

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Arnulf Thiede

Zytokinexpression während der Wundheilung im Anastomosenbereich am Kolon der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Georg Oswald Strehl
aus Belo Horizonte / Brasilien
Würzburg, Dezember 2006

Referent: Prof. Dr. med. E.S. Debus
Koreferent: Prof. Dr. med. W. Scheppach
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2007

Der Promovend ist Arzt

Abkürzungsverzeichnis

A.	Anastomose
C-C	Familie der beta-Chemokine
CXC	Familie der alpha Chemokine
CD	Cluster of differentiation
CD4+	histologisch positive Zellen bezüglich CD4
DAB	3,3'Diaminobenzidin
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon gamma
HLA	Human Leucocyte Antigen
HRP	Horse Radish Peroxidase
IFN- γ	Interferon gamma
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Macrophage Chemotactic Protein 1
MIP-2	Monocyte Inflammatory Protein 2
MHC	Major histocompatibility complex
MHC II	Major histocompatibility complex Klasse II
PA.	Perianastomosärer Bereich
PDGF-B	Platelet Derived Growth Factor B
PCR	Polymerasekettenreaktion
RANTES	Regulated Upon Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SD	Standardabweichung
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Die Wundheilung im Allgemeinen	1
1.2. Untersuchte Zytokine	3
1.2.1. Proinflammatorische Zytokine	3
1.2.2. Chemokine	4
1.2.3. Angiogenetisch wirksame Zytokine	5
1.2.4. Antiinflammatorische Zytokine	7
1.2.5. TGF- β -Superfamilie	7
1.3. Die Wundheilung bei Kolonanastomosen	8
2. Fragestellungen	10
3. Material und Methoden	11
3.1. Tiermodell	11
3.1.1. Versuchstiere und Haltung	11
3.1.2. Anästhesie und Operation	11
3.1.3. Reoperation und Anastomosenentnahme	12
3.1.4. Aufarbeitung des Materials für die Immunhistochemie	12
3.1.5. Aufbereitung des ELISA Materials	13
3.2. Immunhistochemie	13
3.2.1. Kryoschnitte	13
3.2.2. Verwendete Antikörper	13
3.2.3. Färbemethode	15
3.2.4. Auswertung	17
3.2.5. Fotografie	17
3.2.6. Auswertungskriterien beim Gewebsscore	17
3.3. ELISAs	18
3.3.1. Prinzip des ELISAs und verwendete Geräte	18
3.3.2. Proteinbestimmung	20
3.3.3. Auswertung	20

3.4.	<i>Statistische Auswertung</i>	21
4.	Ergebnisse	22
4.1.	<i>morphologische Beurteilung</i>	22
4.2.	<i>Proinflammatorische Zytokine</i>	23
4.2.1.	TNF- α	23
4.2.2.	IFN- γ	25
4.3.	<i>Chemokine</i>	26
4.3.1.	MCP-1	26
4.3.2.	RANTES	28
4.3.3.	MIP-2	29
4.4.	<i>Angiogenetisch wirksame Zytokine</i>	31
4.4.1.	VEGF	31
4.4.2.	FGF-2	32
4.4.3.	PDGF-B1	33
4.5.	<i>Antiinflammatorische Zytokine</i>	34
4.5.1.	IL-10	34
4.5.2.	IL-13	36
4.6.	<i>TGF-β-Superfamilie</i>	37
4.6.1.	TGF- β_1	37
4.7.	<i>Zellmarker</i>	39
4.7.1.	B-Zellen	39
4.7.2.	CD4+ Zellen	39
4.7.3.	CD8+ Zellen	40
4.7.4.	Monozyten und Makrophagen	41
4.8.	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	42
5.	Beantwortung der Fragestellungen	45
6.	Diskussion	52
6.1.	<i>Bedeutung der Wundheilung im Dickdarm</i>	52

6.2.	<i>Morphologie der Wundheilung am Dickdarm der Ratte</i>	53
6.3.	<i>Wundheilung im Spiegel der Zytokine</i>	54
6.3.1.	Proinflammatorische Zytokine	54
6.3.2.	Chemokine	55
6.3.3.	Angiogenetisch wirksame Zytokine	57
6.3.4.	Antiinflammatorische Zytokine	59
6.3.5.	TGF- β -Superfamilie	60
6.4.	<i>Limitationen dieses Wundheilungsmodells</i>	61
6.5.	<i>Ausblick</i>	62
7.	Zusammenfassung	63
8.	Literaturverzeichnis	65
9.	Verzeichnis der Bilder und Diagramme	69
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Für Annette

1. Einleitung

1.1. Die Wundheilung im Allgemeinen

Die Wundheilung ist ein komplexer und gut koordinierter Prozess, der in verschiedenen, häufig überlappenden Phasen abläuft. Dabei ist das Ziel, ein dem ursprünglichen Gewebe möglichst ähnliches Gewebe zu bilden. Zuerst wird durch die Aktivierung der intrinsischen Blutgerinnungskaskade die Wunde provisorisch verschlossen und die Blutung gestillt. In dem Fibrinpfropf, der der Wunde aufgelagert ist, befinden sich neben anderen zellulären Bestandteilen eine große Menge Thrombozyten, welche dort thrombininduziert degranulieren. Dabei wird eine Reihe von chemotaktischen und proinflammatorischen Gewebshormonen freigesetzt.

Der Pfropf selbst dient den einwandernden Entzündungszellen als Gerüst. Der Einstrom dieser Zellen markiert den ersten Abschnitt der Wundheilung, die sogenannte inflammatorische Phase. Außerdem hat er durch die protrahierte Freisetzung von Gewebshormonen eine Speicherfunktion. Eingewanderte Zellen müssen durch die Zytokine erst aktiviert werden, bevor sie im Wundgebiet tätig werden können.

Die ersten durch Chemotaxis angelockten Zellen im Wundgebiet sind neutrophile Granulozyten, die ihr Zellzahlmaximum (*Peak*) schon nach dem ersten Tag haben. Einen Tag später erreichen die ebenfalls durch Chemokine angelockten Monozyten ihre größte Zellzahl in der Wunde. Diese Zellen dienen - nach Ausreifung zu Makrophagen - als wichtige Quelle von Zytokinen im weiteren Verlauf. Sie regulieren unter anderem die Degradation und das Remodelling der extrazellulären Matrix.

Im Anschluss an die inflammatorische Phase folgt etwa am dritten Tag nach Verwundung die zweite oder proliferative Phase. Hier gibt es keinen genau definierten Zeitpunkt. Studien haben ermittelt, dass die zweite Phase beginnt, wenn die Anzahl der Neutrophilen abnimmt und die Anzahl an Fibroblasten und Endothelzellen zunimmt [1]. Fibroblasten replizieren Zytokinsignale, die in der ersten Phase der Wundheilung freigesetzt wurden. Nach wie vor werden Zytokine freigesetzt, die in dem Fibrinpfropf gespeichert sind, in welchen die Fibroblasten einwandern. Fibroblasten synthetisieren Kollagen als Teil des Granulationsgewebes, das gerade entsteht. Gleichzeitig beginnt auch die von Endothelzellen getragene Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße. Die Reepithelialisierung wird hauptsächlich durch Zytokine der *Epidermal Growth Factor* (EGF) Familie gesteuert.

In der dritten und letzten Phase der Wundheilung, der Phase der Gewebereifung, wird das Granulationsgewebe sukzessive in Bindegewebe umgebaut. Auch dieser Abschnitt wird durch Zytokine stark beeinflusst. Prominenter Vertreter ist der profibrotische *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β). Diese letzte Phase kann mehrere Monate dauern [1, 2] (Abb.1).

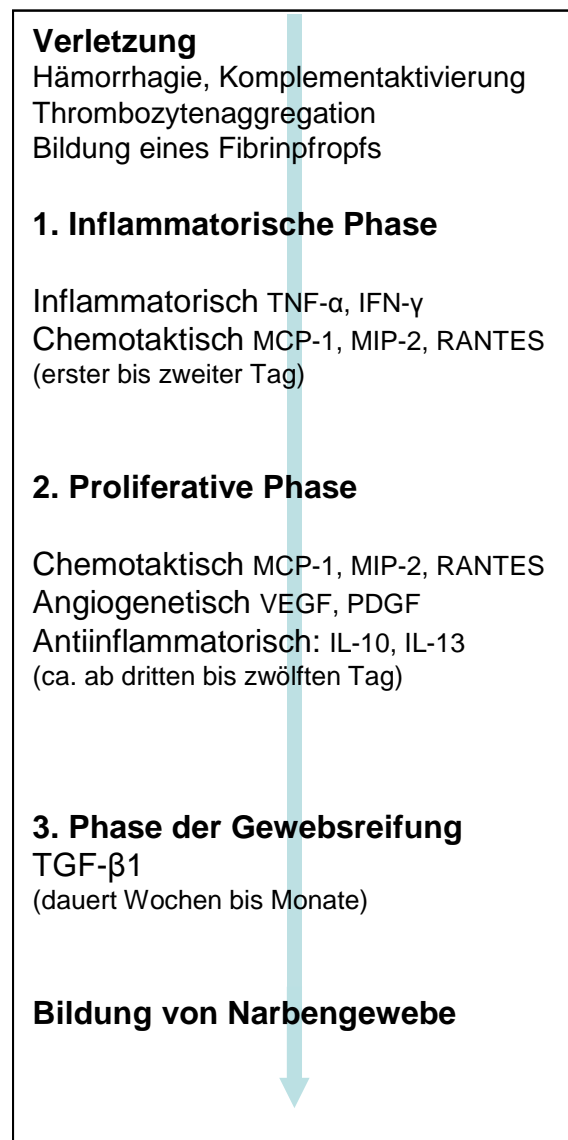


Abbildung 1 Schematischer Verlauf der Wundheilung an der Haut mit untersuchten Zytokinen, die den einzelnen Wundheilungsphasen zugeordnet sind.

1.2. Untersuchte Zytokine

Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die untersuchten Zytokine gegeben, die nach ihrer Hauptfunktion im Rahmen der komplikationslosen Wundheilung, einer Wundheilung ohne Dehiszenzen oder Sepsis, geordnet sind.

Bei der Auswahl der Zytokine wurden aus allen drei Phasen solche ausgewählt, die im kutanen Modell eine Rolle spielen, beziehungsweise solche, bei denen aus dem Literaturstudium eine wichtige Rolle vermutet werden kann.

1.2.1. Proinflammatorische Zytokine

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) ist ein prominenter Vertreter der proinflammatorischen Zytokine, der in der ersten Phase einer Entzündung auftritt (*early response*). TNF- α ist ein bedeutender Lockstoff für neutrophile Granulozyten und kann ihre Phagozytosefähigkeit und Zytotoxizität steigern. Daneben wirkt TNF- α auch als potenter angiogenetischer Faktor. Jedoch wird diese Eigenschaft durch eine gleichzeitige Anwesenheit von *Interferon gamma* (IFN- γ) aufgehoben. TNF- α steigert die durch andere Stimuli ausgelöste Aktivierung von T-Zellen.

Es wird hauptsächlich von Makrophagen, Monozyten, stimulierten und unstimulierten neutrophilen Granulozyten, T- und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sezerniert. Dabei fällt auf, dass CD4+ positive Zellen (T-Helfer-Zellen, inflammatorische Zellen, Monozyten und Makrophagen) reichlich, CD8+ Zellen (zytotoxische T-Zellen) jedoch nur wenig bis kein TNF- α sezernieren.

TGF- β und *Interleukin 10* (IL-10) regulieren die Sekretion von TNF- α herunter [3, 4].

Auch IFN- γ gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine. Es besteht aus einem Dimer mit jeweils 146 Aminosäuren. Dieses Zytokin wird hauptsächlich von T-Zellen und B-Zellen ausgeschüttet, ebenso wie durch NK-Zellen, die durch Antigene, Mitogene (bakterielle Substanzen, zum Beispiel Endotoxin) und Alloantigene aktiviert wurden. Weiterhin wird es von CD4+ und CD8+ Lymphozyten synthetisiert.

Interleukin 2 (IL-2), *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2) und EGF induzieren IFN- γ , während Vitamin D3, Dexamethason und *Cyclosporin A* (CsA) es supprimieren [5]. In Makrophagen und Monozyten induziert IFN- γ unter anderem die Bildung von TNF- α [5] und mindert die fibrogene Wirkung von TGF- β_1 [6].

IFN- γ wirkt antiproliferativ auf eine Reihe von verschiedenen Zellen. So werden etwa glatte Muskelzellen und Endothelzellen an der Proliferation gehindert, ebenso wird die Kollagensynthese von Myofibroblasten und Fibroblasten herunterreguliert. Insofern wirkt der Faktor inhibitorisch auf die Kapillarbildung, die von Myofibroblasten, FGF und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) gefördert wird [5-7]. IFN- γ wirkt immunregulatorisch [7].

1.2.2. Chemokine

Chemokine sind 8-10kD große Gewebshormone, die eine relativ starke Chemotaxis von verschiedenen Leukozyten induzieren. Im Moment sind weit über 40 solche Proteine bekannt. Diese werden in mindestens vier Subgruppen eingeteilt, abhängig von der Position ihrer Cystinmoleküle. Die Gruppen der CXC (alpha) und C-C(beta) Chemokine sind die bislang am Besten erforschten Gruppen [8, 9]. Zu letzterer Gruppe gehört beispielsweise das *Macrophages Chemotactical Protein 1* (MCP-1). Dieses Protein wird unter anderem von glatten Muskelzellen, vaskulären Endothelzellen und Monozyten exprimiert. Für letztere ist die Anwesenheit von bakteriellem Lipopolysaccharid ein starker Anreiz für die Bildung von MCP-1 [10]. MCP-1 lockt als Prototyp der C-C Familie und potenter proinflammatorischer Faktor [11] Basophile, Eosinophile, aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und Monozyten an [11-13] - jedoch keine neutrophilen Granulozyten [13]. Der Höhepunkt der Infiltration mit diesen angelockten Zellen liegt bei etwa 4 Stunden nach Auftreten von MCP-1 [13]. Zusammen mit TNF- α kann MCP-1 die Entzündungsreaktion amplifizieren [14].

Damit spielt MCP-1 eine wichtige Rolle bei der Frage, auf welche Art und Weise sich eine Entzündung entwickelt. Bei fibrotischen Erkrankungen werden häufig erhöhte Spiegel von MCP-1 gefunden [15].

Wie MCP-1 gehört auch RANTES (*Regulated on an Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted*) zur Familie der C-C Chemokine. Es handelt sich hierbei um ein Protein mit einer Größe von ca. 15kD, das von einer ganzen Reihe von Zellen, wie etwa Plättchen, Endothelien, Epithelien, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen und T-Zellen ausgeschüttet wird [16] und bei der Typ1 (T-Helfer-Zell Typ 1 medierte) Entzündung eine wichtige, proinflammatorische [17] Rolle spielt [16]. RANTES wirkt aktivierend und rekrutierend auf inflammatorische Zellen

wie Monozyten, Mastzellen und Eosinophile [18]. Chemotaktisch wirkt es insbesondere auf eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten und T-Zellen [16]. Dabei werden die Anheftung von Makrophagen an Endothelzellen und der selektive Einstrom von CD4+ Makrophagen und CD4+ T-Helfer Zellen gefördert. Weiterhin stimuliert RANTES die Proliferation und Aktivierung von chemokinaktivierten Killerzellen. Die Synthese von RANTES wird durch proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α hochgeregt und von antiinflammatorischen Zytokinen wie *Interleukin 4* (IL-4) und *Interleukin 13* (IL-13) [16] heruntergeregt.

Aus der Familie der α -Chemokine wurde das *Monocyte-Inflammatory-Protein-2* (MIP-2) ausgewählt. MIP-2 ist ein prominenter, ca. 6kDa großer Vertreter aus der Familie der CXC Chemokine. Er wird etwa von Epithelzellen, Endothelzellen, Mastzellen und Makrophagen und von Neutrophilen sezerniert [19].

MIP-2 kann durch mikrobielle Infektionen und durch Lipopolysaccharid (LPS) induziert werden [19]. Dabei wirkt es stark chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten [19] und aktiviert diese während der Entzündung [12]. Vorgeformtes MIP-2 wird in diesen Zellen gefunden [19].

1.2.3. Angiogenetisch wirksame Zytokine

Die Angiogenese ist ein sehr streng regulierter Prozess und beruht auf einer komplexen Interaktion von mehreren Faktoren. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), FGF und PDGF sind die wichtigsten pro-angiogenetischen Faktoren und wirken deutlich mitogen auf vaskuläre Endothelzellen [20, 21].

VEGF ist ein 121 bis 206 Aminosäuren langes Zytokin mit mindestens 5 verschiedenen Isoformen. Ein starker Reiz für die Ausschüttung von VEGF ist die Mangelversorgung eines Bereichs mit Sauerstoff [22]. Kommt es zu einer Gewebsverletzung, schütten Thrombozyten verschiedene Zytokine aus, darunter auch VEGF [23]. Typischerweise erreicht VEGF seinen maximalen Wert im Wundgewebe nach 4 bis 6 Tagen [24]. Zusätzlich sind Epithelzellen und Monozyten Quellen von VEGF [23]. VEGF wirkt im Rahmen der physiologischen Wundheilung chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Monozyten. Weiterhin ist VEGF der potenteste angiogenetisch wirkende Faktor. Er wirkt durch Steigerung der Gefäßpermeabilität sowie durch Endothelzellproliferation und -migration, was zur Bildung neuer Gefäße im Wundgebiet führt. Zusätzlich werden

endotheliale Progenitorzellen rekrutiert und die neu gebildeten Gefäße stabilisiert [23]. In vielen Fällen stimuliert VEGF unter anderem die Bildung des im Folgenden beschriebenen Faktors.

FGF-2 ist ein 146 Aminosäuren langes Zytokin. Er ist ein potenter physiologischer und pathologischer Faktor für die Angiogenese im Wundgebiet und fördert die Wundheilung hauptsächlich durch die Stimulation der Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen im Mausmodell [25]. Weiterhin stimuliert FGF-2 die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten [26]. Topische Applikation von FGF-2 verbessert und beschleunigt die Heilung von Hautwunden in Tiermodellen [27]. Ist FGF-2 hingegen abwesend, verzögert sich die Wundheilung bedeutend [21].

Zusätzlich stimuliert FGF-2 die Hämatopoese, vor allem die Megakaryopoese. In niedrigen Konzentrationen stimuliert TGF- β die FGF-2-Wirkung *in vitro*, in hohen Konzentrationen hemmt es FGF-2. VEGF stimuliert die FGF-2 Produktion [25].

PDGF wird unter anderem von Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Monozyten synthetisiert. Hauptsächlich wird er jedoch in Megakaryozyten synthetisiert und bis zum Einsatz in den α -Granulae von Thrombozyten gespeichert [28]. Sobald es zu einer Gewebsverletzung kommt, wird PDGF von Thrombozyten ausgeschüttet. Nach etwa 2 Tagen erreicht er ein Maximum, fällt danach wieder ab und erreicht an Tag 9 ein erneutes Maximum [24]. PDGF ist ein sehr potenter chemotaktischer Lockstoff für Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Fibroblasten. PDGF-behandelte Wunden im Mausmodell hatten erhöhte Fibroblastenzahlen und mehr Granulationsgewebe, was zu einer deutlichen Wundverstärkung führte. PDGF wirkt stark stimulierend auf die Kollagensynthese [29]. Weiterhin wirkt PDGF proangiogenetisch und mitogen für vaskuläre Endothelzellen [20].

An dieser Stelle sei noch angemerkt, dass für eine komplette Neovaskularisation aber noch weitere Faktoren nötig sind [20], die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht untersucht wurden.

Zu den Faktoren, die hingegen die Gefäßneubildung antagonistisch beeinflussen, gehört etwa IFN- γ [21, 24].

1.2.4. Antiinflammatorische Zytokine

Maus IL-13 wird vor allem durch aktivierte T-Helfer-Zellen Typ 2 (Th2 Zellen) produziert, die unter anderem auch die Interleukine 4, 5 und 10 sezernieren. Menschliches IL-13 wird in aktivierten T-Helfer-Zellen und CD8+ T-Zellen exprimiert. IL-13 ist ein wichtiger Mediator für die Gewebsfibrose, der hier ein Th-2 Entzündungsvorgang zugrunde liegt. Da IL-13 ein potenter Stimulator und Aktivator von TGF- β *in vivo* ist, werden die fibrogenen Effekte von IL-13 durch TGF- β bewirkt [30].

IL-13 hemmt die Aktivität von Makrophagen, was zu einer Reduktion der Produktion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen führt. IL-13 induziert die Differenzierung von Monozyten und erhöht deren Überlebenszeit *in vitro* [30].

Ein weiteres, wichtiges antiinflammatorisches Zytokin ist IL-10. IL-10 ist ein wichtiger Regulator aller entzündlichen Reaktionen. Es wirkt antiinflammatorisch durch die Inhibition der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie etwa *Interleukin 1 beta* (IL-1 β), *Interleukin 6* (IL-6) und TNF- α in aktivierten Makrophagen sowie neutrophilen Granulozyten. IL-10 inhibiert außerdem die Leukozytenmigration, hauptsächlich durch die Inhibition der Synthese von humanem MCP-1 und *Macrophage Inflammatory Protein 1* (MIP-1 α) [31].

Menschliches IL 10 wird etwa von aktivierten CD8+ T-Zellen, CD4+ T-Helfer-Zellen, aktivierten Monozyten und Mastzellen produziert. IL-10 besteht aus einem Homodimer mit Untereinheiten aus jeweils 160 Aminosäuren [32].

1.2.5. TGF- β -Superfamilie

Die TGF- β -Superfamilie besteht aus einer Reihe verschiedener Proteine wie etwa Inhibine, Aktivine, *Mullerian Inhibitory Factor* (MIF), *Growth and Differentiation Factors* (GDF), *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) und die TGF-Isoformen 1-3, wobei letztere untereinander im Durchschnitt 60-80% Homologien aufweisen. Prominentestes Mitglied der Superfamilie ist TGF- β , das eine große Rolle im Verlauf der letzten Phase der Wundheilung spielt. Gut untersucht sind dabei zwei Isoformen, TGF- β_1 und TGF- β_2 [33-35]. Im Rahmen dieser Arbeit galt die Aufmerksamkeit ersterem.

TGF- β_1 wird unter anderem von Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen produziert. Es kann sowohl inhibitorisch als auch stimulierend wirken und ist ein potenter chemotaktischer Faktor für Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Fibroblasten [34]. Darüber hinaus ist dieses Zytokin der potenteste Wachstumsinhibitor für Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und viele andere Zellen [36].

Trotz dieser Wachstumsinhibition spielt TGF- β_1 eine signifikante Rolle bei der Kollagensynthese im heilenden Kolongewebe [37]. TGF- β_1 wird im Verlauf der Wundheilung im perianastomotischen Gewebe signifikant stärker exprimiert und induziert eine verstärkte Kollagensynthese. Dies führt zu einer Vergrößerung der Stabilität in der Anastomosenregion [38].

Eine andere Studie mit kutanen Inzisionswunden ergab, dass eine einmalige Gabe von TGF- β_1 bei alten und bei corticoidbehandelten Tieren, also Tieren mit beeinträchtigter Wundheilung, zu einer signifikanten Steigerung der mechanischen Stabilität führte [39]. Bei kutanen Wunden führte die topische Applikation zu einer Verbesserung der Wundheilung [39, 40]. Jedoch führt dort die Überexpression zu einer verlangsamten Reepithelialisierung der Wunde [41].

TGF- β_1 induziert seine eigene Expression und amplifiziert somit seinen Effekt. Es wirkt angiogenetisch und ist ein wichtiger Regulator der extrazellulären Matrix durch Stimulation von Fibroplasie, der krankhaft gesteigerten Bildung von faserigem Bindegewebe [42], und Kollagenablagerung sowie durch Hochregulation der Synthese von Proteaseinhibitoren. Da all diese Prozesse integrale Bestandteile der Wundheilung sind, spielt TGF- β eine große Rolle in der Wundheilungsregulation [34]. Wird adultes Gewebe verletzt, kommt es zu einer vermehrten TGF- β Produktion, was zu einer vermehrten Synthese und vermindertem Abbau von Matrix Proteinen führt und eine Gewebefibrose verursacht [43].

1.3. Die Wundheilung bei Kolonanastomosen

Die grundlegenden Erkenntnisse zur Wundheilung wurden durch Experimente an der Haut gewonnen. Meist handelt es sich um Inzisionen oder Exzisionen, die dort vorgenommen und analysiert werden. Das hat den Vorteil, dass die Wundentwicklung,

die bakterielle Belastung und die Reproduzierbarkeit relativ leicht kontrolliert werden können. Bei Anastomosen im Dickdarm ist die Situation jedoch ungleich komplexer und weniger gut erforscht [44]. Hohe Bakterienlast, eine vergleichsweise schlechtere Sauerstoffversorgung, erhöhter intraluminaler Druck und ein eventuell erhöhter intraabdomineller Druck sind nur einige Parameter, welche die Wundheilung in diesem Bereich beeinflussen. So enthält ein Gramm Fäzes 10^{11} Bakterien, etwa drei Prozent des Stuhls [37, 44, 45].

