

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren auf die Anastomosen-
heilung nach Dickdarmresektionen im Kaninchenmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Verena Müller

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. W. Mall

2. Prof. Dr. med. M. Anthuber

3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Pfitzmann

Datum der Promotion: 23.06.2008

Erklärung

„Ich, Verena Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren auf die Anastomosenheilung nach Dickdarmresektionen im Kaninchenmodell“ 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

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

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Julian Mall¹ für die Überlassung des Themas und seinem ständig offenen Ohr für meine Probleme. Sein Enthusiasmus und seine Hilfsbereitschaft haben in ganz erheblichem Maß zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Heiko Neuß¹ danke ich für seine Geduld und die Opferung seiner Freizeit, in dem Bemühen, meine Kenntnisse in der Daten- und Textverarbeitung substantiell zu erweitern.

Herrn Prof. Dr. Joachim Müller¹ danke ich für die Bereitstellung der Versuchslabore und die Unterstützung bei der Finanzierung der Arbeit.

Frau Kirsten Führer¹ und Frau Bettina Müller¹ danke ich für die professionelle Pflege und Betreuung der Versuchstiere.

Für die Labordiagnostik möchte ich mich bei Frau Dr. Sabine Ziemer² und Frau Elke Ziebell² bedanken.

Frau Dr. Brigitte Wegner³ danke ich für ihre Unterstützung bei der Datenanalyse.

Für die pathologische Auswertung der Anastomosenpräparate bedanke ich mich bei Herrn Dr. Wilko Weichert⁴ und Herrn PD Dr. Carsten Denkert⁴.

¹ Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte

² Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte

³ Institut für Biometrie und Epidemiologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte

⁴ Institut für Pathologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 Die Cyclooxygenase.....	8
1.2 Medikamente.....	10
1.2.1 Valdecoxib (Bextra®)	10
1.2.2 Metamizol.....	12
1.2.3 Resveratrol.....	13
2 FRAGESTELLUNG	14
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Studienablauf	16
3.2 Operationsverlauf.....	18
3.3 Messung des Berstungsdruckes und Klassifizierung der Berstungsstelle.....	25
3.4 Immunhistochemische Aufarbeitung der Anastomosenpräparate	26
3.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung der Anastomosenpräparate.....	27
3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse	28
4 ERGEBNISSE	30
4.1 Allgemeinzustand, Aktivitätsstatus, Fressverhalten und Gewicht.....	30
4.2 Inspektion der Darmnaht und Anastomoseninsuffizienzen.....	31
4.3 Messung des Berstungsdrucks (Hauptzielkriterium) und Klassifizierung der Berstungsstelle	32
4.4 Entzündungszeichen im Resektionsgebiet.....	34
4.5 Angiogenesecore.....	37
4.6 Laboruntersuchungen	40
4.6.1 Hämoglobin.....	40
4.6.2 Leukozyten.....	41
4.6.3 Kreatinin.....	42
4.6.4 Harnstoff	43
4.6.5 Adhäsionsbildung.....	44
5 DISKUSSION	46

6 ZUSAMMENFASSUNG.....	53
7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	55
8 TABELLENVERZEICHNIS	57
9 LITERATURVERZEICHNIS.....	58

1. EINLEITUNG

Pro Jahr wird bei mehr als 50 000 Menschen in der Bundesrepublik Deutschland ein kolorektales Karzinom diagnostiziert¹. Den entscheidenden Prognosefaktor und damit die zentrale Rolle in der Therapie des kolorektalen Karzinoms stellt nach wie vor die radikale Resektion des Tumor tragenden Darmabschnittes mit einem ausreichenden Sicherheitsabstand in Verbindung mit einer systematischen regionären Lymphadenektomie dar².

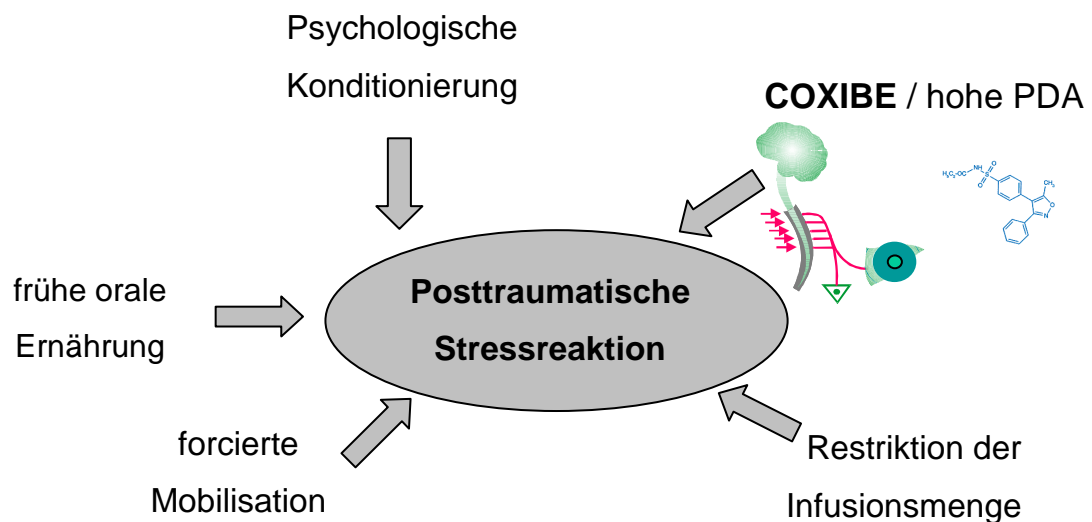
Für den Erfolg des Eingriffs ist neben einer subtilen Operationstechnik die perioperative Therapie entscheidend. Hierbei kommt der adäquaten Analgesie eine entscheidende Bedeutung zu, die zu einer Reduktion der perioperativen Morbidität beitragen kann^{3;4}.

Durch eine hochdosierte Opioidtherapie kann zwar eine zuverlässige Schmerzausschaltung erreicht werden, die hieraus resultierenden Nebenwirkungen müssen jedoch immer bedacht werden (Reduktion der Darmmotilität, Atemdepression, Sedierung, hypotensive Kreislaufstörungen, Toleranzentwicklung) und können die postoperative Morbidität der Patienten steigern⁵. Durch eine Kombinationstherapie aus Opioiden und nichtsteroidalen Antiphlogistika (non steroidal anti-inflammatory drugs = NSAID) lassen sich die Dosierungen der Opiode reduzieren, wodurch sich deren Nebenwirkungen ebenfalls abschwächen lassen^{6;7}. Perioperativ häufig eingesetzte NSAID sind vor allem das in Deutschland angewandte Novalgin (Metamizol), das Ibuprofen, das Voltaren oder auch das Paracetamol.

In den letzten Jahren hat sich eine neue Substanzklasse in der perioperativen Schmerztherapie etabliert. Coxibe, spezifische Cyclooxygenase-2 Hemmer (COX-2), galten lange Zeit als nebenwirkungsärmer. Zudem haben Coxibe eine höhere analgetische Potenz als die etablierten NSAID, sowie eine längere Wirkungszeit⁷⁻⁹. Durch mögliche kardiale Risiken sind sie mittlerweile jedoch in Verruf geraten und weitgehend aus den gängigen Therapiekonzepten in der perioperativen Therapie verschwunden^{8;10}.

In den letzten zehn Jahren hat die Verbesserung der perioperativen Therapie einen immer höheren Stellenwert eingenommen. Die beispielsweise von H. Kehlet initiierte "Fast-track"¹¹ Rehabilitation kombiniert Evidenz basierte perioperative Behandlungs-

maßnahmen (Abb. 1) zu einem Gesamtkonzept, mit dem Ziel, die allgemeinen postoperativen Komplikationen zu reduzieren, und die postoperative Rekonvaleszenz zu beschleunigen.



p

Abbildung 1: „Fast-track“ Rehabilitationskonzept (schematisch); (PDA = Periduralanalgesie)

1.1 Die Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase (COX) ist ein Enzym, welches den Abbau der Arachidonsäure aus Zellmembranen zu Eikosanoiden katalysiert.

Die Produkte der COX-1 übernehmen vor allem physiologische Funktionen, während die der COX-2 Schmerzen und Fieber induzieren, sowie eine Rolle in der Neovaskularisation und der Tumorgenese spielen¹²⁻¹⁴.

Physiologische Funktionen der COX-2 sind im Rahmen der Wundheilung, bei der Ovulation, Implantation und der Weheninduktion, dem Verschluss des Ductus Arteriosus Botalli, bei der Nierendurchblutung und auch der endothelialen Prostacyclinproduktion beschrieben^{15;16}.

Das COX-3 Isoenzym wurde im ZNS und dem Myokard identifiziert, aber auch in anderen Geweben konnte in der Spätphase einer Inflammation eine Aktivität nachgewiesen werden¹⁷⁻¹⁹.

Die Biosynthese der Prostaglandine erfolgt in mehreren Schritten. Durch die Wirkung der Phospholipase A₂ wird aus Membranphospholipiden die in dieser Position lokalisierte Arachidonsäure freigesetzt. In einer sauerstoffabhängigen Reaktion entsteht aus dieser unter Katalyse der Prostaglandin H-Synthase 2, bestehend aus der Cyclooxygenase 2 und einer Peroxidase, das Prostaglandin H₂ (PGH₂) als Muttersubstanz der Prostaglandine I₂, E₂ und F₂ (siehe Abb. 2).

Die Aktivität der Cyclooxygenase 2 wird durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1 und TNF α induziert.

PGE₂ führt in vielen Geweben durch Zunahme des cAMP-Gehaltes zur Relaxierung der glatten Muskulatur. Dies zeigt sich an der Uterusmuskulatur, an einer allgemeinen Vasodilatation sowie einer Erweiterung des Bronchialsystems. Im Magen hat PGE₂ einen zytoprotektiven Effekt durch Hemmung der HCl-Sekretion. Am Fettgewebe ist PGE₂ nach Insulin die am stärksten wirksame antilipolytische Verbindung, da es hier eine Senkung des cAMP-Spiegels auslöst. PGE₂ ist mit PGI₂ verantwortlich für die Erzeugung von Fieber, der Entzündungsreaktion und dem Entzündungsschmerz. Sie selbst sind allerdings nicht schmerzauslösend, sondern sensibilisieren die Nozizeptoren und bewirken so eine Hyperalgesie^{16;20}.

PGI₂ vermittelt neben einer Vasodilatation eine Zunahme der Gefäßpermeabilität.

PGD₂ wirkt bronchokonstriktorisch und spielt eine Rolle bei der Schlaferzeugung.

PGF₂ wirkt broncho- und vasokonstriktorisch²⁰.

Im Gegensatz zu nichtselektiven COX-Hemmern wie ASS oder Metamizol haben die selektiven COX-2 Hemmer keinen Einfluss auf die Thromboxan A₂ Bildung in Throm-

bozyten. Thromboxan A2 stimuliert die Thrombozyten zur Aggregation²⁰. Eine Hemmung dieses Vorganges wird über die COX-1 vermittelt.

Im Vergleich zu COX-1 Hemmern inhibieren COX-2 Hemmer nicht den zytoprotektiven Effekt von PGE2 auf die Magenschleimhaut. Die COX-2 kommt in der Magenschleimhaut nicht vor. In der Behandlung mit COX-2 Hemmern kommt es viel seltener zum Auftreten von Magenzulzera oder Perforationen als mit COX-1 Hemmern^{7;15;16;21-24}.

Coxibe wirken über eine selektive irreversible Hemmung der Cyclooxygenase 2 (siehe Abb. 2)

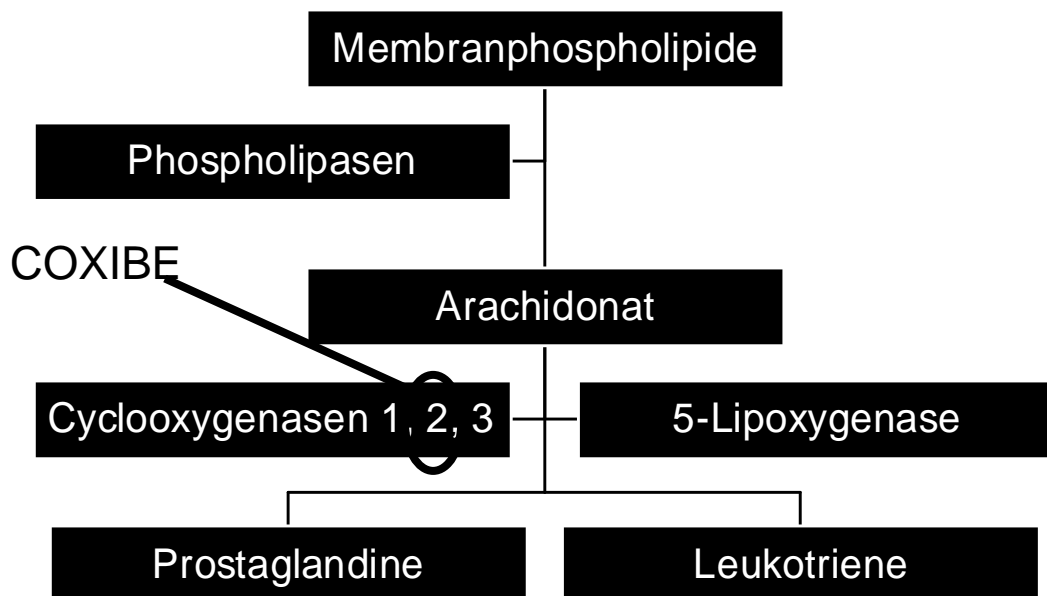


Abbildung 2: Hemmung der Cyclooxygenase 2 durch Coxibe

1.2 Medikamente

1.2.1 Valdecoxib (Bextra®)

Valdecoxib ist ein 4-(5-Methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl)Benzensulfonamid (ein 3,4-Diarylisoxazol-Derivat)⁷. Es kann oral oder auch als Prodrug (Parecoxib, Dynastat®)

intravenös verabreicht werden. Valdecoxib wird nach oraler Aufnahme rasch resorbiert und erreicht nach etwa drei Stunden die maximale Plasmakonzentration.

Das Medikament unterliegt einer ausgeprägten hepatischen Metabolisierung über verschiedene Abbauege, einschließlich über die Isoenzyme Cytochrom P-450 (CYP) 3A4 und CYP2C9 sowie CYP-unabhängige direkte Glukuronidierung der Sulfonamid-Untereinheit^{7;15;21;22}.

In der Literatur sind analgetische, antiphlogistische und antipyretische Effekte beschrieben²¹.

