriles Lochtuch
- Sterile Abdecktücher
- Sprühpflaster
- Braunes Pflaster: Leukoplast®; (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland)
- Natriumchlorid-Lösung 0,9%; (Delta- Pharma GmbH; Pfullingen, Deutschland)

- 2 ml Einmalspritzen

Steriles OP- Besteck bestehend aus:

- Einmalskalpell No: 15
- Hautfäden: Prolene® 4-0, nichtresorbierbares Nahtmaterial (Ethicon GmbH & Co.KG; Norderstedt, Deutschland)
- Faden (Monocryl, PDS II 6/0 Ethicon®) unbeschichtet, PDLLA- beschichtet oder PDLLA/ Wachstumsfaktoren- beschichtet
- Präparationsschere, Fadenschere
- Nadelhalter
- Pinzette, anatomisch und chirurgisch
- Kanülen zur Aufspannung der Faszien, Klemmchen

Geräte:

- Narkosegerät
- Operationsmikroskop

Methode:

Das Operationsfeld wurde desinfiziert und mit Tüchern abgedeckt. Nach Aufstellung des Mikroskops wurde ein steriler Bereich mittels Tüchern geschaffen, und die Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Es wurde eine mediane Laparatomie vorgenommen, wobei der Schnitt von ca. 1 cm unterhalb des Sternums bis 1 cm oberhalb des Os pubis geführt wurde. Nach Aufsuchen des Colon transversums, wurde es in Nähe der linken Flexur durchtrennt, gereinigt und die Enden desinfiziert. Nun wurde eine End-zu-End-Anastomose durch eine fortlaufende, spannungsfreie Naht mit 9 Einstichen hergestellt. Diese wurde anschliessend auf Durchgängigkeit und Suffizienz überprüft.

Während der Operation wurde der Bauchraum immer wieder mit isotoner Kochsalzlösung feucht gehalten. Die Darmschlingen wurden nun reponiert und sowohl die Muskel- als auch die Bauchwand mit jeweils einem 4-0 Prolene Faden genäht und dann desinfiziert.

3.5.8 Nachsorge:

Nach der Operation wurden die Ratten in einer Aufwachbox beobachtet. Nach dem Aufwachen wurden sie in einen frischen Käfig mit Zugang zu Futter und Wasser gesetzt. Täglich wurden die Tiere kontrolliert und die Wundverhältnisse und ihr Befinden überprüft und dokumentiert.

3.6 Biomechanische Testung und Vorbereitung:

Die Inhalationsnarkose, Injektionsnarkose, Temperatur- und Gewichtsbestimmung, Blutentnahme erfolgten wie unter 3.5.1- 3.5.5 beschrieben.

3.6.1 Präparation:

Material:

Steriles OP- Besteck bestehend aus:

- Einmalskalpell No: 15
- Präparationsschere, Fadenschere
- Pinzette, anatomisch und chirurgisch

Methode:

Bei dem narkotisierten Tier wurde nun die Haut- und Muskelnahrt wieder aufgetrennt und das Colon transversum aufgesucht und dargestellt. Während dieses Vorgangs wurden die Wundverhältnisse und der Zustand der Anastomose beurteilt und dokumentiert. 2 cm proximal der Anastomose wurde das Colon durchtrennt, und das distale Ende der Schnittstelle von Kot befreit. 1,5 cm distal der Anastomose wurde das Lumen des Colons mit einem Faden fest verschlossen.

3.6.2 Biomechanische Testung:

Material:

- Notebook (Powernote, Austria)
- Software (Catman)
- Meßverstärker (Mammendorfer Institut für Physik und Medizin, Hattenhofen, Deutschland)
- Spider 8 (Hottinger Baldwin Messtechnik GMBH, Deutschland)
- Pumpe (Masterflex, Cole- Parmer Instrument Company, Barnacht Co., Barrington, Illinois)
- Druckmesssonde (Mammendorfer Institut für Physik und Medizin, Mammendorf, Deutschland)
- Fäden

Methode:

Ein Pumpmessschlauch wurde in den Darmabschnitt vor der Anastomose eingeführt bis kurz vor die Anastomose und mit Hilfe von Fäden proximal abgedichtet (ca. 1 cm vor der Anastomose). Bei diesem Druckmessschlauch handelt es sich um einen speziell angefertigten Silikonschlauch, in den eingebettet der Pumpschlauch und die Druckmesssonde liegen. Dieser ermöglichte ein vollständiges Abdichten proximal der Anastomose, so dass keine Flüssigkeit entweichen konnte. Der typische Messbereich der Druckmesssonde liegt zwischen -100 bis +300 mmHg, der maximale Messbereich zwischen -500 und +2000 mmHg. Gemessen wurde mit einer Sensitivität von $5 \mu\text{V}/\text{V}/\text{mmHg} \pm 2\%$, als Referenzdruck diente der Umgebungsdruck. Eine konstante Menge von 60 g Wasser pro Minute lief durch die Pumpe in den Darmabschnitt. Das Signal der Druckmesssonde wurde über den Messverstärker zum Spider 8 Gerät geleitet, wo es umgewandelt und für das Notebook mit der Software Catman lesbar gemacht wurde. Über das Programm Catman entstand eine Kurve, wobei der Druck auf der y-Achse und die Zeit auf der x-Achse dargestellt waren. In dem Moment, in dem der Darm dem Druck nicht mehr standhalten konnte, war ein starker Druckabfall zu verzeichnen, und die Messung wurde beendet. Die Lokalisation der Darmperforation wurde dokumentiert.

In den Abbildungen 6 bis 9 ist der Versuchsaufbau dargestellt.

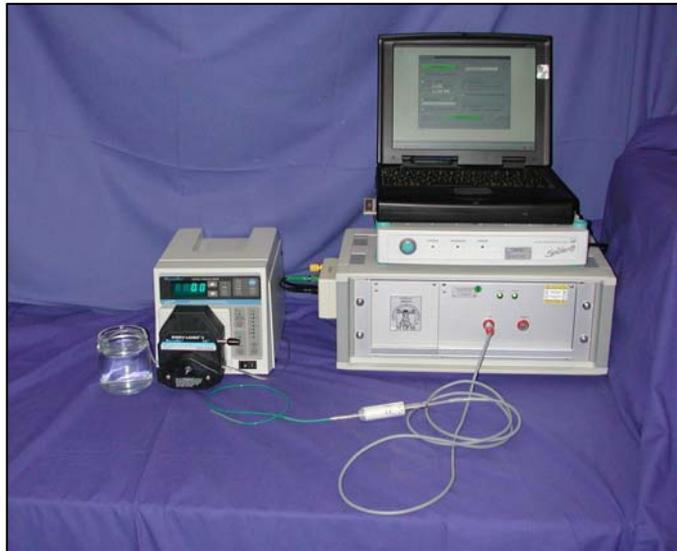


Abb.6: Versuchsaufbau Geräte



Abb.7: Versuchstier kurz vor der biomechanischen Testung. Zu sehen ist der proximal eingeführte Pump-Druckmeßschlauch.

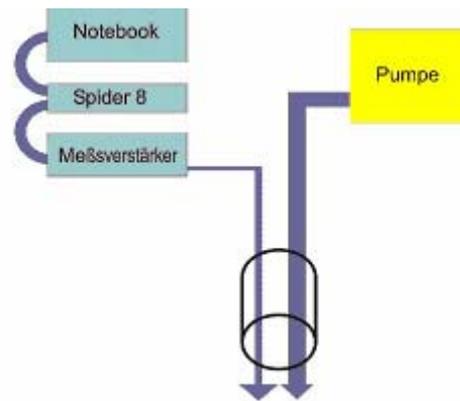


Abb.8: Versuchsaufbau schematisch

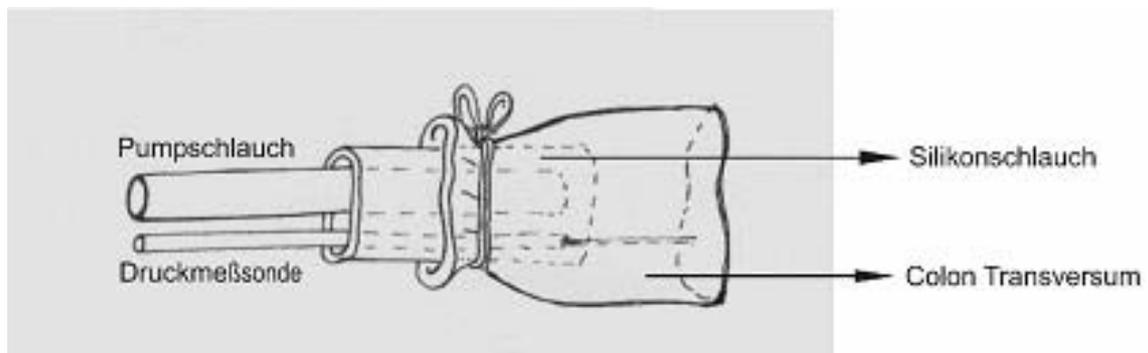


Abb.9: Skizze des Pump-Druckmeßschlauches im Colon Transversum

3.6.3 Tötung:

Material:

- Einmalspritzen 5 ml
- Sterile Kanülen: 0,4mm x 20mm (Firma: B | Braun, Melsungen, Deutschland)
- Kaliumchlorid 14,9 %; (B | Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Plastikkassetten Tissue Tek, Mega Casette;
- (Sakura Finetek, Torrance, USA)
- Stickstoff
- Präparationsbesteck

Methode:

Zur Tötung wurde der Ratte sofort nach der Testung 1,5 ml Kalium 14,9% intrakardial appliziert. Die intrakardiale Lage wurde durch Aspiration überprüft. Die Herzaktion sistierte nach wenigen Sekunden.

Die Anastomose wurde 1cm proximal und 1 cm distal herauspräpariert, gereinigt und in beschrifteten Plastikkassetten in Stickstoff eingefroren. Nach Beendigung der Arbeit wurden die Plastikkassetten später bei $- 80^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Diese Darmstücke standen nun der Proteinanalyse zur Verfügung.

3.7 Auswertung der Computerdaten:

Die statistische Auswertung erfolgte Software gestützt (SPSS) durch eine multiple Varianzanalyse: ANOVA mit anschließendem Bonferronitest mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

3.8 Weitere Methoden:

(nicht Teil dieser Promotionsarbeit)

3.8.1 Histomorphometrische Auswertung:

In verschiedenen Färbungen wurden Parameter wie Fibroblastenzahl, Gefäßneubildung, Endothelzellen über Scores im Anastomosenbereich ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche:

4.1.1 Elutionsversuch:

Im Elutionsversuch zeigte sich eine kontinuierliche Freisetzung von IGF-I nach einem initialen Peak. Die Freisetzungskinetik wird in Abbildung 10 verdeutlicht.