Mangelhafte Wundheilung im Anastomosenbereich hat häufig Dehiszenzen, oder – im schlimmsten Fall – ein Versagen der Anastomose zur Folge. Selbst unter optimalen Bedingungen tritt letztere Entität in 3-5% der Operationen auf. Häufig muss jedoch unter weit weniger günstigen Bedingungen operiert werden, wie etwa bei Perforationen, Traumata oder Ischämien, welche die normale Wundheilung zusätzlich erschweren [44].

Kommt es im Verlauf der Wundheilung zu einer Leckage, so kann ein stark bakterienbelasteter Stuhl in die Bauchhöhle gelangen. Je nach Menge kommt es dann zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Peritonitis, einem Krankheitsbild, das mit einer sehr hohen Mortalität behaftet ist. Überlebt der Patient dieses akute Geschehen, so ist die Langzeitüberlebensrate trotzdem niedriger [46]. In Anbetracht der vergleichsweise hohen Zahl [44, 46] derartiger Komplikationen bei der Kolonchirurgie und der gravierenden Folgen von solchen Komplikationen [46] erscheint eine Untersuchung der Wundheilung in diesem Bereich sinnvoll. Jedoch ist es notwendig, zuerst die komplikationslose, einfache Wundheilung in diesem schwer zugänglichen Bereich zu beobachten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der komplikationslosen Wundheilung einer Anastomose im Übergang von Kolon sigmoideum zum Rektum der Ratte. Dabei soll der Zytokingehalt in der Anastomose per ELISA quantifiziert werden und die Anzahl der Zellen, die das fragliche Zytokin exprimieren, per immunhistochemischer Färbung ermittelt werden. Dabei steht Anastomosenmaterial von sechs verschiedenen Zeitpunkten zur Verfügung.

Aufgrund der Vielzahl der untersuchten Zytokine und Zellmarker und aufgrund des langen Beobachtungszeitraums soll auf diese Weise ein möglichst präzises Bild der Vorgänge während der Heilung im Kolon entstehen.

2. Fragestellungen

Zunächst wurde der Fortschritt der Wundheilung mittels eines Score-Verfahrens nach Verhofstad et al. [47] dokumentiert.

- *Lassen sich die Daten von Verhofstad et al. mit den Daten aus der vorliegenden Arbeit in Einklang bringen?*

Anschließend wurde in dieser Arbeit der Zytokinverlauf in der Anastomosenregion im Zeitraum von insgesamt 90 Tagen an Ratten mittels Immunhistochemie untersucht. Bei der Auszählung der angefärbten Zellen wurde zwischen Anastomose selbst und dem perianastomosären Gebiet unterschieden. Folgende Fragen stellen sich daher:

- *Wie ist der Verlauf für die einzelnen Zytokine über 90 Tage?*
- *Gibt es einen Unterschied zwischen der histologischen Zytokinexpression in der Anastomose selbst und in dem perianastomosären Gewebe?*
- *Kann der Verlauf der Zellzahlen (CD4+, CD8+, Makrophagen, B-Zellen) mit der Zytokinexpression in Einklang gebracht werden?*

Bei einer Reihe von Zytokinen wurden zudem die absoluten Zytokinmengen im Anastomosengebiet mittels ELISA ermittelt.

- *Wie ist der Verlauf der Zytokinmengen im ELISA?*
- *Kann der Verlauf im ELISA mit dem Verlauf der Zellzahlen aus der Immunhistochemie in Korrelation gebracht werden? Ist also eine große Zellzahl gleichbedeutend mit einer großen Zytokinexpression?*
- *Ist der Verlauf mit den histologischen Zellmarkerfärbungen (CD4+, CD8+, Makrophagen, B-Zellen) in Einklang zu bringen? Kann man also bei einem Maximum in der Zytokinkonzentration von einer konsekutiven Zellzahlsteigerung ausgehen?*

Zusammenfassend soll folgende Frage beantwortet werden.

- *Welche Besonderheiten fallen bei der Wundheilung im Colon auf und welche Unterschiede gibt es zur kutanen Wundheilung? Welche klinische Relevanz haben die Ergebnisse?*

3. Material und Methoden

3.1. Tiermodell

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden 95 männliche Wistar-Ratten, die zum Operationszeitpunkt zwischen 240 und 280g wogen und drei bis vier Monate alt waren, mit einer Anastomose im Übergang von Kolon sigmoideum zum Rektum versehen. Bei fünf Tieren wurde keine Anastomose angelegt. Sie dienten als Kontrolle. Die Versuchstiere wurden in 6 Gruppen unterteilt (Abb. 2). Je nach Gruppe wurden sie zu einem definierten Zeitpunkt (Tag 0, 3, 7, 14, 30, 90) getötet und die Anastomose wurde entnommen [48].

3.1.1. Versuchstiere und Haltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 100 männliche Wistar-Ratten (Wistar Unilever, Stammbezeichnung HsdCpb:WU, Firma Harlan Winkelmann, Borchem), die bei der Erstoperation zwischen drei und vier Monate alt waren und 240 bis 280g wogen. Alle Tiere wurden in Makrolon-Käfigen in Laminar Airflow Schränken (Scanbur, Koge, Dänemark) gehalten. Die Versuchstiere bekamen Altromin® Pressfutter und Aqua ad Libidum sowie einmal pro Woche eine Ration Haferflocken und Sonnenblumenkerne.

3.1.2. Anästhesie und Operation

Bei den Tieren wurde eine Anastomose im Bereich des rektosigmoidalen Überganges angelegt. Bei fünf Tieren wurde keine Anastomose angelegt. Sie dienten als Kontrollgruppe (Genehmigungsnummer: 621-2531.01-69/98).

Die Anlage der Anastomosen erfolgte durch zehn allschichtig gestochene Einzelknopfnähte mit einer modifizierten Technik nach Gambee unter Schonung der Aa. rectae.

Bei den Operationen wurden folgende monofile vollynthische Fäden in der Stärke 6/0 verwendet: Biosyn (Auto Suture, Elancourt, France), Maxon (Davis & Geck, Wayne, N.Y., USA), Monocryl (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und Monosyn (B.Braun, Meisungen, Deutschland).

Die Tiere wurden in Narkoseboxen (Firma Gerald Büchold, Würzburg) mit Forene® (1-Chlor-2,2,2-Trifluorethyldifluorethylether) anästhesiert und die Anästhesie mittels

spezieller Kopfmasken (Firma Gerald Büchold, Würzburg) aufrecht erhalten (1,8l O₂ mit 1-1,5% Forene®).

3.1.3. Reoperation und Anastomosenentnahme

Abhängig vom jeweiligen endgültigen Reoperationszeitpunkt wurden die Ratten in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt. Reoperationen fanden nach einer Stunde, sowie nach drei, sieben, vierzehn, dreißig und neunzig Tagen statt. Zum Zeitpunkt der Anastomosenentnahme wurden die Tiere wiederum in Narkoseboxen der Firma Gerald Büchold (Würzburg) betäubt. Dabei wurde die eine Hälfte der Anastomose für eine quantitative ELISA Messung aufgearbeitet, ein Viertel in Paraffinblöcke gegossen und das übrige Viertel in Tissuetek® O.C.T.™ (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet (Abb. 2).

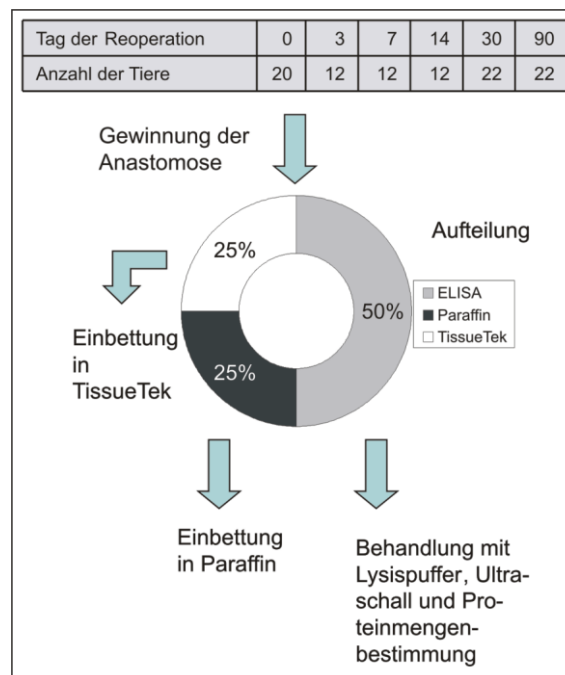


Abbildung 2 Anzahl der Tiere pro Zeitpunkt sowie Aufteilung der Anastomose

3.1.4. Aufarbeitung des Materials für die Immunhistochemie

Die in TissueTek® O.C.T.™ eingebetteten Anastomosenteile wurden zunächst in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff über 10 Minuten schockgefroren und dann bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.1.5. Aufbereitung des ELISA Materials

Ein ca. 200µg schweres Stück Anastomosengewebe beziehungsweise ein gleich schweres Stück unbehandeltes Darmgewebe eines Kontrolltiers wurden in 1ml Lysispuffer gegeben und bei -20°C aufbewahrt.

Dieser Puffer bestand aus 50mM Hepes (Pufferan®, Carl Roth, Karlsruhe), 0,1mM EDTA Puffer (Carl Roth, Karlsruhe), 1% Triton (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim), 150 mosm NaCl und einer Tablette Proteinaseinhibitor (Complite™, Mini, Boehringer, Mannheim) pro 10ml Puffer.

Zur Herauslösung der intrazellulären Proteine wurden die Proben für zwei Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Größere Zellbestandteile wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 14000 Upm entfernt.

Anschließend wurden die Proben bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert.

3.2. **Immunhistochemie**

3.2.1. Kryoschnitte

Bei sämtlichen immunhistochemischen Färbungen wurde Kryomaterial verwendet. Es wurde Probenmaterial von jedem Reoperationszeitpunkt, also vom 0., 3., 7., 14., 30. und 90. Tag gefärbt und ausgewertet. Hierbei wurden pro Primärantikörper jeweils 6 an einem Re-OP-Termin gewonnene Präparate untersucht. Die Rattenanastomosen waren in TissueTek® O.C.T.™ eingebettet und wurden an einem Kryostat (Cryotom 2800 Frigocut N, Reichert Jung, Nußloch) mit einem Leica Messer in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Histobond® Adhäsionsobjektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen) aufgebracht. Anschließend wurden die bestückten Objektträger über 24 Stunden getrocknet, bevor sie in Kryoboxen bei -20°C bis zur Färbung aufbewahrt wurden.

3.2.2. Verwendete Antikörper

In dem folgenden Abschnitt werden die Antikörper und die Strukturen, die sie anfärben, aufgezählt:

B-Zellen: Ki-B1R Klon (DPC Biermann, Nauheim), monoklonaler IgG1 Antikörper, der an B-Lymphozyten und Plasmazellen der Ratte bindet

CD4: W3/25 Klon (DPC Biermann, Nauheim), monoklonaler Maus IgG1 Antikörper, der an T-Helfer-Zellen, Thymozyten und Makrophagen der Ratte bindet

CD8: MRC OX-8 (DPC Biermann, Nauheim), monoklonaler IgG1 Antikörper (Maus gegen Ratte), der an einem Teil der T-Lymphozyten, den meisten NK-Zellen und Thymozyten bindet

FGF-2: Bei FGF-2(sc79) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), affinitätsgereinigter Antikörper vom Hasen, der gegen das Peptide-Mapping der aminoterminalen Domäne von humanen FGF-2 gerichtet ist. Dieser Antikörper reagiert mit FGF-2 aus Maus, Ratte und Mensch.

IFN- γ : IFN- γ (D-17) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper von der Ziege, der am carboxyterminalen Ende von Interferon- γ der Maus bindet. Der Antikörper bindet auch an Ratten-IFN- γ .

IL-10: IL-10 (M-18) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper gegen das Peptide-Mapping am carboxyterminalen Ende von Maus-IL10. Der Antikörper reagiert außerdem mit Ratten-IL-10.

IL-13: affinitätsgereinigter, rekombinanter Antikörper (DPC Biermann, Nauheim) gegen Maus-IL-13.

Makrophagen/Monozyten: ED-1 Klon (DPC Biermann, Nauheim), der an Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen der Ratte bindet.

MCP-1: Bei MCP-1(R-17) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper von der Ziege, der an das carboxyterminale Ende von Ratten-MCP-1 bindet.

MIP-2: polyklonaler, affinitätsgereinigter, rekombinanter Antikörper (DPC Biermann, Nauheim), der an MIP-2/GRO b der Ratte bindet.

PDGF-B: PDGF-B(H55) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper vom Kaninchen, der gegen ein rekombinantes Protein, das mit den Aminosäuren von humanem PDGF-B an den Positionen 136-190 des carboxyterminalen Endes korrespondiert, gerichtet ist. Dieser

Antikörper reagiert mit PDGF-B aus Mensch, Ratte und Maus. und weist keine Kreuzreaktivität mit PDGF-A auf.

RANTES: RANTES (C-19) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), affinitätsgereinigter, polyklonaler Schaf-Antikörper, der gegen das Peptide-Mapping am carboxyterminalen Ende von humanem RANTES ausgerichtet ist. Der Antikörper bindet auch an Maus- und Ratten-RANTES.

TGF- β 1: TGF- β 1(V) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper vom Kaninchen, der am carboxyterminalen Ende von einer Prekursorform von humanem TGF- β 1. TGF- β 1(V) reagiert mit humanem-, Maus- und Ratten-TGF- β 1.

TNF- α : TNF- α (M-18) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper von der Ziege, der am carboxyterminalen Ende von Maus TNF- α bindet. Der Antikörper hat keine Kreuzreaktion mit TNF- β .

VEGF: VEGF(C-1) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), monoklonaler IgG_{2a} Antikörper der Maus, der mit den Aminosäuren 1-140 von VEGF humanen Ursprungs korrespondiert. VEGF(C-1) reagiert mit VEGF aus Maus, Ratte und Mensch. Es treten keine Kreuzreaktionen mit VEGF-B, VEGF-C oder PlGF auf.

3.2.3. Färbemethode

Bei der Färbung wurden alle Schnitte bei -20°C 10 Minuten in kaltem Aceton fixiert. Ausgenommen wurden hier nur die B-Zell-Färbungen. Hier konnte nur Methanol verwendet werden, da sonst die Epitope für KiB1R zerstört worden wären.

Es schloss sich eine fünfzehnminütige Lufttrocknung an. Dann wurden die Präparate 15 Minuten lang in Methanol getaucht, dem H₂O₂ (Sigma-Aldrich Chemie, München) in einer Konzentration von 0,3% beigemischt war. Dieser Schritt diente der Zerstörung der endogenen Gewebeperoxidase. Anschließend folgten drei jeweils fünf Minuten lange Waschschrte in einem Tris-NaCl Puffer mit 0,05% bovinem Serum Albumin (BSA). Dieser Puffer mit pH 7,4 kam bei allen Waschschrten zum Einsatz und setzte sich pro 1 Liter destilliertem Wasser aus 0,6g Tris, 8,1g NaCl sowie 50mg BSA zusammen.

Daraufhin wurden die Präparate mit einem Proteinblock (Protein Block, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg) beträufelt und 10 Minuten inkubiert. Nach Abklopfen des Proteinblocks wurde der Primärantikörper in der jeweils benötigten Verdünnung aufgetragen. Die Antikörperkonzentrate wurden mit dem „*DAKO Antibody Diluent Kit with background reducing Components*“ (DAKO Deutschland GmbH, Hamburg) verdünnt.

In einer feuchten Kammer inkubierten die Schnitte dann über Nacht bei +4°C im Kühlschrank. Am darauf folgenden Morgen wurden die Präparate drei mal fünf Minuten im Tris-NaCl-BSA-Puffer gewaschen, um die überschüssigen und unspezifisch bindenden Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde auf jedem Schnitt der Sekundärantikörper, der mit 10% Rattenserum (Serotec GmbH, Düsseldorf) verdünnt war, aufgetragen.

Nach einer halben Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur in einer trockenen Kammer wurden die Präparate erneut drei mal fünf Minuten im Tris-NaCl-BSA-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die biotinylierte Peroxidase aufgebracht, die ebenfalls 30 Minuten in einer trockenen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Sekundärantikörper und der biotinylierten Peroxidase handelte es sich um das LSAB+ Kit (labelled streptavidin biotin) der Firma DAKO. Dieses kann sowohl bei in TissueTek® O.C.T.™ als auch bei in Paraffin eingebetteten Geweben verwendet werden. Es können Primärantikörper von Kaninchen, Maus und Ziege eingesetzt werden.

Erneut wurden die Schnitte drei mal fünf Minuten gewaschen, bevor die antikörpermarkierten Stellen mit 3,3'-Diaminobenzidine (BioGenex Liquid DAB Substrate Pack und DAB-Ein-Komponenten-Lösung, beide von DCS, Hamburg) braun gefärbt wurden. Der Fortschritt wurde mit einem Lichtmikroskop verfolgt und zu gegebener Zeit abgestoppt, indem das Präparat in eine Küvette mit Tris-NaCl-BSA-Puffer getaucht wurde. Danach wurde es kurz in destilliertes Wasser (aus Reinstwasseranlage Millipore GmbH, Schwalbach) gestellt und dann für etwa fünf Minuten in eine Küvette mit Hämalun getaucht, um eine Gegenfärbung zu erhalten. Anschließend wurden die Präparate unter fließendem Wasser zehn Minuten lang gespült. Danach wurden sie entwässert, indem sie drei mal eine Minute in drei verschiedenen Küvetten mit reinem Alkohol und anschließend zwei mal zehn Minuten in 99,8% Xylol standen, bevor sie

mit einem Deckgläschen (Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) und dem xylohaltigen Eindeckelmittel Entellan® (Merck, Darmstadt) haltbar gemacht wurden.

3.2.4. Auswertung

Die Auswertung wurde mit einem BH-2 Mikroskop der Firma Olympus (Hamburg) durchgeführt. Es wurden jeweils die Anzahl der gefärbten Zellen im Anastomosensbereich selbst und in den angrenzenden, 10 Krypten breiten Bereichen angegeben. Die Gesamtzahl der angefärbten Zellen in den beiden perianastomotischen Bereichen wurde ermittelt. Bei den Kontrollen wurde wegen der fehlenden Anastomose ein zwanzig Krypten breiter Bereich ausgezählt.

3.2.5. Fotografie

Die Präparate wurden in verschiedenen Vergrößerungen und Ausschnitten mit einer Olympus C5050Z Digitalkamera (Firma Olympus, Hamburg) am Olympus BH-2 Mikroskop fotografiert. Die Auflösung betrug dabei 5 Megapixel pro Bild. Die Kamera war mittels USB Kabel an den Rechner gekoppelt. An Software kam dabei der „Camera Controller“ (Pinetree Computing LLC, Olivette USA) zum Einsatz. Die Software ermöglichte eine direkte Überprüfung der Bildschärfe und der Bildhelligkeit am Computermonitor.

3.2.6. Auswertungskriterien beim Gewebsscore

Zu jedem der sechs Zeitpunkte wurden jeweils sechs Präparate in HE Färbung angefertigt. Bei der Beurteilung der Schnitte wurde eine von Biert et al. [49] entwickelte und von Verhofstad et al. [47] modifizierte semiquantitative Skala eingesetzt. Folgende Parameter wurden hier bewertet:

Nekrose: Das Ausmaß der Nekrose wurde in vier Grade unterteilt: Eine völlige Abwesenheit von nekrotischem Gewebe wurde mit Null Punkten bewertet, wenige nekrotische Areale mit einem, einige Areale mit zwei und massive Nekrose mit drei Punkten.

Ödem: Hier wurde das Verhältnis von aktueller ödematöser Wanddicke zur normalen physiologischen Wanddicke bewertet. Normalbefunde bekamen null Punkte, ein

Verhältnis von 1-1,5 einen und ein Verhältnis von 1,5-2 zwei Punkte. War die Wandstärke der Anastomose mehr als doppelt so dick, wurden drei Punkte gegeben.

Mukosales Epithel: Hatte die Mukosa ein normales, glanduläres Epithel, wurden keine Punkte vergeben. Bei einem kubischem Epithel ohne Drüsen wurden ein, bei einem nur teilweise kubischen Epithel zwei, und bei einer Mukosa ohne irgendwelche epithelialen Auflagerungen drei Punkte vergeben.

Submukosal-muskuläre Schicht: Die submukosale Reparatur wurde anhand des „*Fibroblast stretching and bridging*“ in der Anastomose beurteilt. War dieses gut, gab es keinen Punkt. Für Mittelmäßiges gab es einen Punkt, für Schlechtes zwei und für die Abwesenheit von „*stretching and bridging*“ drei Punkte. Es ergab sich, wie in Tabelle 1 dargestellt, folgendes Punkteraster:

Tabelle 1 Score nach Verhofstad et al mit den Parametern Nekrose, Ödem, Epithelialisierungsdefizit und muskuläres Bridgingdefizit

Score	Nekrose	Ödem	Mukosales Epithel	Submukosal-muskuläre Schicht
0	Keine	Kein	Normal glandulär	Gute Brückenbildung
1	Kleine Areale	Wenig	Normal kubisch	Durchschnittliche Brückenbildung
2	Einige Areale	Ausgeprägt	Unvollständig kubisch	Schlechte Brückenbildung
3	Massiv	Schwer	Nicht vorhanden	Keine Brückenbildung

3.3. ELISAs

3.3.1. Prinzip des ELISAs und verwendete Geräte

Die Abkürzung ELISA steht für *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*. Alle verwendeten ELISA Kits stammen aus dem Cytoscreen™ Angebot der Firma Biosource (Biosource Deutschland GmbH, Solingen). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zytokine IL-13, MCP-1, MIP-2 und TNF- α untersucht. Alle Proben, Standards, Referenzen und Blanks wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Dabei wurde aus den beiden Ergebnissen ein Mittelwert gebildet.

Ein für das jeweils gesuchte Zytokin spezifischer Antikörper war mit dem F_c-Teil an den Wells befestigt und somit immobilisiert. In das Well wurde nun eine Probe (oder ein Standard) pipettiert, der eine unbekannte Konzentration des gesuchten Zytokins enthielt. Zur besseren Durchmischung der Proben und Reagenzien wurde ein IKA Schüttler MTS4 (IKA, Staufen) verwendet. Die zu messende Substanz haftete nun an den immobilisierten Antikörpern. Im Falle des MIP-2 ELISAs war eine Inkubation bei 37°C notwendig. Hierzu wurde ein Nuair IR Autoflow CO₂ Water Jacketed Incubator (Zapf Instrumente, Sarstedt), der auf 37°C und 5% CO₂ eingestellt war, eingesetzt.

Der Rest der Probe wurde mit einem Waschschrift aus dem Well entfernt. Bei allen Waschschriften wurde ein Plate-Waschgerät verwendet (Dynatech MWG Plate-Waschgerät, Dynatech, Guernsey Channel Islands). Dieses wurde mit dem Waschpuffer verwendet, der dem Kit beilag und vorschriftsmäßig im Verhältnis 1:25 mit destilliertem Wasser (Aqua ad injectabilia, Delta Pharma GmbH, Pfullingen) verdünnt worden war.

Dann wurde ein zweiter, mit Biotin gekoppelter Antikörper hinzugegeben. Dieser haftete an einem anderen Epitop des Zytokins. Ein weiterer Waschschrift folgte. Anschließend wurde Streptavidin HRP (*Horseradish Peroxidase*) zugegeben. Streptavidin bindet an das Biotin des zweiten Antikörpers und koppelt so die Peroxidase an den Komplex an. Überschüssiges, nicht gebundenes Streptavidin-HRP wurde in einem weiteren Waschschrift entfernt. Anschließend wurde ein Chromogen, in diesem Fall Tetramethylbenzidine (TMB), hinzugegeben. TMB wurde von der Horseradish Peroxidase umgesetzt und bekam eine blaue Farbe. War die Intensität stark genug, wurde die Reaktion mittels einer im Kit enthaltenen Stop- Solution abgebrochen. Der Inhalt der Wells färbte sich nach Zugabe der Chemikalie gelb.

Bei allen Assays wurden die Extinktionen der einzelnen Wells bei einer Wellenlänge von 450nm in einem Microplate Reader (Molecular Devices Thermo Max Microplate Reader, Molecular Devices GmbH, Ismaning) gemessen und automatisch per Software (Softmax Version 2.34, Molecular Devices Corp., Ismaning) anhand der Reihe mit Standardverdünnungen in die entsprechenden Konzentration umgerechnet. Diese Verdünnungsreihen wurden bei jeder Messung angefertigt. Um die Genauigkeit der Messung zu beurteilen, lagen den Kits für IL-13 und TNF- α Kontrollen mit definierten

Zytokinmengen bei. Bei allen Bestimmungen lagen die Kontrollergebnisse im tolerierten Bereich.

3.3.2. Proteinbestimmung

Von meinem Vorgänger Dirk Ziegler wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben durch einen Proteinassay der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bestimmt. Dabei machte man sich den Umstand zunutze, dass sich bei saurem Coomassie-Brilliant-Blau (G250) bei Proteinbindung das Absorptionsmaximum von 495 nach 595nm verschiebt. Mittels eines Microplate Readers wurde die Dichteänderung mit einer Standardreihe verglichen und die Konzentration wurde auf 100µl umgerechnet [48].