Es wirkt über eine selektive irreversible Hemmung der Cyclooxygenase 2. Diese wird durch Entzündungsreize und physiologische Adaptationsvorgänge exprimiert.

Im Gegensatz zu nichtselektiven COX-Hemmern wie ASS oder Metamizol haben die selektiven COX-2 Hemmer keinen Einfluss auf die Thromboxan A₂ Bildung in Thrombozyten. Thromboxan A₂ stimuliert die Thrombozyten zur Aggregation²⁰. Eine Hemmung dieses Vorganges wird über die COX-1 vermittelt.

Im Vergleich zu COX-1 Hemmern inhibieren COX-2 Hemmer nicht den zytoprotektiven Effekt von PGE₂ auf die Magenschleimhaut. Die COX-2 kommt in der Magenschleimhaut nicht vor. In der Behandlung mit COX-2 Hemmern kommt es viel seltener zum Auftreten von Magenulzera oder Perforationen als mit COX-1 Hemmern^{7;15;16;21-24}.

Die Anwendung von Valdecoxib ist kontraindiziert nach koronarer Bypassoperation. Hier zeigte sich in der CABG-Studie (2004) ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre / thromboembolische Ereignisse wie Myokardinfarkt, Schlaganfall / transitorische ischämische Attacken, Lungenembolie und tiefe Venenthrombosen.

Mit zunehmendem Wissen um die Entstehung und Entwicklung von Schmerzen konnte nachgewiesen werden, dass die COX-2 nach einer Verletzung zuerst peripher am Ort der Verletzung und später auch zentral im Rückenmark exprimiert wird²⁵. Aus dieser Feststellung kann geschlossen werden, dass durch die COX-2 Hemmung das Ausmaß

der Schmerzsensibilisierung minimiert werden kann, und damit der Bedarf weiterer Analgetika zur Kontrolle stärkerer Schmerzen reduziert werden könnte.

Die potenziell schweren Nebenwirkungen von Opioiden und nichtselektiven Cyclooxygenasehemmern können das mit jedem chirurgischen Eingriff verbundene Risiko noch erhöhen. Ältere Menschen, Patienten mit peptischen Ulzera in der Vorgeschichte oder einer erhöhten Anfälligkeit für perioperative Blutungen sowie für eine Atemdepression sind hier als Risikogruppe zu nennen.

Der Einsatz von Coxiben für die perioperative Phase birgt aus medizinischer Sicht viele Vorteile. Für COX-2 Hemmer liegen klinische Erfahrungen nach zahnchirurgischen Operationen, orthopädischen, allgemeinchirurgischen, gynäkologischen Operationen und nach koronaren Bypass-Operationen vor^{7;15;21;22}. Sämtliche Studien zeigen eine Verbesserung der postoperativen Schmerzkontrolle, wobei das perioperative Risiko im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht erhöht war. Die zwischenzeitlich erhobenen und schon erwähnten Daten aus der CABG Studie haben jedoch das Indikationsspektrum nachträglich eingeengt und zu einer Reduktion des Einsatzes der Coxibe in der Klinik geführt.

Nach gastrointestinalen Eingriffen lagen zum Zeitpunkt unserer Untersuchung keine ausreichenden Daten vor.

1.2.2 *Metamizol*

Metamizol ist ein in Europa routinemäßig perioperativ eingesetztes Analgetikum im Rahmen zahlreicher Operationen.

Es ist ein Pyrazolonderivat mit analgetischen, antipyretischen, spasmolytischen und leicht antiphlogistischen Eigenschaften^{5;16;26}. Die Wirkung wird über die Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2 vermittelt^{5;16;27}. Es kann oral, rektal, intramuskulär und intravenös verabreicht werden^{5;16;26}.

Metamizol wird nach oraler Gabe vollständig zum pharmakologisch wirksamen 4-N-Methylaminoantipyrin hydrolysiert. Die Bioverfügbarkeit von 4-N-Methylaminoantipyrin liegt bei ca. 90% und ist nach oraler Gabe etwas höher als nach parenteraler Gabe.

Nach intravenöser Gabe beträgt die Plasmahalbwertszeit für Metamizol ca. 14 Minuten. Etwa 96% einer radioaktiv markierten Dosis werden nach intravenöser Gabe im Urin und etwa 6% in den Faeces wiedergefunden.

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen dieses Medikamentes sind v.a. die Agranulozytose (<0,01%), die Leukozytopenie (<0,01%) und Thrombozytopenie (<0,01%), das Lyell-Syndrom (<0,01%) sowie Blutdruckabfall bis hin zum Schock ($\geq 0,1 - <1\%$)^{5;26}.

1.2.3 Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene bzw. 3,4',5-stilbenetriol)^{28;29} ist ein natürlich vorkommendes phenolisches Phytoalexin²⁸. Es wird von Samenpflanzen produziert (z.B. Weintrauben) als Antwort auf Verletzungen oder bei Pilzbefall²⁸. Die Molekularformel ist C₁₄H₁₂O₃³⁰. Resveratrol liegt als cis- und trans-Isomer vor. Das trans-Isomer stellt seine Hauptform dar²⁸.

Resveratrol wirkt über eine selektive Hemmung der Cyclooxygenase 1 sowohl analgetisch als auch antiphlogistisch^{31;32}. Ausserdem hat es möglicherweise eine kardioprotektive Funktion, da es die Oxidation von LDL verhindert und die Plättchenaggregation inhibiert³².

Informationen über die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Resveratrol sind unvollständig und unsicher. Es liegen keine humanen in vivo Studien vor.

Resveratrol ist auf dem deutschen Markt nicht zugelassen, in den USA ist es als Vitaminpräparat frei erhältlich.

2 FRAGESTELLUNG

Die gastrointestinalen Effekte von Valdecoxib und Parecoxib, zwei Vertreter der selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmer, und ihre Effekte auf die Thrombozytenfunktion entsprechen einem im Vergleich zu herkömmlichen NSAID verbesserten Sicherheitsprofil, das auf die selektive COX-2 Hemmung zurückzuführen ist⁷. Zwischenzeitlich (September 2004) wurde jedoch der selektive COX-2 Hemmer Rofecoxib aufgrund seiner möglichen Nebenwirkungen (kardiovaskuläre Ereignisse) nach langfristiger Gabe (18 Monate) vom Markt genommen (APPROVe Studie)^{8;10}. Im April 2005 folgte die Rücknahme von Valdecoxib.

Es liegen bisher keine Hinweise vor, ob diese unerwünschten Arzneimittelwirkungen auch bei kurzfristiger Gabe, wie z.B. bei einer perioperativen Applikation von 7-14 Tagen nach Dickdarmresektionen, auftreten können.

Ebenfalls offen ist die aus chirurgischer Sicht wesentliche Frage, ob Coxibe einen Einfluss auf die Inzidenz der beiden schwerwiegendsten Komplikationen in der Kolonchirurgie haben: die Anastomoseninsuffizienz (Komplikationsrate 0 - 15%)³³ in der frühen postoperativen Phase und der durch beispielsweise Verwachsungen bedingte Ileus im Spätverlauf. Vor einem gezielten Einsatz dieser Medikamente muss deshalb unbedingt geklärt werden, ob es zu einer höheren Insuffizienzrate nach Dickdarmresektionen unter dem Einfluss von Coxiben kommen kann.

Wir untersuchten deshalb in einer randomisierten Studie in einem standardisierten Tiermodell, ob sich die Stabilität und die Insuffizienzrate von Dickdarmanastomosen nach Gabe des selektiven COX-2 Hemmers Valdecoxib im Vergleich mit einem selektiven COX-1 Hemmer, einem unselektiven COX-Hemmer und einer Kontrollgruppe unterscheiden.

Als etabliertes Verfahren zur Beurteilung einer Anastomose gilt die Messung des Bers-tungsdrucks. Dies war das Hauptzielkriterium der Studie.

Folgende Hypothesen wurden formuliert:

H0 = Die perioperative Therapie mit Coxiben beeinflusst den Berstungsdruck von Kolonanastomosen im Kaninchentiermodell nicht.

H1 = Die perioperative Therapie mit Coxiben beeinflusst den Berstungsdruck von Kolonanastomosen im Kaninchentiermodell.

Nebenzielkriterien waren die Gefäßdichte in der Anastomosenregion, Entzündungszeichen /-zellen im Resektionsgebiet und abdominelle Verwachsungen, analysiert nach dem

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studienablauf

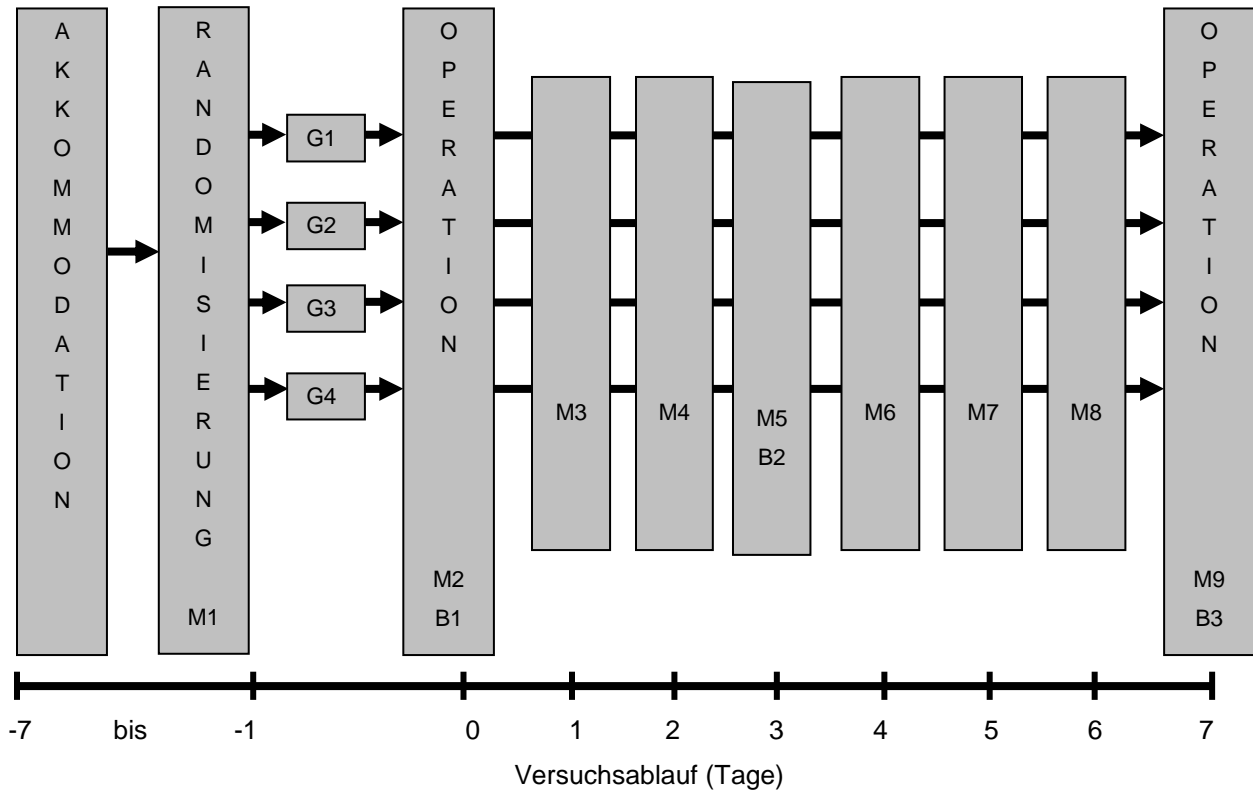
Nach erteilter Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit des Senats von Berlin für das Protokoll Nr. G0056/04 wurden insgesamt 80 weibliche New Zealand White Rabbits (Charles River Kißlegg, Deutschland) mit einem Gewicht von 1.6 bis 2.1 kg in der tierexperimentellen Abteilung der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte unter Standardbedingungen bei Futter und Wasser ad libitum gehalten.

Die Studie wurde als prospektiv randomisierte, geblindete experimentelle Studie geplant und durchgeführt.

Die Stichprobengröße wurde in Bezug auf das Hauptzielkriterium, den Berstungsdruck der Anastomose, berechnet. Bei einem angenommenen Berstungsdruck von 90 mmHg wurde eine Abweichung von 20mmHg Standardabweichung als relevant angesehen. Bei der Berechnung wurde deshalb davon ausgegangen, dass eine Reduktion des Berstungsdrucks im Vergleich zur Kontrollgruppe um mindestens 20 mmHg klinisch relevant wäre. Bei einem Fehler 1. Art von 5% ($\alpha=0.05$) und einem Fehler 2. Art von 20% ($\beta=0.2$) ergab sich im zweiseitigen Test ein Stichprobenumfang von 20 Tieren pro Gruppe bei einer Power von 80%.

Für die Dauer der Studie wurden die Kaninchen durch eine Veterinäringenieurin und eine Tierpflegerin betreut. Täglich wurden das Fressverhalten, der Aktivitätsstatus, das Gewicht und etwaige Auffälligkeiten der Tiere kontrolliert und dokumentiert.

Nach einer Akkommodationszeit von einer Woche erfolgte die Randomisierung der Tiere mit Hilfe eines Zufallsgenerators (www.randomization.com) in 4 Gruppen à 20 Tiere. Versuchsablauf (schematisch) siehe Abbildung 3.



M = Medikamentengabe, B = Blutentnahme, G = Gruppe

Abbildung 3: Versuchsablauf (schematisch)

20 Tiere erhielten präoperativ, am OP-Tag und an den sieben darauffolgenden postoperativen Tagen 10 mg Bextra[®] (Valdecoxib; Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) einmal täglich oral per Knopfkanüle verabreicht.

20 Tiere erhielten 250mg Novaminsulfon[®] (Metamizol; Lichtenstein Pharmazeutica GmbH & Co. OHG, Fürstenfeldbruck, Deutschland),

20 Tiere erhielten 5mg/kg Resveratrol[®] (Resveratrol, LKT Laboratories Inc, St. Paul, Minnesota USA) und 20 Tiere dienten als Kontrollgruppe.

3.2 Operationsverlauf

Am Operationstag wurde den Tieren Blut aus dem aurikulären Venenplexus zur Bestimmung der Laborparameter Harnstoff und Kreatinin abgenommen. Danach wurden sie mit einer Ketanest® Domitor® Narkose betäubt (im. Injektion von 50mg/kg Ketaminhydrochlorid , Hoechst AG, Frankfurt/Main, Deutschland und 0,1ml/kg Medetomidinhydrochlorid, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

In Rückenlage wurde das Abdomen mit Softasept®N (B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und steril abgedeckt. Operiert wurde mit puderfreien Latex-Handschuhen (Gammex®PF, Ansell GmbH, München, Deutschland).