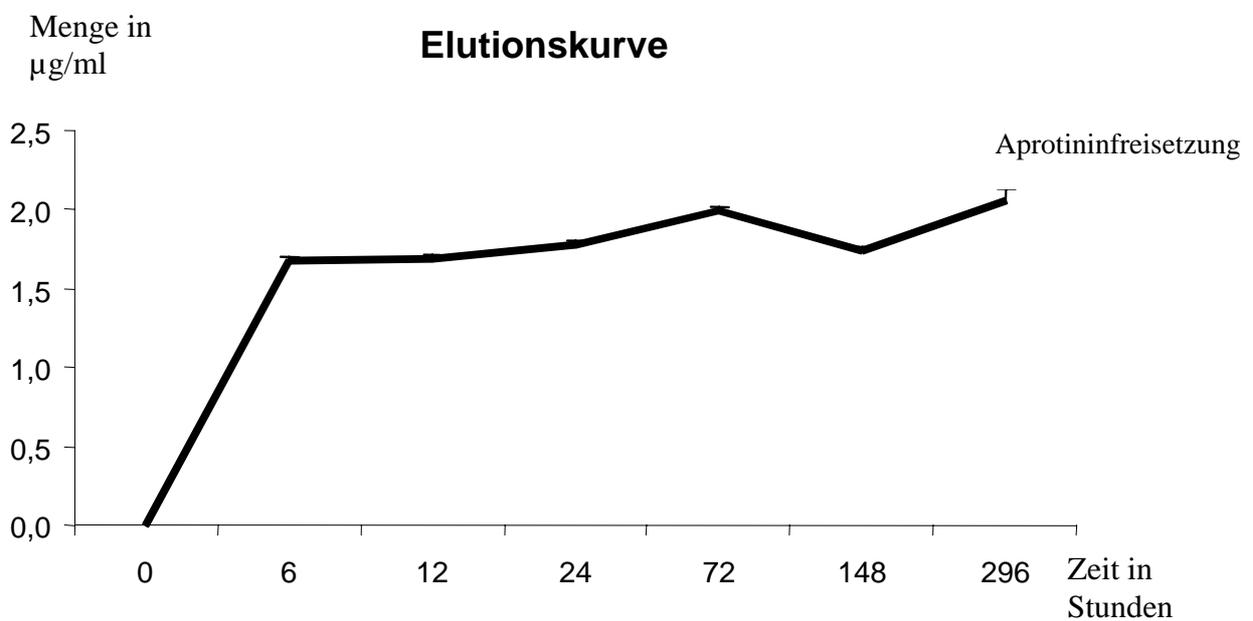


Abb. 10: Elutionskurve

Auf der x-Achse wird die Zeit in Stunden und auf der y-Achse die Freisetzung in $\mu\text{g/ml}$ dargestellt. Nach einem initialen Peak nach ca. 6 Stunden verläuft die Freisetzung weitestgehend gleichmässig.

4.1.2 Zugversuch:

Der Zugversuch zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede in der mechanischen Belastbarkeit zwischen den unbeschichteten und den mit PDLLA- beschichteten Fäden vorlagen. Die folgende Abbildung spiegelt diesen Vergleich mittels eines Balkendiagramms wider.

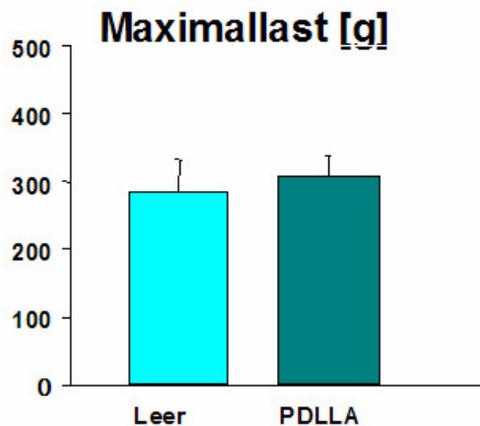


Abb. 11: Balkendiagramm Zugversuch

Links ist die Maximallast der unbeschichteten Fäden und rechts die der PDLLA- beschichteten Fäden aufgetragen. Es handelt sich dabei jeweils um einen Mittelwert (n=5 Fäden pro Gruppe).

4.2 Allgemeines:

Die Operation wurde von den Tieren im Allgemeinen gut toleriert. Kurze Zeit nach der Narkose bewegten sich die Ratten wieder in vollem Umfang. Sie stellten sich auf, fraßen und tranken.

Im Verlauf der Studie verstarben 10 Tiere auf Grund von Narkosezwischenfällen.

Die Versuchstiere wurden in den entsprechenden Gruppen ersetzt.

4.2.1 Temperatur und Gewicht (Versuchstiere der Biomechanik)

Es wurden die Temperatur und das Gewicht präoperativ und vor der Tötung bestimmt. Die Temperatur lag bei den Tieren im Durchschnitt bei 37 °C vor der Operation und vor der Tötung. Das Gewicht der Tiere lag präoperativ bei 254,5g und war vor der Tötung 247,8g. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind den Tabellen 1-3 zu entnehmen.

Zeitpunkt 24 h:

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen von Gewicht und Temperatur zum Zeitpunkt der OP und nach 24 h

Beschichtung	unbeschichtet		PDLLA		IGF-I	
	präop	Tötung	präop	Tötung	präop	Tötung
24h						
Gewicht in g	255,3 ±	253,8 ±	246,7 ±	249,9 ±	253,8 ±	259,4±
	16,0	16,3	8,6	8,9	10,6	11,1
Temperatur in °C	36,7 ± 0,5	37,3 ± 0,4	37,1 ± 0,6	37,0 ± 0,9	37,2 ± 0,5	37,1 ± 0,6

Zeitpunkt 3d:

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen von Gewicht und Temperatur zum Zeitpunkt der OP und nach 3d

Beschichtung	unbeschichtet		PDLLA		IGF-I	
	präop	Tötung	präop	Tötung	präop	Tötung
3d						
Gewicht in g	255,2 ±	243,1 ±	248,9 ±	237,0 ±	257,5 ±	251,8 ±
	18,0	13,7	13,9	15,8	11,4	12,0
Temperatur in °C	37,0 ± 1,0	36,9 ± 0,5	37,1 ± 0,6	36,9 ± 0,6	37,0 ± 0,5	36,8 ± 0,8

Zeitpunkt 7d:

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen von Gewicht und Temperatur zum Zeitpunkt der OP und nach 7d

Beschichtung	unbeschichtet		PDLLA		IGF-I	
	präop	Tötung	präop	Tötung	präop	Tötung
7d						
Gewicht in g	254,4 ±	237,5 ±	260,0 ±	248,6 ±	257,8 ±	250,0 ±
	14,2	13,2	12,7	14,2	12,1	12,0
Temperatur in °C	36,9 ± 0,5	37,2 ± 0,7	36,8 ± 0,8	37,1 ± 0,6	37,3 ± 0,5	37,1 ± 0,5

4.2.2 Wundverhältnisse, Anastomose und Perforationsstelle

Die Wundverhältnisse und der Darm wurden makroskopisch beurteilt. Es waren kaum Auffälligkeiten zu vermerken. Es gab keine Wundinfektionen, jedoch vereinzelt Veränderungen wie Verklebungen der einzelnen Darmabschnitte untereinander oder Hämatombildung im Nahtbereich an der Abdomenoberfläche. Die Durchgängigkeit der Anastomosen konnte nicht einheitlich überprüft werden, da die Gefahr der Perforation des Darms vor der biomechanischen Testung durch teils harte Kotballen bestand.

Es wurde bei jedem Tier dokumentiert, ob der Darm an der Anastomose, proximal oder distal dazu perforierte. Es gab keinen Zusammenhang zwischen Perforationsstelle und Behandlung des Tiers. In jeder Gruppe gab es sowohl Perforationsstellen an der Anastomose, als auch im nahen, angrenzenden Darmbereich. Nach 24 Stunden und nach 3 Tagen war das Verhältnis ausgewogen. Nur in den Gruppen nach 7 Tagen war eine Tendenz erkennen. Hier waren weniger Perforationsstellen direkt an der Anastomose zu verzeichnen.

4.3 Biomechanische Testung:

Zur Untersuchung der Anastomosenstabilität wurden Druckmessungen durchgeführt. Hierbei wurde im definierten Darmabschnitt ein Druck bis zum Versagen des Gewebes (Bursting Pressure) aufgebaut. Unter dem Begriff „Bursting Pressure“ versteht man den maximalen Druck, dem der Darm standhalten kann. Ab diesem Wert fällt die Druckkurve rapide ab und geht gegen 0.

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 12 eine Testkurve exemplarisch dargestellt

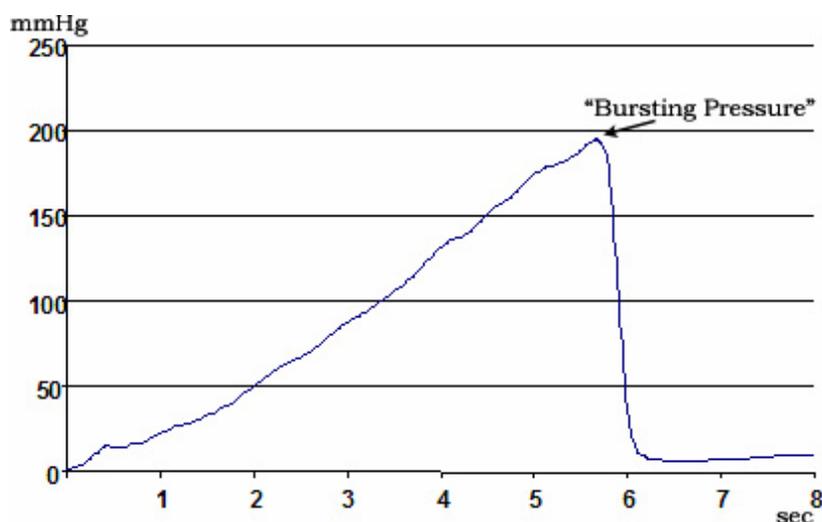


Abb. 12: Druckkurve

Auf der y-Achse ist der Druck in mmHg und auf der x-Achse die Zeit in Sekunden aufgetragen. Der maximale Druck beträgt bei diesem Versuch ca. 195 mmHg.

Es handelt sich um ein Versuchstier, welches mit einem unbeschichteten Faden operiert wurde und eine Standzeit von 24 Stunden hatte.

Es wurde eine Beispieltestung für unbehandelten Darm durchgeführt. Der maximale Druckwert lag ohne Anastomose bei 270 mmHg.

4.3.1 Anastomosenstabilität in der Kontrollgruppe:

Bei der Kontrollgruppe wurde die Anastomose mit einem unbeschichteten Faden genäht. Zur Darstellung der unbeeinflussten Anastomosenwundheilung, soll vorerst der Verlauf anhand der verschiedenen Zeitpunkte gezeigt werden. Verglichen werden die jeweiligen Mittelwerte der „Bursting Pressure“. Nach 24 Stunden liegt der Mittelwert bei 213,9 mmHg. Nach 3 Tagen ist ein Absinken dieses Wertes auf 164,5 mmHg zu verzeichnen. Am Tag 7 liegt er wieder bei 189,1 mmHg.

Um dies zu veranschaulichen ist in Abbildung 13 der Verlauf in einem Balkendiagramm dargestellt.

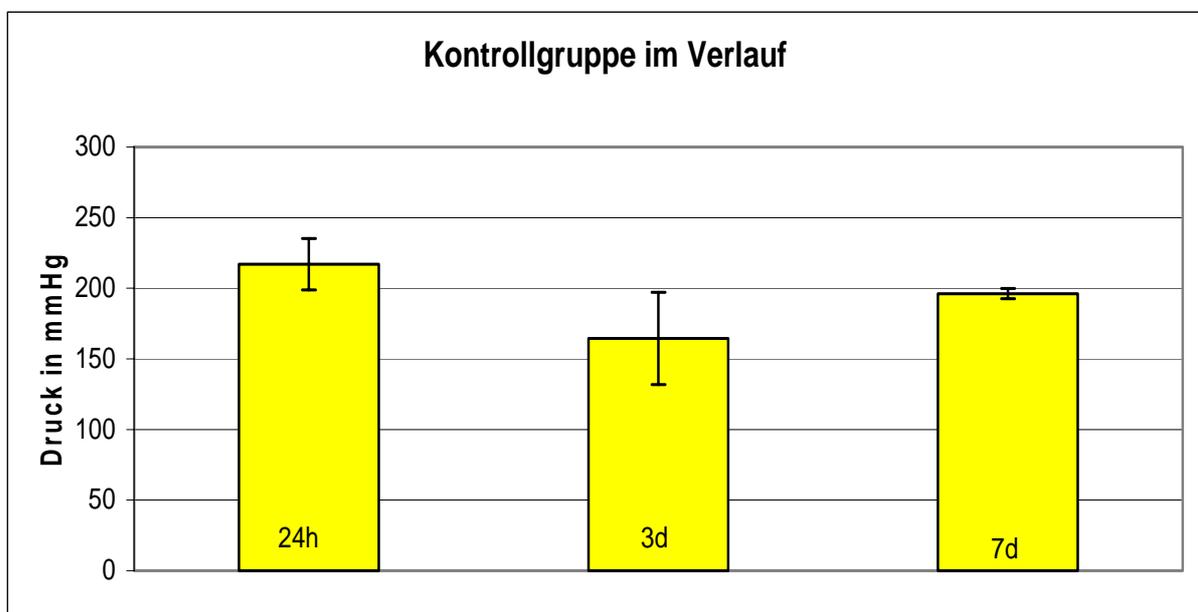


Abb. 13: Balkendiagramm „Kontrollgruppe im Zeitverlauf“

Auf der y-Achse ist die „Bursting Pressure“ in mmHg und auf der x-Achse sind die 3 verschiedenen Zeitpunkte (24h (links), 3d (Mitte), 7d (rechts)) aufgetragen. Zu erkennen ist der starke Abfall der „Bursting Pressure“ an Tag 3.