3.3.3. Auswertung

Die Proteinkonzentrationen in den einzelnen lysierten Proben wurden mittels eines Proteinassays ermittelt und auf 100µl Probenflüssigkeit umgerechnet. Folglich wurden die aus den ELISA bestimmten Konzentrationen ebenfalls auf 0,1ml umgerechnet, auf das Gesamtprotein bezogen und anschließend auf 430µg Gesamtprotein hochgerechnet. Die Formel lautet:

$$[M_{Zytokin/430\mu g}] = [C_{ZytokinELISA}] \cdot \frac{0,1ml \cdot 430}{[M_{Gesamtprotein}] \cdot 430}$$

mit: $[M_{Zytokin/430\mu g}]$ = Zytokinmenge [pg/430µg Gesamtprotein]
 $[C_{Zytokin ELISA}]$ = Zytokinkonzentration, die man im ELISA erhalten hat [pg/ml]
 $[M_{Gesamtprotein}]$ = Menge [µg] des in 100µl Probe vorhandenen Gesamtproteins

3.4. Statistische Auswertung

Sämtliche Statistiken wurden mit den Programmen SPSS Version 13 (SPSS Inc., Chicago) sowie mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond) durchgeführt. Als signifikant wurde ein Niveau <5%, als hochsignifikant ein Niveau <1% gewertet.

Statistische Auswertung der Immunhistochemie

Zunächst wurde mittels eines Kruskal-Wallis-H Tests überprüft, ob die Zellzahlen der sechs verschiedenen Zeitpunkte zu den jeweiligen Zellzahlen der Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich waren. Wurde eine Signifikanz festgestellt, wurde mittels Mann-Whitney-U Tests überprüft, ob dieser Wert auch signifikant gegenüber seinem Vorwert verändert war. War dies der Fall, wurde dieser Wert im Diagramm mit einem Stern (*) versehen. Die Wertegruppen „Anastomose“ und „Perianastomose“ wurden separat betrachtet.

Zusätzlich wurde mittels eines T-Tests überprüft, ob sich zu einem bestimmten Zeitpunkt die Zellzahlen von Anastomose und Perianastomose signifikant unterschieden. Diesem Test voraus ging ein Levene Test.

War das Ergebnis des T-Tests signifikant, wurde dies im Diagramm mit einem Paragrafenzeichen (§) markiert.

Statistische Auswertung der ELISAs

Auch beim ELISA wurden die Werte zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten zunächst gegen die Kontrollwerte mittels eines Kruskal-Wallis-H Tests auf Signifikanz überprüft. War dies der Fall, schloss sich ein Mann-Whitney-U Test an, um eine Signifikanz gegenüber dem Vorwert festzustellen. War dies der Fall, wurde dieser Wert im Diagramm mit einem Stern (*) versehen.

Korrelation der Ergebnisse aus Immunhistochemie und ELISA

Die Werte aus ELISA und IHC wurden für jeden Zeitpunkt miteinander korreliert, indem ein bivariater Test nach Pearson angewendet wurde. Auch hier wurden Anastomose und Perianastomose separat betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. morphologische Beurteilung

Zunächst wurde – noch vor den immunhistochemischen Untersuchungen – der Verlauf der Wundheilung anhand eines von Biert et al. [49] entwickelten und von Verhofstad et al. [47] modifizierten Score Systems dokumentiert. Dabei wurden die Parameter Ödemausprägung, Nekrose, Epitheldefizit und das Defizit beim muskulären Bridging berücksichtigt (Abb.3).

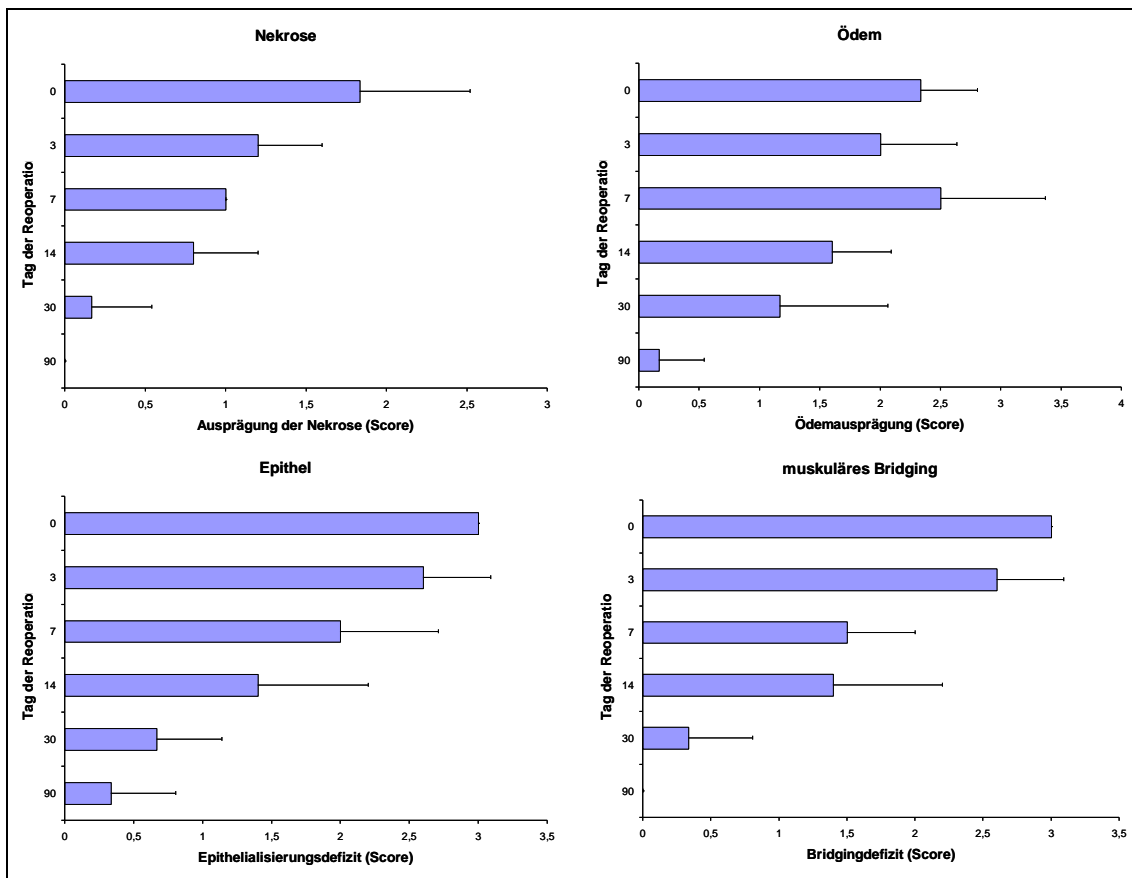


Abbildung 3 Verlauf der Parameter Nekrose, Ödem, Epithelialisierungsdefizit und Defizit beim muskulären Bridging zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 post Operation. Allmählicher Rückgang der vier Scores über 90 Tage. Im Ödemscore Maximum an Tag 7. Hier war das ödematöse Gewebe dem Granulationsgewebe weitgehend gewichen. In den Diagrammen wurde +1 Standardabweichung dokumentiert.

An Tag 0 war erwartungsgemäß die Ausprägung von Nekrose und Ödem sehr hoch. Epithel und muskuläres Bridging waren nicht vorhanden. Von Tag drei an sanken alle vier Scores kontinuierlich ab – mit Ausnahme des Ödemscores, der an Tag sieben sein

Maximum hatte, bevor auch er bis zum 90. Tag etwa auf den Ausgangswert absank (Abb.3 und 4).

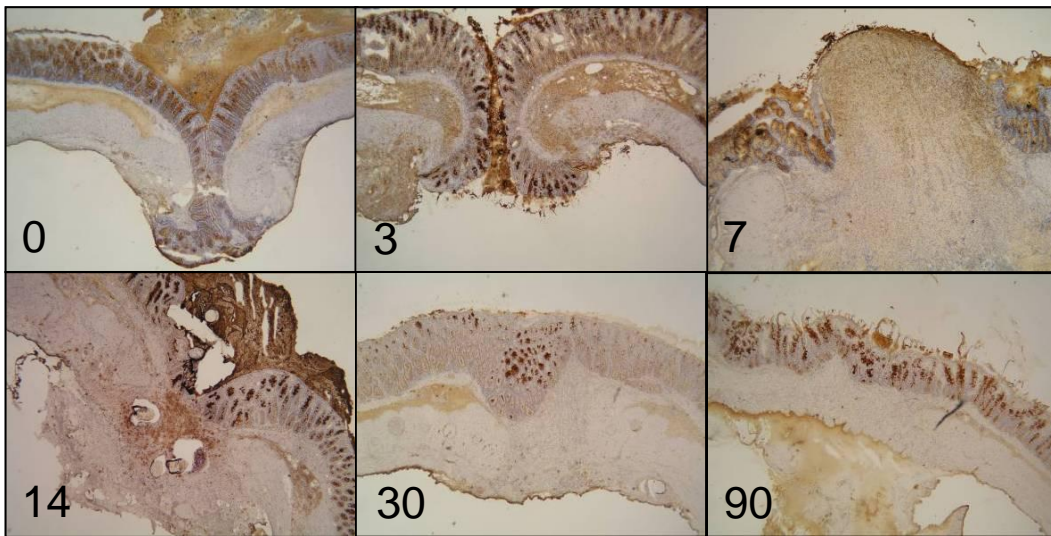


Abbildung 4 Histologie zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation. Histologischer Verlauf der Wundheilung im Bereich der Anastomose im Kolon. Zunehmend ausgeprägtes Ödem bis Tag 3, das allmählich durch Granulationsgewebe (Tag 7) ersetzt wurde. Narbige Abheilung bis Tag 90.

4.2. Proinflammatorische Zytokine

4.2.1. TNF- α

TNF- α stieg im anastomotischen Gewebe von Tag 3 bis zum Maximum an Tag 14 (Abb. 5) stark an. Von Tag 3 bis 7 war der Anstieg sogar hochsignifikant ($p=0,003$). Von Tag 14 über Tag 30 bis Tag 90 (Abb. 5) kam es zu einem signifikanten Absinken der Zellzahlen.

Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bis zum Tag 14 ein weit weniger steiler, aber dennoch hochsignifikanter Anstieg ($p=0,003$, Abb. 6) mit darauf folgenden allmählichen Abfall auf geringfügig höhere Werte als im naiven Kolon bis nach Tag 90 (Abb. 6).

Im Kruskal-Wallis Test waren anastomosär die Werte von Tag 7 bis Tag 30, perianastomosär die Werte der Tage 3 bis 30 gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (nicht abgebildet).

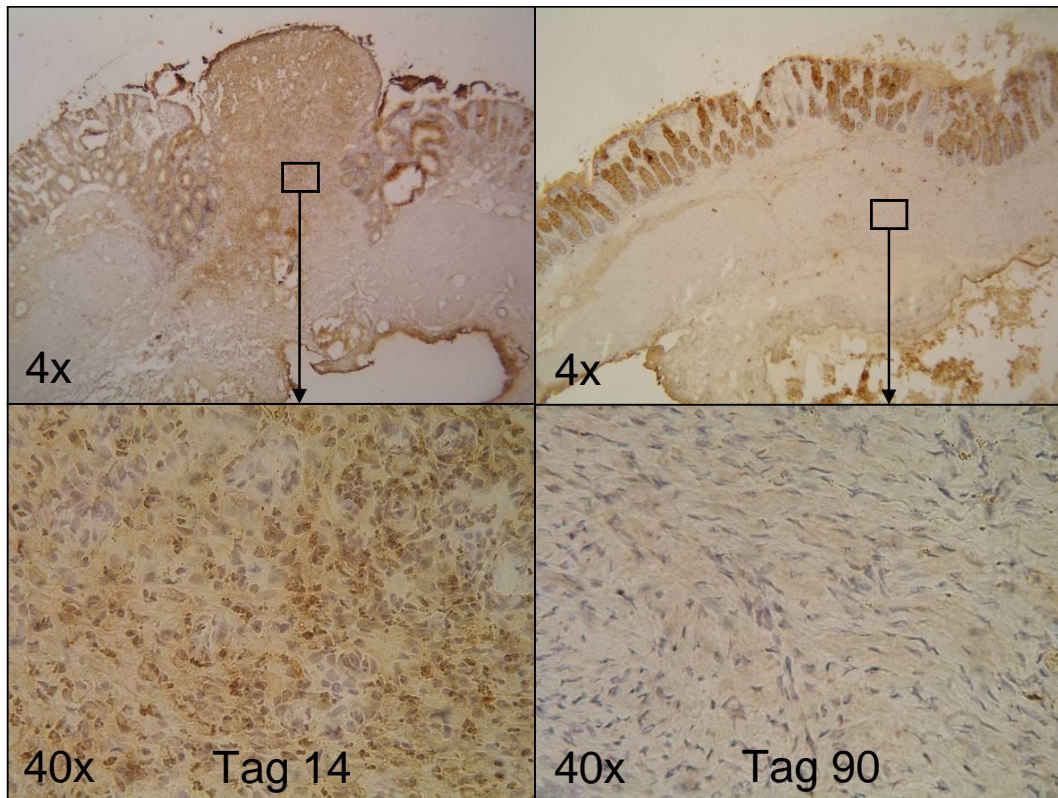


Abbildung 5 Immunhistochemische Färbung von TNF-a positiven Zellen an Tagen 14 und 90. Tag 14: Maximum der Zellzahlen, reichlich Granulationsgewebe, deutliche Anfärbung des Interstitiums. Tag 90: nur geringfügige Anfärbung von TNF-a im Bereich der Anastomose, reifes Narbengewebe. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x).

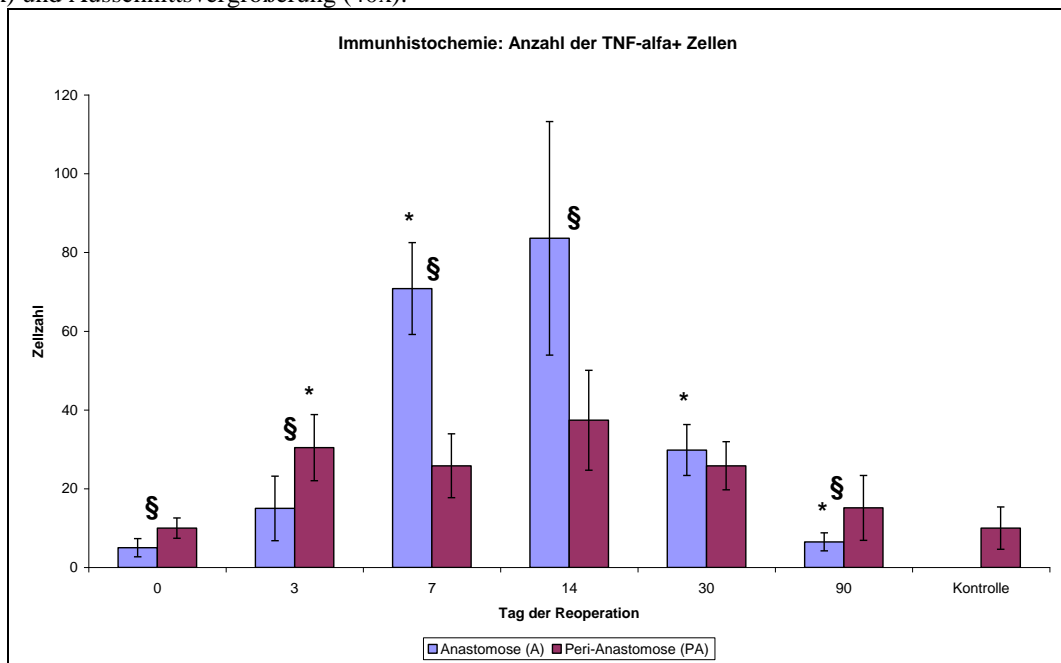


Abbildung 6 Verlauf der Zellzahlen für TNF-alpha zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Maxima bei A. und PA. am Tag 14. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA an den Tagen 0/3/7/14/90. Folglich ist A. der Hauptsekretionsort. +/-1 SD dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanz zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

Im ELISA stieg TNF- α von Tag 0 bis Tag 7 nur allmählich an. Erst dann zeigte sich ein steiler Anstieg von TNF- α im Anastomosengebiet mit einem Peak am Tag 30 und einem darauf folgendem Abfall bis Tag 90. Dabei fiel der Wert etwas unter den Wert im normalen, unoperierten Kolon (Abb. 7).

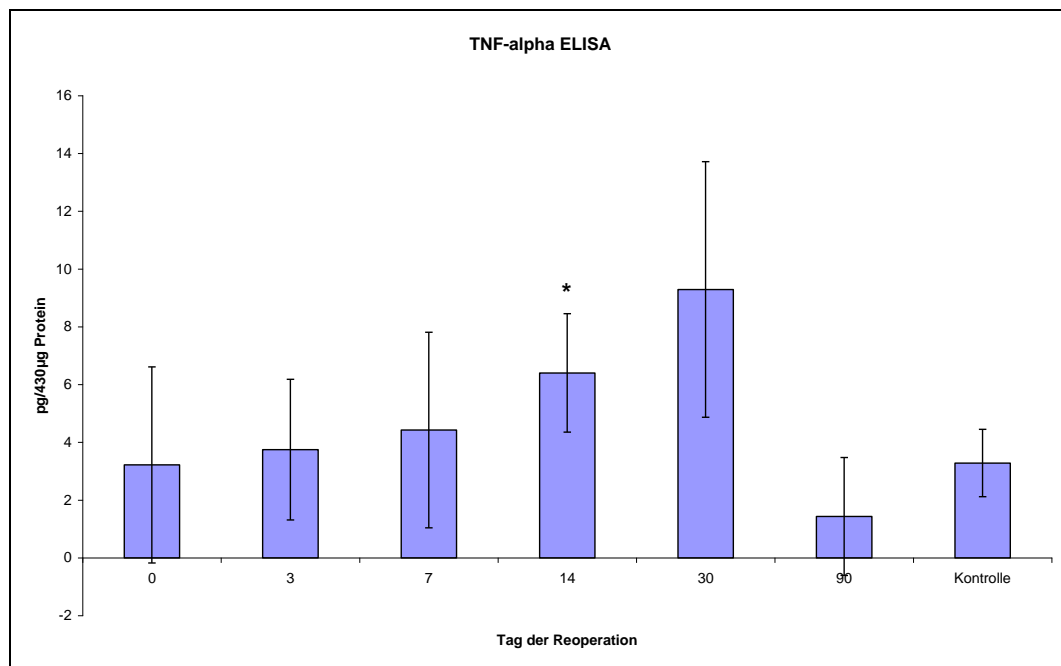


Abbildung 7 Verlauf der Zytokinmengen bezogen auf 430µg Protein im TNF- α ELISA. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum vorherigen Zeitpunkt wurden nur an Tag 14 dokumentiert (*). Maximum der Proteinkonzentration erst an Tag 30 mit anschließendem Abfall der Werte unter den Kontrollwert an Tag 90.

4.2.2. IFN- γ

IFN- γ stieg im anastomotischen Gewebe von Tag 0 bis Tag 7 stetig und steil an mit einem Maximum an Tag 7 und fiel daraufhin bis Tag 90 allmählich wieder ab. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bis zum Tag 3 ein steiler Anstieg mit darauf folgendem Plateau bis zum Tag 30. Danach sank die Zellzahl bis Tag 90 langsam ab (Abb. 8).

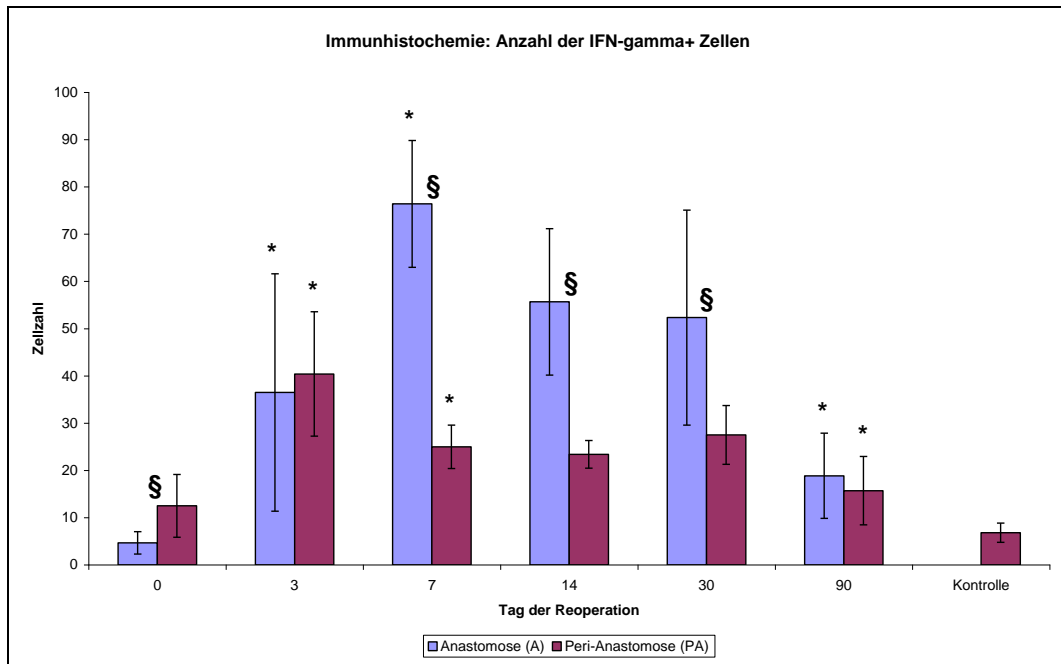


Abbildung 8 Verlauf der Zellzahlen für IFN- γ zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. A: steiler Anstieg der Zellzahlen bis Maximum an Tag 7, danach kontinuierlicher Abfall bis Tag 90. PA: Maximum an Tag 3, deutlich geringer ausgeprägter Anstieg der Zellzahlen als in A. An den Tagen 0/7/14/30 signifikante Unterschiede der Zahlen zwischen A. und PA. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

4.3. Chemokine

4.3.1. MCP-1

MCP-1 stieg im anastomotischen Gewebe von Tag 0 bis Tag 7 signifikant und sehr steil und an. Es hatte ein Maximum an Tag 7 und fiel daraufhin bis Tag 90 allmählich wieder ab. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bis zum Tag 3 ein signifikanter Anstieg der Zellzahl, die von Tag drei bis sieben konstant blieb und danach sehr langsam und kontinuierlich bis Tag 90 auf den Ausgangswert abfiel (Abb. 9).

Im ELISA zeigte sich bis zum Tag 3 ein deutlicher Anstieg mit darauf folgenden, langsamen Abfall bis zum Tag 90 (Abb. 10).

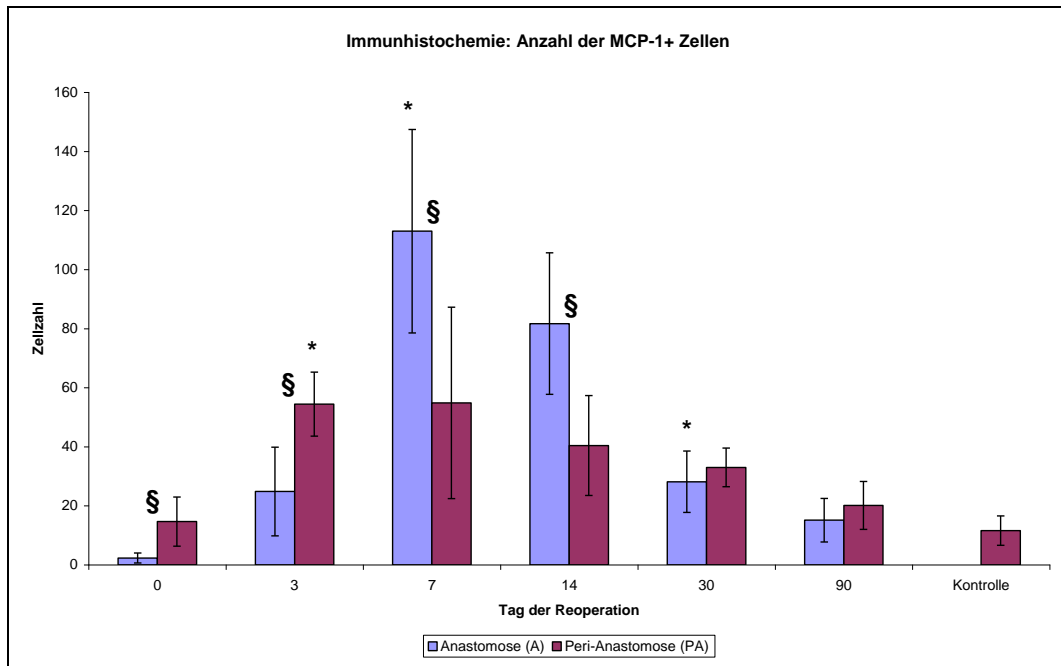


Abbildung 9 Verlauf der Zellzahlen für MCP-1 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. A: Maximum an Tag 7. PA: Maximum an Tag 3. Signifikant unterschiedliche Zellzahlen zwischen A. und PA. an den Tagen 0/3/7/14. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

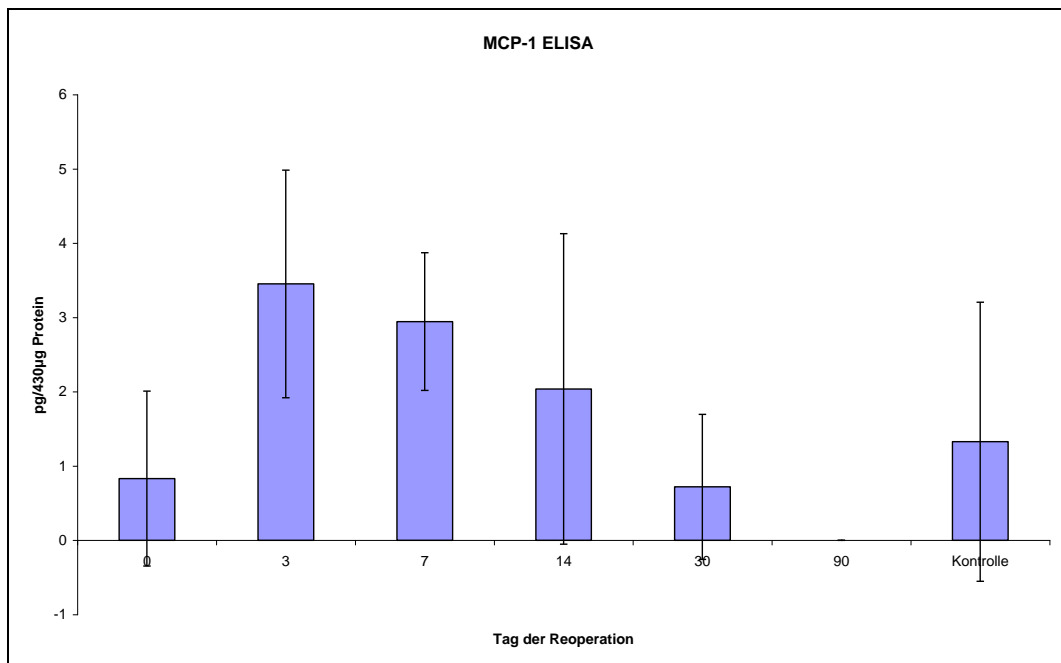


Abbildung 10 Verlauf der Zytokinmengen bezogen auf 430µg Protein im MCP-1 ELISA. Im Verlauf des Untersuchungszeitraums waren die Schwankungen der Zytokinkonzentration zum jeweils vorhergehenden Untersuchungszeitpunkt nicht signifikant. Kein Nachweis von MCP-1 an Tag 90. +/- 1 SD wurden dokumentiert.