Nach einer 5cm langen Laparotomie (Abb.4) wurde der Dünndarm exploriert und dargestellt (Abb. 5 und 6).

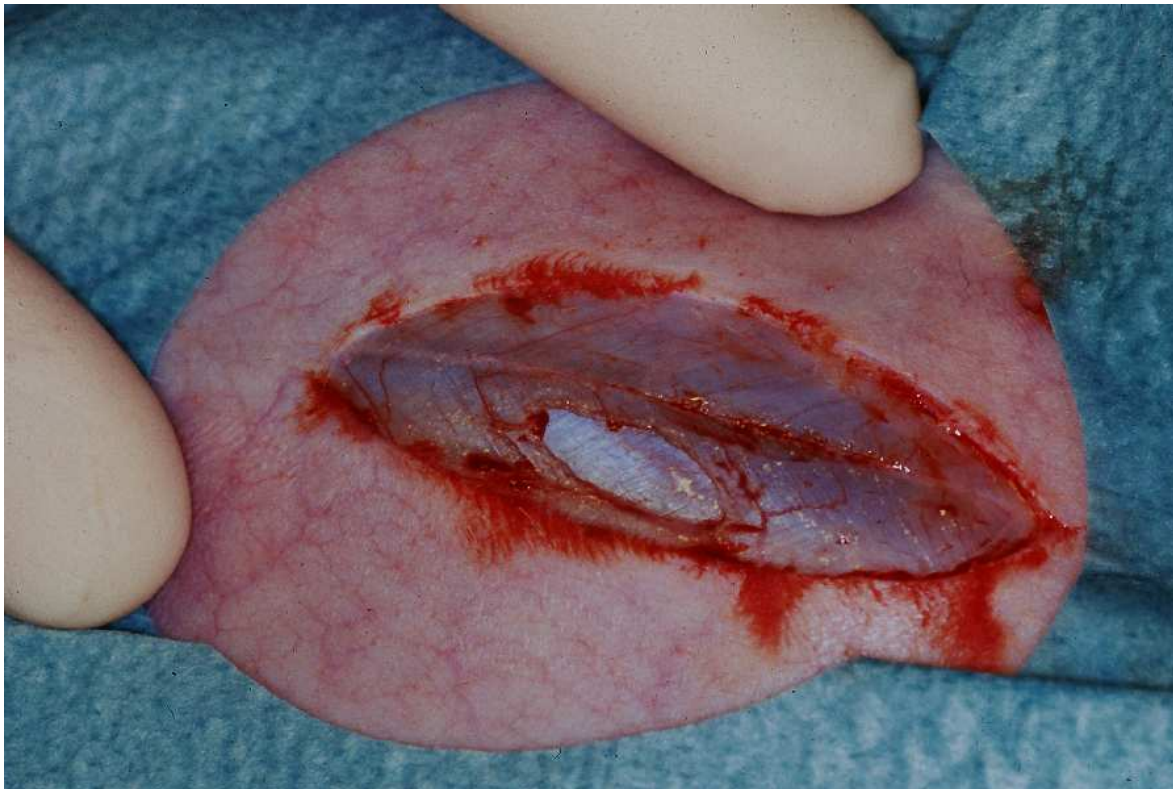


Abbildung 4 : Laparotomie



Abbildung 5: Dünndarm

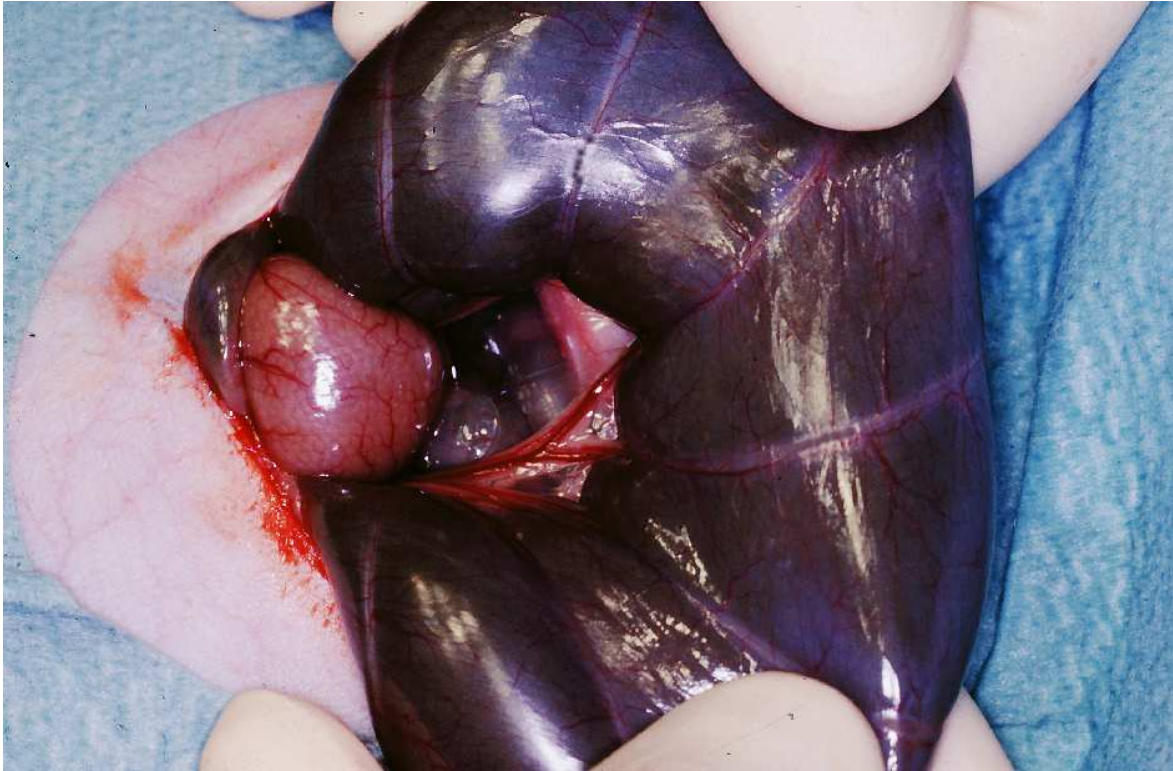


Abbildung 6: Darstellung des Dünndarms

Nach Aufsuchen des terminalen Ileums wurde aboral davon ein 10cm langes Darmstück reseziert (Zökumresektion). Hierzu erfolgte das schrittweise Absetzen des zugehörigen Darmmesenteriums unter Overholtklemmen.

Danach wurden das proximale und distale Ende des zu resezierenden Darmabschnitts mit weichen Darmklemmen schonend abgeklemmt (Abb. 7) und der Abschnitt mit dem Skalpell reseziert (Abb. 8).

Nach Spülung und Blutstillung des OP-Gebietes erfolgte die Wiederherstellung der Kontinuität des Darmes durch eine zweireihige fortlaufende Naht des Darmes entsprechend dem operativen Klinikstandard der Charité mit PDS[®] 4/0 Nahtmaterial (Ethicon, Nordestedt, Deutschland) (Abb. 9 bis 12).

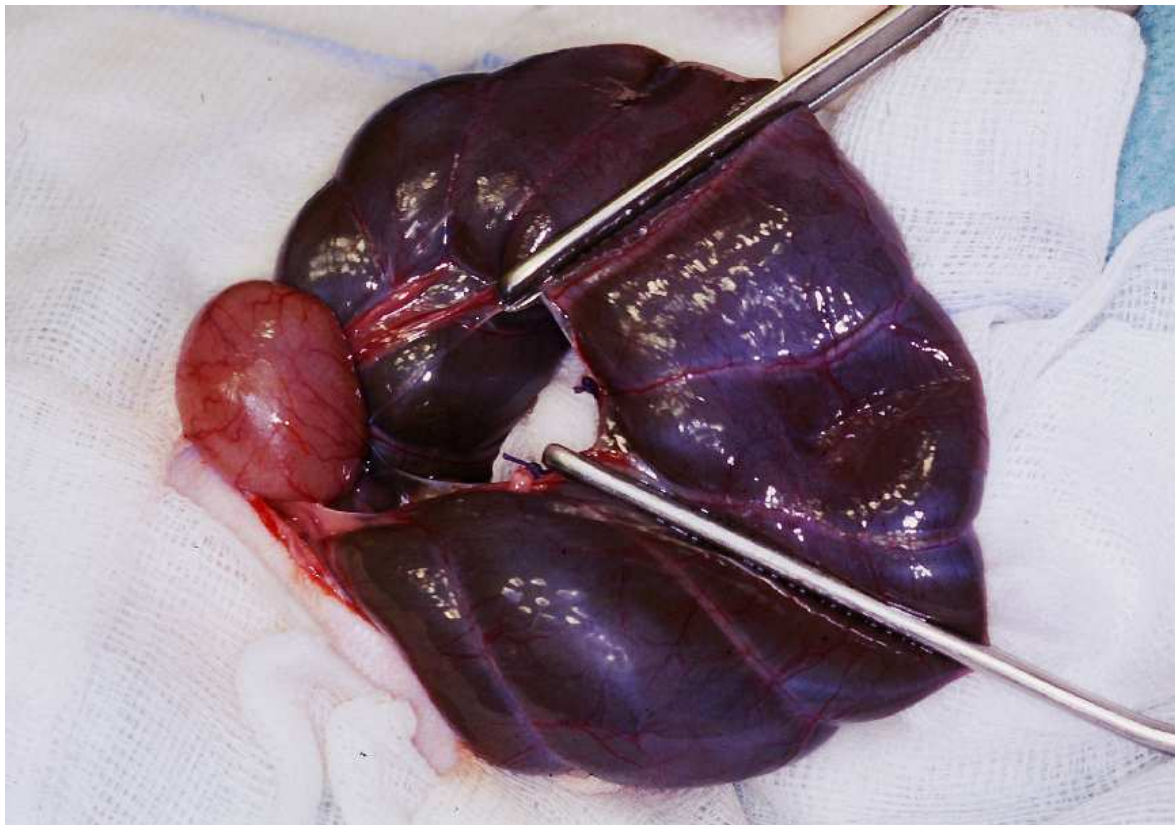


Abbildung 7: Abklemmen des zu resezierenden Darmabschnitts



Abbildung 8 : Resektion des Darmabschnitts



Abbildung 9: Beginn der Naht an der Hinterwand der Anastomose



Abbildung 10: Fertige Naht der Hinterwand der Anastomose



Abbildung 11: Naht der Vorderwand der Anastomose



Abbildung 12: komplette Anastomose

Nach sorgfältiger Kontrolle auf Bluttrockenheit erfolgten eine Spülung des OP-Gebietes mit den Antibiotika Zinacef[®] (35mg/kg KG Cefuroxim, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München, Deutschland) und Metronidazol[®] (2.5mg/kg KG Metronidazol, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) und dann der schichtgerechte Verschluss der Bauchdecke mit einer Vicryl 3/0[®] Subkutannaht (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und Ethibond 4/0[®] Einzelknopfhautnaht (Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Zur postoperativen Analgesie wurde als Basisanalgesie Tramal[®] (50mg/500ml H₂O Tramadol, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) in das Trinkwasser der Tiere gegeben. Zusätzlich erhielten die Tiere der Verum-Gruppen die tägliche Arzneimittel- oder Wasserapplikation entsprechend der Randomisierung.

Am dritten postoperativen Tag wurde den Tieren erneut Blut aus dem aurikulären Venenplexus zur Bestimmung der Laborparameter Kreatinin, Harnstoff, C-reaktives Prote-

in, Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCHC, MCV, RDW, Thrombozyten und MPV abgenommen.

Am siebten postoperativen Tag erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie am ersten Operationstag (Betäubung der Tiere, sterile Abdeckung des Abdomens) die Öffnung des Bauchraumes.

Es wurde der Verwachsungsscore nach Tyrell et al.³⁴ durch zwei geblindete Operateure (PD Dr. Mall und Dr. Neuß, beide Mitarbeiter der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte) bestimmt. Dies ist ein etablierter Bewertungsmaßstab für Adhäsionen (Abbildung 13). Zusätzlich wurde der Bauchraum auf Anzeichen einer Peritonitis untersucht.





Grad 0		keine Adhäsionen
Grad 1		Minimale Adhäsionen, die sich stumpf leicht von der Serosa trennen lassen
Grad 2		Mäßige Adhäsionen, die sich stumpf schwer von der Serosa trennen lassen
Grad 3		Dichte Adhäsionen, die sich nur scharf von der Serosa trennen lassen

Abbildung 13: Adhäsionsscore nach Tyrell et al.³⁴.

Anschließend wurde Blut aus der Vena Cava inf. entnommen.

Zusätzlich zu den Laborparametern, die am dritten postoperativen Tag abgenommen wurden, wurden die Gerinnungsparameter TPZ, TPZ-INR, PTT, Fibrinogen, Faktor XIII und D-Dimer bestimmt.

Alle Laborparameter wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Charité, Campus Mitte (Klinikdirektor: Prof. Dr. Eckhardt Köttgen) bestimmt.

Anschließend wurden die Tiere mit einer iv. Injektion mit T61 (0.3 ml/kg T61, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) schmerzlos getötet. Die reanastomosierten Darmabschnitte wurden entfernt und der Berstungsdruck gemessen (s.u.).

3.3 Messung des Berstungsdruckes und Klassifizierung der Berstungsstelle

Unmittelbar nach der Entnahme der reanastomosierten Darmabschnitte am zweiten Operationstag wurden diese auf einer definierten Länge von 10cm aufgespannt, wobei die Anastomose in der Mitte lag.

An der einen Seite des Darmes wurde ein Druckabnehmer (arterieller Druckmessungskatheter, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zur Messung des intraluminalen Druckes angeschlossen und mit einem computergestützten Monitorsystem verbunden (Sirecust, Siemens AG, München, Deutschland). An der anderen Seite wurde ein Füllungskatheter eingeführt und mit einer Tabaksbeutelnaht flüssigkeits- und gasdicht fixiert. Dann wurde das Darmresektat manuell mit zunächst 100ml H₂O über eine Blasenspritze vorgefüllt. Danach wurde an der dem Druckabnehmer gegenüberliegenden Seite des Darmes eine Infusionspumpe angeschlossen, welche 50 ml H₂O/h in den Darm infundierte.