4.3.2 Anastomosenstabilität in der PDLLA- Gruppe:

Die Anastomosen in der PDLLA Gruppe wurden mit einem mit PDLLA beschichteten Faden angefertigt. In dieser Gruppe liegt der Mittelwert nach 24 Stunden bei 229,16 mmHg, nach 3 Tagen bei 150,70 mmHg und nach 7 Tagen bei 215,41 mmHg. Es ist ein starkes Absinken der Druckwerte am dritten postoperativen Tag zu verzeichnen.

In Abbildung 14 wird dies in einem Balkendiagramm veranschaulicht.

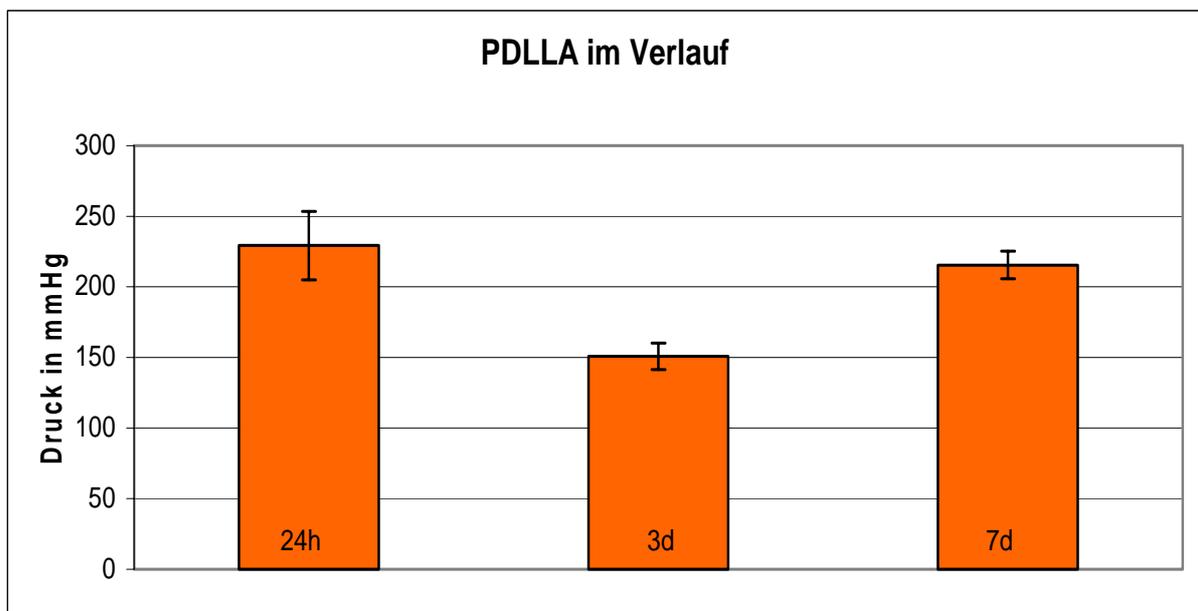


Abb. 14: Balkendiagramm „PDLLA- Gruppe im Zeitverlauf“

Auf der y-Achse ist der Druck in mmHg, und auf der x-Achse sind die drei Zeitpunkte 24h (links), 3d (Mitte) und 7d (rechts) zu sehen.

4.3.3 Anastomosenstabilität in der IGF-I Gruppe:

Der Zeitvergleich in der IGF-I- Gruppe zeigte annähernd gleich hohe Werte an den drei Zeitpunkten. Nach 24 Stunden lag der mittlere Druckwert bei 210,04 mmHg, nach 3 Tagen bei 218,91 und nach 7 Tagen bei 226,14 mmHg. Es ist insgesamt eine ansteigende Tendenz über die Zeit zu erkennen. Ein Abfall der Werte an Tag drei bleibt aus.

In Abbildung 15 ist der Vergleich als Balkendiagramm veranschaulicht.

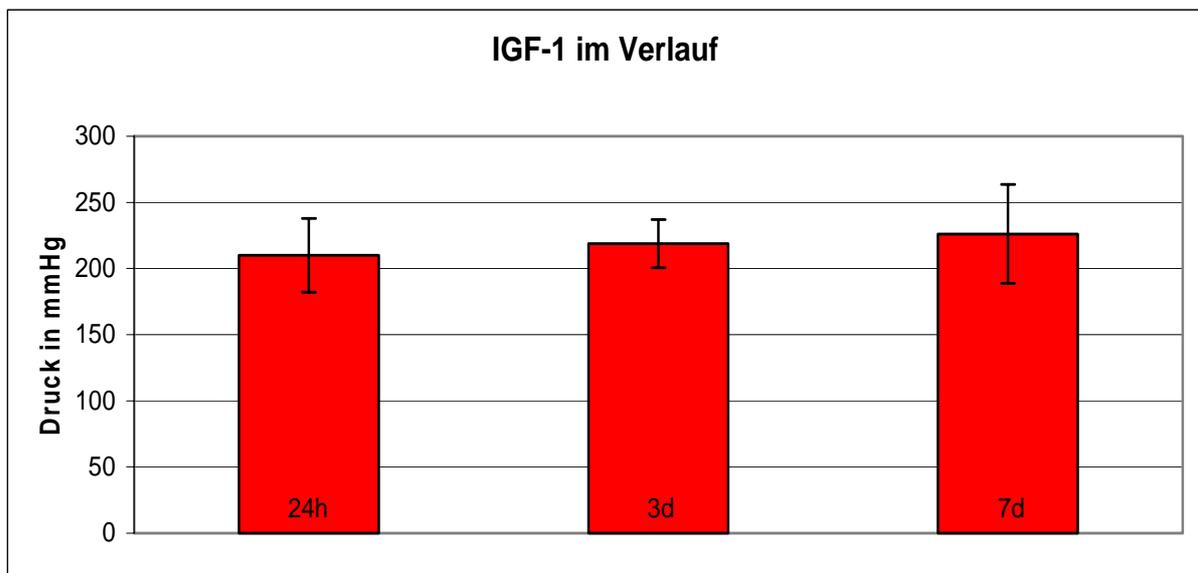


Abb. 15: Balkendiagramm „IGF-I- Gruppe im Zeitverlauf“

Auf der y-Achse ist der Druck in mmHg zu sehen. Auf der x-Achse ist die IGF-I-Gruppe an den verschiedenen Zeitpunkten 24 Stunden (links), 3 Tage (Mitte) und 7 Tage (rechts) dargestellt.

4.3.4 Vergleich über die Zeit:

Stellt man die Ergebnisse der biomechanischen Testung der drei Versuchsgruppen an den drei Versuchstagen einander gegenüber, so wird deutlich, dass sich Änderungen über die Zeit

zwischen den Gruppen ergaben. In der unbeeinflussten Anastomosenwundheilung (Kontrollgruppe) war ein Abfall der „Bursting Pressure“ am dritten Tag zu verzeichnen.

Nach 24 Stunden und nach 7 Tagen liegen die Werte im gleichen Bereich bei allen Gruppen. Nur am dritten Tag gibt es starke Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Gruppe mit PDLLA & IGF-I beschichteten Fäden zeigt einen deutlich höheren Druckwert als die Kontroll- und PDLLA-Gruppe. Dieser höhere Wert liegt im Bereich der Werte nach 24h und 7d. Zum Überblick sind in Balkendiagramm in Abbildung 17 nochmal alle Gruppen nebeneinander dargestellt. Im Vergleich dazu lag der gemessene maximale Beispieldruckwert von unbehandeltem Darm bei 270 mmHg.

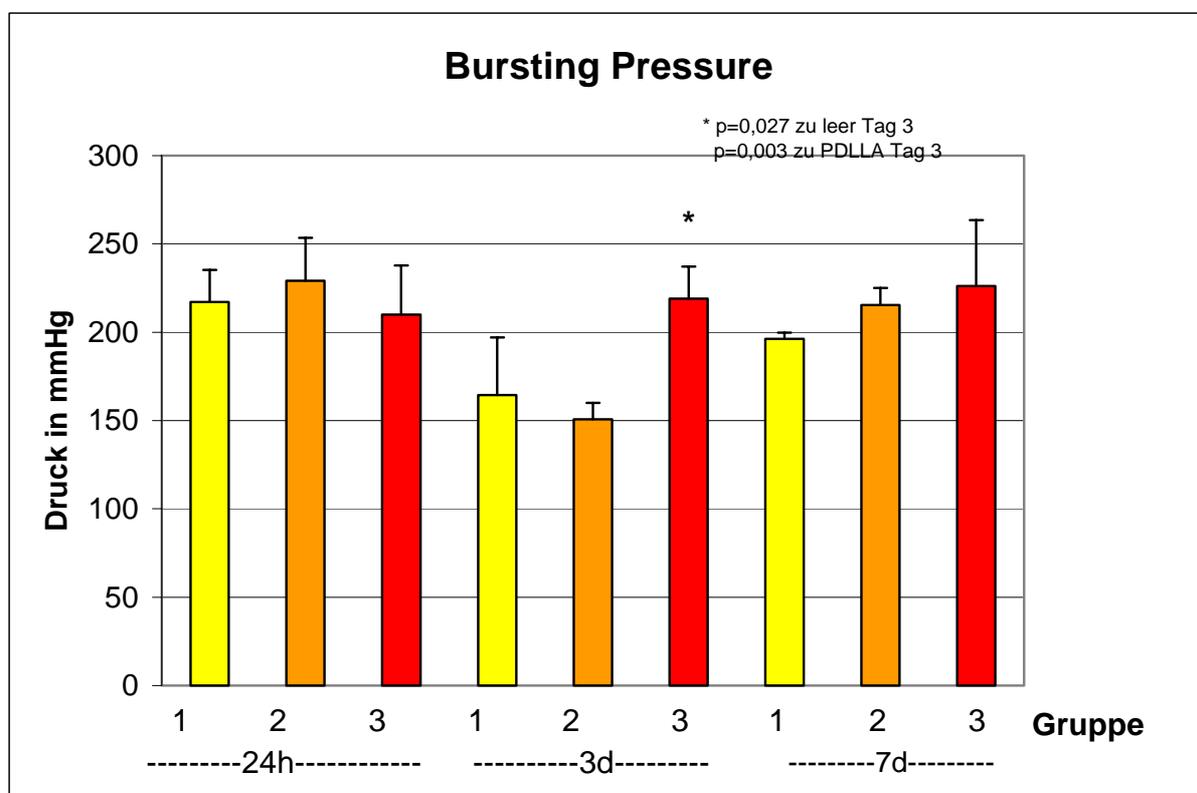


Abb. 16: Balkendiagramm „Bursting Pressure“

Auf der y-Achse ist der Druck in mmHg und auf der x-Achse die Gruppen an den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Gruppe 1 ist jeweils die Kontrollgruppe, 2 die mit PDLLA-beschichteten und in Gruppe 3 die mit PDLLA & IGF-I-beschichteten Fäden.

Der Unterschied der IGF-I- Gruppe zur PDLLA und zur Kontrollgruppe an Tag drei erwies sich als statistisch signifikant.

4.4 Histologische Ergebnisse im Überblick

(nicht Teil dieser Promotionsarbeit)

In der histologischen Auswertung waren Hinweise zu finden auf eine geringere Granulozyteninfiltration der Anastomosenregion in der IGF-I- Gruppe. Die Nekrosenbildung war geringer und es traten vermehrt Fibroblasten im unmittelbaren Fadenbereich auf. Die bindegewebige Überbrückung schien insgesamt stärker zu sein in der IGF-I- Gruppe. Die Ergebnisse sind als Tendenzen zu verstehen; die Differenzierung und Proliferation von Entzündungs-, Epithelzellen und Fibroblasten wurde beeinflusst und lieferte Hinweise auf eine positive Beeinflussung der Phasen der Wundheilung durch IGF-I. Anhand der folgenden Grafiken soll dies verdeutlicht werden. Die Kontrollgruppe entspricht der Leergruppe in den Abbildungen.