4.3.2. RANTES

RANTES zeigte im anastomotischen Gewebe von Tag 3 bis Tag 7 einen hochsignifikanten und sehr steilen Anstieg mit einem Maximum an Tag 7 (Abb. 12) und fiel darauf bis Tag 90 (Abb. 12) kontinuierlich ab. Hierbei war lediglich der Abfall von Tag 14 bis 30 statistisch signifikant. Die Zellzahlen an Tag 0, 3 und 90 unterschieden sich bei RANTES nicht signifikant von den Kontrollen (Abb. 11).

Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bis zum Tag 14 ein Plateau mit einem nur minimalen Anstieg. Das nicht signifikante Maximum lag bei Tag 30. Bis Tag 90 sank die Zellzahl wieder leicht ab. Im Kruskal-Wallis Test unterschieden sich lediglich die Werte der Tage 14 und 30 signifikant von den Kontrollen.

Im ELISA zeigte sich bis zum Tag 7 ein deutlicher Abfall mit darauf folgendem Anstieg bis Tag 14. Nach Tag 14 wurde wieder ein leichten Abfall bis Tag 90 festgestellt [48].

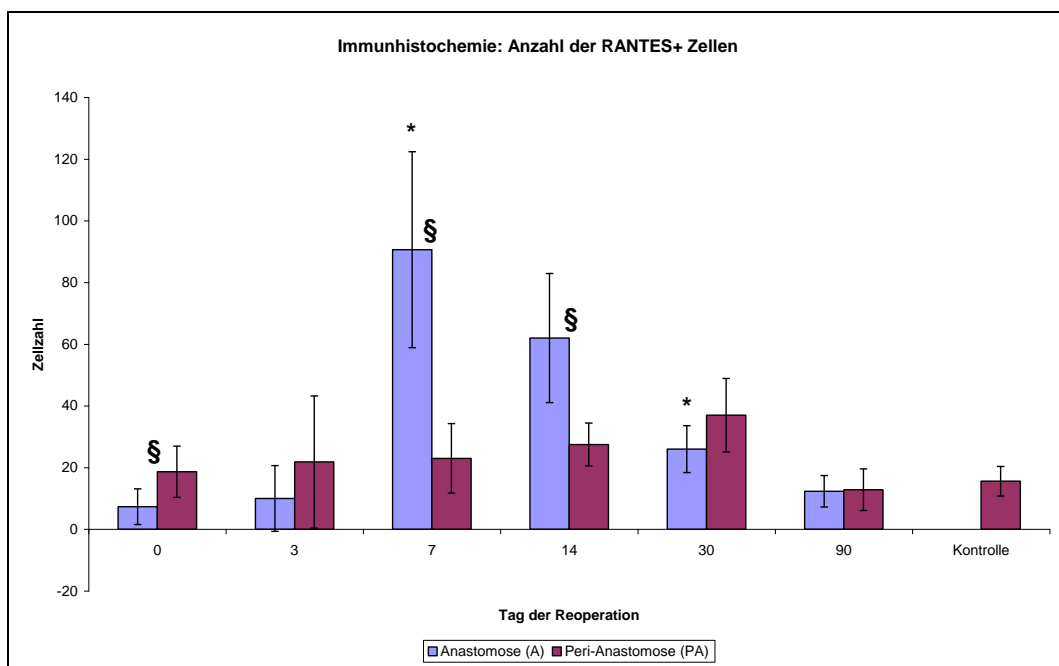


Abbildung 11 Verlauf der Zellzahlen für RANTES zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Ausgeprägtes Maximum an Tag 7 mit Rückgang der Zahlen auf Kontrollniveau an Tag 90 in A. In PA waren nur geringe Zellzahlsteigerungen zu verzeichnen. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

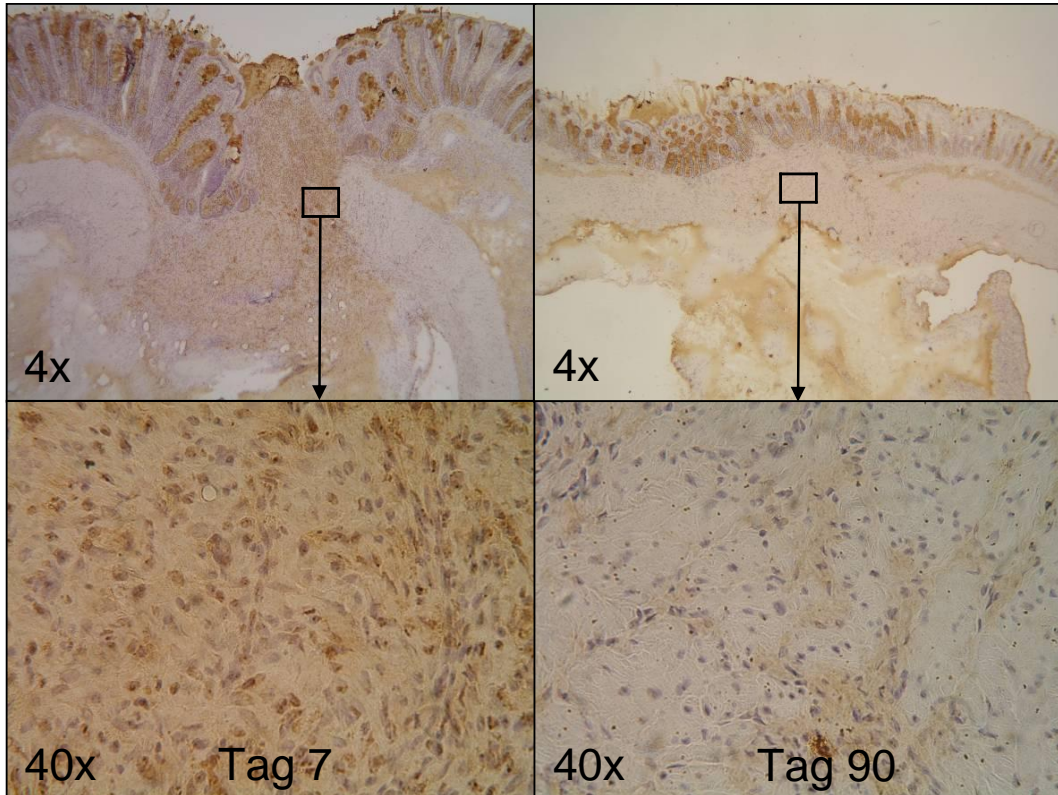


Abbildung 12 Immunhistochemische Färbung von RANTES positiven Zellen an Tag 7. Maximum an Tag 7 mit Anfärbung des Interstitiums im Bereich A. An Tag 90 nur geringe Anfärbung in A. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x).

4.3.3. MIP-2

MIP-2 zeigte im anastomotischen Gewebe von Tag 0 bis Tag 7 einen hochsignifikanten Anstieg ($p=0,004$ bzw. $p=0,006$) mit einem Maximum an Tag 7 und einem nachfolgendem protrahiertem Abfall bis zum Tag 90. Die Werte von Tag 0 und 90 unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle (Abb. 13).

Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich ein deutlicher und signifikanter Anstieg mit Maximum am Tag 3 und danach ein langsamer und diskontinuierlicher Abfall bis nach Tag 90. An diesem Tag war die Zellzahl immer noch signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (Abb. 13).

Im ELISA zeigte sich bis zum Tag 3 ein deutlicher und signifikanter Anstieg mit darauf folgendem ungleichmäßigem Abfall bis zum Tag 90. Es gibt in diesem Verlauf sehr große Ähnlichkeiten mit MCP-1 (Abb. 14).

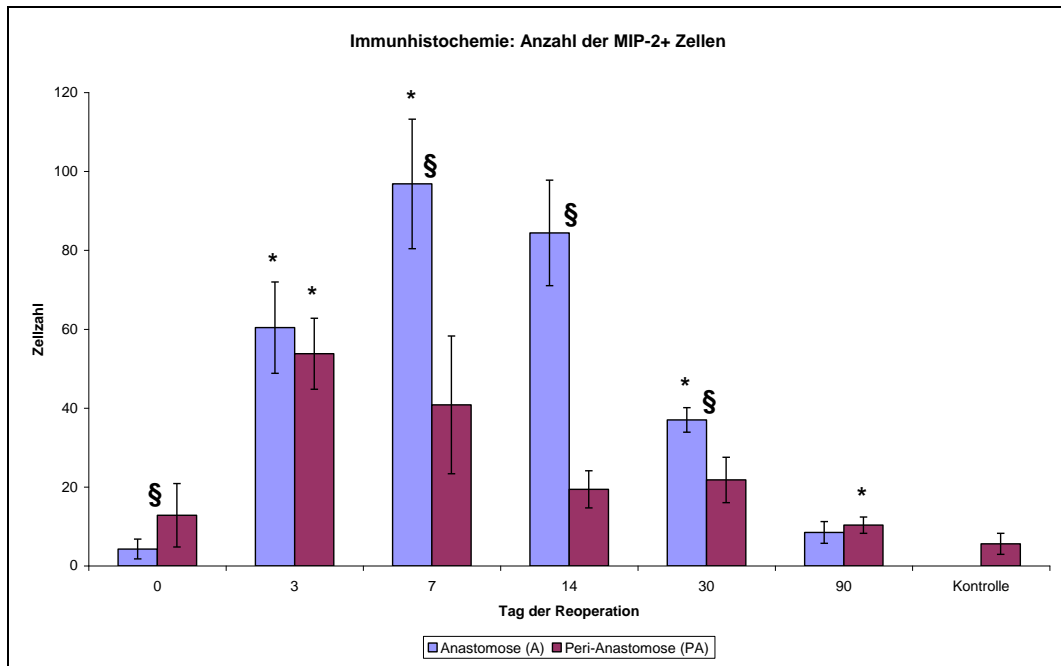


Abbildung 13 Verlauf der Zellzahlen für MIP-2 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. deutlicher Anstieg bis Maximum an Tag 7, in PA Maximum schon an Tag 3. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA an Tagen 0/7/14/30. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

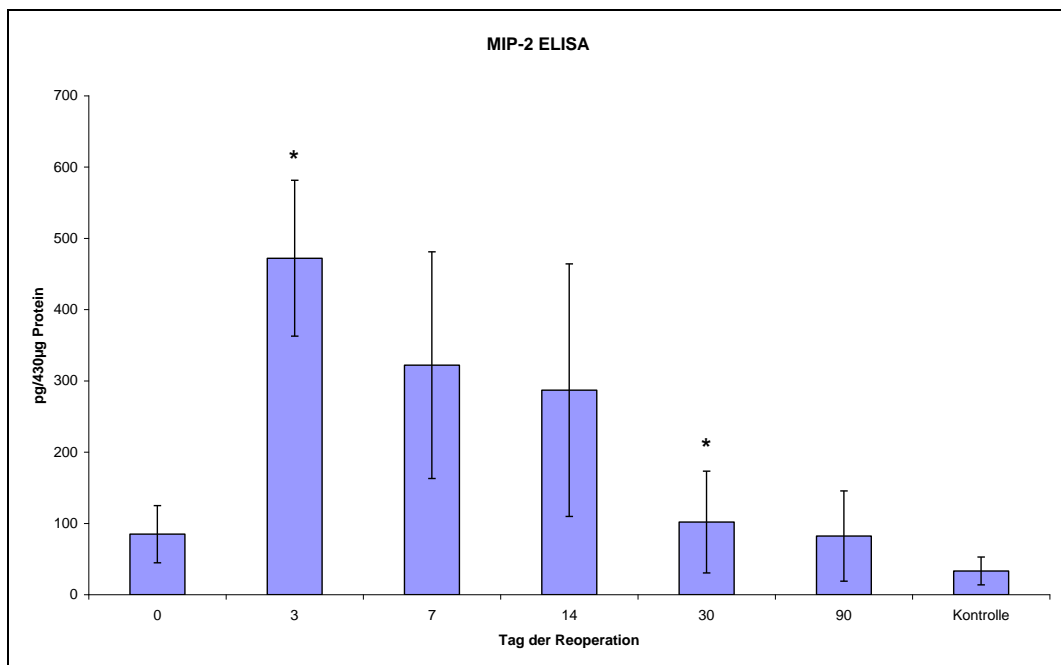


Abbildung 14 Verlauf der Zytokinmengen bezogen auf 430µg Protein im MIP-2 ELISA. Ausgeprägtes Maximum an Tag 3, an Tag 90 immer noch höhere Spiegel als bei den Kontrollen. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert.

4.4. Angiogenetisch wirksame Zytokine

Von den Zytokinen dieser Gruppe liegen keine ELISA Daten vor.

4.4.1. VEGF

VEGF stieg im anastomotischen Gewebe zwischen Tag 3 und Tag 7 sehr steil und hochsignifikant mit einem Maximum an Tag 7 an. Es schloss sich ein protrahierter Abfall bis zum Tag 90 an (Abb. 15 und 16).

Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich ein geringer, protrahierter und diskontinuierlicher Anstieg mit kleinem, jedoch signifikanten Maximum an Tag 30. Danach folgte ein leichter Abfall bis Tag 90 (Abb. 15).

Bei VEGF unterschieden sich alle gemessenen Werte signifikant von den Kontrollen (Abb. 15).

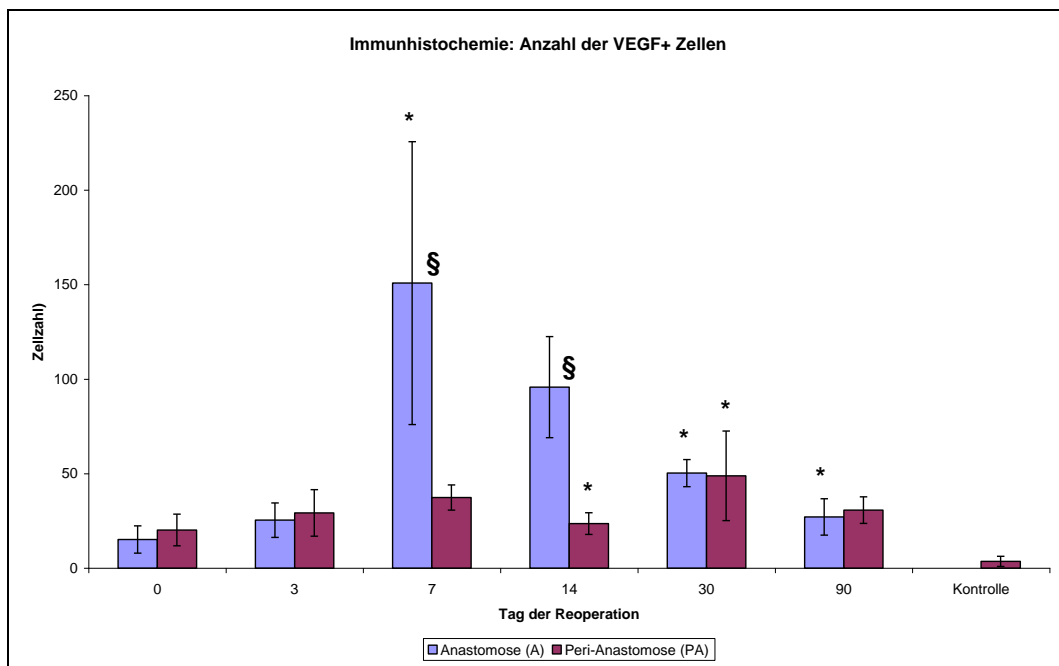


Abbildung 15 Verlauf der Zellzahlen für VEGF zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In der A. deutliches Maximum an Tag 7. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA. nur an den Tagen 7 und 14. Folglich Hinweis auf ausgeprägte Mitreaktion in PA. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

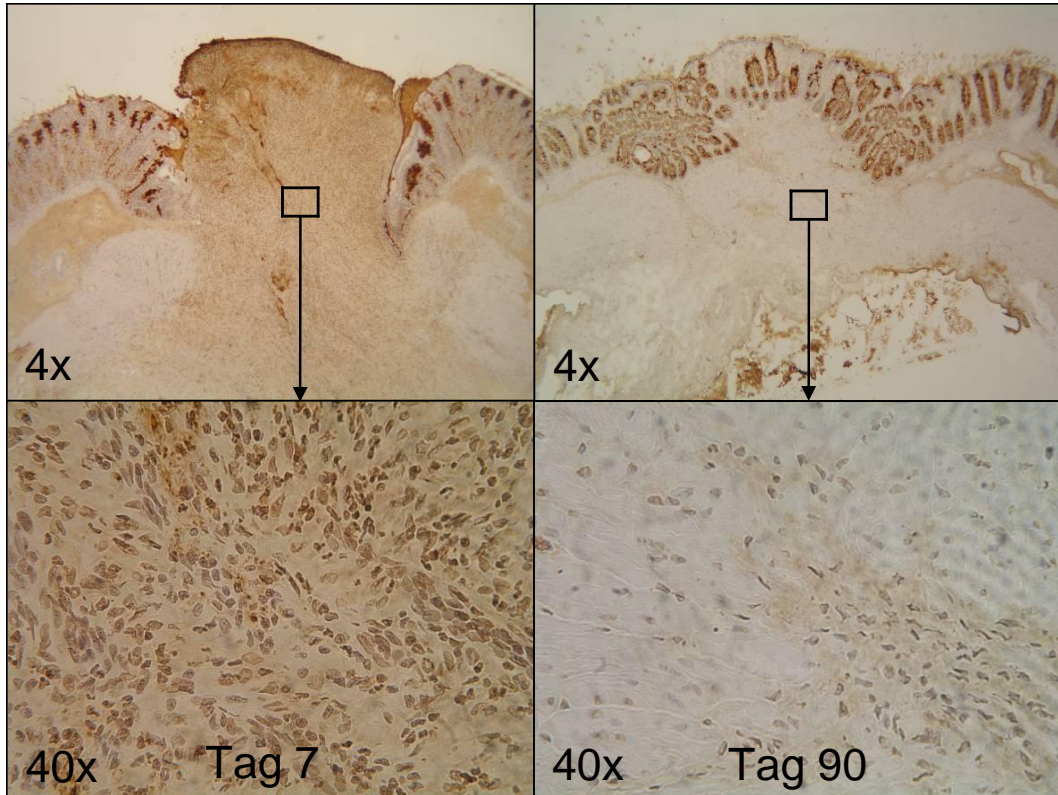


Abbildung 16 Immunhistochemische Färbung von VEGF positiven Zellen an Tag 7. Maximum an Tag 7, zahlreich angefärbte Zellen im Bereich der Anastomose, VEGF auch interstitiell nachweisbar. An Tag 90 kaum positive Zellen im Narbengewebe. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x)

4.4.2. FGF-2

FGF zeigte im anastomotischen Gewebe ab Tag 0 einen kontinuierlichen Anstieg bis zu einem Maximum an Tag 14 und danach einen steilen Abfall bis zum Tag 90. Im perianastomotischen Gewebe zeigten sich bis zum Tag 30 ein protrahierter und diskontinuierlicher Anstieg mit Maximum am Tag 30 und danach ein etwas steilerer Abfall bis nach Tag 90 (Abb. 17).

Mit Ausnahme von Tag 0 waren in der Anastomose alle Zellzahlen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. In der Perianastomose unterschieden sich lediglich Tag 0 und 3 nicht signifikant (Abb. 17).

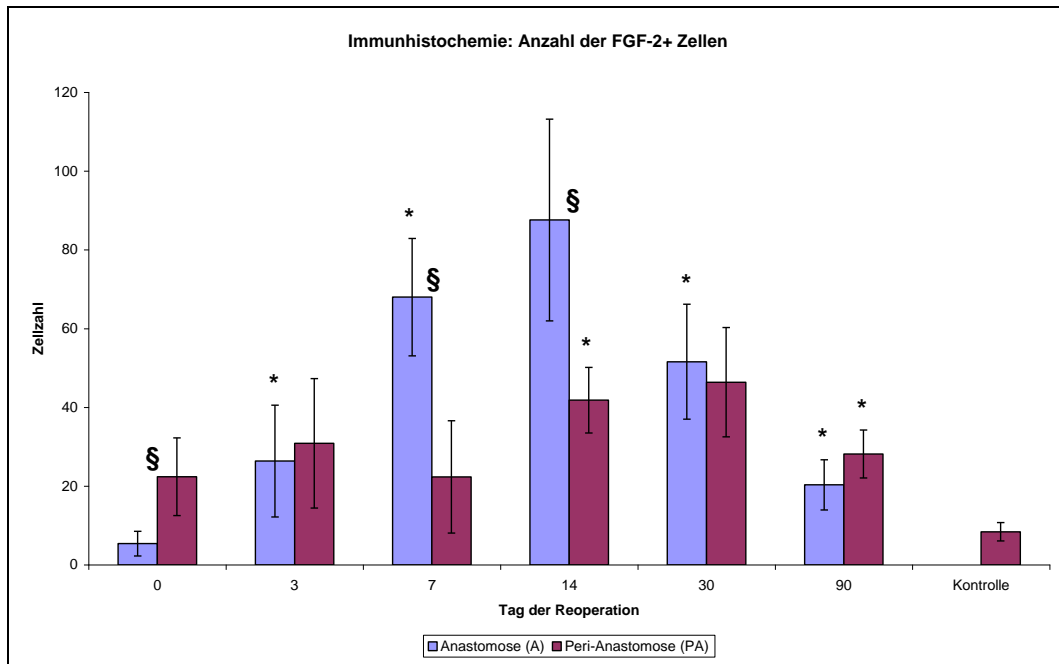


Abbildung 17 Verlauf der Zellzahlen für FGF-2 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. steiler Anstieg mit Maximum an Tag 14, danach Abfall der Zahlen auf ein über den Kontrollen liegendes Niveau. Deutliche Mitreaktion des PA-Bereichs, daher lediglich signifikante Unterschiede zwischen A und PA an zwei Zeitpunkten (7/14). +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

4.4.3. PDGF-B1

PDGF zeigte im anastomotischen Gewebe einen steilen Anstieg von Tag 0 bis zum Tag 7 mit einem Maximum an Tag 7 und danach einen stetigen und langsamen Abfall bis zum Tag 90. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich ein sehr geringer Anstieg mit Maximum am Tag 7 und danach ein geringer und kontinuierlicher Abfall bis nach Tag 90 (Abb. 18).

Mit Ausnahme des Tags 0 waren in der Anastomose alle Zellzahlen zu allen Zeitpunkten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 18).