Es sollte überprüft werden, bei welchem Druck Wasser durch die Anastomose austritt. Nach Ermittlung dieses sogenannten Berstungsdruckes wurde die Berstungsstelle klassifiziert. Diese lag entweder innerhalb der Anastomose, anastomosennah (in einem Umkreis von zwei Zentimetern von der Anastomose entfernt) oder anastomosenern (>2 cm).

Bildete sich in der Anastomosenregion ein intramuraler Abszess aus, haben wir dieses als Anastomoseninsuffizienz, entsprechend einer gedeckten Perforation, gewertet. In diesem Fall wurde der Berstungsdruck, entsprechend dem Vorgehen bei der freien oder offenen Perforation, gleich null gesetzt.

3.4 Immunhistochemische Aufarbeitung der Anastomosenpräparate

Nach Ermittlung des Berstungsdruckes wurden die resezierten Darmabschnitte in Formalin fixiert und anschließend immunhistochemisch auf eventuell vorhandene Unterschiede in der Gefäßdichte in den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe untersucht.

Hierzu wurden in Formalin fixierte Paraffin-Blöcke der pathologischen Präparate in 4µm Schnitte mit dem Mikrotom zugeschnitten. Für die Aufarbeitung der Präparate mussten diese wieder entparaffinisiert werden. Dazu wurde der Objektträger dreimal drei Minuten in Xylol inkubiert und danach direkt in eine absteigende Alkoholreihe überführt (zweimal drei Minuten in 100%igem Ethanol, zweimal drei Minuten in 96%igem Ethanol, drei Minuten in 80%igem Ethanol und drei Minuten in 70%igem Ethanol). Nach der Alkoholreihe wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser rehydriert und anschließend im Schnellkochtopf mit einem Citratpuffer vorbehandelt (Citratpuffer: 3,78g Zitronensäure und 24,21g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Bidest auf 1000ml auffüllen; Mischung des Citratpuffers im Verhältnis 1:10 mit Aqua Dest). Diese Vorbehandlung gewährt eine bessere Aufnahmefähigkeit des primären Antikörpers.

Daraufhin erfolgte die Inkubation des Objektträgers in TBS-Puffer (TBS: 9,0g TRIS-Base, 68,5g TRIS-HCl und 87,8g NaCl mit Bidest auf 1000ml auffüllen) und anschließend die Bearbeitung mit zwei Tropfen Protein Block (DakoCytomation GmbH, Hamburg; Protein Block, Serum-Free, Code X0909). Der Protein-Block verhindert eine nicht spezifische Anfärbung während der immunhistochemischen Ermittlung von Antigenen.

Nun konnte der primäre Antikörper (DakoCytomation GmbH, Hamburg; Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell, Clone JC70A, Code-Nr. M 0823 in einer Verdünnung von 1:150 mit Antibody Diluent Code-Nr. S 0809) hinzugegeben werden.

Der Antikörper CD31 markiert Gefäße und ermöglicht dadurch eine Bestimmung der Gefäßdichte in umschriebenen Gewebeabschnitten.

Die Objektträger wurden 24h in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden sie einmal mit einer TBS/Tween 20 (0,1%) Lösung und zweimal mit einer TBS Lösung (Zusammensetzung TBS s.o.) gewaschen, bevor sie mit dem sekundären biotynilierten

Antikörper (Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK; Biotin-SP conjugated Affini Pur Goat Anti-Mouse IgG + IgM, Code-Nr. 115-065-044) für 20 Minuten versetzt wurden. Wiederholung des Waschvorganges. Anschließend 30minütige Inkubation mit Alkaline Phosphatase SS Label (Biogenex, California, USA; Super Sensitive Detection Kit, Code-Nr. QA 900-9L) und dann Wiederholung des Waschvorganges.

Die Farbdarstellung der Präparate erfolgte durch 30minütige Färbung mit Fast Red (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; SIGMA FAST, Fast Red TR/Naphthol, AS-MX Tablet Set, F- 4523). Die Farbreaktion wurde mit Aqua Dest abgestoppt. Dann wurde der Kern mit Hämalun (Dr. K. Hollborn & Söhne; Code-Nr. H02-1000) nach Mayer für 15 Sekunden gegengefärbt. Danach folgten das Auswaschen der Objektträger mit Wasser und die Deckung mit Deckgläschen.

Positiv- und Negativkontrollen werden bei allen Färbungen zur Überprüfung der Methode mitgeführt.

Die Gefäßdichte (Angiogenesescore) wurde nach der von Saclarides et al.³⁵ beschriebenen Methode ermittelt. Hierbei erfolgte die mikroskopische Untersuchung der gefärbten Schnitte durch zwei unabhängige, geblindete Untersucher (PD Dr. Mall und Dr. Neuß, beide Mitarbeiter der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte).

In jedem Präparat wurden unter 200facher Vergrößerung sechs Felder in einem Quadratzenimeter ausgezählt. Die Anzahl der Gefäße in jedem Feld wurde addiert und der Mittelwert gebildet.

3.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung der Anastomosenpräparate

Um Entzündungszeichen im Resektionsgebiet beurteilen zu können, mussten die Anastomosenpräparate mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt werden.

Nach Erwärmung der Präparate über zehn Minuten bei 90°C im Inkubator erfolgte die Deparaffinisierung. Der Objektträger wurde dreimal zehn Minuten in Xylol inkubiert und danach direkt in eine absteigende Alkoholreihe überführt (fünf Minuten in 98%igem Isopropanolol, fünf Minuten in 96%igem Isopropanolol, fünf Minuten in 90%igem Isopropa-

nolol, fünf Minuten in 80%igem Isopropanolol und fünf Minuten in 70%igem Isopropanolol). Nach der Alkoholreihe wurde der Objektträger über fünf Minuten mit Aqua dest rehydriert und im Anschluss über fünf Minuten mit Hämalaun nach Mayer angefärbt (Hämalaun nach Mayer: 1g Hämatoxylin mit 0,2g Natriumjodatin und 50g Kalilaun in einem Liter destilliertem Wasser lösen. Zugabe von 50g Chloralhydrat und 1g kristalliner Zitronensäure. Vor Gebrauch filtrieren). Der Objektträger wurde unter fließendem Wasser abgespült und 15 Minuten gebläut. Anschließend wurde er über drei Minuten mit 1%igem Eosin versetzt, bevor er kurz mit destilliertem Wasser abgespült und in eine aufsteigende Alkoholreihe überführt wurde (fünf Sekunden in 70%igem Isopropanolol, fünf Sekunden in 80%igem Isopropanolol, fünf Sekunden in 90%igem Isopropanolol und zweimal fünf Minuten in 100%igem Isopropanolol). Danach wurde der Objektträger drei Minuten in Xylol inkubiert und in Eukitt (NOVOGLAS, Bern; Code-Nr. 1026/500) eingedeckt.

Die eingefärbten Präparate wurden von zwei unabhängigen, geblindeten Mitarbeitern des Institutes für Pathologie (Campus Charité Mitte, PD Dr. Denkert und Dr. Weichert) mikroskopisch auf die Ausdehnung und Tiefe eventuell vorhandener Ulcera, Auftreten und Anzahl von Granulozyten und Lymphozyten, Qualität des Bindegewebes und Menge des vorhandenen Granulationsgewebes hin untersucht.

3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Alle Daten wurden in einer relationalen Datenbank (SPSS Data Entry System Version 3.0 für Windows 2000) erfasst und mit den Statistikprogrammpaketen SPSS (SPSS for Windows, Version 12.0) und SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. R. 9.1) statistisch ausgewertet. Kategoriale Daten wurden zwischen den Gruppen mit dem χ^2 -Test (bzw. Fishers exaktem Test) und metrische nicht normalverteilte Daten mit dem Mann-Whitney-U Test jeweils zwischen zwei Gruppen verglichen.

Die paarweisen Tests wurden im explorativen Sinn betrachtet, deshalb erfolgte keine Adjustierung des Signifikanzniveaus.

Zur Untersuchung des Verlaufs von Laborparametern über die Zeit wurde eine zweifaktorielle, nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholungen heran-

gezogen, um Unterschiede zwischen den Gruppen, Unterschiede im Zeitverlauf und Wechselwirkungen zwischen den Gruppen und/oder der Zeit aufzudecken³⁶.

P-Werte kleiner als 0.05 wurden als signifikant definiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Allgemeinzustand, Aktivitätsstatus, Fressverhalten und Gewicht

Ein Tier der Kontrollgruppe starb bei der Operation an einer akuten kardialen Dekompensation. Die anderen Operationen verliefen komplikationslos.

Am ersten postoperativen Tag verstarb ein Tier aus der Metamizolgruppe und am siebten postoperativen Tag ein Tier aus der Valdecoxibgruppe.

Die Todesursachen sind trotz der unmittelbar durchgeführten Kadavereröffnungen ungeklärt. Eine Anastomoseninsuffizienz ließ sich jedoch ausschließen.

Im Beobachtungszeitraum zeigten sich bezüglich des Aktivitätsstatus, des Fressverhaltens und des Gewichts keine Unterschiede zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe.

Alle Tiere begannen noch am Operationstag wieder zu fressen. Das weitere Fressverhalten und der Aktivitätsstatus waren nicht unterschiedlich zu bewerten.

Das Gewicht der Tiere reduzierte sich in den ersten Tagen nach der Operation leicht. Das durchschnittliche präoperative Gewicht betrug 2,04 kg (0,12 kg Standardabweichung).

Postoperativ lagen die Mittelwerte am 3. Tag bei 1,88 kg (0,12 kg) und am 7. Tag bei 1,96 kg (0,15 kg).

Es gab keine Unterschiede im Gewichtsverlauf über die Zeit zwischen den Verumgruppen und der Kontrollgruppe ($p = 0,101$)

Gruppe	KG präoperativ	KG 3. postoperativer Tag	KG 7. postoperativer Tag
	Mittelwert (Minimum- Maximum)	Mittelwert (Minimum- Maximum)	Mittelwert (Minimum- Maximum)
Valdecoxib	2 (1,75-2,25)	1,84 (1,6-2,05)	1,89 (1,65-2,2)
Metamizol	2,05 (1,85-2,15)	1,88 (1,65-2,05)	1,93 (1,5-2,15)
COX-1-Hemmer	2,1 (1,9-2,3)	1,94 (1,7-2,1)	2,05 (1,9-2,2)
Kontrolle	2 (1,65-2,15)	1,87 (1,65-2,05)	1,96 (1,7-2,1)

Tabelle 1: Körpergewicht (KG) der Kaninchen präoperativ, am 3.postoperativen Tag und am 7. postoperativen Tag in kg

4.2 Inspektion der Darmnaht und Anastomoseninsuffizienzen

Die Inspektion der Darmnaht zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,349$) zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe.

Vier Tiere bildeten eine Anastomoseninsuffizienz aus, davon drei aus der Metamizolgruppe und eines aus der Resveratrolgruppe.

Bei keinem der Tiere ließ sich eine Ischämie der Darmnaht beobachten.

Drei Tiere bildeten kleine Stichkanalabszesse um die Anastomose aus, davon eines aus der Valdecoxibgruppe, eines aus der Metamizolgruppe und eines aus der Kontrollgruppe.

Ein Tier aus der Metamizolgruppe bildete eine Narbenhernie aus. Ein Tier aus der Kontrollgruppe hatte eine durchgängige Stenose. Keines dieser Vorkommnisse wirkte sich negativ auf den Berstungsdruck aus.

Bei allen anderen Tieren konnte makroskopisch kein pathologischer Befund der Darmnaht festgestellt werden.

Gruppe	ohne pathologischen Befund	Ischämie	Insuffizienz	Sonstiges
Valdecoxib	18	0	0	1
Metamizol	14	0	3	2
COX-1-Hemmer	19	0	1	0
Kontrolle	17	0	0	2

Tabelle 2: Inspektion der Darmnaht

4.3 Messung des Berstungsdrucks (Hauptzielkriterium) und Klassifizierung der Berstungsstelle

Die Ergebnisse der Berstungsdruckmessungen sind in Abbildung 14 und Tabelle 3 dargestellt.

Der Mittelwert der Berstungsdrücke der Anastomosen war in der Valdecoxibgruppe mit 110 mmHg (48-180 mmHg) am höchsten.

Der Mittelwert der Berstungsdrücke der Metamizolgruppe war 80 mmHg (0-156 mmHg), der der Resveratrolgruppe 97 mmHg (0-152 mmHg) und der Mittelwert der Kontrollgruppe 98 mmHg (39-152 mmHg).

Der Unterschied zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,259$).

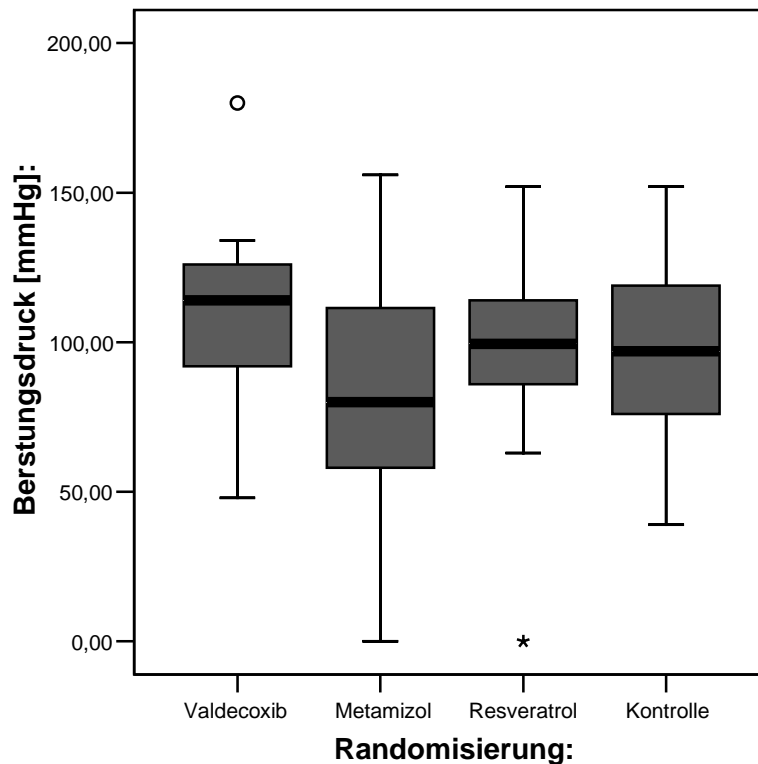


Abbildung 14: Berstungsdruckmessung der Anastomosen am siebten postoperativen Tag

Gruppe	Mittelwert (Minimum-Maximum) [mmHg]
Valdecoxib	110 (48-180)
Metamizol	80 (0-156)
Resveratrol	97 (0-152)
Kontrolle	98 (39-152)

Tabelle 3: Ergebnisse der Berstungsdruckmessung

Auch die Auswertung der Berstungsstelle zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe.