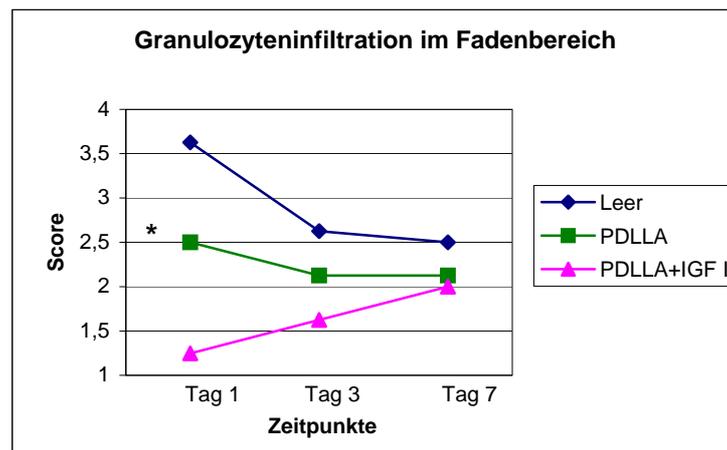


Abb. 17: Granulozyteninfiltration im Fadenbereich

An allen drei Zeitpunkten war die Granulozyteninfiltration geringer im unmittelbaren Fadenbereich der Anastomose in der IGF-I- Gruppe. Nach 24h erwies sich der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der IGF-I- Gruppe als statistisch signifikant.

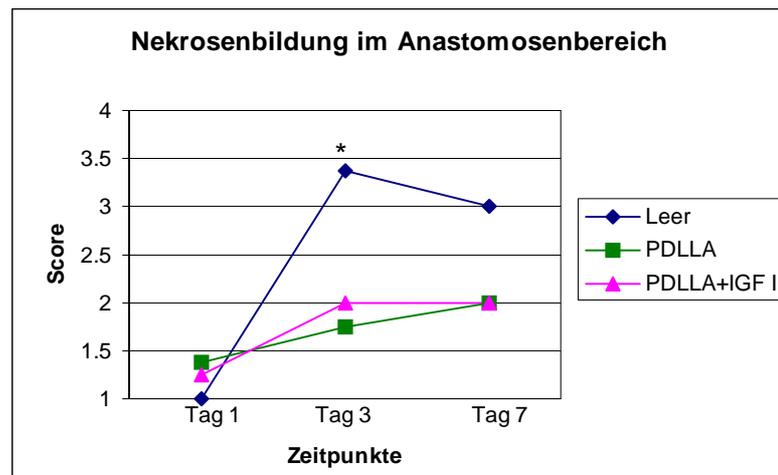


Abb. 18: Nekrosenbildung im Anastomosenbereich

Am dritten Tag waren in der Kontrollgruppe signifikant mehr Nekrosen zu verzeichnen sowohl zur IGF-I- Gruppe als auch zur PDLLA- Gruppe.

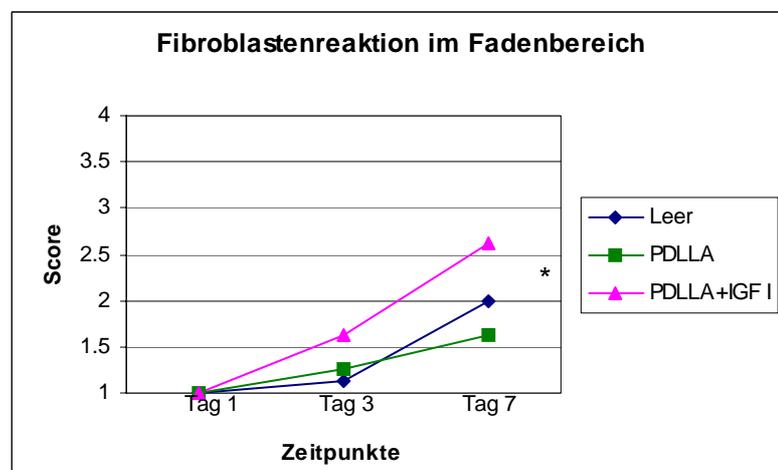


Abb. 19: Fibroblastenreaktion im Fadenbereich

Die Fibroblastenreaktion war in der IGF-I- Gruppe am 7ten Tag signifikant höher zur PDLLA- Gruppe. Nach 24 Stunden waren die Scorewerte in allen 3 Gruppen gleich, an Tag drei zeigte sich bereits die Entwicklung vermehrter Fibroblastenbildung in der IGF-I- Gruppe.

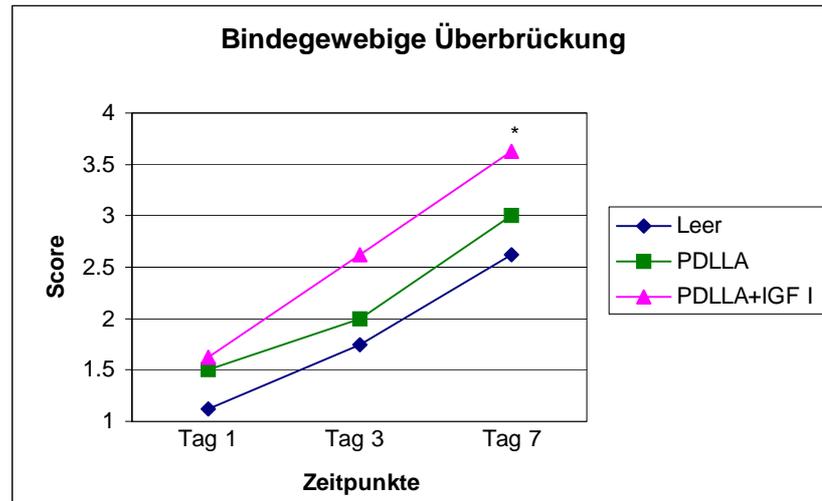


Abb. 20: Bindegewebige Überbrückung

Am Tag 7 postoperativ zeigte sich in der IGF-I- Gruppe eine signifikant grössere bindegewebige Überbrückung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Tendenziell war diese Entwicklung auch an den anderen beiden Zeitpunkten zu sehen.

5 Diskussion:

5.1 Ziele und Ergebnisse

Anastomoseninsuffizienzen stellen eine gefürchtete Komplikation in der Visceralchirurgie dar und beeinträchtigen den postoperativen Verlauf beträchtlich.

In der Einleitung wurden bereits die Insuffizienzraten und verschiedene Faktoren, welche das Risiko für eine Insuffizienz positiv oder negativ beeinflussen können aufgeführt.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von lokal appliziertem Wachstumsfaktor IGF-I auf die Darmanastomosenheilung anhand biomechanischer Belastungstests in einem Rattenmodell zu untersuchen. Hierzu wurde unter standardisierten Bedingungen Colon mit unbeschichteten (Kontrollgruppe), PDLLA- und PDLLA+IGF-I- beschichteten Fäden anastomosiert. Die biomechanische Belastbarkeit der Anastomosen wurde an Tag 1, 3 und 7 nach der Operation durch load to failure Tests geprüft. Hierfür wurden intraluminale Druckbelastungen durchgeführt.

Am dritten postoperativen Tag zeigte sich in der Kontrollgruppe im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten eine geringere Belastbarkeit der Anastomosenregion. Diese Reduktion des „Bursting pressure“ an Tag 3 war auch in der PDLLA-Gruppe deutlich.

Die Polymerbeschichtung auf Basis von PDLLA erbrachte selbst zu keinem der gewählten Zeitpunkte signifikante Veränderungen des „Bursting Pressure“. Die lokale Applikation von IGF-I aus der Fadenbeschichtung hingegen führte am Tag 3 post OP zu einer signifikanten Steigerung des „Bursting pressure“ im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis spricht für eine fortgeschrittenere Heilung der Anastomose, die auf den lokal wirkenden Insulin like growth factor – I zurück zu führen ist.

Gleichzeitig finden sich in dieser Gruppe in den histologischen Untersuchungen (nicht Teil dieser Promotionsarbeit) geringere Granulozyteninfiltration, weniger Nekrosenbildung, Zunahme der Fibroblasten und eine stärkere bindegewebige Überbrückung im Bereich der Anastomose [Quandte S 2006]. Diese Ergebnisse könnten die höhere biomechanische Belastbarkeit der Anastomosen in der Wachstumsfaktorengruppe erklären.

Am 7. postoperativen Tag fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Ursächlich hierfür könnte die weitestgehende abgeschlossene Darmheilung bei der Ratte zu diesem Zeitpunkt sein.

5.2 Heilung

Die Wundheilung lässt sich in eine entzündliche bzw. exsudative Phase, eine proliferative Phase und schließlich eine Phase der Differenzierung [Sedlarik KM 1997] einteilen. Diese Phasen sind ausführlicher in der Einleitung erläutert.

Cronin et al. untersuchten in einer Studie am Rattenmodell „Bursting Strength“ und den Kollagengehalt der Anastomose nach 3, 5, 7, 10 und 14 Tagen [Cronin K 1968]. Der Druck bis zum Nachgeben des Gewebes wurde intraluminal mit O₂ erzeugt, und ein starker Abfall der „Bursting Strength“ und des Kollagengehaltes der Anastomose an Tag 3 gemessen. Zu diesem Zeitpunkt finden viele Umbauvorgänge statt. Kollagen wird abgebaut und neues wird synthetisiert, und genau am dritten postoperativen Tag erreicht der Kollagengehalt im Gewebe um die Anastomose sein Minimum, was mit einer Minderung der Stabilität im Gewebe einhergeht.

Die Beurteilung der physiologischen Anastomosenheilung in der vorliegenden Studie zeigt einen vergleichbaren Verlauf. Auch hier war der Zeitraum um den dritten postoperativen Tag besonders kritisch und es zeigten sich niedrige Druckwerte in den Belastungstests in der Kontrollgruppe.

Diesem kritischen Zeitpunkt der Anastomosensuffizienz 3 Tage nach der Operation könnte durch die gezielte Stimulation der Heilung entgegengewirkt werden. Verschiedene systemische Faktoren sind bekannt, die die Heilungsprozesse beeinflussen.

Dazu gehören beispielsweise Wachstumsfaktoren, sie haben Einfluss auf alle beschriebenen Phasen der Wundheilung.

Epidermal growth factor (EGF) spielt eine wichtige Rolle für die Wundheilung im Darmgewebe und stimuliert unter anderem die Epithelneubildung, Angiogenese und steigert die Kollagenaseaktivität [Falanga V 1993]. Der Vascular endothelial growth factor und der Fibroblast Growth Factor sind bedeutsam für die Angiogenese und somit ebenfalls für die ischämische Wundheilung [Yanagisawa-Miwa A 1992].

Der Wachstumsfaktor IGF-I wird in der Leber sowie auch in anderen Zelltypen synthetisiert und besitzt einen trophischen Effekt auf das Zellwachstum und den Metabolismus der Zelle. Sowohl die Kollagensynthese als auch das Wachstum von Mucosazellen werden stimuliert [Petersen TI 1996, Egger B 2001, Werner S 2003]. Das Darmgewebe stellt eines der wichtigsten Zielgewebe für IGF-I dar [Read TC 1992] und durch verschiedene Studien wurde ein stimulierender Effekt

von IGF-I auf die Wundheilung gezeigt [Vanderhoof JA 1992, Bitar MS 1997, Petersen TI 1996, Egger B 2001].