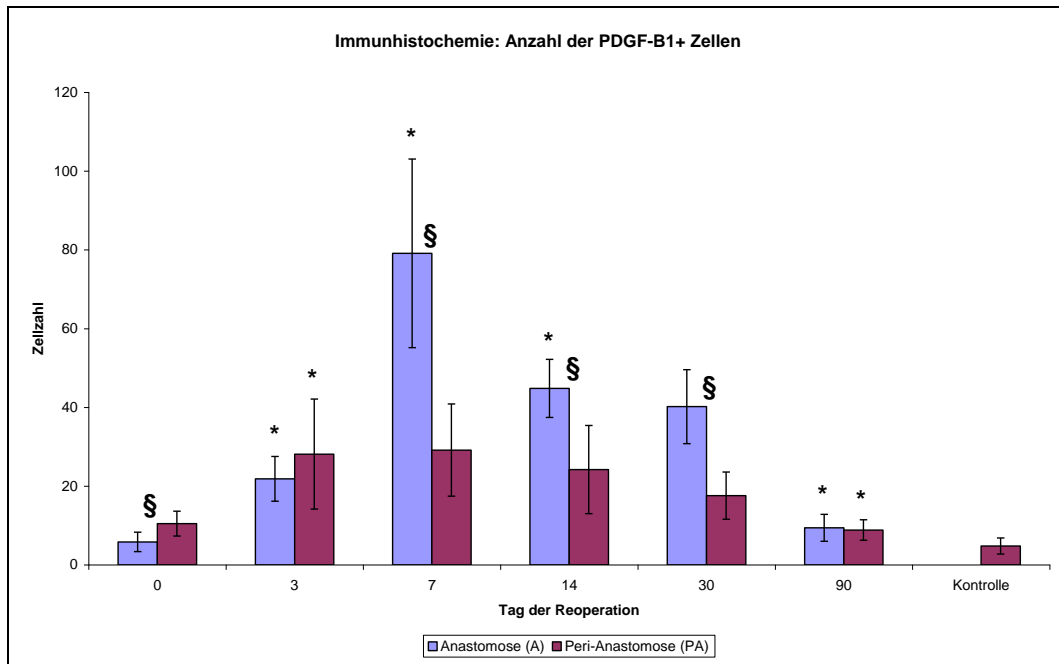


Abbildung 18 Verlauf der Zellzahlen für PDGF-B1 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. und PA Maxima an Tag 7. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA. an Tagen 0/7/14/30. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

4.5. Antiinflammatorische Zytokine

4.5.1. IL-10

IL-10 stieg im anastomotischen Gewebe von Tag 0 bis Tag 7 kontinuierlich an mit einem Maximum an Tag 7 und einem nachfolgenden gleichmäßigen Abfall bis zum Tag 90 (Abb. 20). Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bis zum Tag 3 ein deutlicher Anstieg mit Maximum am Tag 3 und danach ein langsamer Abfall mit einem Plateau um den Tag 30 und einem weiteren Abfall bis nach Tag 90 (Abb. 19).

Im ELISA zeigte sich bis zum Tag 7 ein deutlicher Abfall mit darauf folgendem Anstieg bis zum Tag 14, allerdings nicht bis zu der ursprünglichen Höhe. Nach Tag 14 zeigte sich ein geringer Abfall bis zum Tag 90 (nicht dokumentiert).

Einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen beobachtete man nur bei den Tagen 3, 7, 14 und 30 (Kruskal-Wallis Test).

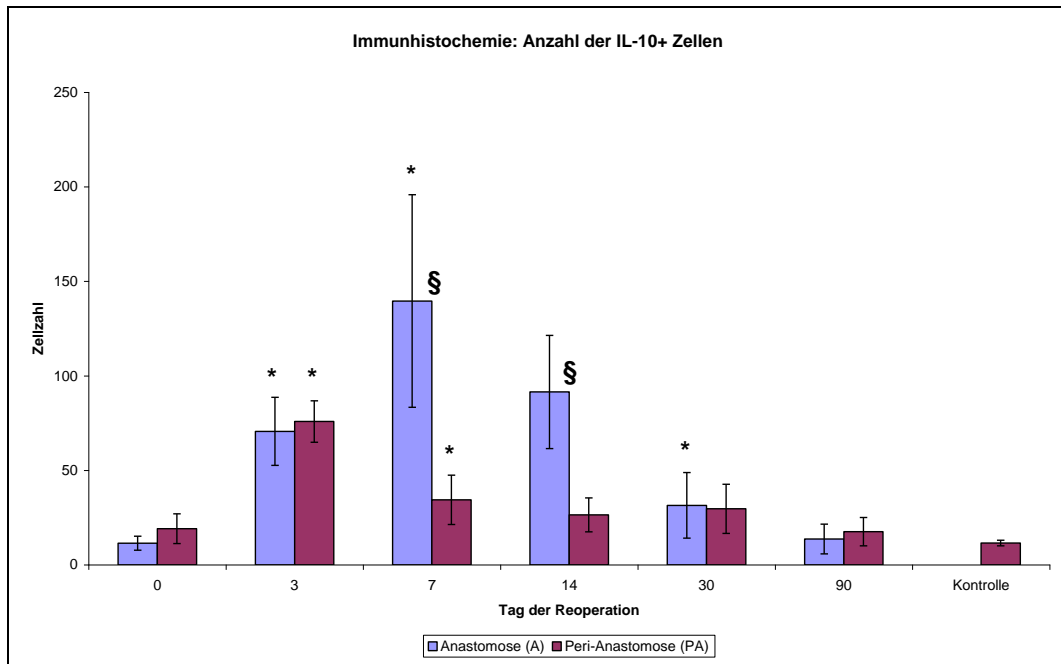


Abbildung 19 Verlauf der Zellzahlen für IL-10 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. Maximum an Tag 7. Deutliche Mitreaktion des PA.-Gewebes, daher sind die Zellzahlen zwischen A. und PA. nur an den Tagen 7/14 signifikant unterschiedlich. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

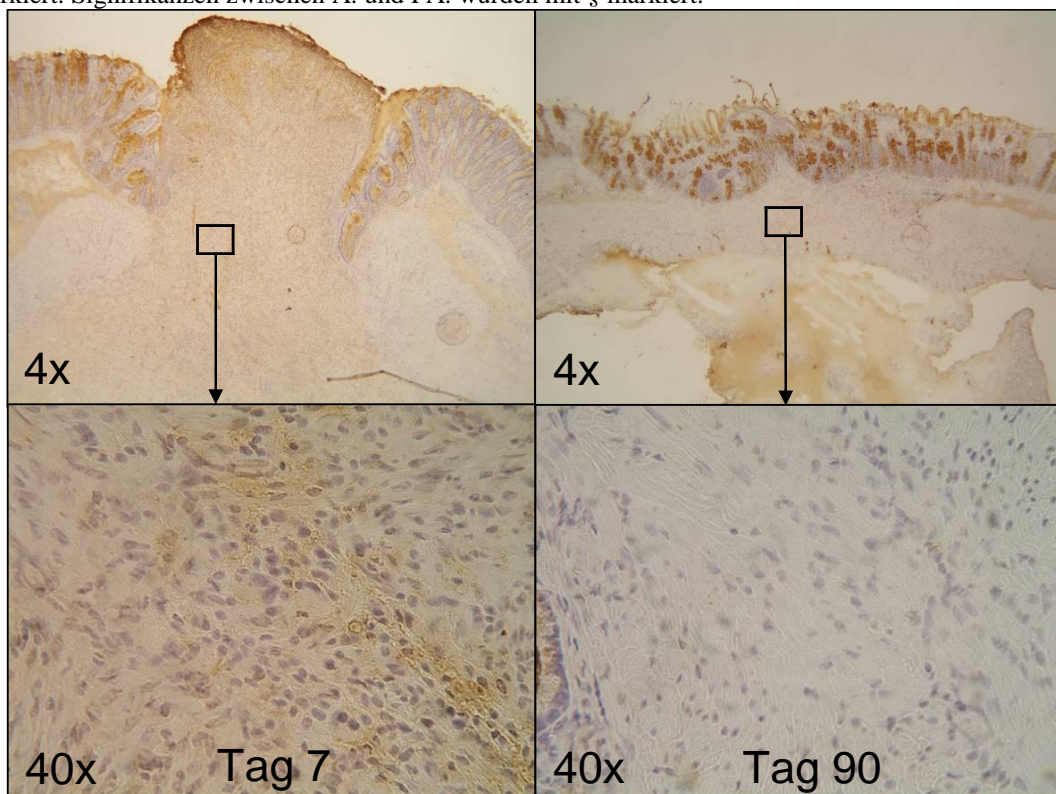


Abbildung 20 Immunhistochemische Färbung von IL-10 positiven Zellen. Maximum an Tag 7, interstitielle Anfärbung sichtbar. An Tag 90 kaum Anfärbung in Anastomose. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x)

4.5.2. IL-13

IL-13 stieg im anastomotischen Gewebe von Tag 0 bis Tag 7 steil und kontinuierlich an mit einem Maximum an Tag 7 und einem nachfolgenden gleichmäßigen und weniger steilen Abfall bis zum Tag 90. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bis zum Tag 3 ein geringer Anstieg mit Maximum am Tag 3 und danach ein sehr langsamer Abfall bis nach Tag 90 (Abb. 21).

Mit Ausnahme von Tag 90 waren in der Anastomose alle Werte gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. In der Perianastomose hingegen gab es keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen (Abb. 21).

Im ELISA zeigten sich bis zum Tag 14 ein langsamer Anstieg und danach ein protrahierter Abfall bis zum Tag 90. Im Mann-Whitney Test konnten keine Signifikanzen nachgewiesen werden (Abb. 22). Im Kruskal-Wallis Test war lediglich der Wert von Tag 14 signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen (nicht dokumentiert).

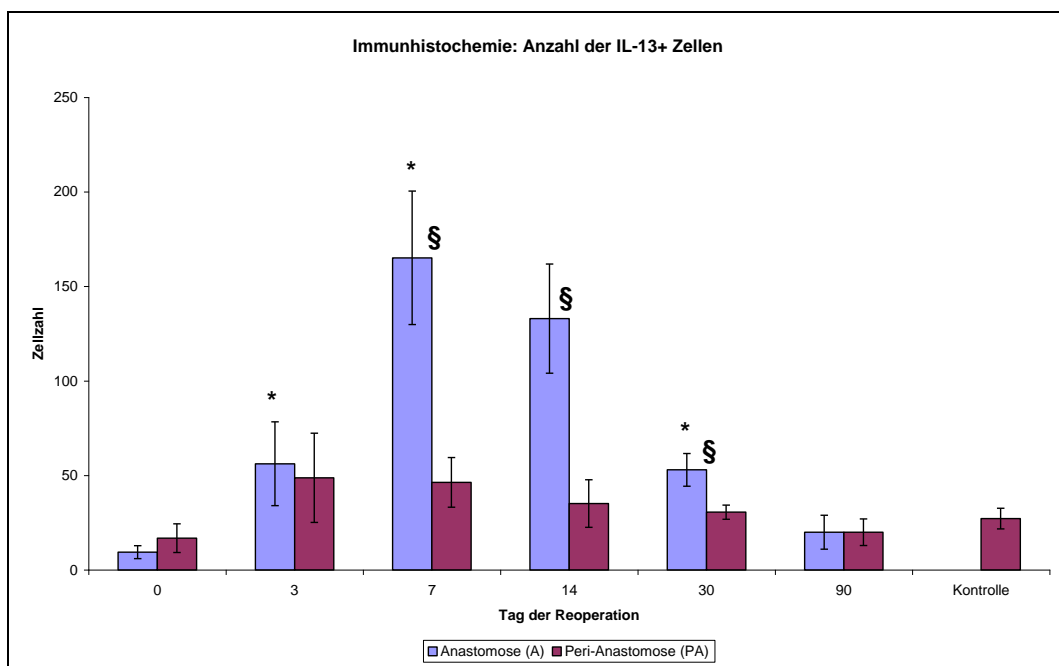


Abbildung 21 Verlauf der Zellzahlen für IL-13 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. +/-1 SD wurden dokumentiert. In A. Maximum an Tag 7, in PA. an Tag 3. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA. an Tagen 7/14/30. Signifikante unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

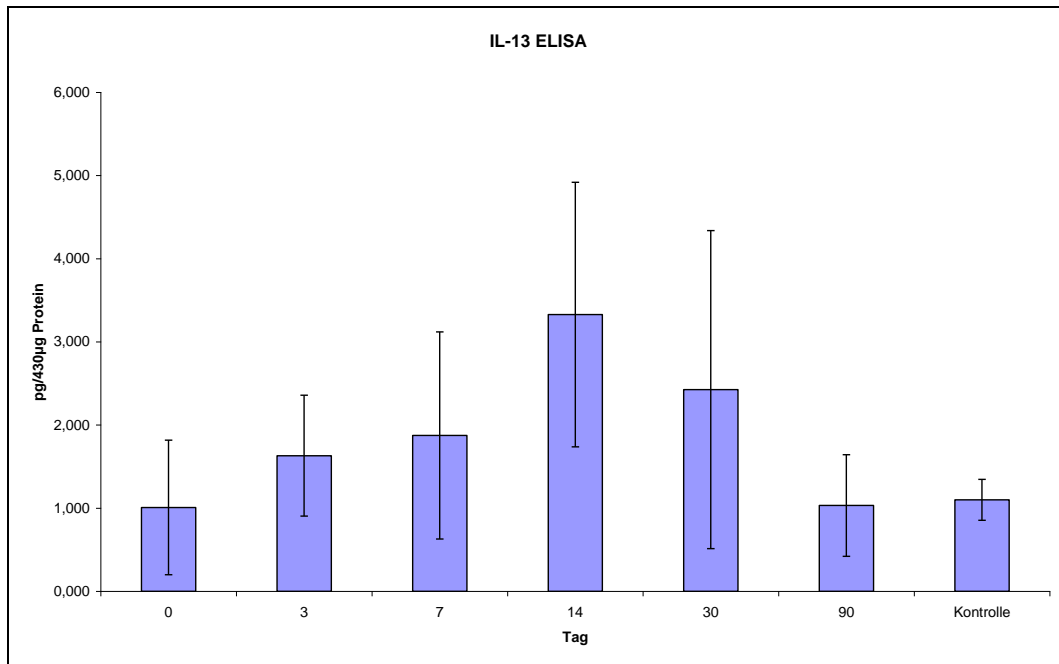


Abbildung 22 Verlauf der Zytokinmengen bezogen auf 430µg Protein im IL-13 ELISA. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes waren keine signifikanten Veränderungen zum jeweils vorhergehenden Zeitpunkt zu beobachten. Anstieg der Konzentration auf ein Maximum an Tag 14, danach progredienter Rückgang auf die Ausgangs- und Kontrollwerte. Gegenüber den Kontrollen war lediglich Tag 14 signifikant erhöht.

4.6. TGF-β-Superfamilie

4.6.1. TGF-β₁

TGF-β₁ zeigte im anastomotischen Gewebe einen kontinuierlichen steilen Anstieg von Tag 0 bis Tag 7 mit einem Maximum an Tag 7 und fiel darauf hin bis Tag 90 allmählich wieder ab (Abb. 24). Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bis zum Tag 3 ein sehr steiler Anstieg mit darauf folgendem protrahiertem Abfall bis nach Tag 90. Im Gegensatz zu TNF-α zeigten sich im anastomotischen und perianastomotischen Gewebe ähnlich hohe Zellzahlen (Abb. 23).

Gegenüber den Kontrollen waren in der Anastomose lediglich die Werte der Tage 0 und 90 nicht signifikant erhöht. In der Perianastomose unterschieden sich alle Werte signifikant von den Kontrollen (Abb. 23).

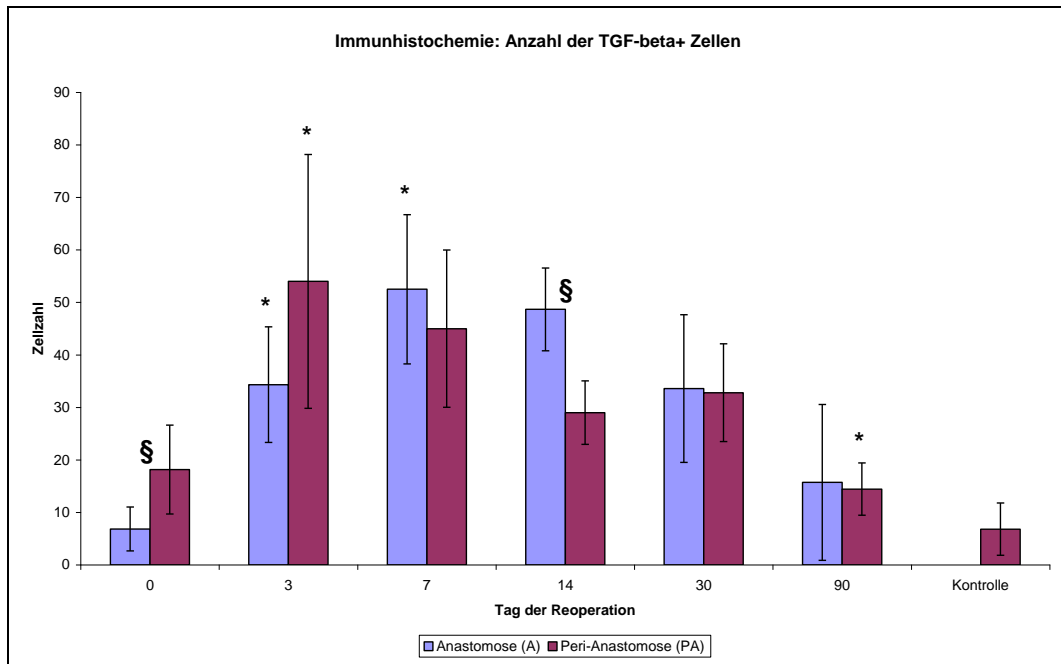


Abbildung 23 Verlauf der Zellzahlen für TGF- β zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Maxima in A. an Tag 7 und PA. an Tag 3. Starke Mitreaktion in der PA., deshalb unterschieden sich die Zahlen zwischen A. und PA. lediglich an Tag 0/14. ± 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

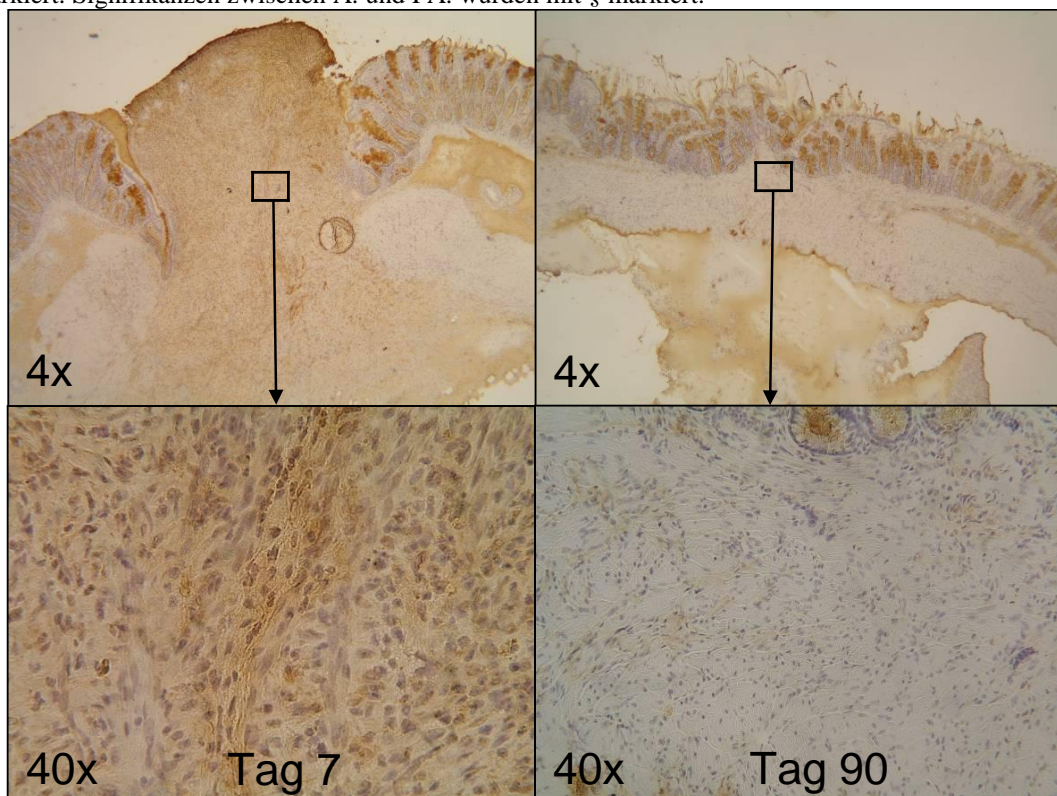


Abbildung 24 Immunhistochemische Färbung von TGF-beta positiven Zellen. Maximum an Tag 7 mit zahlreichen positiven Zellen sowie Anfärbung des Interstitiums. An Tag 90 nur geringe Expression. Deutliche Narbenbildung, kaum interstitielle Expression von TGF-beta. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x)

4.7. Zellmarker

4.7.1. B-Zellen

Die B-Zellen zeigten im anastomotischen Gewebe von Tag 0 bis zum Tag 14 einen sehr gleichmäßigen und steilen Anstieg mit Maximum an Tag 14, um danach ebenso gleichmäßig und kontinuierlich wieder abzufallen. Im perianastomotischen Gewebe wurde von Tag 0 bis Tag 3 ein deutlicher Anstieg mit Maximum an Tag 3 und danach ein diskontinuierlicher Abfall mit einem zweiten, geringeren Peak an Tag 30 beobachtet (Abb. 25).

Im Kruskal-Wallis Test war lediglich der Tag 0 gegenüber den Kontrollwerten nicht signifikant erhöht.

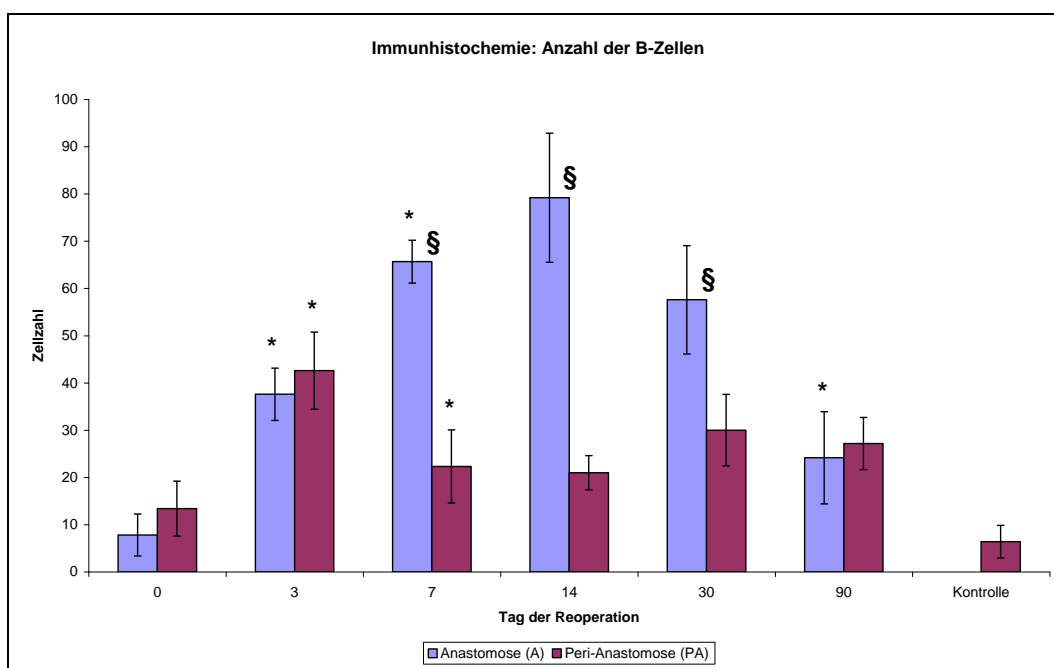


Abbildung 25 Verlauf der Zellzahlen für B-Zellen zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Steiler Anstieg mit Maximum an Tag 14 in A. In PA. Maximum an Tag 3. Signifikante Unterschiede zwischen den Zahlen in A. und PA. an 3 Tagen (7/14/30). +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

4.7.2. CD4+ Zellen

Die Anzahl der CD4-positiven-Zellen, wie T-Helfer-Zellen und Makrophagen, zeigte im anastomotischen Gewebe von Tag 0 bis zum Tag 7 einen steilen Anstieg mit Maximum an Tag 7 und danach einen gleichmäßigen und etwas weniger steilen Abfall bis zum Tag 90. Im perianastomotischen Gewebe wurde von Tag 0 bis Tag 3 ein

geringer Anstieg mit Maximum an Tag 3 und danach ein sehr geringer und protrazierter Abfall bis nach Tag 90 festgestellt (Abb. 26).

Gegenüber den Kontrollwerten waren in der Anastomose die Werte von Tag 3 bis Tag 30, in der Perianastomose die Werte von Tag 3 bis Tag 14 signifikant erhöht (Abb. 26).