Bei drei Tieren lag die Berstungsstelle innerhalb der Anastomose, davon gehörten zwei Tiere zur Valdecoxibgruppe und ein Tier zur Kontrollgruppe ($p = 0,371$).

Bei 23 Tieren lag die Berstungsstelle in einem Abstand von 2 cm um die Anastomose (anastomosennah), davon stammten fünf Tiere aus der Valdecoxibgruppe, drei aus der

Metamizolgruppe, sieben aus der Resveratrolgruppe und acht aus der Kontrollgruppe ($p = 0,229$).

Bei allen anderen Tieren lag die Berstungsstelle anastomosennah ($p = 0,061$; Tab. 4).

Gruppe	innerhalb der Anastomose	anastomosennah	Anastomosennah
Valdecoxib	0	5	14
Metamizol	0	3	16
COX-1-Hemmer	0	7	13
Kontrolle	0	8	11

Tabelle 4: Klassifizierung der Berstungsstelle

4.4 Entzündungszeichen im Resektionsgebiet

Die Auswertung der Entzündungszeichen im Resektionsgebiet zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe ($p = 0,533$). Bis auf ein Tier aus der Kontrollgruppe bildeten alle Tiere postoperativ ein Ulcus aus (Abb. 15 und 16).

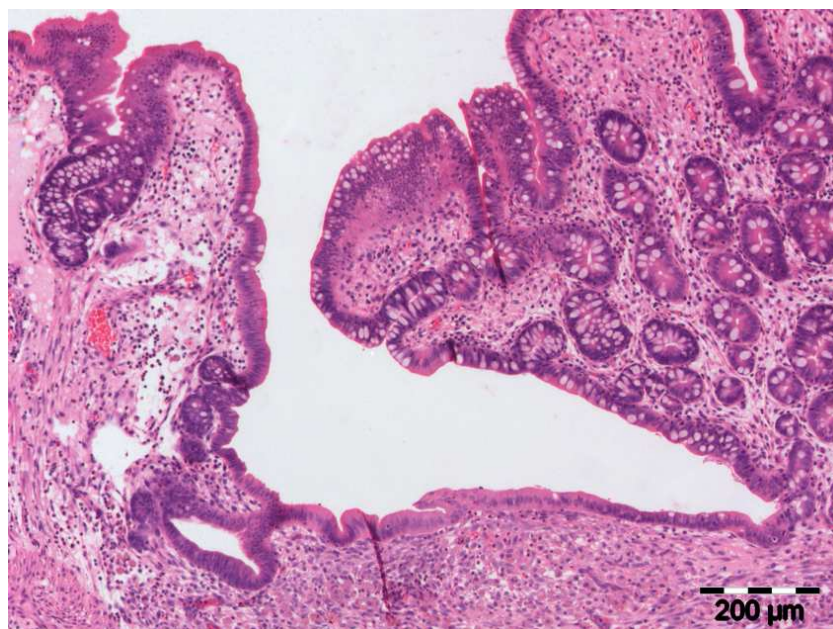


Abbildung 15: Querschnitt durch die Mukosa in der Anastomosenregion eines mit Valdecoxib behandelten Tieres. Es zeigt sich geringe Ulzeration und spärliches Entzündungsinfiltrat in der Lamina propria (Hämatoxylin-Eosin Färbung).

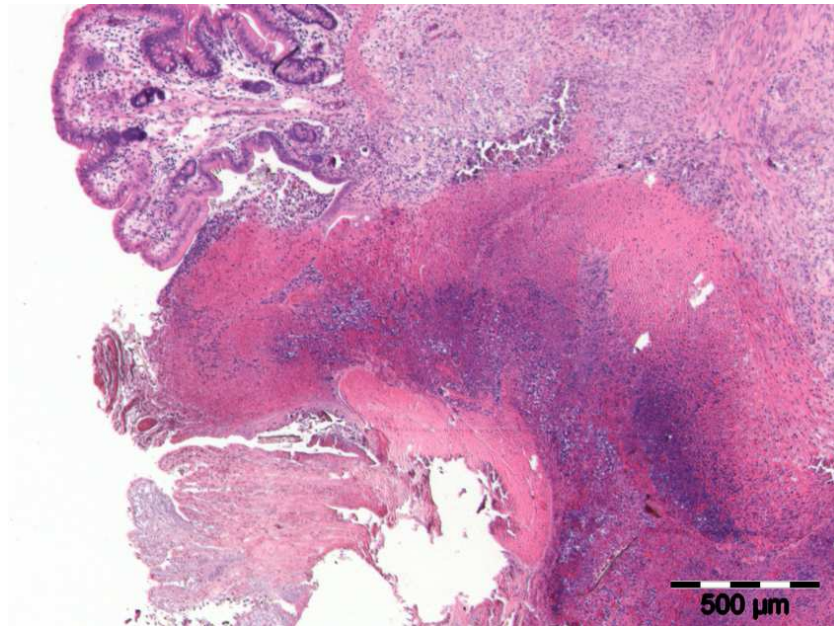


Abbildung 16: Querschnitt durch die Mukosa in der Anastomosenregion eines Tieres aus der Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine tiefe Ulzeration der Kolonmukosa und dichtes Entzündungsinfiltrat (überwiegend Granulozyten) in der Lamina propria (Hämatoxylin-Eosin Färbung).

Gruppe	Kein Ulcus	Erosion	Ulcus erreicht die Submukosa	Ulcus erreicht die Muskularis	Ulcus erreicht das Fettgewebe
Valdecoxib	0	0	0	9	8
Metamizol	0	0	5	4	7
COX-1-Hemmer	0	0	2	7	11
Kontrolle	1	0	2	8	8

Tabelle 5: Klassifizierung der Entzündung: Ulcustiefe

Es zeigte sich weder in der Ulcustiefe ($p = 0,27$) noch in der Ulcusausdehnung ($p = 0,36$) ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (Tab. 5 und 6).

Gruppe	Klein (Ulcus < 20 % der Fläche)	Mittel (Ulcus 20 – 40 % der Fläche)	Groß (Ulcus > 40 % der Fläche)
Valdecoxib	0	7	10
Metamizol	4	4	8
COX-1-Hemmer	2	5	13
Kontrolle	2	6	11

Tabelle 6: Klassifizierung der Entzündung: Ulcusausdehnung

Granulozyten traten in jeder Wunde auf und bildeten hauptsächlich ein fokal konfluierendes Infiltrat (Tab. 7).

Gruppe	keine	vereinzelt	lockeres Infiltrat	fokal konfluie- rendes Infiltrat
Valdecoxib	0	0	7	10
Metamizol	0	1	8	7
COX-1- Hemmer	0	1	6	13
Kontrolle	0	2	4	13

Tabelle 7: Klassifizierung der Entzündung: Granulozyten

Lymphozyten wurden in keiner Wunde gefunden.

Das Bindegewebe war in allen Wunden locker, so dass auch dieses Wund- bzw. Anastomosenkriterium zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich war ($p = 0,45$; Tab. 8).

Gruppe	locker	Fibrös
Valdecoxib	17	0
Metamizol	16	0
COX-1-Hemmer	20	0
Kontrolle	19	0

Tabelle 8: Klassifizierung der Entzündung: Bindegewebe

Die Quantifizierung des Granulationsgewebes ergab keinen statistischen Unterschied ($p = 0,533$) zwischen den Gruppen (Tab. 9).

Gruppe	wenig	mittel	Viel
Valdecoxib	1	7	9
Metamizol	5	3	8
COX-1-Hemmer	2	7	11
Kontrolle	2	9	8

Tabelle 9: Klassifizierung der Entzündung: Granulationsgewebe

4.5 Angiogenescore

Die Ergebnisse der Gefäßdichtemessung sind in Abbildung 17 und Tabelle 10 dargestellt.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe.

Der Mittelwert des Angiogenesescores der Valdecoxibgruppe war 21.05 Gefäße/cm², der der Metamizolgruppe 20.26 Gefäße/cm², der Mittelwert der Resveratrolgruppe war 24.50 Gefäße/cm² und der der Kontrollgruppe 23.05 Gefäße/cm² und somit ebenfalls statistisch nicht unterschiedlich (p = 0,33).

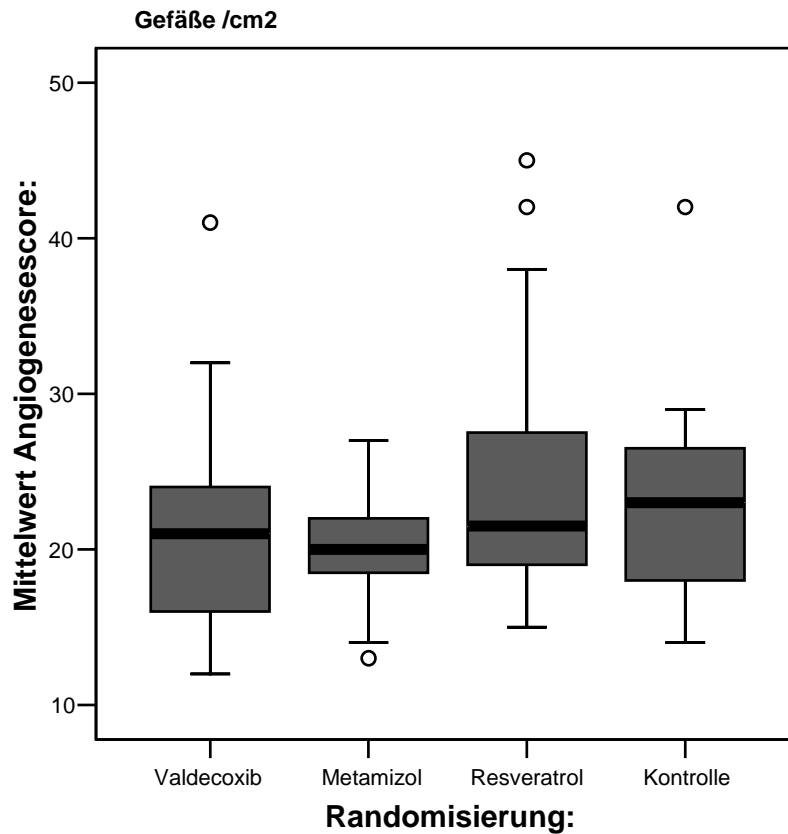


Abbildung 17: Angiogenesescore in der Anastomosenregion

Gruppe	Mittelwert (Minimum-Maximum) [Gefäße/cm ²]
Valdecoxib	21.05 (12 - 41)
Metamizol	20.26 (13 - 27)
Resveratrol	24.50 (15 - 45)
Kontrolle	23.05 (14 - 42)

Tabelle 10: Ergebnisse des Angiogenesescores

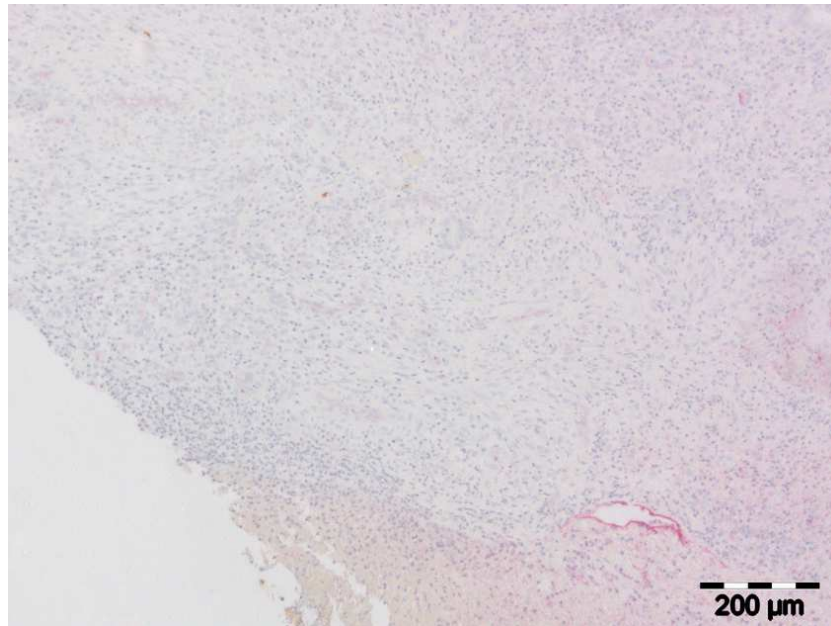


Abbildung 18: Querschnitt durch die Mukosa in der Anastomosenregion eines mit Valdecoxib behandelten Tieres. Es zeigen sich einige Gefäße mit CD-31 positivem Endothel (200fache Vergrößerung; Lichtmikroskopie).