5.3 Stimulation der Heilung

Petersen et al. verglichen in ihrer Studie die Stabilität der Anastomose anhand der Breaking Strength und des Kollagengehaltes an Tag 3 postoperativ in zwei Gruppen, welche systemisch entweder mit IGF-I oder mit Placebo behandelt wurden [Petersen TI 1996]. Die Applikation erfolgte subcutan über implantierte Pumpen. Sie fanden keinen signifikanten Unterschied in der Breaking Strength, jedoch einen 23% höheren Kollagengehalt (statistisch signifikant). In der vorliegenden Studie wurde hingegen eine signifikante Verbesserung der mechanischen Anastomosenstabilität 3 Tage nach der Operation gemessen. Der Unterschied in dem Ergebnis zur biomechanischen Stabilität der Anastomose könnte durch die unterschiedlichen Applikationsformen erklärt werden. Auch die unterschiedlichen biomechanischen Testverfahren spielen eine Rolle und werden im Teil Methodendiskussion ausführlicher diskutiert. Zur biomechanischen Testung wurde in der genannten Studie der Darmabschnitt mit der Anastomose nach Separation möglicher Adhäsionen entnommen, im Vergleich dazu wurde in der vorliegenden Studie die biomechanische Testung ohne Manipulationen an der Anastomose in vivo am narkotisierten Tier durchgeführt.

Petersen et al. stellten zusätzlich eine signifikante Gewichtszunahme in der mit IGF-I behandelten Gruppe fest [Petersen TI 1996]. In dieser Promotionsarbeit war diese Gewichtszunahme nicht zu finden, die Tiere nahmen tendenziell in allen Gruppen ab (bis auf die PDLLA- und IGF-I-Gruppe nach 24h). Dieser Unterschied ist mit der systemischen vs. lokalen Verabreichung des Wachstumsfaktors begründbar. Durch die lokale Applikation können am Zielort hohe Wachstumsfaktorkonzentrationen erzielt werden, gleichzeitig wird der Gesamtorganismus nicht belastet. IGF-I besitzt einen trophischen Effekt auf alle Zellen, dies könnte die Gewichtszunahme bei systemischer Applikation erklären.

Egger et al. untersuchten in ihrer Studie Bursting Pressure, führten histologische- und morphometrische Untersuchungen durch [Egger B 2001]. Sie bestimmten den Muzin-, Kollagengehalt und die Zellproliferation (BrdU) im Gewebe um die Anastomose an den postoperativen Tagen 2, 4 und 6 unter systemischer (intraperitonealer) Verabreichung von IGF-I. Zusätzlich wurde in der gleichen Studie die Wirkung des Keratinozyten Wachstumsfaktors (KGF) überprüft. In der mit IGF-I behandelten Gruppe zeigte sich an allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante Verbesserung der Bursting Pressure. Unterschiede zwischen den

Ergebnissen könnten durch die anders gewählten Zeitpunkte erklärt werden. In der vorliegenden Studie zeigte sich eine erhöhte Vulnerabilität der Anastomosenregion an Tag 3 und an diesem Tag konnte durch das applizierte IGF-I eine signifikante Besserung der Belastbarkeit erzielt werden. Die von Egger et al. gewählten Zeitpunkte liegen um den dritten postoperativen Tag, es ist also vorstellbar, dass die Umbauvorgänge im Gewebe noch bzw. schon ablaufen und dies nach 24h und 7d nicht im gleichen Maße der Fall ist. Die gemessenen Werte waren in der genannten Studie weitaus niedriger als in der vorliegenden Arbeit, jedoch wurde auch hier der Darmabschnitt mit der Anastomose komplett vor der biomechanischen Testung herausgetrennt. Die Stellen, an denen das Gewebe nachgab, lagen in beiden Experimenten entweder an der Anastomose oder im nahen, angrenzenden Bereich. In der histochemischen und histomorphometrischen Untersuchung fanden Egger et al. eine signifikant größere Kryptentiefe, vermehrt proliferative Zellen und höheren Kollagengehalt nach 2, 4 und 6 Tagen. Des Weiteren wurden Hinweise auf weniger Entzündung an der Anastomose gefunden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der histochemischen Untersuchung der vorliegenden Studie gefunden. Eine geringere Granulozyteninfiltration und weniger Nekrosenbildung sprechen ebenfalls für weniger Entzündung an der Anastomose. Eine gleichzeitige Zunahme der Fibroblasten und des Bindegewebes im Bereich der Anastomose weisen auf eine erhöhte Stabilität hin.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass weitere Faktoren auf die Wundheilung der Darmanastomosen Einfluß nehmen.

Turan et al applizierten Phenytoin oral oder rektal bei Ratten, welche zuvor am Darm operiert worden waren. Untersucht wurde nach 3 und nach 7 Tagen jeweils eine Kontrollgruppe, eine Gruppe mit oral und eine mit rektal appliziertem Phenytoin [Turan M 2004]. Biomechanisch wurde wie in der vorliegenden Studie die Bursting Pressure gemessen und eine verbesserte Stabilität bei den behandelten Tieren festgestellt. In den histologischen Untersuchungen fanden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein höherer Hydroxyprolinegehalt, mehr Kollagenexpression, mehr Fibroblasten und eine stärkere Kapillareinsprossung in der Anastomosenregion. Die rektale Verabreichung erwies sich als effektiver im Vergleich zur oralen Applikation.

Der Einfluß des „Granulocyte macrophage-colony stimulating factor“ (GM-CSF) wurde in verschiedenen Studien bei Ratten mit einer problematischen Ausgangssituation untersucht. In einer Studie waren die Tiere vorher mit Kortikosteroiden [Dinc S 2004] oder mit Mitomycin-C behandelt worden [Cetinkaya K 2005], in einer anderen Studie wurde eine Ligatur des Ductus choledochus durchgeführt [Gulcelik MA 2005]. Desweiteren untersuchte man den Einfluß des

GM-CSF auf Anastomosen in einem ischämischen Darmsegment [Dinc S 2004]. Die Applikation erfolgte in allen 4 Studien durch lokale Injektion des GM-CSF in die perianastomotische Region. Es wurden sowohl höhere Bursting Pressure Werte als auch verbesserte histologische Parameter bestimmt nach Gabe von GM-CSF in allen genannten Studien.

Migaly et al. untersuchten den Einfluß von Transforming Growth Factor beta1 (TGF- β 1) auf die Darmanastomosenwundheilung [Migaly J 2004]. Die Applikation erfolgte über einen intraluminalen Silikonkatheter, über welchen postoperativ eine Infusion durchgeführt wurde. Die Übertragung des TGF- β 1 erfolgte adenovirenvermittelt. Es zeigten sich auch in dieser Studie signifikant höhere Bursting Pressure Werte am dritten postoperativen Tag bei den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während bei den unbehandelten Tieren meist die Anastomose selbst dem Druck nachgab, war dies bei den behandelten Tieren nicht der Fall.

In einer anderen Studie wurde Leptin intraperitoneal verabreicht [Tasdelen A 2004], um den Einfluß auf die Darmanastomosenheilung zu überprüfen. Bei normaler und ischämischer Anastomosenregion konnten signifikant höhere Bursting Pressure Werte erzielt werden am siebten postoperativen Tag im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Desweiteren wurden ein höherer Hydroxyprolin-, Kollagen-, Gefäßgehalt und ein größerer Anteil von mononukleären Leukozyten gefunden.

Als weitere Stimulationsmöglichkeit erwies sich die Applikation von Epidermal Growth Factor (EGF) bei mit Steroid behandelten Ratten [Sakallioglu AE 2004]. Die Gabe des EGF erfolgte über implantierte Gelatineschwämme. Anhand von Bursting Pressure- und Hydroxyprolingehaltbestimmung konnte eine Verbesserung der Heilung der Anastomose festgestellt werden sowohl im Ablauf der normalen Wundheilung als auch unter schlechteren Bedingungen nach Steroidbehandlung.

Diese vielfältigen Studien zeigen, daß die Anastomosenheilung im Tiermodell signifikant verbessert werden kann. Zusätzlich wird deutlich, dass IGF-I einen starken Einfluß auf die Heilung und das Wachstum im Darmgewebe besitzt und sich positiv auf die Stabilität einer Anastomose nach Darmresektion auswirkt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es viele mögliche Einflussfaktoren und Ansätze gibt um die Anastomosenheilung zu stimulieren. Auch der Zeitpunkt und die Applikationsform scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen.

5.4 Modelldiskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente an Ratten durchgeführt, da es sich um ein vielfach bewährtes Tiermodell zur Untersuchung von Anastomosenheilung handelt [Koruda MJ 1990]. Zum einen sind die Tiere in ausreichender Zahl in genetisch ähnlicher Konstitution erhältlich, zum anderen sind sie einfach zu halten. Es stellt sich jedoch die Frage ob dieses Modell auf den Menschen übertragbar ist. Es zeigte sich ein Einfluß unterschiedlicher Tiernahrung auf die Größe und die Proliferationsrate der Mucosa des Kolons [Jacobs L R 1984, Ryan G P 1980]. Beim Menschen wurde eine erhöhte Wachstumshormonkonzentration unter Stressbedingungen nachgewiesen, bei Ratten war dies nicht der Fall, somit sind sie eventuell durch eine Applikation von Wachstumsfaktoren leichter stimulierbar [Christensen H 1992].

5.5 Methodendiskussion

In den Arbeiten von Petersen und Egger zum Einfluss von IGF-I auf die Anastomosenheilung wurde zur Messung der Anastomosenstabilität die „Breaking Strength“ beurteilt [Petersen TI 1996, Egger B 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurde die „Bursting pressure“ des Anastomosenbereichs ermittelt.

Im Folgenden sollen einerseits die Wahl der „Bursting Pressure“ und andererseits die Probleme der Meßmethoden erläutert werden.

Bei der „Bursting Pressure“ handelt es sich um einen maximalen intraluminal erzeugten Druck und bei der „Breaking Strength“ um die maximale longitudinale Zugkraft der das Gewebe standhalten kann. Neben diesen methodischen Unterschieden erschweren selbst bei gleicher Methode verschiedene Faktoren den Vergleich experimenteller Studien. Betrachtet man zunächst die „Bursting Pressure“ so ist es für einen Vergleich beispielsweise entscheidend wie schnell und wie gleichmäßig der Druck an der Anastomose aufgebaut wird. Bei Verwendung von 2 oder 12 ml pro Sekunde wurden in einer Studie ähnliche Druckwerte gefunden. Bei der Verwendung von 50 ml pro Sekunde zeigten sich jedoch weitaus höhere „Bursting Pressure“ Werte [Nelsen TS 1966]. Zu erklären wäre dies durch eine weitere Einflußgröße: die Zeitdauer der Druckbelastung. Je langsamer der Druck aufgebaut wird, desto niedriger könnten also die erforderlichen Werte sein bis das Gewebe nachgibt.

Weitere Unterschiede können auftreten in den unterschiedlichen Darmsegmenten. So wurden im intakten Colon Transversum höhere Druckwerte gemessen als im angrenzenden linken Colon im gleichen Versuchstier [Yale CE 1971, Jiborn H 1978]. Das linke Colon ist höheren Drücken

ausgesetzt als das Colon Transversum, da es vor allem im distalen Anteil eine Speicherfunktion hat. Diese „Vorbelastung“ kann ein Grund für die unterschiedlichen Werte sein. In der vorliegenden Studie wurde das Colon Transversum gewählt.

Ein weiterer Aspekt im Vergleich von Studien ist die Behandlung des Darmsegments vor der Testung. Viele Autoren haben das Darmsegment zur Testung entnommen, ohne eventuelle Verwachsungen etc. zu erwähnen. In anderen Studien wurde die Testung in situ durchgeführt und höhere Werte erzielt als bei den zuvor entnommenen Anastomosen [Petersen TI 1996, Egger B 2001, Foster ME 1986, Haukipuro 1988]. Es ist meist nicht bekannt wie groß der Zeitraum zwischen Entnahme des Darmsegments und der eigentlichen Testung war. In diesem Zeitraum wird das Darmsegment nicht mehr durchblutet, und die Werte können auch hier beeinflusst werden. In dieser Studie wurden die biomechanischen Versuche in vivo am narkotisierten Tier durchgeführt, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten.