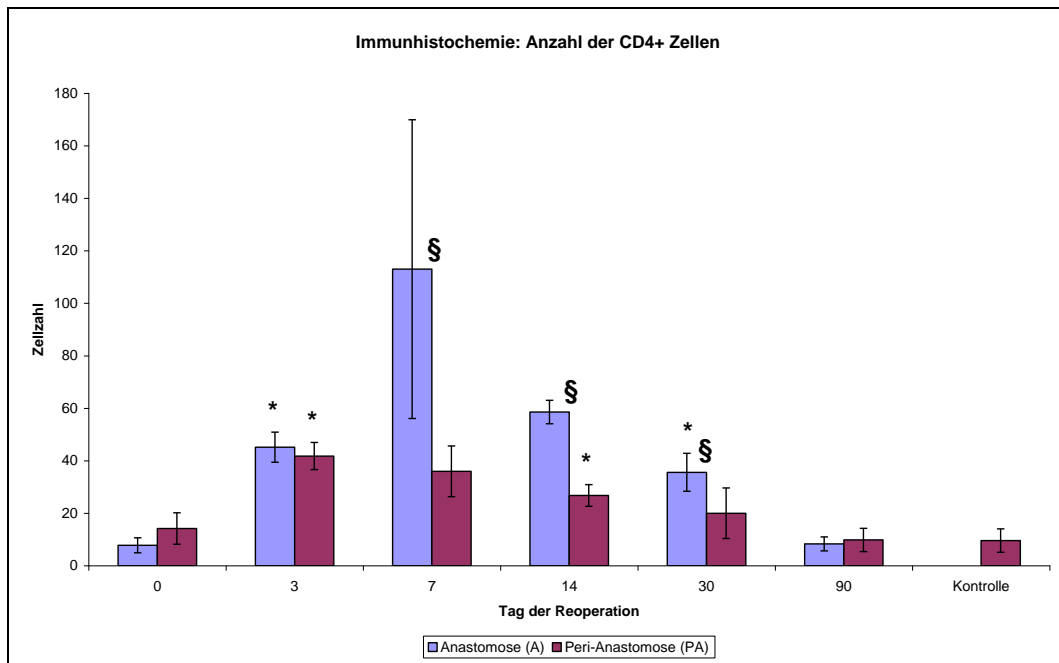


Abbildung 26 Verlauf der Zellzahlen für CD4+ zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. Maximum an Tag 7 in PA. an Tag 3. Zu drei Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen A. und PA (7/14/30). +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

4.7.3. CD8+ Zellen

Die Anzahl der CD8-positiven-Zellen, wie zytotoxische T-Zellen, stieg im anastomotischen Gewebe von Tag 0 bis zum Tag 7 deutlich an mit Maximum an Tag 7, um danach langsam und kontinuierlich bis zum Tag 90 abzufallen. Im perianastomotischen Gewebe wurde von Tag 0 bis Tag 3 ein geringer Anstieg und danach ein Plateau bis zum Tag 30 mit nur sehr diskretem Anstieg in diesem Zeitraum beobachtet. Nach Tag 30 zeigte sich ein geringer Abfall bis nach Tag 90 (Abb. 27).

Im Kruskal-Wallis Test waren nur die Werte von Tag 0 und Tag 90 nicht signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht.

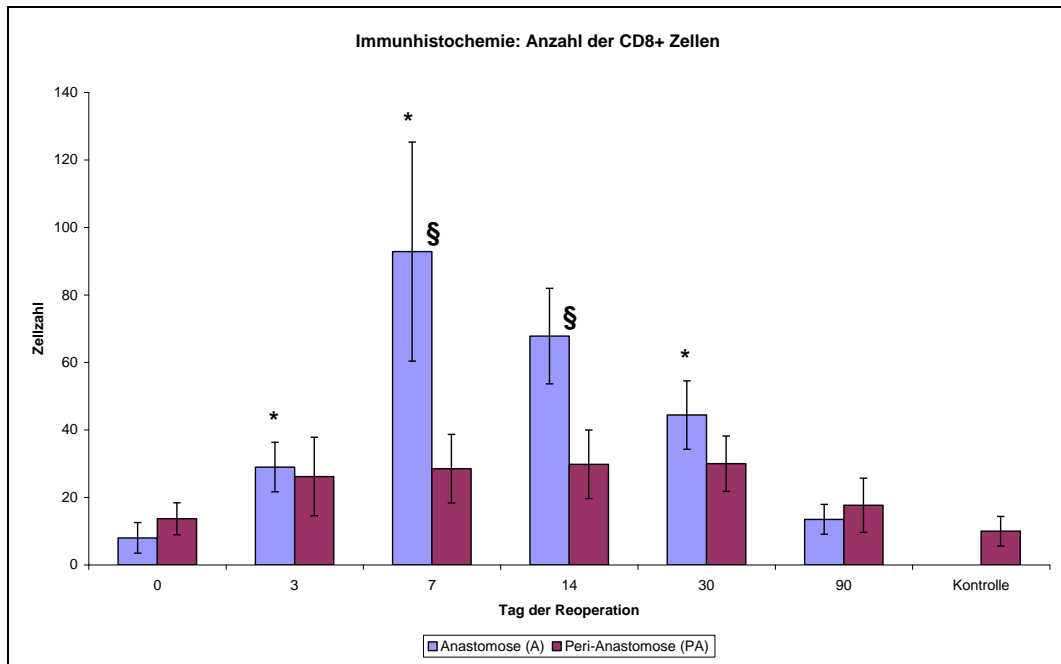


Abbildung 27 Verlauf der Zellzahlen für CD8+ zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Maximum an Tag 7 in A. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA. an Tagen 7/14. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

4.7.4. Monozyten und Makrophagen

Die Monozyten- und Makrophagenzahl im Bereich der Anastomose stieg von Tag 0 bis Tag 7 steil an, erreichte ein Plateau bei Tag 14 und fiel im Verlauf der nächsten 76 Tage allmählich wieder ab. Im perianastomotischen Bereich war lediglich ein kleiner Peak am dritten Tag zu verzeichnen, dann blieb die Zellzahl auf niedrigerem Niveau von Tag 7 bis 30 konstant, bevor sie wieder auf Werte in der Größenordnung von Tag 0 abfiel (Abb. 28). Im Kruskal-Wallis Test waren nur die Werte von Tag 3 bis Tag 90 signifikant erhöht (Abb. 28).

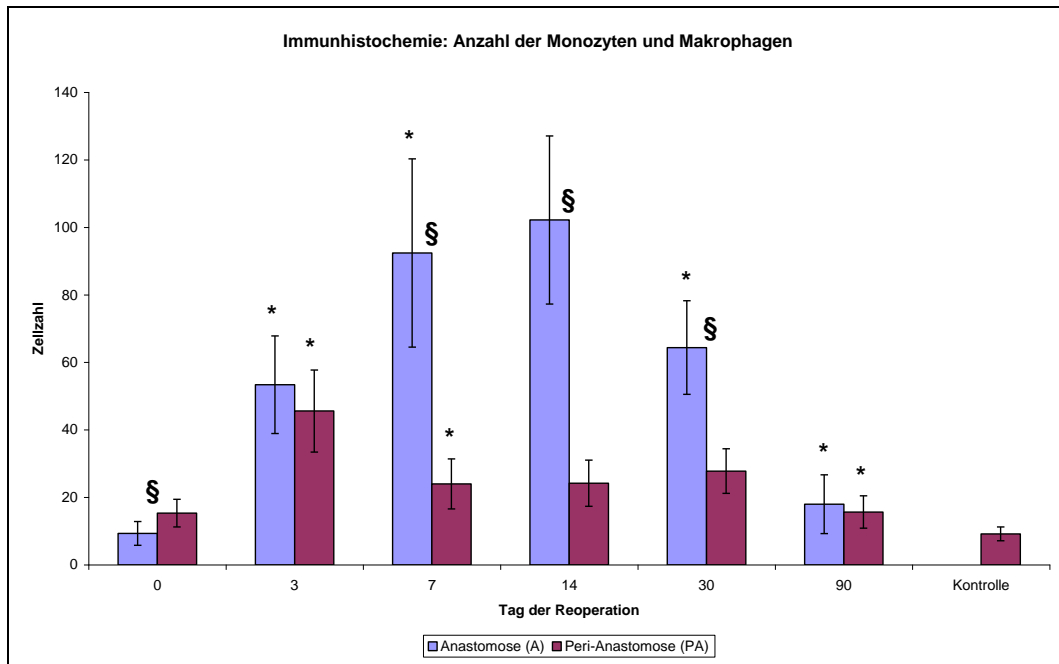


Abbildung 28 Verlauf der Zellzahlen für Monozyten zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Maximum in A. an Tag 14, in PA an Tag 3. Deutliche Konzentration der Makrophagen in A., daher signifikante Zellzahlunterschiede zwischen A. und PA. an vier Zeitpunkten (0/7/14/30) +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert.

4.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der Arbeit wurden Zytokine und Chemokine, die im Rahmen einer komplikationslosen Wundheilung eine wichtige Rolle spielen, im Verlauf von 90 Tagen immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich wurden für TNF- α , MCP-1, MIP-2 und IL-13 die Zytokinmengen im Anastomosengebiet mittels ELISA quantitativ erfasst.

Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ zeigten im anastomotischen Gewebe einen steilen Anstieg der Zellzahlen. Bei TNF- α stieg die Kurve von Tag 3 bis zum Tag 7 besonders stark und signifikant an und erreichte an Tag 14 ihr Maximum. IFN- γ wies einen steileren Anstieg mit signifikanten Zellzahlsteigerungen an Tag 3 und 7 auf. Daraufhin folgte ein Abfall der Zellzahlen bis Tag 90. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bei TNF- α bis zum Tag 14 ein weniger steiler Anstieg. Bei IFN- γ beobachtete man nach Tag 3 ein Plateau mit nachfolgendem Abfall der Zellzahlen von Tag 30 bis Tag 90.

Im ELISA hingegen stieg TNF- α von Tag 0 bis zu einem Maximum am Tag 30 allmählich an, um danach bis Tag 90 steil abzufallen.

Die Chemokine MCP-1, MIP-2 und RANTES stiegen signifikant und sehr steil im anastomotischen Gewebe zu einem Maximum bis Tag 7 an und fielen anschließend bis Tag 90 allmählich wieder ab. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bei MIP-2 und MCP-1 ein Maximum an Tag 3 mit anschließendem langsamen Abfall bis Tag 90. RANTES dagegen hatte im perianastomotischen Gewebe einen langsamen Anstieg bis zu seinem Peak an Tag 30.

Die ELISAs von MCP-1 und MIP-2 zeigten sehr ähnliche Verläufe mit signifikantem Anstieg bis Tag 3 und mit darauf folgendem, langsamem Abfall bis zum Tag 90.

Die angiogenetisch wirksamen Faktoren VEGF und PDGF stiegen im anastomotischen Gewebe steil bis zu ihren Peaks an Tag 7 an. Danach zeigte sich bei beiden ein protrahierter Abfall. FGF-2 zeigte einen langsamen Anstieg mit Peak an Tag 14 und steilem Abfall bis Tag 90. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bei VEGF ein geringer Anstieg mit einem kleinem Maximum an Tag 90. PDGF stieg bis Tag 7 gering an und fiel danach protrahiert ab bis Tag 90. FGF-2 zeigte bis zum Tag 30 einen protrahierten Anstieg mit Maximum am Tag 30 und danach einen etwas steileren Abfall.

Die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 stiegen im anastomotischen Gewebe bis zu einem Maximum an Tag 7 kontinuierlich an mit nachfolgendem gleichmäßigen Abfall. Im perianastomotischen Gewebe zeigten sich bei beiden bis zum Tag 3 ein deutlicher Anstieg und danach ein langsamer Abfall bis nach Tag 90.

IL 13 stieg im ELISA bis zum Tag 14 langsam an und fiel daraufhin langsam ab bis Tag 90.

TGF- β zeigte im anastomotischen Gewebe einen kontinuierlichen steilen Anstieg mit einem Maximum an Tag 7 und fiel darauf hin bis Tag 90 allmählich wieder ab. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich bis zum Tag 3 ein sehr steiler Anstieg mit darauf folgendem protrahiertem Abfall bis nach Tag 90. Die Zellzahlunterschiede zwischen Anastomose und Perianastomose waren hier nur zu zwei Zeitpunkten signifikant unterschiedlich, was für eine weitestgehend ausgewogene Zellverteilung in beiden Kompartimenten spricht.

Im Anastomosengebiet hatten die B-Zellen und die Makrophagen einen ähnlichen Verlauf mit einem Anstieg der Zellzahlen von Tag 0 bis zu einem Maximum an Tag 14. Dem schloss sich ein langsamer Abfall bis Tag 90 an. Perianastomosär fiel bei beiden Verläufen ein Peak an Tag 3 auf.

Die CD4+ und CD8+ Zellen hatten ähnliche Verläufe. Bei beiden imponierte ein steiler und signifikanter Anstieg mit Maximum an Tag 7 in der Anastomose. Dem schlossen sich in beiden Fällen protrahierte Reduktionen der Zellzahlen über die folgenden 83 Tage an.

5. Beantwortung der Fragestellungen

Lassen sich die Daten von Verhofstad et al. [47] mit den Daten aus der vorliegenden Arbeit in Einklang bringen?

Die oben genannte Studie erstreckte sich über einen Zeitraum von sieben Tagen. Dabei waren die Untersuchungszeitpunkte am ersten, dritten und siebten Tage nach Operation. Dies deckte sich nicht ganz mit dieser Arbeit, jedoch sollte ein Vergleich möglich sein. Die Werte von Tag 1, beziehungsweise von Tag 0 in dieser Arbeit, waren weitgehend deckungsgleich. An Tag 3 und 7 traten allerdings Unterschiede auf.

Die Ödemausrprägung war an Tag 3 in dieser Arbeit etwas höher als im Vergleich. Eine deutliche Diskrepanz hingegen wurde an Tag 7, wo bei Verhofstad kein Ödem mehr vorhanden war, hier jedoch der Wert bei 2,5 rangierte, beobachtet. Beim Nekrosescore deckten sich die Verläufe mit Ausnahme von Tag 7 weitgehend, an dem hier immer noch etwas Nekrose zu finden war, während bei Verhofstad keine Nekrose mehr auftrat. Auch die Epithelbildung und das muskuläre Bridging hinkten dem von Verhofstad dokumentierten Verlauf bis Tag 7 zunehmend nach.

Wie ist der Verlauf für die einzelnen Zytokine über 90 Tage?

Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ zeigten im anastomotischen Gewebe einen steilen Anstieg der Zellzahlen mit einem Maximum bei Tag 7 (IFN- γ) und Tag 14 (TNF- α) sowie signifikanten Zellzahlsteigerungen bei Tag 3 und Tag 7. Bis Tag 90 folgte ein stetiger und weniger steiler Abfall der Zellzahlen. Das perianastomotische Gewebe zeigte bei diesen beiden Zytokinen einen viel weniger steilen Anstieg mit Plateaubildung zwischen Tag 3 und 30.

Bei den Chemokinen MCP-1, MIP-2 und RANTES fand sich ein signifikanter und sehr steiler Anstieg im anastomotischen Gewebe zu einem Maximum bis Tag 7 mit anschließendem allmählichen Abfall bis Tag 90. Im perianastomotischen Gewebe zeigten MIP-2 und MCP-1 ein Maximum an Tag 3 mit folgendem langsamen Abfall bis Tag 90, RANTES wiederum hatte im perianastomotischen Gewebe einen langsamen Anstieg bis zu einem Peak an Tag 30.

VEGF und PDGF (angiogenetisch wirksame Faktoren) stiegen im anastomotischen Gewebe bis zu ihren Peaks an Tag 7 steil an mit darauf folgendem protrahierten Abfall.

FGF-2 zeigte einen langsamen Anstieg mit Peak an Tag 14 und steilem Abfall bis Tag 90.

Das perianastomotische Gewebe zeigte bei VEGF einen leichten Anstieg mit geringem Maximum bei Tag 90. PDGF stieg bis Tag 7 an und fiel danach langsam und protrahiert ab bis Tag 90. Bei FGF-2 fand sich bis Tag 30 ein Anstieg mit Maximum am Tag 30 und folgendem steileren Abfall.

Die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 zeigten im anastomotischen Gewebe bis zu ihrem Maximum an Tag 7 einen regelmäßigen Anstieg mit nachfolgendem gleichmäßigen Abfall. Im perianastomotischen Gewebe fanden sich in beiden Fällen deutliche Anstiege bis zum Tag 3 mit folgendem langsamen Abfall bis nach Tag 90.

Bei TGF- β erkannte man im anastomotischen Gewebe einen kontinuierlichen steilen Anstieg mit Maximum an Tag 7 und allmählichem Abfall bis Tag 90. Im perianastomotischen Gewebe zeigte sich ein sehr steiler Anstieg bis Tag 3 mit protrahiertem Abfall bis Tag 90.

Die B-Zellen und Makrophagen zeigten sehr ähnliche Verläufe mit einem gleichmäßigen Anstieg der Zellzahlen im Anastomosengebiet bis zu einem Maximum an Tag 14, anschließend folgte ein langsamer Abfall bis Tag 90. Perianastomosär fand sich bei beiden Verläufen ein Peak an Tag 3.

Die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen hatten ebenso ähnlich aussehende Verläufe mit steilem Anstieg und Maximum an Tag 7 im Anastomosengebiet. In beiden Fällen folgten darauf protrahierte Reduktionen der Zellzahlen bis Tag 90. Perianastomosär fanden sich kleine Peaks bei Tag 3 mit folgendem langsamen Abfall.

Gibt es einen Unterschied zwischen der histologischen Zytokinexpression in der Anastomose selbst und dem perianastomosären Gewebe?

In aller Regel reagierte das perianastomosäre Gewebe weniger ausgeprägt auf die im Anastomosengebiet ablaufende Wundheilung. Dies konnte quantifiziert werden, wenn man mittels eines T-Tests, dem ein Levene Test vorgeschaltet war, die Zellzahlen in Anastomose und Perianastomose auf signifikante Unterschiede überprüfte.

So fanden sich besonders viele signifikante Unterschiede bei TNF- α . Dort differierten die Zellzahlen bei fünf von sechs Untersuchungszeitpunkten signifikant. Dies war ein guter Hinweis, dass die Zellen, die dieses Zytokin exprimieren, hauptsächlich in der Anastomose selbst lokalisiert sind – und zwar fast über den gesamten Untersuchungszeitraum.

Im Mittelfeld mit vier von sechs Signifikanzen bewegten sich die Zytokine IFN- γ , MCP-1, MIP-2 und PDGF, sowie RANTES, FGF-2 und IL-13 mit drei von sechs signifikanten Unterschieden.

Eine relativ starke Mitreaktion des perianastomosären Gewebe lag bei VEGF, IL-10 und TGF- β_1 vor, wo sich die Zellzahlen zu lediglich zwei Zeitpunkten (VEGF und IL-10 an den Tagen 7 und 14 und TGF- β_1 an den Tagen 0 und 14) signifikant unterschieden.

Das Ergebnis dieser Analyse war insofern nicht allzu überraschend, da TNF- α als starkes proinflammatorisches Zytokin seine Wirkung in dem tatsächlich geschädigten Gewebe ausüben soll. Am anderen Extrem war beispielsweise TGF- β_1 , dessen profibrotische Wirkungen natürlich nicht nur auf die Anastomose selbst beschränkt bleiben sollten. Auch VEGF als potentester proangiogenetischer Faktor musste auch im umliegenden Gewebe zwecks Vaskularisation des neuen Gewebes wirken.

Kann der Verlauf der Zellzahlen (CD4+, CD8+, Makrophagen, B-Zellen) mit der Zytokinexpression in Einklang gebracht werden?

Bei der Betrachtung der proinflammatorischen Zytokine fiel bei TNF- α auf, dass der Zellverlauf recht gut mit dem des Monozytenmarkers übereinstimmte. Die Synthese von TNF- α fand nicht nur in Monozyten sondern auch in T-Lymphozyten und den hier nicht gefärbten Neutrophilen statt. Beim Marker für CD4+ und CD8+ Zellen stimmte die Kurve größtenteils überein, wenn man von dem Peak bei Tag 7 absah.

Bei den Chemokinen ergab sich folgendes Bild. Ein nicht unerheblicher Teil des MCP-1 Spiegels wurde von Monozyten synthetisiert. Es überraschte nicht, dass die Kurve der der Monozytenzahlen ähnelte. Jedoch hatte MCP-1 seinen Peak schon bei Tag 7, während die Monozytenzahlen noch bis Tag 14 stiegen. MIP-2 wird hauptsächlich von Neutrophilen und Monozyten synthetisiert. Auch dieses Zytokin hatte seinen Peak bei Tag 7.

Angiogenetisch wirksame Zytokine wie VEGF, PDGF und FGF-2 werden hauptsächlich von Zellen synthetisiert, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht separat berücksichtigt werden konnten. Dazu gehören Fibroblasten, Thrombozyten, Endothelzellen und andere. Nachdem die Wirkung dieser Zytokine auf die angefärbten Zellen (B-Zellen, Monozyten, CD4+ und CD8+ Zellen) eher gering war, wurde davon Abstand genommen, eine Korrelation anzufertigen.

Der Großteil der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 wird von CD4 und CD8 positiven T-Zellen synthetisiert. Die Verläufe der Zellzahlen der beiden Zytokine in der Immunhistochemie wiesen starke Ähnlichkeiten auf. Beide hatten in der Anastomose signifikante Maxima an Tag 7 und einen konsekutiven Rückgang der Zellzahlen auf das Niveau der Kontrollen an Tag 90. Dieser Verlauf war weitestgehend deckungsgleich mit den Verläufen von CD4 und CD8 positiven Zellen. Auch perianastomosär waren die Ähnlichkeiten groß. Dabei ähnelte IL-10 dem Verlauf der CD8+ und IL-13 dem der CD4+ Zellen jeweils ein wenig besser. Vor dem Hintergrund, dass die Hauptquellen dieser Zytokine T-Zellen waren, erscheint ein ähnlicher Verlauf sehr plausibel.

TGF- β_1 wird von Lymphozyten, Makrophagen und Endothelzellen produziert. Hierbei ließen sich aber keine wesentlichen Ähnlichkeiten mit den gefärbten Zellmarkern feststellen.

Wie ist der Verlauf der Zytokinmengen im ELISA?

Der ELISA von TNF- α zeigte von Tag 0 bis Tag 30 (Maximum) einen allmählichen Anstieg mit darauf folgendem steilen Abfall bis Tag 90.

Die Verläufe der ELISAs von MCP-1 und MIP-2 waren sehr ähnlich, mit signifikantem Anstieg bis Tag 3 und folgenden, langsamen Abfall bis Tag 90. RANTES hingegen zeigte im ELISA einen deutlichen Abfall bis Tag 7 mit danach folgendem leichten Anstieg bis Tag 90.

IL-13 stieg im ELISA bis zum Tag 14 gleichmäßig an und fiel daraufhin bis Tag 90 ebenso gleichmäßig wieder ab.

Kann der Verlauf im ELISA mit dem Verlauf der Zellzahlen aus der Immunhistochemie in Korrelation gebracht werden? Ist also eine große Zellzahl gleichbedeutend mit einer großen Zytokinexpression?

Mittels ELISA wurden die Zytokine TNF- α , MCP-1, MIP-2 und IL-13 untersucht. Bei einem qualitativen Vergleich der jeweiligen Verlaufskurven musste man feststellen, dass die histologisch positive Zellzahl nur ungenügend mit den Zytokinmengen aus dem ELISA korrelierte. Im Falle der TNF- α Histologie lag das Maximum bei Tag 7 – gefolgt von einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellzahl bis Tag 30. Im ELISA hingegen stieg die Zytokinmenge stetig bis zu einem Maximum an Tag 30. Bei RANTES war der Unterschied noch deutlicher. Während histologisch ein signifikantes Maximum an Tag 7 imponierte, fand sich im ELISA zu diesem Zeitpunkt das absolute Minimum der Konzentration im Verlauf von 90 Tagen [48]. Dieser Wert lag signifikant unterhalb dem der gesunden Kontrolltiere. Ähnliches galt auch für IL-10 und IL-13.

Einzig MCP-1 und MIP-2 zeigten bei den Zellzahlen einen Verlauf, der dem der ELISAs ähnelte. Diese Aussage galt aber wiederum nur für die Zellzahlen in den perianastomotischen Gebieten. Eine Korrelationsanalyse mittels eines Pearson Tests ergab aber auch in diesem Falle keine Signifikanzen.

Insofern musste festgestellt werden, dass die Menge des im ELISA gemessenen Zytokins nicht mit der Zellzahl zu korrelieren war. Dieses Ergebnis war in Einklang mit einer Reihe von Studien, die besagten, dass in der Regel nicht die absolute Menge eines Chemokins entscheidend war, sondern dass das Auftreten zusammen mit anderen Zytokinen entscheidend für die Gesamtwirkung war.

Ist der Verlauf im ELISA mit den histologischen Zellmarkerfärbungen (CD4+, CD8+, Makrophagen, B-Zellen) in Einklang zu bringen? Kann man also bei einem Peak in der Zytokinkonzentration von einer konsekutiven Zellzahlsteigerung ausgehen?

Diese Frage zielt hauptsächlich auf Zytokine mit starker chemotaktischer Komponente ab, da man nur solche für größere Änderungen der Zellzahlen verantwortlich machen kann.

Erwartungsgemäß ließen sich einige Übereinstimmungen finden. MCP-1 beispielsweise lockt hauptsächlich Monozyten und Makrophagen an. Bei Betrachtung der beiden Kurven war ein plausibler Zusammenhang zu vermuten. MCP-1 hatte im ELISA ein

Maximum an Tag drei, das dann langsam bis Tag 14 auf etwa Kontrollwerte absank. An Tag 30 war MCP-1 deutlich unterhalb der unoperierten Kontrolle, an Tag 90 war es nicht mehr nachweisbar. Die Monozytenzahlen stiegen von Tag 0 bis zu einem Maximum an Tag sieben steil an. Anschließend sanken die Zahlen bis Tag 14 nicht signifikant ab. Eine signifikante Minderung setzte erst an Tag 30 ein und führte bis Tag 90 zu einer Normalisierung der Zellzahlen.

RANTES lockt vorwiegend eosinophile Granulozyten, Monozyten und T-Zellen an. Im ELISA zeigte sich an Tag 7 ein signifikantes Minimum – ganz im Gegensatz zu den Zellzahlverläufen der T-Zellen, die an diesem Tag einen imposanten Peak hatten. Die Monozytenzahlen waren an Tag 7 schon hoch, erreichten ihren Peak aber erst an Tag 14.