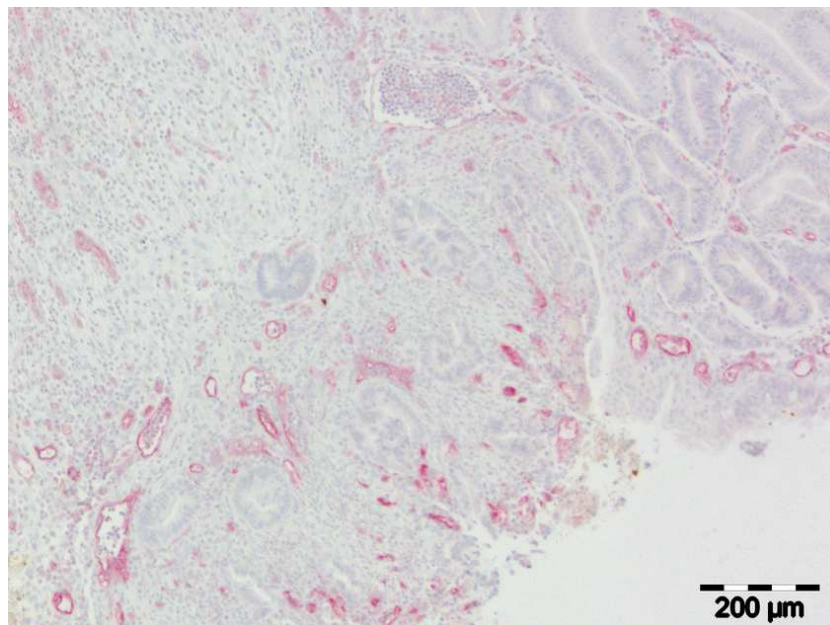


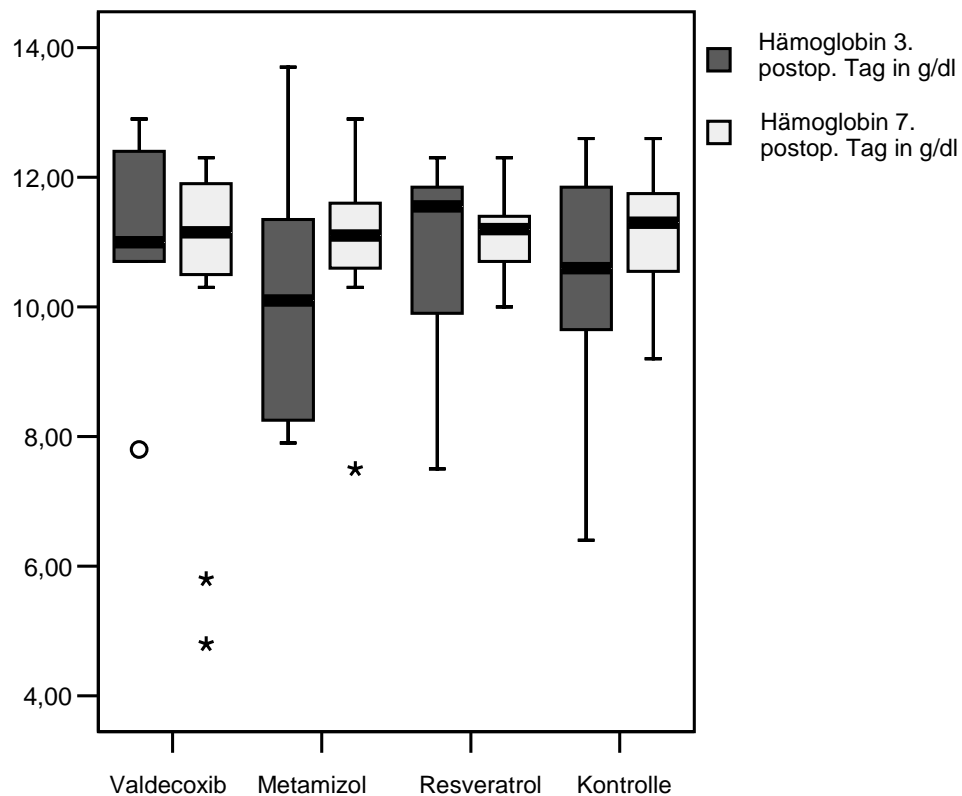
Abbildung 19: Querschnitt durch die Mukosa in der Anastomosenregion eines Tieres aus der Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine starke Neovaskularisation (200fache Vergrößerung; Lichtmikroskopie).

4.6 Laboruntersuchungen

4.6.1 Hämoglobin

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Hämoglobinkonzentration zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe ($p = 0,85$). Auch gab es in keiner der vier Gruppen eine signifikante Veränderung der Hämoglobinkonzentration vom dritten zum siebten postoperativen Tag (Abb. 20).

In keiner der Therapiegruppen oder der Kontrollgruppe kam es zu einem relevanten intraoperativen Blutverlust.



Randomisierung:

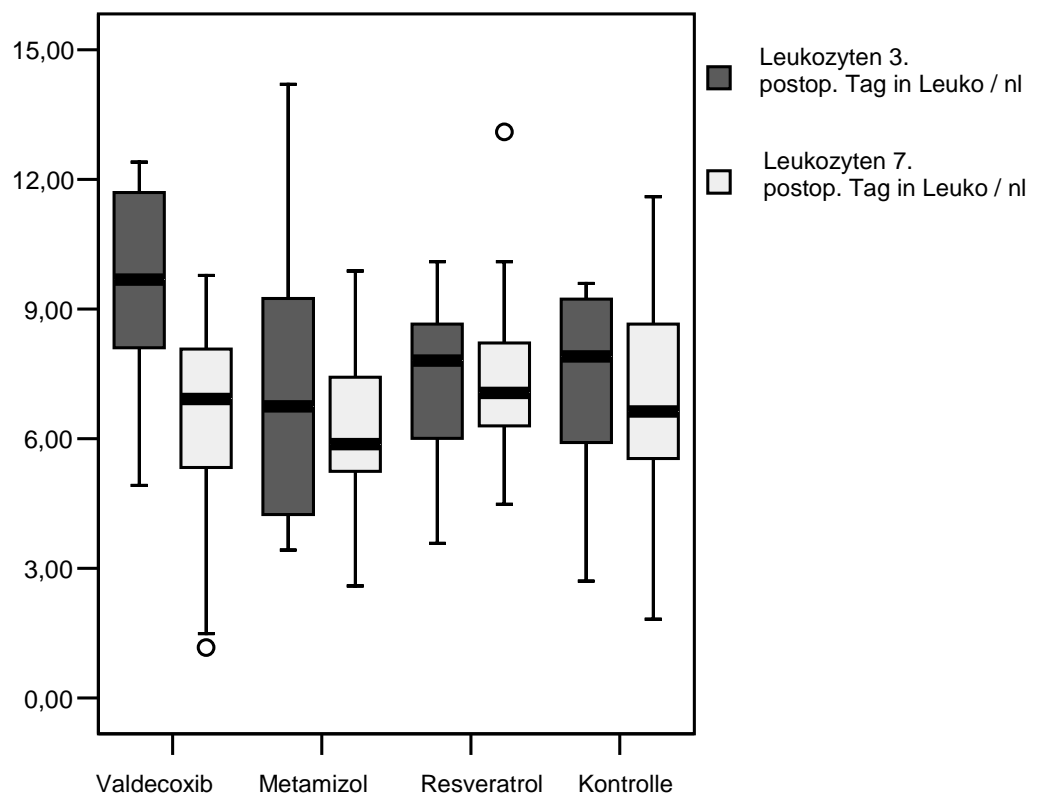
Abbildung 20: Verlauf der Hämoglobinwerte am dritten und siebten postoperativen Tag

4.6.2 Leukozyten

Der Verlauf der Leukozytenwerte zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ist in Abbildung 21 dargestellt.

In der Valdecoxibgruppe fielen die Leukozytenwerte vom 3. (Mittelwert: 9.41/nl) auf den 7. (6.29/nl) postoperativen Tag ab, in der Metamizolgruppe, in der Resveratrol- und in der Kontrollgruppe gab es keine Veränderungen der Leukozytenwerte vom 3. auf den 7. postoperativen Tag.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe ($p = 0,508$).



Randomisierung:

Abbildung 21: Verlauf der Leukozytenpopulation

4.6.3 Kreatinin

Der Verlauf der Kreatininkonzentrationen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ist in Abbildung 22 dargestellt.

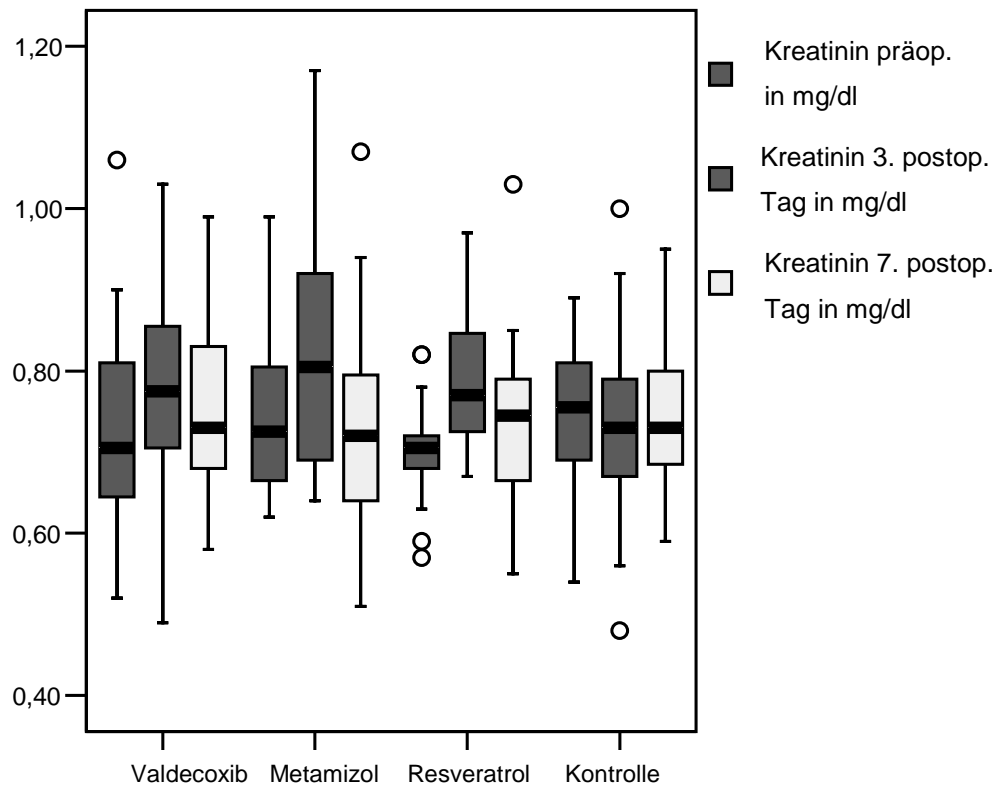
Die Kreatininkonzentration war zwischen den Verum- und der Kontrollgruppe nicht unterschiedlich ($p = 0,973$).

Vergleicht man jedoch die Serumkreatininkonzentration über die Zeit, kommt es generell zu einem Anstieg postoperativ, der sich nach sieben Tagen wieder normalisiert ($p = 0,019$).

In der Valdecoxib- und der Kontrollgruppe veränderten sich die Werte nicht signifikant.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Kreatininkonzentration zwischen der Valdecoxib- und der Kontrollgruppe, zwischen der Metamizolgruppe und der Kontrollgruppe und zwischen der Resveratrolgruppe und der Kontrollgruppe.

Wir konnten jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen der Resveratrol – und der Kontrollgruppen feststellen ($p = 0,002$).

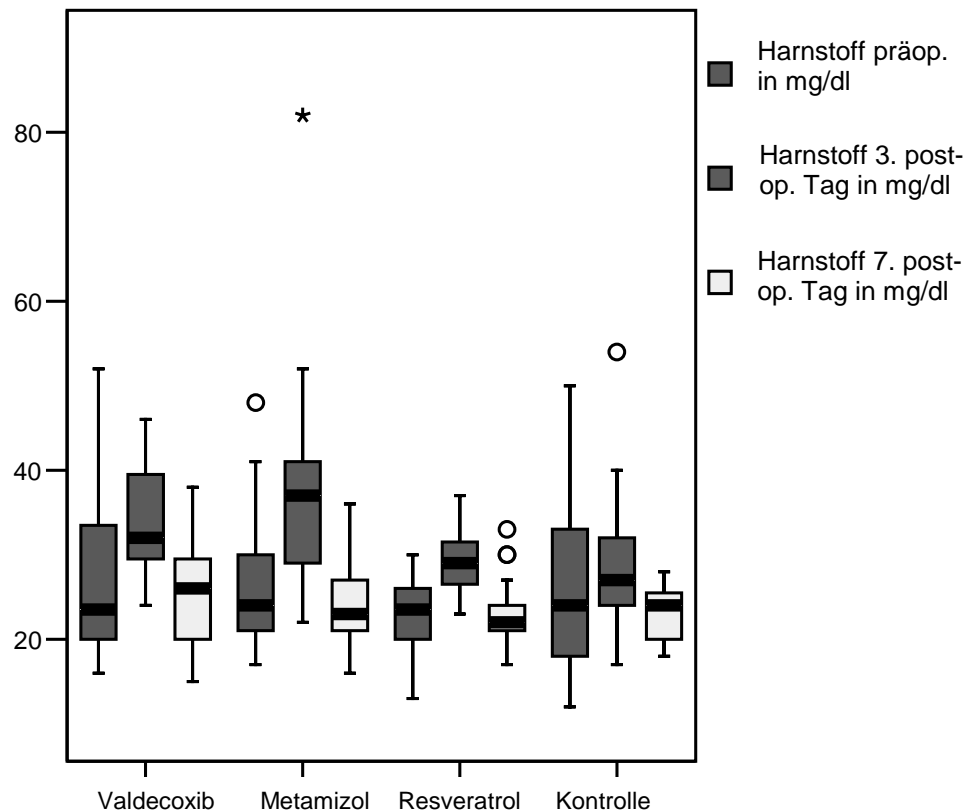


Randomisierung:

Abbildung 22: Verlauf der Kreatininwerte präoperativ, am dritten und am siebten postoperativen Tag

4.6.4 Harnstoff

Der Verlauf der Harnstoffwerte zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ist in Abbildung 23 dargestellt. Es zeigten sich in den Therapiegruppen und in der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied ($p = 0,2188$) der Harnstoffwerte. Auch hier stiegen sie zum 3. postoperativen Tag an und fielen dann wieder ab. Zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede.



Randomisierung:

Abbildung 23: Verlauf der Harnstoffwerte präoperativ, am dritten und am siebten postoperativen Tag

4.6.5 Adhäsionsbildung

Alle Kaninchen hatten bei der initialen Laparatomie einen verwachsungsfreien Bauchraum.

Bei der Relaparotomie am siebten postoperativen Tag beurteilten zwei Untersucher unabhängig voneinander die Adhäsionsbildung nach dem von Tyrell et al.³⁴ beschriebenen Score.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe ($p = 0,662$).

Gruppe	Grad 0	Grad I	Grad II	Grad III
Valdecoxib	6	2	2	9
Metamizol	8	0	6	5
Resveratrol	6	1	6	7
Kontrolle	7	2	3	7

Tabelle 11: Adhäsionsscore (n. Tyrell et al.³⁴) in der Anastomosenregion

5 DISKUSSION

Im Jahre 1852 wurde durch Maisonneuve (1809-1894) erstmalig das Erstellen einer Anastomose aus zuführender Schlinge und abführender Schlinge nach resezierenden Darmeingriffen beschrieben. In jener Zeit wurde bei Darmokklusion noch die proximale Afterbildung nach Nelaton durchgeführt^{37;38}. Da die Technik der Anastomosierung noch nicht ausgereift war, dauerte es bis zum Ende des 19. Jahrhunderts, bevor die Anastomose als operationstechnische Option anerkannt wurde. Die ersten an Menschen gelungenen Anastomosierungen sind Wölffer (1881 Gastroenterostomie) und Billroth (1882 Ileocolostomie) zuzuschreiben³⁹.