Einen weiteren Faktor stellt der Durchmesser der Anastomose dar. Er beeinflusst ebenfalls die „Bursting Pressure“, da sich die „Bursting Wall Tension“ nach dem Laplace’schen Gesetz aus dem Produkt der „Bursting Pressure“ und des internen Radius berechnet. Diese Beeinflussung durch biologische Variationen würde für einen Vergleich von Bedeutung sein, bzw. könnte auch Schwankungen innerhalb einer Versuchsreihe erklären. Einfluß auf den Durchmesser des Darmabschnittes nehmen außerdem der Operateur durch Anfertigung der Anastomosen und auch die Ernährung der Tiere mit eventuell unterschiedlicher Vordehnung des Darmes. Ganz entscheidend ist auch das Alter der Tiere, da Ratten lange wachsen. Des weiteren können Unterschiede zwischen spannungsfreier vs. unter Spannung stehender Naht vorliegen. Je mehr Spannung auf das Gewebe einwirkt, desto weniger durchblutet und umso verletzlicher ist es [Waninger J 1992]. Da auf diesen Parameter der Operateur einen Einfluss hat, wurden in dieser Studie alle Tiere vom gleichen Operateur randomisiert mit einer möglichst spannungsfreien Naht versorgt.

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren kann geschlussfolgert werden, dass quantitative Vergleiche der „Bursting Pressure“ nur in ein und derselben Studie zulässig sind. Zwischen verschiedenen Studien sind nur Tendenzen beurteilbar.

In den meisten Studien waren die Daten in sofern vergleichbar, dass die „Bursting Pressure“ Werte am dritten bis vierten Tag absanken [Jiborn H 1978, Cronin K 1968, Irvin TT 1974] und im Anschluss bis zum siebten Tag wieder anstiegen.

Nach Hendriks et al. [Hendriks T 1990] ist das größte Problem bei der Verwendung der „Bursting Pressure“ die Möglichkeit, dass der Darm außerhalb der Anastomose perforiert und der Druckwert nicht aussagekräftig ist. Da dies ab 14 Tagen nach OP fast ausschließlich der Fall

zu sein scheint, ist dieses Verfahren bei Langzeitstudien als kritisch zu bewerten [Hendriks T 1990].

In den Versuchen dieser Arbeit traten Perforationsstellen sowohl innerhalb als auch im nahen angrenzenden Gewebe der Anastomose auf. Die Verteilung war jedoch nicht gruppenspezifisch. Da aber nie ein Druckwert erzielt wurde, der dem eines unbehandelten Darmabschnittes entspricht, sind sie als aussagekräftig einzustufen, da die Applikation von Wachstumsfaktoren natürlich auch das umliegende Gewebe beeinflusst. Befindet sich die Perforationsstelle im Einstichbereich des Fadens liegt sie schon außerhalb der eigentlichen Anastomose aber dennoch im Bereich der „Wunde“.

Bei der „Breaking Strength“ handelt es sich um die maximale longitudinale Kraft, die nötig ist, um die Anastomose zur Ruptur zu bringen.

Auch diese Methode wurde mehrfach kritisiert. Nelsen und Anders stellten fest, dass es schwierig ist, die jeweils gleiche distraktive Kraft aufzubringen, und sie kritisierten außerdem, dass keine zirkuläre Kraft auf die Anastomose einwirkt [Nelsen TS 1966], wie es physiologischerweise im Darm der Fall ist.

Auch bei dieser Methode kommt es bei einem Vergleich von Studien darauf an, wie der Darm entnommen wurde, und ob die Anastomose eventuell schon vorher geschädigt wurde.

Die verwendete Kraft kann entweder kontinuierlich oder aber im Intervall appliziert werden, dies könnte Abweichungen in den Ergebnissen bewirken [Hillan K 1988].

Die „Breaking Strength“ verhält sich analog zur „Bursting Pressure“ in der ersten postoperativen Woche [Blomquist P 1984, Udén P 1988] mit niedrigeren Druckwerten um den dritten und vierten Tag.

Im Vergleich mit der „Bursting Pressure“ ist zu sagen, dass bei Verwendung der „Breaking Strength“ bis zur vierten Woche die Ruptur des Gewebes weitestgehend innerhalb der Anastomose liegt [Jiborn H 1978], wobei dies bei der „Bursting Pressure“ nach zwei Wochen meist nicht mehr der Fall ist. Die „Bursting Pressure“ scheint schneller wieder hergestellt, und die Aussagekraft nach einem gewissen Zeitraum begrenzt zu sein. In dieser Arbeit mit Experimenten in der ersten postoperativen Woche ist die „Bursting Pressure“ also gut zu verwenden.

In den ersten postoperativen Tagen stellten Blomquist et al. fest, dass die „Breaking Strength“ bei Belastung der Naht vor allem die „Nahthaltekapazität“ widerspiegelt, da die Kraft ausschließlich in longitudinaler Ebene wirkt [Blomquist P 1984, 1985]. Bei Verwendung der Bursting Pressure existiert zusätzlich eine zirkuläre Kraft und die Belastung ist der

physiologischen Beanspruchung ähnlich. Dies könnte erklären, warum die Bursting Pressure Werte nicht in gleicher Weise von der Nahthaltekapazität beeinflusst werden in den ersten postoperativen Tagen. Ab dem siebten Tag beeinflusste die Naht die Werte der Breaking Strength nicht mehr, ein weiterer Grund für die Verwendung der „Bursting Pressure“ in der ersten postoperativen Woche.

Die Werte, bis wann sich die Ruptur bei Verwendung der „Breaking strength“ innerhalb der Anastomose befand, variieren zwischen zwei bis vier Wochen [Jönsson K 1983, Jiborn H 1978] oder sind gar nicht dokumentiert worden [Udén P 1988].

In unterschiedlichen Experimenten variieren die Werte der „Breaking Strength“ stark. Es wurde eine große Abhängigkeit vom Abstand zwischen Wundrand und Naht festgestellt [Högström H 1985, Jönsson K 1986], was zu Schwierigkeiten im Vergleich unterschiedlicher Studien führt. Für die „Bursting Pressure“ sind keine solchen Abhängigkeiten dokumentiert.

In nur wenigen Studien wurden beide Parameter im Vergleich verwendet. In den Studien von Rosin et al. und Young & Wheeler wurden die gleichen Signifikanzen zwischen den Gruppen für beide Parameter gefunden [Rosin RD 1978, Young HL 1983], wobei in der Studie Smith et al. die Ergebnisse nicht übereinstimmten [Smith SR 1982]. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gefunden bei Verwendung der „Breaking Strength“, bei Verwendung der „Bursting Pressure“ jedoch schon.

5.5.1 Lokale Applikation

Wie in der Studie von Petersen gezeigt, hat die systemische Applikation von IGF-I einen Einfluss auf systemische Parameter wie das Körpergewicht [Petersen TI 1996]. Da es sich bei der Anastomosenheilung um ein lokales Ereignis handelt, wäre auch eine lokale Applikation eines stimulierenden Faktors wünschenswert, um mögliche Nebenwirkungen zu minimieren.

Zur lokalen Applikation wurde in der vorliegenden Studie ein neu entwickeltes Drug Delivery System auf Basis von Poly(D,L-Laktid) verwendet. Diese Technologie erlaubt das Beschichten von verschiedenen Materialien und somit die Modifikation von medizinischen Implantaten oder Materialien zu lokalen Wirkstoffträgern. In verschiedenen Studien wurde der Einfluss lokal applizierter Wachstumsfaktoren (IGF-I, TGF- β 1, BMP-2) aus der PDLLA-Beschichtung von orthopädischen Implantaten untersucht und sowohl in den biomechanischen Analysen als auch in der Histologie eine verbesserte Heilung erreicht. [Schmidmaier G 2001, Kandziora F 2002, 2003].

In der vorliegenden Studie wurde dieses Verfahren zur Beschichtung von Nahtmaterial übertragen. Nahtmaterialien konnten ohne Strukturveränderung mit PDLLA als Trägermaterial und Wachstumsfaktoren beschichtet werden.

Mit dem „kalten Beschichtungsverfahren“ ließen sich dabei die Wachstumsfaktoren in stabiler Form in die Beschichtung einarbeiten. Die Faktoren waren hierbei als feine Suspension verteilt und wurden v.a. durch Diffusions- und Erosionsvorgänge freigesetzt. In einem Elutionsversuch zeigte sich eine kontinuierliche Freisetzung von Wachstumsfaktoren nach einem initialen Peak aus der PDLLA-Beschichtung.

In der biomechanischen Studie zeigte sich eine verbesserte Stabilität der Anastomose am dritten postoperativen Tag durch die lokale Freisetzung von IGF-I aus der PDLLA-schicht.

Durch die lokale Applikationsform konnte die systemische Belastung durch Wachstumsfaktoren minimiert werden. Dies ist wichtig, um die Nebenwirkungen der Wachstumsfaktoren zu verhindern. IGF-I kann Elektrolytverschiebungen, veränderte Serumkonzentrationen von Insulin und Wachstumshormonen, Hypoglykämie, Hypokaliämie, Konvulsionen, Pseudotumor Cerebri, Papillenödem, Facialisparesen, Parotisschwellung, Tachykardie, vorübergehend veränderte Leber-Funktionstests, Bildung von Anti-IGF-I-Antikörpern, Haarausfall, vermehrt Infektionen des oberen Respirationstraktes [Guevara-Aquirre J 1969, Vasconez O 1994, Wilton P 1992], Beeinflussung der Nierenfunktion durch IGF-I und bei experimentell erzeugtem Diabetes eine erhöhte Konzentration an IGF-I hervorrufen [Flyvbjerg A 1990, 1999].

In der vorliegenden Studie zeigten sich für die PDLLA-Beschichtung keine heilungsstörenden Eigenschaften. Beurteilt wurde dies histologisch anhand von Nekrosenbildung, Makrophageneinwanderung und Granulozyteninfiltration und biomechanisch mittels der „Bursting Pressure“, welche sich im Vergleich zur Kontrollgruppe weder verschlechterte noch verbesserte.

In Experimenten zur Knochenheilung konnten sogar stimulierende Effekte von PDLLA auf Heilungsvorgänge gezeigt werden, deren Mechanismus jedoch nicht geklärt ist [Schmidmaier G 2001]

Andere lokale Applikationsverfahren sind kritisch zu diskutieren. Bei lokaler Injektion von Substanzen in die perianastomotische Region [Dinc S 2004, Cetinkaya K 2005, Gulcelik MA 2005] ist das Infektionsrisiko durch eventuelle Keimverschleppung erhöht. Eine Infektion der Region wäre trotz möglicher Verabreichung heilungsstimulierender Substanzen kontraproduktiv für die Heilungsvorgänge. Auch eine Verletzung intraabdominell gelegener Strukturen während des Injektionsvorganges wäre denkbar. Die Implantation von Fremdkörpern wie

Gelatineschwämmen [Sakallioğlu AE 2004] oder intraluminalen Kathetern [Migaly J 2004] birgt ebenfalls eine erhöhte Infektionsgefahr und zusätzlich wären Abstoßungsreaktionen möglich, da es sich um einen Fremdkörper handelt. Im Grunde handelt es sich bei dem eingebrachten Nahtmaterial in der vorliegenden Studie ebenfalls um einen Fremdkörper, jedoch wird dieses bei den anderen Applikationsverfahren ja noch zusätzlich in den Organismus eingebracht zu den Kathetern, Gelatineschwämmen etc. Das Nahtmaterial kann also gleichzeitig mechanisch stabilisieren und durch die eingebrachten Substanzen die Heilungsvorgänge stimulieren ohne den Organismus durch weitere Störfaktoren belasten zu müssen. Es können hohe Konzentrationen des Wachstumsfaktors am Wirkort erzielt werden bei gleichzeitig geringerem Bedarf der Substanz im Vergleich zur systemischen Applikation und weitaus geringerer Belastung des Organismus durch mögliche Nebenwirkungen der Substanz.

5.6 Alternativen und klinische Relevanz

Im Rahmen dieser Studie wurde ein Beschichtungsverfahren für Fadenmaterial entwickelt, welches die Einarbeitung von biologisch aktiven Wachstumsfaktoren ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von IGF-I die Heilung positiv beeinflusst wird und eine Senkung der Insuffizienzrate erzielt werden kann.

Der Einsatz und die lokale Applikation weiterer Substanzen sind denkbar: Keratinocyte Growth Factor (KGF) verbessert die Darmheilung und reduziert die Entzündung [Egger B 1998]. Desweiteren zeigten Fibroblast Growth Factor (FGF) [Kirsner RS 1993], Epidermal Growth Factor (EGF) [Jones MK V 1999, Falanga V 1993] oder Erythropoetin (EPO) [Fatouros MS 1999] eine fördernde Wirkung auf die Darmheilung und könnten untersucht werden. Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist bedeutsam für die Angiogenese und somit ebenfalls für die ischämische Wundheilung [Yanagisawa-Miwa A 1992].