Welche Besonderheiten fallen bei der Wundheilung im Kolon auf und welche Unterschiede gibt es zur kutanen Wundheilung? Welche klinische Relevanz haben die Ergebnisse?

Die Wundheilung am Kolon ging im Gegensatz zu den kutanen Modellen langsamer vonstatten. Zunächst zeigte sich eine verlängerte inflammatorische Phase, die sich vor allen Dingen in den Verläufen der Zellzahlen von TNF- α und IFN- γ , dem TNF- α ELISA und dem Verlauf der Makrophagen widerspiegelte. Auch die Angiogenese, die am kutanen Modell ab dem dritten Tag rasch einsetzte, begann im Dickdarm erst richtig um den siebten Tag.

Überhaupt war Tag 7 in diesem Modell ein außerordentlicher Tag, an dem eine Reihe von Zytokinen in der Histologie hohe positive Zellzahlen oder gar Maxima hatten. Unter diesen waren nicht nur erwartungsgemäß die Chemokine der proinflammatorischen und proliferativen Phasen, sondern mit IL-10 und IL-13 auch Vertreter der antiinflammatorischen Fraktion.

Im Gegensatz zum kutanen Model, wo sich im Rahmen der Wundheilung keinerlei Expression von RANTES und IFN- γ fand, war im Darm eine ausgeprägte Expression dieser Zytokine zu verzeichnen.

Die Ergebnisse und Erkenntnisse aus dieser Arbeit, die sich mit der komplikationslosen Wundheilung am Kolon der Ratte befasste, werden jetzt als Grundlage für ein Modell mit erhöhter Dehiszenzwahrscheinlichkeit verwendet. Damit soll ein besseres und vor

allen Dingen systematisches Verständnis für die Pathogenese der Anastomoseninsuffizienz gewonnen werden. So wird es möglich, auf histologischer Ebene und auf Proteinebene die Unterschiede zwischen komplikationsloser und komplikationsbehafteter Anastomosenheilung zu beobachten, sind die klinischen Folgen bei einer Leckage doch in vielen Fällen verheerend.

6. Diskussion

6.1. Bedeutung der Wundheilung im Dickdarm

Die Wundheilung ist ein wichtiges und häufig untersuchtes Gebiet in der Medizin. Eine möglichst schnelle und effiziente Wundheilung mit geringer Entzündungsreaktion und Narbenbildung ist besonders vorteilhaft. Dem Gros der Studien liegt jedoch ein Modell an der Haut zugrunde [44]. Die Gründe für die Auswahl von kutanen Modellen bei der Wundheilung liegen hauptsächlich in der guten Erreichbarkeit, der einfachen Möglichkeit der Kontrolle der Wundentwicklung, der Ruhigstellung, der geringeren bakteriellen Belastung der Wunde sowie daraus folgend der besseren Reproduzierbarkeit [37, 44, 45].

Die Wundheilung am Darm hingegen ist weit weniger gut untersucht. Zweifellos gibt es viele Parallelen zur Wundheilung an der Haut. Jedoch sind am Kolon die Voraussetzungen für eine komplikationslose Heilung ungünstiger. Eine niedrigere Sauerstoffspannung im Blut, schlechtere Gefäßversorgung, ein möglicherweise erhöhter intraabdomineller Druck, hohe Bakterienlast und die Unmöglichkeit, die Wundregion ruhig zu stellen, sind Faktoren, die sich negativ auf die Heilung auswirken [44, 45].

Komplikationen in Form von Leckagen sind daher verhältnismäßig häufig. Schwerwiegende Komplikationen mit konsekutiver Peritonitis werden derzeit in der Literatur mit etwa 3-5% angegeben [44]. Neben der hohen akuten Mortalität, die mit diesem Krankheitsbild verknüpft ist, ist auch die Langzeitprognose bei solchen Patienten signifikant verschlechtert [50].

Seit vielen Jahren sind die Bemühungen groß, die Leckagerate zu minimieren. Dies ist auch gelungen [37], berücksichtigt man Zahlen von 1980 und 2003. In diesem Zeitraum sank die Zahl der peritonitisassoziierten Leckagen von 10,8% [51] auf etwa 3-5% [44].

Solche Verbesserungen sind auf veränderte Operationstechniken und Nahttechniken, Stapler, den biofragmentablen Anastomosenring, verbesserte Nahtmaterialien und viele andere neuere Entwicklungen zurückzuführen [52].

Ein weiteres, zunehmend in den Blickpunkt der Forschung gerücktes Feld, ist die Beeinflussung der Wundheilung mittels eingebrachter Zytokine beziehungsweise Zytokinantagonisten. Bei der Steuerung der einzelnen Wundheilungsprozesse spielen Zytokine bekanntlich eine wichtige Rolle. Daher erschien es sinnvoll, zunächst an einem Rattenmodell der komplikationslosen Wundheilung den Verlauf der Zytokine zu

untersuchen. Durch den relativ langen Versuchszeitraum von 90 Tagen konnte in dieser Arbeit die Wundheilung bis weit in die TGF- β beeinflusste Phase der Gewebsreifung beobachtet werden. Neben der Verlaufskontrolle einer Reihe von Zytokinen wurde zusätzlich der Verhofstad Score [47] erhoben, um den Fortschritt der Wundheilung festzuhalten.

6.2. Morphologie der Wundheilung am Dickdarm der Ratte

Um den Fortschritt der Wundheilung an dem Rattenmodell zu dokumentieren, wurde ein von Biert et al [49] entwickeltes und von Verhoftstad et al. [47] modifiziertes Score System verwendet. Dabei wurden die Parameter Ödemausprägung, Nekrosemenge, Epithelialisierungsdefizit und muskuläres Bridgingdefizit berücksichtigt.

Verglichen mit der Studie von Verhofstad et al. [47], in der unter anderem auch eine Anastomose im aboralen Kolon untersucht wurde, ging in diesem Modell die Wundheilung langsamer vonstatten. An Tag sieben, an dem Verhofstads Tiere nekrosefrei und fast ödemfrei waren, waren in diesem Modell ein Maximum an Ödem und kleine nekrotische Flächen zu finden. Eine Ursache könnte sein, dass nicht immer die gleichen Darmschichten aneinander lagen und sich deshalb die Wundheilung verzögerte.

Weiterhin war der zögerliche Rückgang des Ödem-Scores im weiteren Verlauf (Tag 14-30) wohl darauf zurückzuführen, dass dieser Raum vom immer weiter reifenden Granulationsgewebe eingenommen wird. An Tag 90 hat die Wanddicke des Kolons fast wieder den Ausgangswert erreicht. Möglicherweise hätte dieser Parameter Ödem-Bindegewebsscore genannt werden sollen, bedenkt man den ungleich längeren Untersuchungszeitraum.

Bei Betrachtung der Histologie fiel ein Maximum der Granulationsgewebsbildung an Tag 7 respektive 14 auf. Verglichen mit den kutanen Modellen war dies ein recht später Zeitpunkt.

6.3. Wundheilung im Spiegel der Zytokine

Bevor jetzt auf die einzelnen Zytokine eingegangen wird, soll nicht außer Acht gelassen werden, dass bei Zytokinen häufig nicht die absolute Menge an einem Ort entscheidend ist, sondern das Zusammenwirken verschiedener Zytokine [1].

Im Laufe der Diskussion wird immer wieder auf eine kutane Wundheilungsstudie von Bryan et al. [53] eingegangen. Dabei wurde Mäusen eine Hautwunde beigebracht, die nach einer bestimmten Zeit entnommen und mittels RT-PCR und ELISA untersucht wurde. Reoperationszeitpunkte waren 0, 3, 12, 18, 24, 48, 72, 120 und 168 Stunden nach Operation. Mittels RT-PCR wurden unter anderem TNF- α , TGF- β_1 , IFN- γ , RANTES, MCP-1, MIP-2, PDGF- β und FGF-2 untersucht. Mittels ELISA wurden TNF- α und IFN- γ und andere Zytokine gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass die Ergebnisse von Gen- und Proteinebene gut in Einklang zu bringen waren. Nachdem diese Studie in der Diskussion häufig herangezogen werden soll, wurde sie schon hier vorgestellt.

6.3.1. Proinflammatorische Zytokine

Die Zellzahlen der beiden untersuchten proinflammatorischen Zytokine stiegen nach der Operation im anastomotischen Gewebe stark und signifikant an. Bemerkenswert dabei war der Anstieg der Zellzahlen bis zu Tag 14 bei TNF- α , beziehungsweise Tag 7 bei IFN- γ . Dies sind eigentlich Zeitpunkte, bei denen in der kutanen Wundheilung die inflammatorische Phase langsam in die proliferative übergegangen sein sollte.

Für TNF- α wurde dieser Verlauf im ELISA weitestgehend bestätigt. Dort fand sich ein kontinuierlicher und teils signifikanter Anstieg der Zytokinmenge sogar bis zu Tag 30. Auffällig war dabei der steile Abfall der histologisch positiven Zellzahlen trotz des kontinuierlichen Anstiegs im ELISA an Tag 30. Möglicherweise spricht dieser Verlauf, verglichen mit der kutanen Wundheilung, für eine protrahierte inflammatorische Phase.

TNF- α wird von einer Reihe von Zellen exprimiert, unter anderem auch von Monozyten, Makrophagen, CD4+ und CD8+ Lymphozyten. Betrachtete man die Zellzahlen der einzelnen Zellmarkerfärbungen, so fand sich bei den Monozytenfärbungen eine gute Korrelation, bei CD4+ und CD8+ hingegen fand sich

ein deutlicher Peak schon bei Tag 7 mit einem konsekutiven Abfall der Zellzahlen an Tag 14.

Dem histologischen Verlauf von IFN- γ , das unter anderem von CD4+, CD8+ Zellen und Monozyten synthetisiert und abgegeben wird, folgten CD4+ und CD8+ Zellen gut, bei den Monozyten lag der Peak hingegen erst an Tag 14.

Im perianastomotischen Gewebe hingegen zeigte sich ein moderater Anstieg der histologisch positiven Zellzahlen, der darauf hindeutete, dass Entzündungsreiz und Entzündungsgeschehen im Anastomosenbereich deutlich ausgeprägter waren.

In einer Studie von Bryan et al. [53], in der die Genexpression verschiedener Zytokine an einem kutanen Wundheilungsmodell an der Maus untersucht wurde, konnte im Untersuchungszeitraum von sieben Tagen keinerlei Genexpression von IFN- γ nachgewiesen werden. Auch im Verlauf des Genprodukts von TNF- α gab es erhebliche Unterschiede. In unoperiertem Gewebe war nur eine minimale TNF- α Genexpression vorhanden, die schon drei Stunden nach Operation deutlich anstieg und an Tag 3 einen ähnlich hohen Wert hatte. Bereits an Tag 7 war die Genexpression wieder auf ein Minimum zurückgegangen, das mit dem unoperierten Gewebe vergleichbar war. Zusätzlich zur Genexpression wurde für TNF- α ein ELISA angefertigt. Dieser unterstützt den in der RT-PCR gefundenen Verlauf.

Der Verlauf von TNF- α gibt Anlass zur Vermutung, dass die inflammatorische Phase im Darm länger dauert als an der Haut. Auch die Anwesenheit von IFN- γ könnte ein Hinweis auf das Hinauszögern der proliferativen Phase sein, da dieses Zytokin auf die meisten Zellen dieser Phase dämpfend wirkt [6, 7].

6.3.2. Chemokine

Die Zellzahlen der untersuchten Chemokine MCP-1, MIP-2 und RANTES stiegen in der immunhistologischen Untersuchung im anastomotischen Wundgewebe bis zu einem Maximum an Tag 7 sehr steil an. Bei allen dreien war der Anstieg an Tag 7 signifikant. Auch fand sich bei allen ein leichter, jedoch nicht signifikanter Rückgang der positiven Zellzahlen an Tag 14. An Tag 30 war der Abfall dann bei allen signifikant, ehe sich die Zellzahlen im Laufe der folgenden 60 Tage in etwa den Ausgangsverhältnissen annäherten.

Im MCP-1 ELISA sah die Situation jedoch anders aus. An Tag 0 lag der Wert unterhalb der gesunden Kontrolle. Dann stieg die Zytokinmenge steil auf ein Maximum an Tag 3 an und sank bis Tag 14 langsam etwas ab. An Tag 30 lag der Wert wiederum unterhalb dem der Kontrolltiere, an Tag 90 war MCP-1 nicht nachweisbar. Vergleich man den Zellzahlverlauf im Perianastomosenbereich mit dem ELISA, so zeigte sich ein ähnlicher Verlauf.

Betrachtete man den Verlauf des Genproduktes in der Studie von Bryan et al. [53], so stieg der Wert im Vergleich zu den Kontrollen in den ersten drei Stunden auf das mehr als Vierfache, sank bis Tag 3 auf das Dreifache und lag am siebten Tag immer noch doppelt so hoch wie beim naiven Tier.

MCP-1 ist ein potenter Lockstoff für Monozyten und Makrophagen. Dies spiegelte sich auch in der immunhistochemischen Anfärbung von Monozyten wieder. Dort fand man einen Anstieg von Tag 0 mit einem Maximum an Tag 14. Danach sanken die Zellzahlen rasch auf Werte, die an Tag 90 noch etwas höher als die Kontrollen waren, ab. Dieser Verlauf entsprach weitgehend der Kurve von MCP-1.

Beim RANTES-ELISA [48], fiel zunächst der extrem hohe Ausgangswert an Tag 0 auf. Eine zelluläre Entsprechung fand sich allerdings nicht. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist der Umstand, dass in den aggregierten Plättchen RANTES enthalten ist, das sukzessive bis Tag 3 abgegeben wird. Studien haben ergeben, dass der Fibrinpfropf die Gewebshormone so lange speichern kann [1]. Dies könnte auch den raschen Abfall der Zytokinmenge über Tag 3 bis fast an die Nachweisgrenze an Tag 7 erklären. Immunhistochemisch war jedoch gerade an Tag 7 ein Maximum bei den Zellzahlen in der Anastomose zu verzeichnen. Möglicherweise wird die Synthese des Chemokins auch von dem rapide fallenden Gewebespiegeln angeregt. An Tag 14 hatte RANTES im ELISA einen weiteren, diesmal jedoch kleinen Peak und verlief ab Tag 30 etwa auf einem Plateau bis Tag 90. RANTES wirkt besonders chemotaktisch auf Zellen, die CD4 positiv sind, so wie T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen. Letztere hatten ihr eindrucksvolles Maximum in der Anastomose ausgerechnet an Tag 7.

Im perianastomotischen Bereich hingegen fand man kaum eine nennenswerte Steigerung der Zellzahlen. Vielmehr blieb die Zahl über den Untersuchungszeitraum konstant – mit Ausnahme eines kleinen Peaks an Tag 30.

Im kutanen Modell von Bryan et al. [53] fiel auf, dass im gesamten Untersuchungszeitraum keine RANTES Expression beobachtet werden konnte.

MIP-2 zeigte im ELISA einen starken und signifikanten Anstieg mit Maximum an Tag 3. Bis Tag 7 sank die Zytokinkonzentration etwas ab, blieb in etwa konstant bis Tag 14 und sank dann bis Tag 30 auf den Ausgangswert ab. Dieser Wert blieb bis Tag 90 etwa konstant und war etwa doppelt so hoch wie der Wert aus der unoperierten Kontrolle. Immunhistochemisch stiegen die Zellzahlen bis Tag 7 in der Anastomosenregion signifikant an, bevor sie langsam wieder auf Normalwerte an Tag 90 absanken.

In der perianastomotischen Region fand sich ebenfalls ein Anstieg - allerdings mit Maximum schon an Tag 3. Danach sanken die Zellzahlen bis Tag 90 langsam auf Werte ab, die etwas über den Kontrollen lagen.

MIP-2 ist ein potentes Chemokin, das neutrophile Granulozyten anlockt. Ein starker Reiz für die Sekretion dieses Chemokins ist sowohl bakterielle Kontamination sowie – damit Hand in Hand gehend – die Anwesenheit von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) im Gewebe [9]. Der Peak an Tag 3 war wohl mit der zunehmenden Zellzahl an neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen zu erklären, die eine Stunde post operationem noch nicht in die Wunde eingewandert waren. Bei Betrachtung der Histologie stellte man fest, dass an Tag 3 die Integrität der Mukosa noch nicht hergestellt war. Eine bakterielle Ursache für das Maximum ist somit sehr wahrscheinlich.

6.3.3. Angiogenetisch wirksame Zytokine

Die proangiogenetischen Faktoren wurden ausschließlich immunhistochemisch beurteilt. Dabei stiegen die Zellzahlen von VEGF und PDGF-B im anastomotischen Gewebe steil und signifikant bis zu einem Maximum an Tag 7 an. Danach folgte ein protrahierter Abfall bis Tag 90, der sich im Falle von PDGF-B an den Wert der Kontrollen annäherte, bei VEGF jedoch signifikant darüber lag.

Im perianastomotischen Bereich waren die histologisch positiven Zellzahlen insgesamt deutlich geringer als in der Anastomose selbst. Bei VEGF blieben die Werte etwa konstant, wenn man von einem kleinen, aber dennoch signifikanten Peak an Tag 30 absah. Bei PDGF-B hingegen stieg die Zellzahl bis Tag 7 langsam an, um dann

allmählich wieder bis zum Tag 90 etwa den Kontrollwert von unoperierten Tieren zu erreichen.

FGF-2 hatte im anastomotischen Gewebe erst am Tag 14 und im perianastomotischen Gewebe erst am Tag 30 sein Maximum und fiel danach steil wieder ab.

Bei allen drei Faktoren fanden die größten Steigerungen der Zellzahlen erwartungsgemäß in der Anastomose selbst statt. Dort ist eben hauptsächlich der Ort der Angiogeneese.

Bemerkenswert war auch der Umstand, dass VEGF, der potenteste proangiogenetische Faktor [54] sein ausgeprägtes, histologisches Maximum erst an Tag 7 hatte. In der Haut beginnt die Phase der Gefäßneubildung bereits ab Tag 3, zusammen mit dem Beginn der proliferativen Phase.

Dieses spätere Auftreten reihte sich ein in die schon vorher erwähnte Verzögerung des Wundheilungsprozesses. Dafür sprach auch das Diagramm nach Verhofstad (Abb. 3), das die Ödemmenge quantifizierte, sowie die Betrachtung der histologischen Präparate vom Tag 3, wo fast kein Granulationsgewebe zu finden war. Erst an Tag 7 beziehungsweise 14 fanden sich davon große, gut vaskularisierte Mengen. Und eben in der Phase der Proliferation und auch der Kollagensynthese werden hohe Mengen an Sauerstoff benötigt. Ein (relativer) Sauerstoffmangel ist ein starker Reiz für die Bildung von VEGF [22]. Insofern schien der Verlauf gut mit den histologischen Befunden in Einklang zu bringen zu sein.

Beim kutanen Modell in der Studie von Bryan et al. stiegen die Genprodukte von PDGF-B nach drei Stunden auf das siebenfache des Normalwerts, waren nach drei Tagen um den Faktor acht größer und sanken bis zum siebten Tag auf den Faktor sechs ab.

Bei FGF-2 stieg der Wert nach drei Stunden auf das Elffache, nach drei Tagen war er immer noch acht mal so hoch, um dann am siebten Tag etwa wieder das Ausgangsniveau zu erreichen. Hier fiel auf, dass die Phase von FGF-2 insgesamt sehr viel kürzer als im Darm war. Dort fand sich das histologische Maximum erst an Tag 14.

6.3.4. Antiinflammatorische Zytokine

Die Zellzahlen der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 im Anastomosengebiet stiegen steil und signifikant bis zu einem Maximum an Tag 7 an. Danach fielen beide Zytokine sukzessive bis Tag 90 auf Werte der Kontrollen ab. Dieses gleichsinnige Verhalten schien den sehr ähnlichen Wirkungsarten der beiden Zytokine Rechnung zu tragen [31].

Perianastomosär fand sich bei IL-10 an Tag 3 ein signifikantes Maximum, bei IL-13 hingegen nur ein kleiner Peak. Die Zellzahlen sanken bis zum siebten Tag auf ein Plateau ab, das bis Tag 90 nur knapp über dem Niveau der Kontrolltiere lag.

Dies weist darauf hin, dass die Zellen, die entzündungshemmende Zytokine exprimieren, im Randbereich des Anastomosengebietes in der frühen Phase der Wundheilung die räumliche Ausdehnung der Entzündung begrenzen.

Im Gegensatz zu den ähnlichen, histologischen Verläufen unterschieden sich die ELISA-Kurven sehr deutlich voneinander. Bei IL-10 war an Tag 0 ein deutlicher Peak zu finden, der über Tag drei auf ein Minimum an Tag 7 absank. Bis Tag 14 stieg der Zytokingehalt deutlich an, um dann bis Tag 90 auf ein Niveau im Bereich der Kontrolltiere abzusinken. Der hohe Ausgangswert eine Stunde post operationem wurde allerdings am kutanen Modell ebenfalls beobachtet. Dort fanden sich stark positive Zellen in der Epidermis am unmittelbaren Wundrand. Für den Einfluss von Neutrophilen war dieser Zeitpunkt sicherlich noch zu früh – diese Zellen erscheinen etwa zwei Stunden nach Wundsetzung [31]. Am Kolon hingegen wurden stark positive Zellen am Wundrand in keiner Wandschicht gefunden.

Weiterhin inhibiert IL-10 die Synthese von MCP-1 und MIP-2. Dies kann eine Erklärung für das Absinken der Spiegel dieser Zytokine in den Tagen 30 bis 90 sein [31].

Im Gegensatz zu IL-10 lagen bei IL-13 die Werte im ELISA an Tag 0 auf Höhe der Kontrollwerte. Sie stiegen bis zu einem Maximum an Tag 14 deutlich an, um dann bis Tag 90 wieder auf den Ausgangswert abzusinken.

Interessanterweise fielen die beiden Maxima an Tag 14 mit den höchsten Monozytenzahlen im Anastomosengewebe zusammen, die ab diesem Zeitpunkt ebenfalls deutlich absanken. Dies kann als ein Hinweis auf die entzündungshemmende Aktivität der beiden Zytokine gewertet werden.

Dagegen verstärkt IL-13 seinerseits die Synthese von TGF- β . Am Maximum von IL-13 konnte eine kleine Steigerung des TGF- β_1 Spiegels registriert werden.

6.3.5. TGF- β -Superfamilie

TGF- β nimmt in der Wundheilung eine exponierte Rolle ein, weshalb es abseits der übrigen Zytokine aufgeführt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde TGF- β_1 untersucht. Einerseits ist dieses Zytokin in der Lage, eine ganze Reihe von Zellen wie etwa Lymphozyten, Fibroblasten, Neutrophile, Monozyten und Makrophagen anzulocken. Andererseits ist es der potenteste Wachstumsinhibitor etwa für Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten. Davon unberührt steigert TGF- β_1 aber die Kollagensynthese bei Fibroblasten signifikant.

Betrachtete man die Immunhistochemie, so fiel auf, dass sowohl in der Anastomose, als auch im Randbereich die Zellzahlen im Verlauf der Wundheilung stark und signifikant anstiegen. In der Anastomose selbst kam es zu einem starken Anstieg mit Maximum an Tag 7, perianastomosär bereits an Tag 3. In der Folgezeit sanken die Zellzahlen in beiden Gebieten stark ab, lagen jedoch weit höher als die Zahlen in den Kontrollen. Ein solcher Verlauf lässt in beiden Bereichen deutliche Effekte durch TGF- β_1 erwarten.

Der Verlauf der Zellzahlen wies viele Ähnlichkeiten mit dem Verlauf der Monozyten auf. Die histologischen Verläufe von CD4+ und CD8+ Zellen stimmten nicht mit dem Verlauf TGF- β_1 überein. Insbesondere waren die deutlichen Maxima von CD4 und CD8 an Tag 7 bei TGF- β_1 sehr viel weniger stark ausgeprägt.

Der Verlauf des ELISAs folgte allerdings den Zellzahlen nicht [48]. An Tag 0 fand sich ein Wert von 5,33pg/430 μ g Protein. Damit war in der frisch operierten Anastomose nur etwa halb so viel Zytokin zu finden, wie im gesunden Darm. An Tag 3 fiel dieser Wert bis auf 0,24 pg/430 μ g Protein ab, um dann bis zu Tag 90 auf ein Maximum von 11,33pg/ μ g Protein anzusteigen. Somit war der TGF- β_1 Spiegel fast während der gesamten Wundheilung unterhalb des Wertes für gesundes Gewebe. Besonders überraschend war Tag 0, da in Platelets TGF- β vorhanden ist und folglich ein über den Normalwerten liegender Wert erwartet wurde.

In der Studie von Bryan [53] war das TGF- β_1 Genprodukt 3 Stunden nach Operation unter dem Kontrollwert. Nach 3 Tagen erreichte es mit dem vierfachen Wert ein

Maximum in der Haut, um am siebten Tag wieder auf den Kontrollwert zu sinken. Nachdem sich der Untersuchungszeitraum dieser Studie lediglich über sieben Tage erstreckte und selbst in der kutanen Wundheilung die Phase der Bindegewebsbildung erst etwa ab Tag 12 beginnt, wurde die bei TGF- β interessanteste Phase hier nicht berücksichtigt.

Bemerkenswert bei der Untersuchung ist das Maximum an Tag 3. Just an diesem Zeitpunkt fand sich im Darm auf der Proteinebene das absolute Minimum [48], histologisch waren jedoch sehr hohe Zellzahlen zu finden.