Bis heute wurden sowohl lokale als auch systemische Faktoren gefunden, die die Anastomosenheilung negativ beeinflussen können (Tabelle 12). Zu den am meisten gefürchteten Komplikationen nach der Resektion gastrointestinaler Karzinome mit anschließender Reanastomosierung gehört die Anastomoseninsuffizienz nach Anlage einer intestinalen Anastomose⁴⁰.

Die Vermeidung bzw. Minimierung dieser Risikofaktoren sollte zu einer verbesserten Anastomosenheilung führen und damit die Insuffizienzrate reduzieren.

In den ersten Tagen nach der Operation kommt es zu einem Abfall der Kollagenkonzentration im Anastomosengebiet⁴³. Die chirurgische Naht übernimmt die wesentliche Haltefunktion (sog. „lag phase“: die Wunde besitzt noch keine Eigenstabilität)³⁹ und die Anastomosenstärke ist abhängig von der Naht-Halte-Kapazität der übriggebliebenen Kollagenfasern⁴³. Die Naht muss ihren Halt in der Tela submucosa finden, da diese reich an Kollagenfasern ist und somit zuständig für die mechanische Belastbarkeit des Darmes. Die Tunica serosa dichtet die Naht zusätzlich ab³⁹.

Die physiologischen Wundheilungsvorgänge im Gastrointestinaltrakt bilden die Grundlage für die Heilung der Anastomose. Sie folgen den bekannten Abläufen eines Entzündungsprozesses.

Aus histologischer Sicht wird dieser Prozess in drei ineinander greifende Etappen eingeteilt:

- die exsudative Phase,
- die proliferative Phase,
- die reparative Phase.

Ein gewisses Maß an Entzündungsreaktion ist für die Bildung von Granulationsgewebe nötig und für den Heilverlauf günstig. Faktoren, die die Entzündung stimulieren, führen zu einer verzögerten Wiederherstellung der Wundstärke; eine Minimierung der Entzündung führt zu einer schnelleren Heilung⁴³.

Systemische Faktoren	Lokale Faktoren
<ul style="list-style-type: none"> - Hohes Alter des Patienten - Mangelernährung (bes. Proteinmangel) - Diabetes mellitus - Hyperbilirubinämie - Urämie - Adipositas - Kortisontherapie - Zytostatikatherapie - Radiatio - Minderdurchblutung des Darms 	<ul style="list-style-type: none"> - Operationstechnische Fehler: (zu ausgedehnte Skelettierung der Darmenden mit daraus folgender Minderdurchblutung der Anastomose; auf Spannung genähte Anastomose; Mucosaprolaps; exzessive Gewebetraumatisierung; zu fest angezogene Anastomosennaht;) - Ungeeignetes Nahtmaterial - evertierende Nähte - Bakterielle Kontamination

Tabelle 12: Negative Einflussfaktoren der Anastomosenheilung^{37-39;41;42}

Die exsudative Phase wird durch das vom Operateur gesetzte chirurgische Trauma eingeleitet. In dieser Phase geht es vorrangig darum, die Wunde von Zellresten zu reinigen und die Wundränder notdürftig mit Fibrin zu verschliessen^{44;45}.

Proteasen, die aus den Zellresten freigesetzt werden, führen zu einer Aktivierung des Komplementsystems mit nachfolgender Degranulation von Histamin aus Mastzellen.

Die Histaminausschüttung führt zu einer Vasodilatation und zu einer Erhöhung der Permeabilität von kleinen Blutgefäßen⁴⁶ und anschließender Plasmaexsudation mit Aktivierung der Gerinnung⁴⁷. Diese Reaktion ist allerdings vergänglich.

Nach ca. 1h wird die kurzfristige histaminvermittelte Vasodilatation und Gefäßpermeabilitätserhöhung von den verspätet auftretenden aber länger anhaltenden Prostaglandinen PGE, PGD₂ und PGF₂ vermittelt.

Prostaglandine werden durch die Cyclooxygenase aus Arachidonsäure hergestellt, nachdem diese aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt worden ist⁴⁶. Somit wird einer der entscheidenden Einflussfaktoren der getesteten Medikamente im System der Wund- bzw. Anastomosenheilung deutlich.

Die Aktivierung des Komplementsystems führt ausserdem zur Einwanderung verschiedener Zelltypen (Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen) in die Wunde⁴⁶.

In der Frühphase der akuten Entzündung sind neutrophile Granulozyten die vorherrschenden Zellen, werden aber bereits nach wenigen Stunden zahlenmäßig von den Makrophagen abgelöst^{46;47}. Beide Zellarten versuchen, das Wundareal von Bakterien und Zellresten per Phagozytose und durch Freisetzung proteolytischer Enzyme, wie z.B. Kollagenasen (Familie der Matrix-Metallo-Proteinasen⁴⁸) zu reinigen (Tage 0 - 4)^{39;43;46;49}.

Cyclooxygenasehemmer scheinen nicht nur in der Lage zu sein, die Prostaglandinsynthese zu verhindern, sondern auch die Migration von Makrophagen und die Freisetzung von Enzymen aus Makrophagen zu minimieren⁴³. Diese Reduktion kollagenolytisch wirkender Enzyme könnte sich positiv auf die Reissfestigkeit der Anastomose auswirken.

Die Arbeitsgruppe um Futagami et al.⁵⁰ untersuchte temporäre Veränderungen in der Lokalisation von COX-1 und COX-2 Proteinen und mRNA und die Expression dieser Proteine nach Hautinzision im Rattentiermodell. Sie beobachteten einen markanten Anstieg der COX-2 Expression innerhalb der ersten 12h nach Gewebetraumatisierung mit einem Gipfel am 3. postoperativen Tag. Der Ausgangswert wird erst am 10. postoperativen Tag wieder erreicht.

In der proliferativen Phase zeigt sich, dass Makrophagen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Wundreinigung und beim Gewebeabbau, sondern auch beim Aufbau neuen Gewebes spielen⁴⁹.

Makrophagen bewirken über die Freisetzung von bFGF und TGF α eine Aktivierung von ortsständigen Fibroblasten mit anschließender Wundkontraktion durch Myofibroblasten und Bildung von Typ III Kollagen.

Ab dem dritten Tag kommt es dann zum Auftreten von Typ I Kollagen, welches sich durch eine größere Reißfestigkeit im Vergleich zu Typ III auszeichnet^{37;44;49;50}. Eine Aktivitätshemmung der Makrophagen durch Cyclooxygenasehemmer in dieser Phase der Wundheilung könnte sich negativ auf die Anastomosenstärke auswirken durch eine verspätete oder verringerte Kollagensynthese^{43;51}.

Die Blutversorgung einer Anastomose ist abhängig von der Formation neuer Blutgefäße (Neoangiogenese)⁵²⁻⁵⁵. Die Wiederherstellung der vaskulären Architektur in der Anastomose beginnt ca. 48-72h nach Anlage der Darmwandnaht^{56;57}.

Die Neoangiogenese beginnt mit der Aktivierung von bereits vorhandenen Endothelzellen durch Zellmitogene, sogenannte Zytokine.

Durch verschiedene Arbeitsgruppen wurden in den letzten Jahren mehrere dieser Substanzen identifiziert, unter anderem der Vasculo-endothelial-growth-factor (VEGF), der Transforming-growth-factor α (TGF α), der Platelet derived-growth-factor (PDGF) oder der Basic-fibroblast-growth-factor (bFGF)⁵⁸⁻⁶¹.

Die zytokininduzierte Initiierung der Angiogenese wird über die Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie vermittelt. Dies führt zu einer Erhöhung der Permeabilität der Kapillaren und damit zum Austreten von Plasmaproteinen.

Die Endothelzellen beginnen sich unter der Einwirkung von sezernierten Zellmitogenen zu teilen und proteolytische Enzyme, sogenannte Matrixmetalloproteasen zu produzieren. Nach Degradation der Basalmembran der Gefäße reagieren die Endo-

thelzellen mit Proliferation und Migration und letztendlich der Ausbildung primitiver tubulärer Strukturen, die sich in weiteren Schritten zu neuen Gefäßen umformen.

Schließlich kommt es zur Ausbildung neuer Gefäße (Tage 3 - 14)^{62;62;63}. Cyclooxygenasehemmer inhibieren die Neoangiogenese direkt durch Minimierung der Endothelzellproliferation und indirekt über die Hemmung der PGE2 Bildung. PGE2 stimuliert die Ausschüttung von VEGF¹⁸.

Schließlich folgt die reparative Phase, in der besonders die Fibroblasten aktiv sind, die Kollagenablagerung zunimmt und durch Kollagenvernetzung die Wunde an mechanischer Belastbarkeit zunimmt (Tage 10-80)³⁹.

In der Frühphase der Wundheilung bis zum 4. Tag überwiegt nach tierexperimentellen Studien die Kollagenolyse über die Kollagensynthese. In dieser Phase wird die Anastomose also in erster Linie durch die Fibrinbildung stabilisiert. Die Kollagensynthese erreicht ihren Höhepunkt zwischen dem 5. und 7. Tag. Der Gesamtkollagengehalt muss allerdings nicht mit der Anastomosenfestigkeit korrelieren. Andere Faktoren, wie Qualität und Vernetzung des Kollagens haben einen Einfluss auf die Anastomosenfestigkeit^{39;45}.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren auf die Anastomosenheilung nach Dickdarmresektionen im Kaninchenmodell zu untersuchen.

Die Anastomosen wurden anhand ihrer mechanischen Belastbarkeit, ihrer Morphologie (makroskopisch/mikroskopisch) und ihrer Durchblutung (Angiogenesescore) beurteilt. Hauptzielkriterium war der Berstungsdruck der Anastomose.

Anastomoseninsuffizienz, Berstungsdruck und Berstungsstelle

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Absolutwerte des Berstungsdrucks der Anastomosen in der Valdecocix-Gruppe tendenziell höher als in der Kontrollgruppe oder in den anderen Therapiegruppen waren.

In der statistischen Auswertung zeigte sich jedoch kein Unterschied bzw. er war nicht statistisch signifikant.

Ursächlich für die Erhöhung des Berstungsdrucks könnte eine antiinflammatorische Wirkung von Valdecoxib sein. Der Abfall der Leukozytenwerte vom 3. auf den 7. postoperativen Tag war in der Valdecoxibgruppe statistisch signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Jiborn et al.⁴⁵ zeigten, dass eine Infektion ein Risikofaktor für eine Anastomoseninsuffizienz ist.

Auch eine Beschleunigung der Kollagenreifung könnte man diskutieren.

Forslund et al.⁶⁴ zeigten eine Verbesserung der Heilung von Achillessehnen im Rattentiermodell nach Gabe des selektiven Cox-2-Hemmers Celecoxib.

Sowohl in der Valdecoxib-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe bildete kein Tier eine Anastomoseninsuffizienz aus.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie von Cahill et al.⁶⁵, in der die Anastomosenfestigkeit bei 20 Ratten nach Rofecoxibgabe im Vergleich mit einer Kontrollgruppe untersucht wurde. 5 der mit Rofecoxib behandelten Tiere bildeten eine Anastomoseninsuffizienz aus im Gegensatz zu 0 Ratten in der Kontrollgruppe. Ausserdem war der Berstungsdruck der Anastomosen in der Rofecoxibgruppe signifikant erniedrigt. Hier zeigte sich durch die selektive COX-2 Hemmung eine scheinbare Erniedrigung des Berstungsdrucks der Anastomose durch Rofecoxib.

Eine Ursache ergab sich aus den Studienergebnissen nicht, da es weder einen Unterschied in der mikroskopischen Beurteilung der Anastomosen gab, noch einen Unterschied im Angiogenesescore. Es wurde argumentiert, dass die Unterschiede in der mechanischen Belastbarkeit an einer Verschlechterung der Kollagenvernetzung liegen könnten.

Auch in dieser Studie konnte weder makroskopisch noch mikroskopisch ein Unterschied in der Morphologie der Anastomosen festgestellt werden. Weiterhin zeigte

diese Studie auch keinen Unterschied in der Neoangiogenese zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe.

Man hätte einen Unterschied erwarten können.

Hernandez et al.⁶⁶ zeigten, dass es unter einer selektiven COX-2 Hemmung zu einer Reduktion von VEGF und hierüber zu einer verminderten Neoangiogenese kommen kann. Dies hätte sich negativ auf die Anastomosenheilung auswirken können.

Wilker⁴² konnte zeigen, dass es bei Drosselung der Durchblutung einer Anastomose zu einer Abnahme der Anastomosenfestigkeit kam.

Der makroskopische Eindruck einer Anastomose unterschied sich in unserer Untersuchung unter selektiver COX-2 Hemmung nicht von dem der Kontrollgruppe, nicht von dem der Resveratrolgruppe (selektive COX-1 Hemmung) und nicht von dem der Metamizolgruppe (unspezifische COX-Hemmung). Weder eine veränderte Entzündungsreaktion (Granulozyten in der Anastomosenregion), noch die Ausbildung von Granulationsgewebe wurde durch die perioperative Anwendung eines Coxibs bedingt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung:

Die Cyclooxygenase ist ein zentrales Enzym in der Eikosanoidsynthese aus der Arachidonsäure der Zellmembran. Im wesentlichen sind zwei relevante Isoformen bekannt, die konstitutive COX-1 und die durch Entzündungen oder in der Tumorgenese induzierbare COX-2. Die Produkte der COX-2 induzieren und unterhalten Entzündungen und Schmerzen, stimulieren Tumorwachstum und die Neoangiogenese im Rahmen der Wundheilung und der Tumorgenese.

Traditionelle nichtsteroidale Antiphlogistika haben zumeist einen Effekt auf beide der Isoformen und damit auch ein entsprechendes Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil. Spezifische COX-2 Hemmung könnte die Nebenwirkungen reduzieren und in zentrale Prozesse eingreifen. Klinisch ist diese Medikamentengruppe – die Coxibe – durch ein erhöhtes kardiovaskuläres und renales Nebenwirkungsprofil in Verruf geraten und damit im Einsatz seither weitgehend eingeschränkt.

Aufgrund der perioperativen Einsatzmöglichkeiten der Coxibe zur Verbesserung des postoperativen Analgesieregimes, wollten wir in dieser Studie relevante Nebenwirkungen - gerade in der Abdominalchirurgie - unter dem Fokus auf die Hemmung der Cyclooxygenase untersuchen.