Eine Kombination mehrerer oder die Verwendung anderer Substanzen wäre denkbar. So ist es möglich zum Beispiel Antibiotika mit Hilfe der PDLLA-Beschichtung lokal zu applizieren [Lucke M 2003]. In der Tumorthherapie wäre ein Einsatz von antiproliferativen Substanzen denkbar.

In der Klinik hat eine Anastomoseninsuffizienz oft katastrophale Folgen für den Patienten bis hin zum Tod. Die Vorteile für die mögliche lokale Applikation von IGF-I liegen in einer Senkung der Insuffizienz- und somit der Komplikationsrate. Die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus könnte verkürzt werden. Es wären weniger Zweiteingriffe nötig und eine Kosteneinsparung möglich.

Beschichtete Fäden könnten auch in anderen Bereichen Anwendung finden und die Beschichtung anderer Materialien wäre denkbar.

6 Zusammenfassung:

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten in einem Rattenmodell, dass durch die lokale Applikation von rh-IGF-I aus einer bioresorbierbaren PDLLA Beschichtung die Anastomosenheilung positiv stimuliert werden konnte.

Die Beschichtungsmethode veränderte weder Handhabung noch mechanischen Eigenschaften der Fäden und lässt sich letztendlich mit jedem handelsüblichen Faden durchführen.

Durch die biomechanischen Messungen wurde deutlich, dass am dritten postoperativen Tag die Stabilität der Anastomosenregion in der Kontrollgruppe kritisch abnimmt. Gerade dieser Zeitraum konnte durch eine Beschichtung des Nahtmaterials mit PDLLA und IGF-I überbrückt werden. Die Stabilität der Anastomosenregion blieb bei lokaler Applikation von IGF-I zu allen Zeitpunkten ungefähr gleich. Die histologischen Ergebnisse geben ebenfalls Hinweise auf einen verbesserten Zustand der mit IGF-I behandelten Anastomosen durch mehr Fibroblasten und Bindegewebe, zudem zeigten sich weniger Entzündungszeichen.

Die regelmäßigen Kontrollen des Gewichts, der Körpertemperatur sowie die makroskopische Beurteilung der Tiere zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Keiner dieser Parameter wies pathologische Veränderung innerhalb des Untersuchungszeitraums zwischen den Gruppen auf. Die systemische IGF-I Konzentration wurde nicht zusätzlich bestimmt, es konnte aber im Rahmen der durchgeführten Studie zur lokalen Applikation von IGF-I über eingebrachte Knochenimplantate am Rattenmodell keine signifikanten Änderungen festgestellt werden [Schmidmaier G 2001]. Der im Rahmen dieser Studie durchgeführte Elutionsversuch verdeutlichte, dass ausreichend hohe Mengen an Wachstumsfaktor am Wirkort freigesetzt werden. Bestätigt wurde dies durch die signifikante Verbesserung der biomechanischen Parameter.

Das Prinzip der lokalen Applikation über Beschichtung von Nahtmaterial lässt sich auch auf andere Wirkstoffe übertragen. Es könnten weitere Wachstumsfaktoren oder aber eine Kombination mehrerer untersucht werden, um einen eventuell zusätzlichen Nutzen zu überprüfen. Auch könnte das Beschichtungsverfahren in der Tumorchirurgie Anwendung finden. Es müssten wachstumshemmende Substanzen verwendet werden. Die durchgeführten Experimente im Rahmen dieser Promotionsarbeit könnten hierfür die Grundlagen liefern.

7. Literaturverzeichnis

1. Aguilar-Nascimento JE, Mathie RT, Man WK, Williamson RC. Enhanced intra-anastomotic healing by operative lavage with nutrient solutions in experimental left-sided colonic obstruction. *Br J Surg* 1995; 82:461-464.
2. Aguilar-Nascimento JE, Oliveira-Neto JP, Mathie RT, Williamson RC. Effect of intraoperative nutritional solutions on perianastomotic colonic mucosa in experimental large bowel obstruction. *Dig Dis Sci* 1997; 42:2581-84.
3. Akyol AM, McGregor JR, Galloway DJ, George WD. Early postoperative contrast radiology in the assessment of colorectal anastomotic integrity. *Int J Colorectal Dis* 1992; 7:141-43
4. Bitar MS et al. Insulin-like growth factor-1 reverses diabetes-induced wound healing impairment in rats. *Horm Metab Res* 1997; 29:383-86.
5. Blomquist P, Jiborn H, Zederfeldt B. Effect of diverting colostomy on breaking strength of anastomoses after resection of the left side of the colon: studies in the rat. *Am J Surg* 1985; 149:712-15.
6. Blomquist P, Jiborn H, Zederfeldt B. The effect of relative bowel rest on healing of colonic anastomoses: breaking strength and collagen in the colonic wall following left colon resection and anastomosis in the rat. *Acta Chir Scand* 1984; 150:671-75.
7. Cetinkaya K, Dinc S, Gulcelik MA et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor improves impaired anastomotic wound healing in rats treated with intraperitoneal mitomycin-C. *Surg Today* 2005; 35(4):290-4.
8. Christensen H, Flyvbjerg A. Dose dependent stimulatory effect of human growth hormone on the strength and collagen deposition of colonic anastomoses in the rat. *Acta Endocrinologia* 1992; 126:438-43.
9. Cronin K, Jackson DS, Dunphy JE. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. *Surg Gynecol Obstet* 1968; 126:747-53.
10. Debas HT, Thomson FB et al. A critical review of colectomy with anastomosis. *Surg Gynecol Obstet* 1972; 135:747-752.
11. Del Rio JV, Beck DE, Opelka FG. Chronic perioperative steroids and colonic anastomotic healing in rats. *J Surg Res* 1996; 66:138-42.

12. Dinc S, Gucelik MA, Kuru B et al. Effects of locally applied recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on ischemic bowel anastomoses in rat. *Eur Surg Res* 2004; 36(1):59-63.
13. Dinc S, Alagol H, Gulcelik MA et al. Locally applied granulocyte-macrophage colony-stimulating factors improves the impaired bowel anastomoses in rats with long-term corticosteroid treatment. *World J Surg* 2002; 26:1208-13.
14. Duraker N, Bender O, Memisoglu K, Yalciner A. Intraoperative bowel irrigation improves anastomotic collagen metabolism in the left-sided colonic obstruction but not covering colostomy. *Int J Colorectal Dis* 1998; 13:232-34.
15. 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* 2001; 88:90-98.
16. Egger B, Tolmos J, Prosaccino F et al. Keratinocyte growth factor promotes healing of left-sided colon anastomoses. *Am J Surg* 1998; 176:18-24.
17. Erbil Y, Calis A, Berber E, Mercan S. The effect of intraoperative colonic lavage with NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on anastomotic healing in the presence of left-sided colonic obstruction in the rat. *Surg Today* 2000; 30:421-25.
18. Falanga V. Growth factors and wound healing. *Derm Clin* 1993; 11:667-75.
19. Fatouros MS, Vekinis G, Bourantas KL et al. Influence of growth factors erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on mechanical strength and healing of colonic anastomoses in rats. *Eur J Surg* 1999; 165:986-92.
20. Fawcett A, Shembekar M, Church JS, Vashisht R, Springall RG, Nott DM. et al. Smoking, hypertension, and colonic anastomotic healing ; a combined clinical and histopathological study. *Gut* 1996; 38:714-18.
21. Fielding LP, Steward-Brown S, Blesovsky L, Kearney G. Anastomotic integrity after operations for large-bowel cancer: A multicentre study. *Brit J Med* 1980; 281:411.
22. Flyvbjerg A, Bennett WF, Rasch R, Kopchick JJ, Scarlett JA. Inhibitory effect of a growth hormone receptor antagonist (G120K-PEG) on renal enlargement, glomerular hypertrophy and urinary albumin excretion in experimental diabetes in mice. *Diabetes* 1999; 48:377-82.
23. Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Arnqvist HJ, Orskov H.. Kidney IGF-I mRNA in intestinal renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 1990; 33:334-38.

24. Foschi D, Corsi F, Cellerino P, Cassini P, Trabucchi E. Diabetes impairs the development of early strength, but not the accumulation, of collagen during intestinal anastomotic healing in the rat. *Br J Surg* 1995; 82:423-24.
25. Foster ME, Johnson CD, Billings PJ, Davies PW, Leaper DJ. Intraoperative antegrade lavage and anastomotic healing in acute colonic obstruction. *Dis Colon Rectum* 1986; 29:255-59.
26. Furst MB, Stromberg BV, Blatchford GJ, Christensen MA, Thorson AG. Colonic anastomoses: Bursting strength after corticosteroid treatment. *Dis Colon Rectum* 1994; 37:12-15.
27. Garcia JG, Criado FJ, Persona MA, Alonso AG. Healing of colonic ischemic anastomoses in the rat: Role of superoxide radicals. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:892-95.
28. Goligher JC, Graham NG, De Dombal FT. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. *Br J Surg* 1970; 57:109.
29. Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, et al. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1988; 94:257.
30. Guevara-Aguirre J, Vasconez O, Martinez V et al. A randomized, double blind, placebo-controlled trial on safety and efficacy of recombinant insulin-like growth factor-I in children with growth hormone receptor deficiency. *J Clin Endocrinol and Metabol* 1969; 80:1393-98.
31. Gulcelik MA, Dinc S, Bir F et al. Locally applied molgramostim improves wound healing at colonic anastomoses in rats after ligation of the common bile duct. *Can J Surg* 2005; 48(3):213-18.
32. Guo Y-S, Narayan S, Yallampalli C, Singh P. Characterization of insulin-like growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 1992; 102:1101-08.
33. Hartmann M, Jonsson K, Zederfeldt B. Importance of dehydration in anastomotic and subcutaneous wound healing: An experimental study in rats. *Eur J Surg* 1992; 158:79-82.
34. Haukipuro KA, Hulkko OA, Alavaikko MJ, Laitinen ST. Sutureless colon anastomosis with fibrin glue in the rat. *Dis Colon Rectum* 1988; 31:601-04.
35. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses: parameters for repair. *Dis Colon Rectum* 1990; 33:891-901.
36. Hesp FL, Hendriks T, Lubbers EJ, de Boer HH. Wound healing in the intestinal wall. Effects of infection on experimental ileal and colonic anastomoses. *Dis Colon Rectum* 1984; 27:462-67.