Insgesamt verwunderte der Verlauf dieses Zytokins im ELISA. Dort waren alle Werte unterhalb des Kontrollwertes – mit der Ausnahme von Tag 90, der nur sehr wenig darüber liegt [48].

6.4. Limitationen dieses Wundheilungsmodells

Im Zuge der Minimierung der Dehiszenzrisikos ist die Forschung meist darauf angewiesen, neue Methoden und Verfahren vor dem Einsatz am Patienten zunächst an einem Modell zu erproben. Auch bei grundsätzlichen Fragen zur Wundheilung, wie sie in dieser Arbeit gestellt wurden, kommt ein Modell zum Einsatz. Es liegt auf der Hand, dass das Rattenmodell die humane Wundheilung nicht perfekt wiedergeben kann.

Jedoch stimmt der histologische Wandaufbau des Ratten-Dickdarms weitgehend mit dem des menschlichen Kolons weitgehend überein [55]. Autoren, die mit Modellen die chronische Hypoxie im Zusammenhang mit der Wundheilung von Anastomosen im Dickdarm untersuchten, kommen zu dem Schluss, dass die Ratte als zufrieden stellendes Modell verwendet werden kann [22].

In der traditionell besser erforschten kutanen Wundheilung gibt es ein Modell für die chronisch ischämische Wunde an der Haut. Dieses wurde von Chen et al. [56] im Jahr 1997 entwickelt und von Gould et al [57] optimiert. Dort wurde ein molekulares Profil gefunden, das der chronischen menschlichen Wunde sehr ähnlich ist – trotz eines Panniculus carnosus, für den es in der menschlichen Haut keine Entsprechung gibt.

6.5. Ausblick

Die Ergebnisse und Erkenntnisse aus dieser Arbeit, die sich mit der komplikationslosen Wundheilung am Kolon der Ratte befasste, stellen eine molekularhistologische Grundlage der intestinalen Wundheilung dar. Diese sind übertragbar auf ein Modell mit erhöhter Dehiszenzwahrscheinlichkeit. Damit soll ein besseres und vor allen Dingen systematisches Verständnis für die Pathogenese der Anastomoseninsuffizienz gewonnen werden. So wird es möglich, auf histologischer Ebene und auf Proteinebene die Unterschiede zwischen komplikationsloser und komplikationsbehafteter Anastomosenheilung zu beobachten, sind die klinischen Folgen bei einer Leckage doch in vielen Fällen verheerend.

Außerdem erscheint es dann möglich, beispielsweise die Wirkungen von lokal gegebenen Zytokinen oder von zytokingetränkten Fäden im Anastomosenbereich besser zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

Die Wundheilung im Kolon ist ein wichtiges Thema in der Medizin, da sich dieser Prozess durch die besonderen Ausgangsbedingungen, wie etwa hohe Bakterienlast, ein hoher intraluminaler Druck und niedrigere Sauerstoffspannung von der viel untersuchten kutanen Wundheilung unterscheidet. Auch sind die Folgen einer Dehiszenz im Anastomosenbereich ungleich gravierender, besteht doch das Risiko einer Peritonitis, die mit hoher Letalität verbunden ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die komplikationslose Wundheilung über einen langen Zeitraum zu beobachten. Anhand des Verlaufs einer Vielzahl von für die Wundheilung wesentlichen Zytokinen sollte die Wundheilung am Kolon möglichst ausführlich untersucht werden.

Im Rahmen meiner Fragestellung wurden 100 männliche Wistarratten unter anderem mit einer Anastomose am Übergang von Kolon sigmoideum zum Rektum versehen. Die Tiere waren in verschiedene Gruppen aufgeteilt und wurden je nach Gruppe zu einem der sechs verschiedenen Zeitpunkte (0, 3, 7, 14, 30 und 90 Tage post Operationem) getötet und die Anastomose wurde entnommen. Das Anastomosengewebe wurde für immunhistologische und ELISA Untersuchungen verwendet.

Durch den langen Untersuchungszeitraum konnten nicht nur die initialen Phasen der Wundheilung, sondern auch die Phase der Bindegewebsbildung erfasst werden. Es wurden immunhistochemische Färbungen und ELISA-Analysen von verschiedenen proinflammatorischen (TNF- α , IFN- γ), chemotaktischen (RANTES, MIP-2, MCP-1), angiogenetischen (VEGF, PDGF-B, FGF-2) und antiinflammatorischen (IL-10, IL-13) Zytokinen und TGF- β_1 durchgeführt.

Dabei wurde eine insgesamt verzögerte Wundheilung festgestellt. Es zeigte sich eine wesentlich verlängerte inflammatorische Phase sowie eine verlängerte proliferative Phase. Erst von Tag 30 bis 90 kehrten die meisten Parameter wieder auf ein mehr oder minder normales Niveau zurück. Erwartungsgemäß waren die meisten histologisch positiven Zellen in der Anastomose selbst zu finden. Die Zellzahlen der Zellmarker ließen sich gut mit den Zytokinen in Einklang bringen. Jedoch ließen sich Zellzahlen und Zytokinkonzentration meist nicht korrelieren. Es traten mit IFN- γ und RANTES zwei Zytokine auf, die im kutanen Modell nicht beobachtet wurden. IFN- γ hemmt die

meisten Zellen, die im Rahmen der proliferativen Phase benötigt werden und könnte ein Grund für die verlängerte inflammatorische Phase sein.

Aus diesen Untersuchungen lässt sich schließen, dass die komplikationslose kolonische Wundheilung grundsätzlich mit der kutanen vergleichbar ist. Die Ergebnisse und Erkenntnisse aus dieser Arbeit werden jetzt als Grundlage für ein Modell mit erhöhter Dehiszenzwahrscheinlichkeit verwendet. Damit soll ein besseres und systematisches Verständnis für die Pathogenese der Anastomoseninsuffizienz gewonnen werden. So wird es möglich, auf histologischer Ebene und auf Proteinebene die Unterschiede zwischen komplikationsloser und komplikationsbehafteter Anastomosenheilung zu beobachten, sind die klinischen Folgen bei einer Leckage doch in vielen Fällen verheerend.

Zudem wird es dann möglich sein, systematischer zu ergründen, wie etwa intraoperativ eingebrachte Zytokine oder zytokingetränkte Fäden das Wundmilieu verändern und beeinflussen.

8. Literaturverzeichnis

1. Ibelgaufts, H. *Horst Ibelgaufts' C O P E Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia "Wound Healing"*. www.copewithcytokines.de [Internet Resource] 2006 July 2006 [cited; Available from: www.copewithcytokines.de.
2. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
3. Zhang, X.W., et al., *Redundant function of macrophage inflammatory protein-2 and KC in tumor necrosis factor-alpha-induced extravasation of neutrophils in vivo*. Eur J Pharmacol, 2001. **427**(3): p. 277-83.
4. Ibelgaufts, H. *Horst Ibelgaufts' C O P E Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia "TNF -alpha"*. www.copewithcytokines.de 2006 [cited; Available from: www.copewithcytokines.de.
5. Ibelgaufts, H. *Horst Ibelgaufts' C O P E Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia "IFN-gamma"*. www.copewithcytokines.de 2006 2006 [cited; Version 16.9 (July 2006)]. Available from: www.copewithcytokines.de.
6. Yamanaka, O., et al., *Effects of interferon-gamma on human subconjunctival fibroblasts in the presence of TGFbeta1: reversal of TGFbeta-stimulated collagen production*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2003. **241**(2): p. 116-24.
7. Ishida, Y., et al., *The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1848-55.
8. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
9. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
10. Ibelgaufts, H. *Horst Ibelgaufts' C O P E Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia "MCP-1"*. www.copewithcytokines.de 2006 [cited 2006; Version 16.9 (July 2006):[Available from: www.copewithcytokines.de.
11. Conti, P., et al., *Impact of Rantes and MCP-1 chemokines on in vivo basophilic cell recruitment in rat skin injection model and their role in modifying the protein and mRNA levels for histidine decarboxylase*. Blood, 1997. **89**(11): p. 4120-7.
12. Marisa, C., et al., *MCP-1 and MIP-2 expression and production in BB diabetic rat: effect of chronic hypoxia*. Mol Cell Biochem, 2005. **276**(1-2): p. 105-11.
13. Conti, P., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 is a proinflammatory chemokine in rat skin injection sites and chemoattracts basophilic granular cells*. Int Immunol, 1997. **9**(10): p. 1563-70.
14. Reale, M., et al., *Induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and TNF alpha by Trichinella spiralis in serum of mice in vivo*. Mol Cell Biochem, 1998. **179**(1-2): p. 1-5.
15. Dipietro, L.A., et al., *Modulation of macrophage recruitment into wounds by monocyte chemoattractant protein-1*. Wound Repair Regen, 2001. **9**(1): p. 28-33.
16. Chensue, S.W., et al., *Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 165-73.

17. Conti, P., et al., *RANTES is a pro-inflammatory chemokine and chemoattracts basophil cells to extravascular sites*. J Pathol, 1997. **183**(3): p. 352-8.
18. Ajuebor, M.N., et al., *The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 552-8.
19. Matzer, S.P., et al., *Constitutive expression of macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2) mRNA in bone marrow gives rise to peripheral neutrophils with preformed MIP-2 protein*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4635-43.
20. Viores, S.A., et al., *Experimental models of growth factor-mediated angiogenesis and blood-retinal barrier breakdown*. Gen Pharmacol, 2000. **35**(5): p. 233-9.
21. Liekens, S., E. De Clercq, and J. Neyts, *Angiogenesis: regulators and clinical applications*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(3): p. 253-70.
22. Attard, J.A., et al., *The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model*. Dis Colon Rectum, 2005. **48**(7): p. 1460-70.
23. Byrne, A.M., D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey, *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(4): p. 777-94.
24. Yao, F., et al., *Age and growth factors in porcine full-thickness wound healing*. Wound Repair Regen, 2001. **9**(5): p. 371-7.
25. Bikfalvi, A., et al., *Biological roles of fibroblast growth factor-2*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 26-45.
26. Burgess, A.W. and A.M. Sizeland, *Growth factors and the gut*. J Gastroenterol Hepatol, 1990. **5 Suppl 1**: p. 10-21.
27. Ortega, S., et al., *Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5672-7.
28. Ibelgaufts, H. *Horst Ibelgaufts' C O P E Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia "PDGF"*. www.copewithcytokines.de 2006 [cited; Available from: www.copewithcytokines.de].
29. Pierce, G.F., et al., *Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms*. J Cell Biol, 1989. **109**(1): p. 429-40.
30. Lee, C.G., et al., *Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1)*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 809-21.
31. Sato, Y., T. Ohshima, and T. Kondo, *Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(1): p. 194-9.
32. Ibelgaufts, H. *Horst Ibelgaufts' C O P E Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia "IL10"*. www.copewithcytokines.de 2006 [cited; Version 16.9 (July 2006):[Available from: www.copewithcytokines.de].
33. Sporn, M.B. and A.B. Roberts, *TGF-beta: problems and prospects*. Cell Regul, 1990. **1**(12): p. 875-82.
34. O'Kane, S. and M.W. Ferguson, *Transforming growth factor beta s and wound healing*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 63-78.
35. Chin, D., et al., *What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)?* Br J Plast Surg, 2004. **57**(3): p. 215-21.

36. Ibelgaufts, H. *Horst Ibelgaufts' C O P E Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia "TGF-beta"*. www.copewithcytokines.de 2006 [cited; Version 16.9 (July 2006):[Available from: www.copewithcytokines.de.
37. Buckmire, M.A., et al., *Temporal expression of TGF-beta1, EGF, and PDGF-BB in a model of colonic wound healing*. J Surg Res, 1998. **80**(1): p. 52-7.
38. Mustoe, T.A., et al., *Differential acceleration of healing of surgical incisions in the rabbit gastrointestinal tract by platelet-derived growth factor and transforming growth factor, type beta*. Surgery, 1990. **108**(2): p. 324-9; discussion 329-30.
39. Beck, L.S., et al., *One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2841-9.
40. Brown, G.L., et al., *Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta*. Ann Surg, 1988. **208**(6): p. 788-94.
41. Yang, L., et al., *Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2147-57.
42. Boss, N., *Fibroplasie*, in *Roche Lexikon Medizin*. 1998, Urban & Fischer Verlag. p. 552.
43. Branton, M.H. and J.B. Kopp, *TGF-beta and fibrosis*. Microbes Infect, 1999. **1**(15): p. 1349-65.
44. Witte, M.B. and A. Barbul, *Repair of full-thickness bowel injury*. Crit Care Med, 2003. **31**(8 Suppl): p. S538-46.
45. Polat, C., et al., *The effects of increased intraabdominal pressure on colonic anastomoses*. Surg Endosc, 2002. **16**(9): p. 1314-9.
46. Rudinskaite, G., et al., *Risk factors for clinical anastomotic leakage following the resection of sigmoid and rectal cancer*. Medicina (Kaunas), 2005. **41**(9): p. 741-6.
47. Verhofstad, M.H., et al., *Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats*. Dis Colon Rectum, 2001. **44**(3): p. 423-31.
48. Ziegler, D., *Untersuchungen zur Anastomosenheilung am Colon der Wistar ratte: Physikalische und zytokinetische Analysen unter Verwendung verschiedener absorbierbarer Nahtmaterialien*, in *Chirurgische Klinik und Poliklinik*. 2002, Julius: Würzburg. p. 100.
49. Biert, J., et al., *A semiquantitative histological analysis of repair of anastomoses in the rat colon after combined preoperative irradiation and local hyperthermia*. Radiat Res, 1998. **149**(4): p. 372-7.
50. Walker, K.G., et al., *Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer*. Ann Surg, 2004. **240**(2): p. 255-9.
51. Fielding, L.P., et al., *Anastomotic integrity after operations for large-bowel cancer: a multicentre study*. Br Med J, 1980. **281**(6237): p. 411-4.
52. Dietz, D., *Resektions- und Rekonstruktionsverfahren in der Viszeralchirurgie Lehrbuch und Atlas der biofragmentablen Anastomose*. 2002, Kaden. p. 46-50.
53. Bryan, D., et al., *Cytokine gene expression in a murine wound healing model*. Cytokine, 2005. **31**(6): p. 429-38.

54. McCourt, M., et al., *Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis*. Arch Surg, 1999. **134**(12): p. 1325-31; discussion 1331-2.
55. Storch, V., *Kükenthals Leitfaden für das zoologische Praktikum*, 23. Auflage, S.430f. 1999, Spektrum, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin. p. 430-432.
56. Chen, C., et al., *Molecular and mechanistic validation of delayed healing rat wounds as a model for human chronic wounds*. Wound Repair Regen, 1999. **7**(6): p. 486-94.
57. Gould, L.J., et al., *Optimization and validation of an ischemic wound model*. Wound Repair Regen, 2005. **13**(6): p. 576-82.

9. Verzeichnis der Bilder und Diagramme

- Abbildung 1 Schematischer Verlauf der Wundheilung an der Haut mit untersuchten Zytokinen, die den einzelnen Wundheilungsphasen zugeordnet sind. 2
- Abbildung 2 Anzahl der Tiere pro Zeitpunkt sowie Aufteilung der Anastomose 12
- Abbildung 3 Verlauf der Parameter Nekrose, Ödem, Epithelialisierungsdefizit und Defizit beim muskulären Bridging zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 post Operation. Allmählicher Rückgang der vier Scores über 90 Tage. Im Ödemscore Maximum an Tag 7. Hier war das ödematöse Gewebe dem Granulationsgewebe weitgehend gewichen. In den Diagrammen wurde +1 Standardabweichung dokumentiert. 22
- Abbildung 4 Histologie zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation. Histologischer Verlauf der Wundheilung im Bereich der Anastomose im Kolon. Zunehmend ausgeprägtes Ödem bis Tag 3, das allmählich durch Granulationsgewebe (Tag 7) ersetzt wurde. Narbige Abheilung bis Tag 90. 23
- Abbildung 5 Immunhistochemische Färbung von TNF-a positiven Zellen an Tagen 14 und 90. Tag 14: Maximum der Zellzahlen, reichlich Granulationsgewebe, deutliche Anfärbung des Interstitiums. Tag 90: nur geringfügige Anfärbung von TNF-a im Bereich der Anastomose, reifes Narbengewebe. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x). 24
- Abbildung 6 Verlauf der Zellzahlen für TNF-alpha zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Maxima bei A. und PA. am Tag 14. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA an den Tagen 0/3/7/14/90. Folglich ist A. der Hauptsekretionsort. +/-1 SD dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 24
- Abbildung 7 Verlauf der Zytokinemengen bezogen auf 430µg Protein im TNF-α ELISA. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum vorherigen Zeitpunkt wurden nur an Tag 14 dokumentiert (*). Maximum der Proteinkonzentration erst an Tag 30 mit anschließendem Abfall der Werte unter den Kontrollwert an Tag 90. 25
- Abbildung 8 Verlauf der Zellzahlen für IFN-γ zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. A: steiler Anstieg der Zellzahlen bis Maximum an Tag 7, danach kontinuierlicher Abfall bis Tag 90. PA: Maximum an Tag 3, deutlich geringer

ausgeprägter Anstieg der Zellzahlen als in A. An den Tagen 0/7/14/30 signifikante Unterschiede der Zahlen zwischen A. und PA. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 26

Abbildung 9 Verlauf der Zellzahlen für MCP-1 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. A: Maximum an Tag 7. PA: Maximum an Tag 3. Signifikant unterschiedliche Zellzahlen zwischen A. und PA. an den Tagen 0/3/7/14. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 27

Abbildung 10 Verlauf der Zytokinmengen bezogen auf 430µg Protein im MCP-1 ELISA. Im Verlauf des Untersuchungszeitraums waren die Schwankungen der Zytokinkonzentration zum jeweils vorhergehenden Untersuchungszeitpunkt nicht signifikant. Kein Nachweis von MCP-1 an Tag 90. +/- 1 SD wurden dokumentiert. 27

Abbildung 11 Verlauf der Zellzahlen für RANTES zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Ausgeprägtes Maximum an Tag 7 mit Rückgang der Zahlen auf Kontrollniveau an Tag 90 in A. In PA waren nur geringe Zellzahlsteigerungen zu verzeichnen. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 28

Abbildung 12 Immunhistochemische Färbung von RANTES positiven Zellen an Tag 7. Maximum an Tag 7 mit Anfärbung des Interstitiums im Bereich A. An Tag 90 nur geringe Anfärbung in A. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x). 29

Abbildung 13 Verlauf der Zellzahlen für MIP-2 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. deutlicher Anstieg bis Maximum an Tag 7, in PA Maximum schon an Tag 3. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA an Tagen 0/7/14/30. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 30

Abbildung 14 Verlauf der Zytokinmengen bezogen auf 430µg Protein im MIP-2 ELISA. Ausgeprägtes Maximum an Tag 3, an Tag 90 immer noch höhere Spiegel als

bei den Kontrollen. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. 30

Abbildung 15 Verlauf der Zellzahlen für VEGF zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In der A. deutliches Maximum an Tag 7. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA. nur an den Tagen 7 und 14. Folglich Hinweis auf ausgeprägte Mitreaktion in PA. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 31

Abbildung 16 Immunhistochemische Färbung von VEGF positiven Zellen an Tag 7. Maximum an Tag 7, zahlreich angefärbte Zellen im Bereich der Anastomose, VEGF auch interstitiell nachweisbar. An Tag 90 kaum positive Zellen im Narbengewebe. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x) 32

Abbildung 17 Verlauf der Zellzahlen für FGF-2 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. steiler Anstieg mit Maximum an Tag 14, danach Abfall der Zahlen auf ein über den Kontrollen liegendes Niveau. Deutliche Mitreaktion des PA-Bereichs, daher lediglich signifikante Unterschiede zwischen A und PA an zwei Zeitpunkten (7/14). +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 33

Abbildung 18 Verlauf der Zellzahlen für PDGF-B1 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. und PA Maxima an Tag 7. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA. an Tagen 0/7/14/30. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 34

Abbildung 19 Verlauf der Zellzahlen für IL-10 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. Maximum an Tag 7. Deutliche Mitreaktion des PA.-Gewebes, daher sind die Zellzahlen zwischen A. und PA. nur an den Tagen 7/14 signifikant unterschiedlich. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 35

Abbildung 20 Immunhistochemische Färbung von IL-10 positiven Zellen. Maximum an Tag 7, interstitielle Anfärbung sichtbar. An Tag 90 kaum Anfärbung in Anastomose. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x) 35

Abbildung 21 Verlauf der Zellzahlen für IL-13 zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. +/- 1 SD wurden dokumentiert. In A. Maximum an Tag 7, in PA. an Tag 3. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA. an Tagen 7/14/30. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 36

Abbildung 22 Verlauf der Zytokinmengen bezogen auf 430µg Protein im IL-13 ELISA. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes waren keine signifikanten Veränderungen zum jeweils vorhergehenden Zeitpunkt zu beobachten. Anstieg der Konzentration auf ein Maximum an Tag 14, danach progredienter Rückgang auf die Ausgangs- und Kontrollwerte. Gegenüber den Kontrollen war lediglich Tag 14 signifikant erhöht. 37

Abbildung 23 Verlauf der Zellzahlen für TGF-β zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Maxima in A. an Tag 7 und PA. an Tag 3. Starke Mitreaktion in der PA., deshalb unterschieden sich die Zahlen zwischen A. und PA. lediglich an Tag 0/14. +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 38

Abbildung 24 Immunhistochemische Färbung von TGF-beta positiven Zellen. Maximum an Tag 7 mit zahlreichen positiven Zellen sowie Anfärbung des Interstitiums. An Tag 90 nur geringe Expression. Deutliche Narbenbildung, kaum interstitielle Expression von TGF-beta. Übersicht (4x) und Ausschnittsvergrößerung (40x) 38

Abbildung 25 Verlauf der Zellzahlen für B-Zellen zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Steiler Anstieg mit Maximum an Tag 14 in A. In PA. Maximum an Tag 3. Signifikante Unterschiede zwischen den Zahlen in A. und PA. an 3 Tagen (7/14/30). +/- 1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 39

Abbildung 26 Verlauf der Zellzahlen für CD4+ zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. In A. Maximum an Tag 7 in PA. an Tag 3. Zu drei

Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen A. und PA (7/14/30). +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 40

Abbildung 27 Verlauf der Zellzahlen für CD8+ zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Maximum an Tag 7 in A. Signifikante Unterschiede zwischen A. und PA. an Tagen 7/14. +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 41

Abbildung 28 Verlauf der Zellzahlen für Monozyten zu den Zeitpunkten 0/3/7/14/30/90 Tage post Operation und Kontrollen. Maximum in A. an Tag 14, in PA an Tag 3. Deutliche Konzentration der Makrophagen in A., daher signifikante Zellzahlunterschiede zwischen A. und PA. an vier Zeitpunkten (0/7/14/30) +/-1 SD wurden dokumentiert. Signifikant unterschiedliche Expressionen zum jeweils vorherigen Zeitpunkt wurden mit * markiert. Signifikanzen zwischen A. und PA. wurden mit § markiert. 42

Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie die gute Betreuung und Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. Debus sehr. Mein Dank gilt selbstverständlich auch Herrn Prof. Dr. Scheppach für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer Dr. Fichtner. Meinem Vorgänger Dr. Ziegler danke ich sehr für die Operation der Tiere sowie die freundliche Überlassung des Materials.

Ganz besonders möchte ich auch Herrn Priv. Doz. Dr. Otto von der Experimentellen Transplantationsimmunologie danken, ohne dessen unermüdliche Hilfe diese Arbeit undenkbar gewesen wäre. Bei Frau Dragan bedanke ich mich für die Einweisung in die ELISA-Technik. Frau Chodnevskaja danke ich sehr für die Einweisung und die vielen Hilfestellungen beim Erlernen der Immunhistochemie. Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Ulrichs für die freundliche Aufnahme in ihren Räumlichkeiten, sowie für die Erlaubnis, viele Geräte zu benutzen.

Frau Martina Zöhrer danke ich herzlich für die kompetente Beratung beim Erstellen der Statistik. Meiner Frau, Dr. Annette Strehl danke ich von ganzem Herzen für die viele Geduld, die sie mir gegenüber aufbrachte, als ich diese Arbeit erstellte, sowie für das Korrekturlesen und die wertvollen Hinweise beim Verfassen der Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Georg Oswald Strehl
Geburtsdatum	09.09.1976
Geburtsort	Belo Horizonte, Brasilien
Anschrift	Straubmühlweg 11, App. 3303 97078 Würzburg
Familienstand	verheiratet seit dem 14. Mai 2004
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1983-1987	Grundschule Ebern
1987-1996	Friedrich – Rückert - Gymnasium Ebern
1996	Allgemeine Hochschulreife

Studium der Elektrotechnik

SS1997-WS1997/98	Friedrich Alexander Universität Erlangen
------------------	--

Zivildienst:

1997-1998	Kreiskrankenhaus Ebern (Station für Innere Medizin)
-----------	---

Studium der Humanmedizin

SS 1998-SS 2004:	Julius Maximilians Universität Würzburg
Frühjahr 2000:	Physikum
Frühjahr 2001:	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Herbst 2003:	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
19.10.2004:	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
22.10.2004:	Erhalt der Approbation

Studium der Zahnmedizin

WS 2004/2005 bis jetzt	Julius Maximilians Universität Würzburg
------------------------	---

Würzburg, Dezember 2006