Material und Methoden:

In unserer Studie wurde eine Serie von 80 New Zealand Kaninchen in 4 Gruppen randomisiert und anschließend über eine mediane Minilaparotomie Kolonsegmentreseziert und End-zu-End reanastomosiert. Gruppe 1 (n=20) wurde mit Valdecoxib (Bextra[®]), einem spezifischem COX-2 Inhibitor, behandelt. Gruppe 2 mit Metamizol-Na (Novalgin[®]), einem in Europa in der Abdominalchirurgie häufig eingesetzten Analgetikum. Gruppe 3 mit Resveratrol, einem spezifischen COX-1 Inhibitor und Gruppe 4 mit einem Plazebo gleichen Volumens.

Die Fallzahlberechnung erfolgte nach dem Hauptzielkriterium, dem Berstungsdruck der Anastomosen.

Die Anastomosenheilung wurde nach sieben Tagen in vitro getestet. Anschließend wurden Schnittpräparate zur Immunhistochemischen CD 31 Untersuchung bearbeitet. Mit diesem polyklonalen Antikörper wurde die Vaskularisation der Anastomose untersucht. Zudem wurden präoperativ, am dritten und siebten postoperativen Tag Blutwerte bestimmt. Statistische Analysen wurden mittels des Mann-Whitney U Test, Fishers exaktem Test und dem T-Test durchgeführt.

Ergebnisse:

Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Verumgruppen und der Kontrollgruppe bezüglich der Rate an Anastomoseninsuffizienzen, des Bers-tungsdruckes oder der Gefäßdichte in der Anastomosenregion.

Die Nierenretentionswerte waren in der Coxibgruppe nicht erhöht.

Hämoglobin relevante Blutungskomplikationen gab es in keiner der Gruppen.

Schlussfolgerung:

Kaninchen unter perioperativer Coxibgabe haben kein erhöhtes unmittelbar postope-ratives Risikoprofil.

Die durch die Studie erfasste perioperative Komplikationsrate war durch die spezifi-sche COX-2 Hemmung nicht erhöht und v.a. war die Anastomosenheilung nach einer Kolonsegmentresektion nicht beeinträchtigt.

Aufgrund der Möglichkeit, das perioperative akute Analgesieregime zu erweitern, und eine effektive nichtopioid-basierte Langzeitmedikation einzusetzen, scheinen Coxibe in der Abdominalchirurgie weiterhin eine Alternative zu sein.

Im Kaninchenmodell gab es keine klinisch relevanten Nachteile in der Valdecoxib-Gruppe.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 3: „Fast-track“ Rehabilitationskonzept (schematisch); (PDA = Periduralanalgesie)
- Abbildung 4: Hemmung der Cyclooxygenase 2 durch Coxibe
- Abbildung 3: Versuchsablauf (schematisch)
- Abbildung 4: Laparotomie
- Abbildung 5: Dünndarm
- Abbildung 6: Darstellung des Dünndarms
- Abbildung 7: Abklemmen des zu resezierenden Darmabschnitts
- Abbildung 8 : Resektion des Darmabschnitts
- Abbildung 9: Beginn der Naht an der Hinterwand der Anastomose
- Abbildung 10: Fertige Naht der Hinterwand der Anastomose
- Abbildung 11: Naht der Vorderwand der Anastomose
- Abbildung 12: komplette Anastomose
- Abbildung 13: Adhäsionsscore nach Tyrell et al.³⁴
- Abbildung 14: Berstungsdruckmessung der Anastomosen am siebten postoperativen Tag
- Abbildung 15: Querschnitt durch die Mukosa in der Anastomosenregion eines mit Valdecoxib behandelten Tieres. Es zeigt sich geringe Ulzeration und spärliches Entzündungsinfiltrat in der Lamina propria (Hämatoxylin-Eosin Färbung).
- Abbildung 16: Querschnitt durch die Mukosa in der Anastomosenregion eines Tieres aus der Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine tiefe Ulzeration der Kolonmukosa und dichtes Entzündungsinfiltrat (überwiegend Granulozyten) in der Lamina propria (Hämatoxylin-Eosin Färbung)
- Abbildung 17: Angiogenesescore in der Anastomosenregion
- Abbildung 18: Querschnitt durch die Mukosa in der Anastomosenregion eines mit Valdecoxib behandelten Tieres. Es zeigen sich einige Gefäße mit CD-31 positivem Endothel (200fache Vergrößerung; Lichtmikroskopie)
- Abbildung 19: Querschnitt durch die Mukosa in der Anastomosenregion eines Tieres aus der Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine starke Neovaskularisation (200fache Vergrößerung; Lichtmikroskopie)

- Abbildung 20: Verlauf der Hämoglobinwerte am dritten und siebten postoperativen Tag
- Abbildung 21: Verlauf der Leukozytenpopulation
- Abbildung 22: Verlauf der Kreatininwerte präoperativ, am dritten und am siebten postoperativen Tag
- Abbildung 23: Verlauf der Harnstoffwerte präoperativ, am dritten und am siebten postoperativen Tag

8 TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 12: Körpergewicht (KG) der Kaninchen präoperativ, am 3.postoperativen Tag und am 7. postoperativen Tag in kg
- Tabelle 13: Inspektion der Darmnaht
- Tabelle 14: Ergebnisse der Berstungsdruckmessung
- Tabelle 15: Klassifizierung der Berstungsstelle
- Tabelle 16: Klassifizierung der Entzündung: Ulcustiefe
- Tabelle 17: Klassifizierung der Entzündung: Ulcusausdehnung
- Tabelle 18: Klassifizierung der Entzündung: Granulozyten
- Tabelle 19: Klassifizierung der Entzündung: Bindegewebe
- Tabelle 20: Klassifizierung der Entzündung: Granulationsgewebe
- Tabelle 21: Ergebnisse des Angiogenesecores
- Tabelle 22: Adhäsionsscore (n. Tyrell et al.³⁴) in der Anastomosenregion
- Tabelle 12: Negative Einflussfaktoren der Anastomosenheilung^{37-39;41;42}

9 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Jungck M, Friedl W, Propping P. [Hereditary gastrointestinal tumors]. Internist (Berl) 1999; 40(5):502-512.
- (2) Klimpfinger M, Hauser H, Beham A, Denk H. [Classification of colorectal cancers: current results from the catchment area of the Graz Institute of Pathology]. Wien Med Wochenschr 1988; 138(11-12):267-270.
- (3) Rosenberg AD. Reducing post-traumatic morbidity with pain management. Curr Opin Anaesthesiol 2000; 13(2):181-184.
- (4) bu-Bondoc SM. Regional anesthesia and perioperative outcome: what is new? Curr Opin Anaesthesiol 2004; 17(5):435-439.
- (5) Ruß A. Arzneimittel Pocket. 2004; Börm Bruchmeier Verlags GmbH
- (6) Gan TJ, Joshi GP, Zhao SZ, Hanna DB, Cheung RY, Chen C. Presurgical intravenous parecoxib sodium and follow-up oral valdecoxib for pain management after laparoscopic cholecystectomy surgery reduces opioid requirements and opioid-related adverse effects. Acta Anaesthesiol Scand 2004; 48(9):1194-1207.
- (7) Pharmacia Deutschland GmbH. Produktmonographie Dynastat 2002 / 2
- (8) Vioxx: an unequal partnership between safety and efficacy. Lancet 2004;(364):1287-1288.
- (9) Schottke-Hennings H. UAW-Datenbank: Differenzierte Anwendungsempfehlung. Deutsches Ärzteblatt 2005;(102):194.
- (10) Juni P, Nartey L, Reichenbach S, Sterchi R, Dieppe PA, Egger M. Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. Lancet 2004; 364(9450):2021-2029.

- (11) Kehlet H, Wilmore DW. Fast-track surgery. *Br J Surg* 2005; 92(1):3-4.
- (12) Legan M, Luzar B, Ferlan-Marolt V, Cor A. Cyclooxygenase-2 expression determines neo-angiogenesis in gallbladder carcinomas. *Bosn J Basic Med Sci* 2006; 6(4):58-63.
- (13) Basu GD, Liang WS, Stephan DA, Wegener LT, Conley CR, Pockaj BA et al. A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2006; 8(6):R69.
- (14) Koga T, Shibahara K, Kabashima A, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Takahashi I et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2004; 51(60):1626-1630.
- (15) Pharmacia Deutschland GmbH. Produktinformation Dynastat. 2002 / 3.
- (16) Karow T. *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie*. 2004; Lang und Roth Verlag.
- (17) Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21):13926-13931.
- (18) Rao M, Yang W, Seifalian AM, Winslet MC. Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19(1):1-11.
- (19) Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 2000; 355(9204):646-648.
- (20) Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. 2005; Springer Verlag Berlin.
- (21) Pharmacia Deutschland GmbH. Produktinformation Valdyn. 2002 / 3.

- (22) Pharmacia Europe. Scientific discussion Dynastat. www.emea.eu.int
- (23) Harris SI, Stoltz RR, LeComte D, Hubbard RC. Parecoxib sodium demonstrates gastrointestinal safety comparable to placebo in healthy subjects. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38(7):575-580.
- (24) Ormrod D, Wellington K, Wagstaff AJ. Valdecoxib. *Drugs* 2002; 62(14):2059-2071.
- (25) Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000; 288(5472):1765-1769.
- (26) Aventis Pharma. Fachinformation Novalgin 2003 / 2. BPI Service GmbH
- (27) Campos C, de GR, Garcia-Nieto R, Gago F, Ortiz P, Alemany S. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. *Eur J Pharmacol* 1999; 378(3):339-347.
- (28) Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000; 66(8):663-673.
- (29) PDRhealth. Resveratrol. 2004; www.pdrhealth.com/drug-info
- (30) Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS et al. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res* 2002; 19(12):1907-1914.
- (31) Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D et al. Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. *Microsc Res Tech* 2001; 53(5):343-353.
- (32) Torres-Lopez JE, Ortiz MI, Castaneda-Hernandez G, onso-Lopez R, somoza-Espinosa R, Granados-Soto V. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci* 2002; 70(14):1669-1676.
- (33) Kockerling F, Rose J, Schneider C, Scheidbach H, Scheuerlein H, Reymond MA et al. Laparoscopic colorectal anastomosis: risk of postoperative leakage.

Results of a multicenter study. Laparoscopic Colorectal Surgery Study Group (LCSSG). *Surg Endosc* 1999; 13(7):639-644.

- (34) Tyrell J, Silberman H, Chandrasoma P, Niland J, Shull J. Absorbable versus permanent mesh in abdominal operations. *Surg Gynecol Obstet* 1989; 168(3):227-232.
- (35) Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37(9):921-926.
- (36) Brunner E LF. Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten. 1999.
- (37) Hosch SB, Knoefel WT, Izbicki JR. Peritonitis und Anastomosenheilung. Johann Ambrosius Barth Verlag ; 1997.
- (38) Thiede A. Lünstedt B. Standards in der Viszerosynthese. 1994; Springer Verlag Berlin.
- (39) Dietz UA, Debus ES. Die gastrointestinale Wundheilung Resektions und Rekonstruktionsverfahren in der Viszeralchirurgie. Kaden Verlag; 2002.
- (40) Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353-364.
- (41) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(1):1-8.
- (42) Rötzscher VM. Die komplizierte Anastomose. 1997; Johann Ambrosius Barth Verlag.
- (43) Mastboom WJ, Hendriks T, van EP, de Boer HH. The influence of NSAIDs on experimental intestinal anastomoses. *Dis Colon Rectum* 1991; 34(3):236-243.

- (44) Oxlund H, Christensen H, Seyer-Hansen M, Andreassen TT. Collagen deposition and mechanical strength of colon anastomoses and skin incisional wounds of rats. *J Surg Res* 1996; 66(1):25-30.
- (45) Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. The effect of suture technic on collagen concentration in the colonic wall. *Am J Surg* 1978; 135(3):333-340.
- (46) Mitchinson MJ. *Essentials of Pathology*. Blackwell Science Ltd; 1996.
- (47) Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999; 5(6):698-701.
- (48) Syk I, Agren MS, Adawi D, Jeppsson B. Inhibition of matrix metalloproteinases enhances breaking strength of colonic anastomoses in an experimental model. *Br J Surg* 2001; 88(2):228-234.
- (49) Marsolais D, Cote CH, Frenette J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug reduces neutrophil and macrophage accumulation but does not improve tendon regeneration. *Lab Invest* 2003; 83(7):991-999.
- (50) Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab Invest* 2002; 82(11):1503-1513.
- (51) de Sousa JB, Soares EG, Aprilli F. Effects of diclofenac sodium on intestinal anastomotic healing. Experimental study on the small intestine of rabbits. *Dis Colon Rectum* 1991; 34(7):613-617.
- (52) Risau W. Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int Suppl* 1998; 67:S3-S6.
- (53) Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626):671-674.

- (54) Risau W. Angiogenesis and endothelial cell function. *Arzneimittelforschung* 1994; 44(3A):416-417.
- (55) Risau W. Embryonic angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 1991; 51(3):371-376.
- (56) Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143(2):401-409.
- (57) Millikan KW, Mall JW, Myers JA, Hollinger EF, Doolas A, Saclarides TJ. Do angiogenesis and growth factor expression predict prognosis of esophageal cancer? *Am Surg* 2000; 66(4):401-405.
- (58) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246(4935):1309-1312.
- (59) Compagni A, Wilgenbus P, Impagnatiello MA, Cotten M, Christofori G. Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2000; 60(24):7163-7169.
- (60) Christofori G, Luef S. Novel forms of acidic fibroblast growth factor-1 are constitutively exported by beta tumor cell lines independent from conventional secretion and apoptosis. *Angiogenesis* 1997; 1(1):55-70.
- (61) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-1309.
- (62) Senger DR, Van De WL. VEGF expression by epithelial and stromal cell compartments: resolving a controversy. *Am J Pathol* 2000; 157(1):1-3.
- (63) Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through

alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(25):13612-13617.

- (64) Forslund C, Bylander B, Aspenberg P. Indomethacin and celecoxib improve tendon healing in rats. Acta Orthop Scand 2003; 74(4):465-469.
- (65) Cahill RA, Sheehan KM, Scanlon RW, Murray FE, Kay EW, Redmond HP. Effects of a selective cyclo-oxygenase 2 inhibitor on colonic anastomotic and skin wound integrity. Br J Surg 2004; 91(12):1613-1618.
- (66) Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martinez-Martinez S, Grau R et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. J Exp Med 2001; 193(5):607-620.