37. Hillan K, Nordlinger B, Ballet F, Puts JP, Infante R. The healing of colonic anastomoses after early intraperitoneal chemotherapy: an experimental study in rats. *J Surg Res* 1988; 44:166-71.
38. Högström H, Haglund U, Zederfeldt B. Suture technique and early breaking strength of intestinal anastomoses and laparotomy wounds. *Acta Chir Scand* 1985; 151:441-43.
39. Howarth GS, Xian CJ, Read LC. Insulin-like growth factor I partially attenuates colonic damage in rats with experimental colitis induced by oral dextran sulphate sodium. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:180-90.
40. Irvin TT, Hunt TK. Effect of malnutrition on colonic healing. *Ann Surg* 1974; 180:765-72.
41. Irvin TT. Collagen metabolism in infected colonic anastomoses. *Surg Gynecol Obstet* 1976; 143:220-24.
42. Ishimura K, Tsubouchi T, Okano K, Maeba T, Maeta H. Wound healing of intestinal anastomosis after digestive surgery under septic conditions: Participation of local interleukin-6 expression. *World J Surg* 1998; 22:1069-75.
43. Jacobs LR, Lupton SR. Effects of dietary fibers on rat large bowel mucosal growth and cell proliferation. *Amer J Physiol* 1984; 264:G378.
44. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomoses. *Am J Surg* 1978; 136:587-94.
45. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. II. Breaking strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg* 1978; 136:595-99.
46. Jönsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. *Am J Surg* 1983; 145:800-03.
47. Jönsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Mechanical and biochemical alterations in the intestinal wall adjacent to an anastomosis. *Am J Surg* 1986; 151:387-90.
48. Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B et al. Gastrointestinal Mucosal Regeneration: Role of Growth Factors. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4:303-09.
49. Kandziora F, Bail H, Schmidmaier G et al. Bone morphogenetic protein-2 application by a poly (D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg* 2002; 97(1 Suppl):40-8.
50. Kandziora F. Einfluss von Cagedesign, Carriersystemen und Wachstumsfaktoren auf die intervertebrale Spondylodese- biomechanische und tierexperimentelle Untersuchungen

- an der Halswirbelsäule des Schafs. Habilitationsschrift 2003/Humboldt-Universität zu Berlin.
51. Kasperk R, Philipps B, Vahrmeyer M, Willis S, Schumpelick V. Risikofaktoren der Anastomoseninsuffizienz nach sehr tiefer colorectaler und coloanaler Anastomose. *Chirurg* 2000; 71:1365-69.
 52. Kirsner RS, Eaglstein WH. The wound healing process. *Derm Clin* 1993; 11:629-40.
 53. Kologlu M, Sayek I, Kologlu LB, Eng C, Onat D. Effects of persistently elevated intraabdominal pressure on healing of colonic anastomoses. *Am J Surg* 1999; 178:293-97.
 54. Kologlu M, Yorganci K, Renda N, Sayek I. Effect of local and remote ischaemia-reperfusion injury on healing of colonic anastomoses. *Surgery* 2000; 128:99-104.
 55. Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res* 1990; 48:504-15.
 56. Law NW, Ellis H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomoses in protein-malnourished rats. *Surgery* 1990; 107:449-54.
 57. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF- β and BMP. *Bone* 1996; 19:1-12.
 58. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S et al. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 2003; 32:521-31.
 59. Mann B, Kleinschmidt S, Stremmel W. Prospective study of hand-sutured anastomosis after colorectal resection. *Br J Surg* 1996; 83:29-31.
 60. Migaly J, Lieberman J, Long W et al. Effect of adenoviral-mediated transfer of transforming growth factor-beta1 on colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum* 2004; 47(10):1699-705.
 61. Miller SK, Martindale RG, Gao XX, Gadacz TR. The effects of octreotide on healing of small bowel anastomosis. *Am Surg* 1996; 62:733-37.
 62. Nelsen TS, Anders CJ. Dynamic aspects of small intestinal rupture with special consideration of anastomotic strength. *Arch Surg* 1966; 93:309-14.
 63. Petersen TI, Kissmeyer-Nielsen P, Flyvbjerg A, Laurberg S, Christensen H. Effect of insuline-like growth factor I (IGF-I) administration on the healing of colonic anastomoses in rats. *Int J Colorectal Dis* 1996; 11:19-24.
 64. 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. Dissertationsschrift 2006/Humboldt-Universität zu Berlin.
65. Read TC, Tomas FM, Howarth GS et al. Insulin-like growth factor-1 and its N-terminal modified analogues induce marked gut growth in dexamethasone-treated rats. *J Endocrinol* 1992; 133:421-31.
 66. Rosin RD, Exarchakos G, Gilmore OJA, Ellis H. Topical noxythiolin in colonic healing. *Br J Surg* 1978; 65:603-06.
 67. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg* 1998; 85:355-58.
 68. Ryan GP, Dudrick SJ, Copeland EM. Effects of various diets on colonic growth in rats. *Gastroenterology* 1980; 78:1500.
 69. Sakallioglu AE, Yagmurlu A, Dindar H et al. Sustained local application of low-dose epidermal growth factor on steroid-inhibited colonic wound healing. *J Pediatr Surg* 2004; 39(4):591-95.
 70. Schmidmaier G.; Stemberger A.; Alt E et al. A new biodegradable polylaktic acid coronary stent-coating, releasing PEG-Hirudin and a prostacycline analog, reduces both platelet activation and plasmatic coagulation. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29(2):354A.
 71. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. Local application of growth factors (IGF-I and TGF- β 1) from a biodegradable Poly(D,L-Lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001; 28:341-50.
 72. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable Poly(D,L-Lactide) Coating of Implants for Continuous Release of Growth Factors. *Biomed Mater Res* 2001; 58:449-55.
 73. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factor contributing to leakage of colonic anastomoses. *Ann Surg* 1973; 177:513-18.
 74. Schwartz MZ, Kato Y, Yu D, Lukish JR. Growth factor enhancement of compromised gut function following massive small-bowel resection. *Pediatr Surg Int* 2000; 16:174-75.
 75. Sedlarik KM. [Wounds and wound healing]. *Med Monatsschr Pharm* 1997; 20:44-46.
 76. Seyer-Hansen M, Andreassen TT, Christensen H, Oxlund H. Effect of experimental diabetes and growth hormone administration on the strength of colonic anastomoses in rats. *Eur Surg Res* 1999 ; 31 :419-28.
 77. Smith SR, Connolly JC, Crane PW, Gilmore OJ. The effect of surgical drainage materials on colonic healing. *Br J Surg* 1982; 69:153-55.

78. Tadros T, Wobbes T, Hendriks T. Blood transfusion impairs the healing of experimental intestinal anastomoses. *Ann Surg* 1992; 215:276-81.
79. Tadros T, Wobbes T, Hendriks T. Opposite effects of interleukin-2 on normal and transfusion-suppressed healing of experimental intestinal anastomoses. *Ann Surg* 1993; 218:800-08.
80. Tasdelen A, Algin C, Ates E et al. Effect of leptin on healing of colonic anastomoses in rats. *Hepatogastroenerology* 2004; 51(58):994-97.
81. Thornton FJ, Ahrendt GM, Schaffer MR, Tantry US, Barbul A. Sepsis impairs anastomotic collagen gene expression and synthesis: A possible role for nitric oxide. *J Surg Res* 1997; 69:81-6.
82. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am* 1997; 77:549-73.
83. Trippel SB. Growth factors as therapeutic agents. *J Bone, Jt Surg* 1996; 78-A:1272-86.
84. Turan M, Saraydin SU, Canbay E et al. Positive effects of phenytoin on experimental colonic anastomoses. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19(3):250-57.
85. Udén P, Blomquist P, Jiborn H, Zederfeldt B. Influence of proximal colostomy on the healing of a left colon anastomosis: an experimental Study in the rat. *Br J Surg* 1988; 75:325-29.
86. Vanderhoof JA, McCusker RH, Clark R et al. Truncated and native insulinlike growth factor I enhance mucosal adaptation after jejunoileal resection. *Gastroenterology* 1992; 102:1949-56.
87. Vandertoll DJ, Beahrs OH. Carcinoma of the rectum and low sigmoid. Evaluation of anterior resection of 1766 favorable lesions. *Arch Surg* 1965; 90:793-98.
88. Vasconez O, Martinez V, Martinez AL et al. Heart rate increases in patients with growth hormone receptor deficiency treated with insulin-like growth factor I. *Acta Paediat Scand* 1994; 399:137-39.
89. Verhofstad MH, Hendriks T. Diabetes impairs the development of early strength, but not the accumulation of collagen, during intestinal anastomotic healing in the rat. *Br J Surg* 1994; 81:1040-45.
90. Verhofstad MH, Hendriks T. Complete prevention of impaired anastomotic healing in diabetic rats requires preoperative blood glucose control. *Br J Surg* 1996; 83:1717-21.
91. Waninger J, Kauffmann GW, Shah IA, Farthmann EH. Influence of the distance between interrupted sutures and the tension of sutures on the healing of experimental colonic anastomoses. *Am J Surg* 1992; 163:319-23.

92. Ward MW, Danzi M, Lewin MR, Rennie MJ, Clark CG. The effects of subclinical malnutrition and refeeding on the healing of experimental colonic anastomoses. *Br J Surg* 1982; 69:308-10.
93. Welch RD, Jones AL, Buchholz RW et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J of Bone and Mineral Res* 1998; 13,9:1483-90.
94. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83:835-70.
95. Wilton P. Treatment with recombinant human Insulin-like growth factor I of children with growth hormone receptor deficiency. *Acta Paediatr* 1992; Suppl 383:137.
96. Winsey K, Simon RJ, Levenson SM, Seifter E, Demetriou AA. Effect of supplemental vitamin A on colon anastomotic healing in rats given preoperative irradiation. *Am J Surg* 1987; 153:153-56.
97. Yale CE, van Gemert JV. Healing of inverted and everted intestinal anastomoses in germfree rats. *Surgery* 1971; 69:382-88.
98. Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F et al. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1992; 257:1401-03.
99. Young HL, Wheeler MH. Collagenase inhibition in the healing colon. *J Roy Soc Med* 1983; 76:32-6.
100. Zeeh JM, Hoffmann P, Sottili M, Eysselein VE, McRoberts JA. Up-regulation of insulin-like growth factor I binding sites in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1995; 108:644-52.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1 Wachstumsfaktor und zelluläre Mechanismen

Abb. 2 Rasterelektronenmikroskop. Aufnahme in 2000 facher Vergrößerung eines unbeschichteten Fadens

Abb. 3 Rasterelektronenmikroskop. Aufnahme in 5000 facher Vergrößerung- PDLLA beschichteter Faden

Abb. 4 REM- Aufnahme in 500facher Vergrößerung- unbeschichteter Faden

Abb. 5 REM- Aufnahme in 500facher Vergrößerung- PDLLA-beschichteter Faden

Abb. 6 Versuchsaufbau Geräte

Abb.7 Versuchstier kurz vor der biomechanischen Testung

Abb.8 Versuchsaufbau schematisch

Abb.9 Skizze des Pump-Druckmeßschlauches im Colon Transversum

Abb. 10 Elutionskurve

Abb. 11 Balkendiagramm Zugversuch

Abb. 12 Druckkurve

Abb. 13 Balkendiagramm „Kontrollgruppe im Zeitverlauf“

Abb. 14 Balkendiagramm „PDLLA- Gruppe im Zeitverlauf“

Abb. 15 Balkendiagramm „IGF-1- Gruppe im Zeitverlauf“

Abb. 16 Balkendiagramm „Bursting Pressure“

Abb. 17 Granulozyteninfiltration im Fadenbereich

Abb. 18 Nekrosenbildung im Anastomosensbereich

Abb. 19 Fibroblastenreaktion im Fadenbereich

Abb. 20 Bindegewebige Überbrückung

Tabellen

Tab. 1 Mittelwerte und Standardabweichungen von Gewicht und Temperatur zum Zeitpunkt der OP und nach 24 h

Tab. 2 Mittelwerte und Standardabweichungen von Gewicht und Temperatur zum Zeitpunkt der OP und nach 3d

Tab. 3 Mittelwerte und Standardabweichungen von Gewicht und Temperatur zum Zeitpunkt der OP und nach 7d

9. Danksagung:

Ich bedanke mich bei dem Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie (Klinik für Orthopädie und Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie) der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. N. P. Haas

in dessen Klinik ich meine wissenschaftliche Arbeit durchführen durfte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Leiter des Projektes

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Gerhard Schmidmaier, Oberarzt der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow

für die die freundliche Anleitung und seine persönliche Unterstützung.

Ich bedanke mich ebenfalls herzlich bei

Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. Britt Wildemann.

Durch Ihre unermüdliche Arbeit und Unterstützung hat sie einen grossen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Med. Thomas Fuchs, Assistenzarzt und Projektkoordinator

danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Operationen und seine konstruktive Hilfestellung bei den biomechanischen Versuchen.

Desweiteren möchte ich mich bedanken bei *Herrn Carsten Surke, Frau Steffanie Quandt* und *Herrn Moritz Kapp* für die vielen gemeinsamen Stunden, ihre Hilfe und Freundschaft.

Weiterer Dank gilt folgenden Personen:

Herrn Dipl. Ing. Jan- Erik Hoffmann

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

und allen Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Campus Virchow Humboldt-Universität zu Berlin

Natürlich gilt mein grosser Dank auch meiner Familie, Freunden und meinem Partner für ihre Unterstützung.

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung an Eides Statt

„Ich, [Christine Haebler], erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Einfluss lokaler Applikation von rekombinantem humanem Insulin-like growth factor-I (rh-IGF-I) auf die Anastomosenwundheilung im Darm - eine biomechanische Studie am Rattenmodell - selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift