

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. A. Thiede

**Untersuchungen zur Anastomosenheilung am Colon der Wistaratte:  
Physikalische und zytokinetische Analysen unter Verwendung verschiedener  
absorbierbarer Nahtmaterialien**

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

vorgelegt von  
Dirk Ziegler  
aus Hassfurt am Main

Würzburg, August 2002

Referent: Priv.-Doz. Dr. E.S. Debus

Korreferent: Professor Dr. med. A. Thiede

Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2002

Der Promovend ist Arzt im Praktikum.

Gewidmet meiner Mutter

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellung	8
2.1 Experimentelle Fragestellung I	8
2.2 Experimentelle Fragestellung II	8
3. Material und Methoden	9
3.1 Versuchstiere und Haltung	9
3.2 Experimentelle Untersuchungen: Operativer Teil	10
3.2.1 Studiengruppe	10
3.2.2 Verwendete Nahtmaterialien	11
3.2.3 Anastomosenerstellung	12
3.2.4 Postoperativer Verlauf und Leckagerate	15
3.2.5 Anastomosenentnahme	16
3.2.6 Anastomosenaufbereitung	17
3.2.7 Fotodokumentation	18
3.3 Experimentelle Untersuchungen: Physikalische Studien und Histologie	19
3.3.1 Untersuchungsmaterial	19
3.3.2 Laserflowmetrie	19
3.3.3 Zugfestigkeit	20
3.3.4 Berstungsdruck	22
3.3.5 Berstungslokalisation	23
3.3.6 Histologie	24
3.4 Experimentelle Untersuchungen: Zytokinetische Studien	24
3.4.1 Untersuchungsmaterial	24
3.4.2 Untersuchungsmethoden	25
3.4.3 TGF $\beta$ 1 – ELISA	25
3.4.4 Rantes- ELISA	27
3.4.5 IL-10- ELISA	28
3.4.6 Protein – Assay	29
3.5 Auswertung und Statistik	29

4. Ergebnisse	31
4.1 Ergebnisse aus den Experimentellen Untersuchungen: Operativer Teil	30
4.1.1 Gewichtsverlauf	30
4.1.2 Postoperativer Verlauf und Leckagerate	32
4.2 Ergebnisse aus den Experimentelle Untersuchungen: Physikalische Studien und Histologie	34
4.2.1 Laserflowmetrie	34
4.2.2 Zugfestigkeit und Berstungslokalisation	37
4.2.3 Berstungsdruck und Berstungslokalisation	40
4.2.4 Histologie	43
4.3 Ergebnisse aus den Experimentelle Untersuchungen: Zytokinetische Studien	45
4.3.1 Proteingehalt	45
4.3.2 TGF $\beta$ 1 – Zytokinetik	46
4.3.3 Rantes – Zytokinetik	47
4.3.4 IL-10 – Zytokinetik	48
5. Beantwortung der Fragen	50
5.1 Beantwortung der experimentellen Fragestellung I	50
5.2 Beantwortung der experimentellen Fragestellung II	51
6. Diskussion	53
6.1 Der postoperative klinische Verlauf	54
6.2 Physikalische Auswertungen: Laserflowmetrie, Zugfestigkeit und Berstungsdruck sowie Histologie	55
6.3 Zytokinetische Auswertungen: TGF $\beta$ 1, RANTES und IL-10	61
7. Zusammenfassung	73
8. Literaturverzeichnis	77
9. Anhang	91
Danksagung	
Lebenslauf	

## 1. Einleitung

Die Anastomosenheilung nach Eingriffen am Colon ist in der operativen Medizin von hoher klinischer Relevanz. Nahtinsuffizienzen mit konsekutiver Leckagebildung sowie Wundheilungsstörungen sind mit einem Anteil von bis zu 50% noch immer inakzeptabel hoch (Karanjia et al. 1994, Thiede et al. 1987). Sie fordert vom viszeralchirurgisch tätigen Arzt fundierte Kenntnisse sowohl über Physiologie und Pathophysiologie der intestinalen Wundheilung, als auch über die Wahl des zur Adaptation verwendeten Nahtmaterials. Das Vertiefen grundlegender Kenntnisse über den normalen, unkomplizierten Heilungsverlauf nach operativer Darmnaht ist das Ziel intensiver experimenteller Forschung. Es stellt den Kern der hier vorliegenden Arbeit dar.

Die intestinale Wunde heilt analog den allgemeinen Prinzipien der kutanen Wundheilung und gliedert sich in vier morphologisch differenzierbare Phasen, in deren Verlauf Zellaktivierungen, Zellteilung, Chemotaxis und Zellmigration eine besondere Rolle spielen. Insbesondere dem Peritoneum kommt bei allen gastrointestinalen Wundheilungsabläufen mit der möglichen Ausbildung einer Peritonitis oder Adhäsionen eine wichtige Funktion zu. Der Darm unterscheidet sich zudem durch seinen vielschichtigen Aufbau aus Schleimhaut, drei Muskelschichten und einer reichhaltigen Kapillarisation auch morphologisch deutlich von der Cutis.

Nach erfolgter Gewebsdurchtrennung kommt es in der *exsudativen Phase* (1. Tag) der Wundheilung zunächst zu einem provisorischen Wundschluss durch austretendes Wundsekret aus Blut und Lymphe unter Aktivierung der Gerinnungskaskade. Im Falle der Darmwand ist dies mit der Ausbildung eines Ödems verbunden. In diesem durch lokale Hypoxie geprägten katabolen Stadium, besteht durch die stattfindende Kollagenolyse und fehlende Kollagensynthese noch keine Eigenstabilität der Wunde. Der Zusammenhalt der Wundränder muss zu diesem Zeitpunkt noch durch das Nahtmaterial gewährleistet werden (Lünstedt und Debus 1990). Im Wundgebiet überwiegen morphologisch Thrombozyten und, mit einem Peak nach etwa 24 Stunden, neutrophile Granulozyten, angezogen durch zahlreiche chemotaktische Faktoren wie TGF  $\beta$  (Ibelgauft 1999).

In der darauf folgenden *resorptiven Phase* (2.-4. Tag) treten hauptsächlich autolytische Prozesse durch einwandernde Gewebsmakrophagen und zytokinetisch transformierte

Blutmonozyten auf. Tote Zellen werden durch enzymatische Vorgänge lysiert, phagozytiert und abgeräumt. Die eingeschleusten Makrophagen und Thrombozyten gewinnen durch die Abgabe von Wachstumsfaktoren und chemotaktischen Stoffen eine besondere Bedeutung. Für die Heilung ist eine gewisse entzündliche Reaktion zur Ausbildung des Granulationsgewebes zwar notwendig, schwere Entzündungsformen mit Abszessbildungen hemmen jedoch die Produktivität der Fibroblasten (Nöthinger et al. 1980).

Es schließt sich nun die *proliferative, anabole Phase* (4.-14. Tag) mit der Aussprossung von Kapillaren und der Differenzierung von Histozyten an. Das Zellbild wird beherrscht von Fibroblasten zur Kollagen- und Mukopolysaccharidneubildung, im Rahmen der kutanen Wundheilung zudem von Keratinozyten, welche die Reepithelialisierung der Wundfläche übernehmen. Es entsteht Granulationsgewebe. Die verletzten Strukturen erlangen allmählich ihre mechanische Reißfestigkeit wieder.

In der *reparativen Phase* (10.-180. Tag) wird der Heilungsvorgang mit dem Ausreifen der Kollagenfasern und der Differenzierung der wundkontrahierenden Myofibroblasten abgeschlossen. Enzyme (z.B. Kollagenasen, Elastasen) lockern die interzellulären Strukturen und die Gewebsintegrität wird letztlich vollendet. Allerdings verbleibt kollagenes Narbengewebe. Am Darm wird die Gewebsintegrität der Mukosa wieder vollständig hergestellt.

Aus mikroskopischer Sicht heilen Dünndarmanastomosen schneller als Anastomosen des Dickdarms. Granulozyten werden im Anastomosengebiet ilealer Anastomosen bereits drei Stunden nach Gewebsdurchtrennung nachgewiesen und erreichen ein Maximum nach 12 bis 24 Stunden (Hendriks et al. 1985, Hesp et al. 1985). Monozyten und Fibroblasten erscheinen 24 bis 48 Stunden nach Anastomosierung. Zudem dauert die inflammatorische Reaktion nach entsprechenden Eingriffen am Dickdarm länger als am Dünndarm, wo bereits nach einer Woche postoperativ nahezu keine Leukozyten mehr nachweisbar sind (Hesp et al. 1985). Die kollagenolytische Aktivität überwiegt über die Kollagenneubildung innerhalb der ersten drei bis fünf postoperativen Tage, wie Hydroxyprolinuntersuchungen an heilenden Colonanastomosen zeigten (Jiborn et al. 1980, Cronin et al. 1968b). Bei Betrachtung der ersten fünf postoperativen Tage fällt auch der Rekapillarierungsprozess am Colon spärlicher aus als am Dünndarm. Innerhalb der ersten postoperativen Woche ist ein Mukosadefekt des Dünndarms regelmässig verschwunden. Am Colon ist dieser zu diesem Zeitpunkt noch immer regelmäßig zu finden (Hesp et al. 1985).

All diese Punkte sollen den speziellen Charakter der Colonanastomose und seiner sensiblen Wundheilungssituation im Gastrointestinalbereich verdeutlichen.

Die obigen Ausführungen lassen erkennen, dass dem chirurgischen Nahtmaterial in der frühen Phase der intestinalen Wundheilung eine tragende Haltefunktion zukommt. Das Naturprodukt Catgut wurde als erster resorbierbarer Faden 1869 von Lister eingeführt und war noch mit Nachteilen wie enzymatischer Degradation, allergischer Fadenunverträglichkeit und Mikroabszessbildung behaftet (Knopp und Keck 1990). Es ebnete jedoch den Weg für die Entwicklung vollsynthetischer Polyglykolsäurefäden wie Dexon® (Davis and Geck) oder Vicryl® (Ethicon), die zu Beginn der 70er Jahre eingeführt wurden. Aus dem nunmehr vollständig hydrolytischen Abbau resultierte eine nur noch schwache Gewebereaktion und somit bessere Verträglichkeit bei abnehmender Komplikationsrate. Neuester Stand der Produktentwicklung stellen vollsynthetische, monofile, absorbierbare Fäden dar, wie das Ende der 80er Jahre eingeführte Maxon®, das Mitte der 90er Jahre auf den Markt gebrachten Monocryl® und Biosyn® sowie neuerdings der Faden Monosyn®, welcher sich unmittelbar in der klinischen Erprobung befindet. Sie verbinden den Vorteil einer atraumatischen Gewebspassage mit dem der vollständigen Auflösbarkeit.

Kostensparende handgenähte Anastomosen gehören nach einer prospektiven Studie aus dem Jahre 1996 (Mann et al.) zur effektivsten Methode des Darmverschlusses nach colorektalen Eingriffen. Zudem hat sich die einreihige, extramukös gestochene, nicht-invertierende Naht mit monofilen, resorbierbaren Fäden (Kontic 1994, Kostic 1994, Popovic 1994, Mickley et al. 1991, Nöthinger et al. 1980) als Standard der Anastomosenerstellung in der gastrointestinalen Chirurgie durchgesetzt. Die vorliegende Arbeit soll deshalb in ihrem ersten Teil mögliche Unterschiede im Einsatz monofiler, resorbierbarer Nahtmaterialien bei der Darmanastomosenerstellung im postoperativen Heilungsverlauf im Rahmen physikalischer Messungen offenlegen. Als Untersuchungsmodell wurde hierzu die Wistarratte verwendet. Die fetale Mikroflora des Rattencolons gleicht nach Untersuchungen von Herrmann et al. (1964) der des Menschen. Studien von Postlethwait et al. aus dem Jahre 1975 sowie von Smit et al. aus dem Jahre 1991 zeigen darüber hinaus eine dem menschlichen Gewebe ähnliche Gewebsreaktion auf implantiertes Nahtmaterial. Das Tiermodell der Wistarratte eignet sich somit sehr gut sowohl für die Untersuchung des unkomplizierten Heilungsverlaufes nach primärer Darmnaht, als auch für die anschließenden zytokinetischen Messungen.

Dieser Heilungsverlauf und insbesondere die Entwicklung einer frühen postoperativen Anastomosenfestigkeit wird durch zahlreiche technische, lokale und systemische Faktoren beeinflusst (Thornton et al. 1997, Basson 1994). Anastomosendehiszenzen werden regelmäßig in der ersten postoperativen Woche beobachtet. Zu diesem frühen Zeitpunkt hängt die unmittelbare Festigkeit der Anastomose von der Fähigkeit der extrazellulären Matrix, insbesondere der kollagenen Fasern ab, das Nahtmaterial zu halten. Später sollte die Wunde durch anastomosenübergrenzende Kollagenneubildung wieder die gleiche Resistenz wie das unverletzte Gewebe erhalten, wobei Fibroblasten, unter Kontrolle des zellulären und humoralen Immunsystems, eine besondere Rolle spielen (Paul et al. 1997). Die Submukosa muss bei der Darmnaht stets als wichtigste Schicht adaptiert werden, da das neugebildete Kollagen dort seinen Ursprung findet (Kostic 1994). Auch untermauerte bereits Chlumsky 1899 bei Berstungsdruckmessungen am Hundedünndarm und frischem menschlichem Leichendarm die Bedeutung der Submukosa als mechanisch tragende Wandschicht.

Zahlreiche Studien befassten sich bereits mit der Auswirkung systemischer und lokaler Faktoren auf die intestinale Anastomosenheilung und die Möglichkeit, deren Ablauf gezielt zu beeinflussen. Arbeitsgruppen unter Rao et al. (1995), Smit et al. (1991), Stone (1988), Knoop et al. (1987), Thiede et al. (1987) oder Raab et al. (1980) analysierten den Einfluss verschiedener Anastomosen- und Nahtmaterialien auf den Heilungsverlauf hinsichtlich Handhabung, physikalischer (Berstungsdruck, Zugfestigkeit) und biochemischer Parameter (Hydroxyprolinegehalt, histologische Gewebereaktion). Okada et al. (1999) kamen zu dem Schluss, dass die normale intestinale Darmflora entscheidend zum Heilungserfolg nach primärer Anastomosierung beiträgt. Schardey et al. (1997) konnten in ihren Untersuchungen den Vorteil einer selektiven Darmdekontamination zur Reduktion der Insuffizienzrate bei Oesophagojejunostomie nach Gastrektomie nachweisen. Die Auswirkungen von Urämie, Ikterus, Peritonitis, Durchblutungsstörungen, hochdosierter Kortison- oder Strahlentherapie sowie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen auf die intestinale Wundheilung wurden ebenso untersucht (Mann et al. 1996, Matsusue und Walser 1992, Lange und Lütgens 1990, Aszodi und Ponsky 1984, Gilmour et al. 1980, Irvin 1978, Scheele et al. 1978, Kilam et al. 1975) wie Versuche mit Fibrinkleber (Van der Ham et al. 1992) oder Kollagenpatches (Mutter et al. 1996), um den Heilungsverlauf zu beschleunigen.

Erst seit einigen Jahren nimmt das Interesse an den am Wundheilungsprozess beteiligten Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen zu. Diese Mediatoren sind von essentieller Bedeutung für einen ungestörten Ablauf und unterliegen einem bis dato unzureichend analysierten Regelmechanismus. Der Gedanke an die Entwicklung sogenannter „wound healing enhancers“ und gezielte Eingriffe in diese Funktionskreise liegt nahe und könnte eines Tages entscheidende Verbesserungen auf dem Gebiet der kutanen als auch der intestinalen Wundheilung erbringen (Thornton und Barbul 1997).

Vor gut vier Jahrzehnten rückten erstmals der Nerve Growth Factor (NGF) und der Epidermal Growth Factor (EGF) mit ihrer Entdeckung in das Interesse der medizinischen Forschung. Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen erhielten für deren Entdeckung im Jahre 1986 den Nobelpreis für Medizin (Raju 2000). Erst die Entwicklung molekularbiologischer Methoden ermöglichte jedoch deren genauere Lokalisierung, die Charakterisierung des molekularen Aufbaus der Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie die Einteilung in Wachstumsfaktorfamilien. Ihre für Leukozyten und Fibroblasten chemotaktische Aktivität, mitogene Stimulation, angiogenesefördernde sowie auf benachbarte Zellen parakrinen Effekte ließen die Idee aufkommen, sie in Form systemischer oder lokaler Applikation für die Optimierung der Wundheilung einzusetzen.

Eingehend wurde die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen für den Ablauf der kutanen Wundheilung untersucht (Engelhardt et al. 1998). Karahasanoglu et al. (1998) studierte den Einfluss von Wachstumshormonen auf den Anastomosenheilungsverlauf bei protein-mangelernährten Ratten, konnte jedoch keinen erhöhten Berstungsdruck in der mit Hormonen behandelten Gruppe feststellen. Christensen und Oxlund (1994) sowie Christensen und Flyvbjerg (1992) wiesen dagegen schon früher nach systemischer Gabe von biosynthetischen human growth hormone (hGH) einen erhöhten Gehalt an Kollagenfibrillen und eine verbesserte Kollagentextur gegenüber der nicht-behandelten Kontrollgruppe im Anastomosenbereich nach.

Ein ebenfalls sehr gut charakterisierter, ubiquitärer Wachstumsfaktor ist der vor über zehn Jahren erstmals beschriebene *TGF- $\beta$* ; eine Superfamilie, die wenigstens 25 Moleküle umfasst und in fünf Isoformen mit überwiegend TGF- $\beta$ 1 vorkommt. Er

bindet an drei verschiedenen, bereits erfolgreich geklonten, Rezeptoren TGF  $\beta$  RI-III. TGF  $\beta$ 1 ist entlang der Basallamina und in Mesenchymzellen nachweisbar (O'Kane und Ferguson 1997). TGF  $\beta$ -Rezeptoren sind auf nahezu allen Zellen vorhanden (Kramer et al. 2001). Die biologisch aktive Form des TGF  $\beta$  ist ein Homodimer von 25 kDa und besteht aus zwei identischen 112-gliedrigen Aminosäureketten, die durch Disulfidbrücken verknüpft sind. Als biologisch inaktive Form (latent TGF  $\beta$ ), wird TGF  $\beta$  an Proteoglykane der extrazellulären Matrix in Speicherform gebunden und bei Bedarf durch limitierte Proteolyse freigesetzt und aktiviert. In Säugetieren wurden bislang nur die Isoformen TGF  $\beta$  1-3 nachgewiesen, mit 60 bis 80% igen Sequenzhomologien. Die biologischen Wirkungen der von Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten und Lymphozyten produzierten TGF  $\beta$  Isoformen sind mannigfaltig. Im Vordergrund steht jedoch die reversible Hemmung des Zellwachstums in vivo (Kramer et al. 2001).

Zahlreiche Studien weisen auf einen therapeutischen Nutzen für die Wundheilung hin. TGF  $\beta$  zeigt kollageninduzierende (Buckmire et al. 1998, Slavin et al. 1992, Mustoe et al. 1990), fibrosefördernde (Sheppard 2001, Chen et al. 2000) und angiogenesestimulierende (Amento et al. 1991) Aktivität, wobei durch seine antagonistische Wirkung auf leukozytenstimulierende Zytokine zudem ein Einsatz als Immunsuppressivum denkbar wäre. Das TGF  $\beta$  essentiell für die normale Wundheilung ist, zeigt eine Untersuchung von Mustoe et al. aus dem Jahre 1987. Nach chirurgischer Wundsetzung auf dem Rücken männlicher Ratten wurde gereinigtes TGF  $\beta$  systemisch verabreicht. Es zeigte sich bereits nach fünf Tagen eine 220%ige Steigerung der Gewebereißfestigkeit. Zu gleichen Ergebnissen kamen McGee et al. 1989 und Beck et al. im Jahre 1993. Im Hinblick auf die intestinale Wundheilung zeigte eine Studie von Buckmire et al. (1998) die Bedeutung von TGF  $\beta$ 1 für den Kollagenmetabolismus bei der Heilung von Colonanastomosen. Das Interesse an TGF  $\beta$  als Mediator im Wundheilungsprozess ist demnach groß. Vor diesem Hintergrund wird im Rahmen dieser Arbeit versucht, das Expressionsmuster im Heilungsverlauf nach primärer Colonanastomosierung zu charakterisieren.

Anschließend wird das Augenmerk auf *RANTES* gerichtet, einen Vertreter der Gruppe der Chemokine, die erst in den letzten Jahren näher identifiziert und eingeordnet werden konnten. Er gehört zu einer heterogenen Gruppe von etwa 40 chemotaktisch wirkenden

Zytokinen. Sie zeichnen sich durch Strukturhomologien in der Lokalisation des gemeinsamen Cysteins aus und werden danach in vier Hauptgruppen eingeteilt: CC, C, CXC und CXXC. Chemokine sind unabdingbarer Bestandteil jeder Entzündungsreaktion und wirken in erster Linie leukotaktisch. Pattison et al. untersuchte 1994 den Zusammenhang zwischen eingesetzten anti-RANTES-Antikörpern und der deutlichen Abnahme der zellulären Infiltration bei mesangioproliferativer Nephritis. Eine neuere immunhistochemische Arbeit an einer in-vitro-Zelllinie aus dem Jahre 2000 (Frank et al.) stellt Keratinozyten im Randbereich von Inzisionswunden als Hauptproduzenten von RANTES im Wundbereich dar. Untersuchungen zur RANTES-Expression im Rahmen der intestinalen Wundheilung nach primärer Colonanastomosierung fanden bisher nicht statt. Deshalb soll auch dieser Faktor, als inflammatorisch wirkendes Zytokin, im Heilungsverlauf der unkomplizierten einfachen Dickdarmnaht untersucht werden.

Im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen weniger gut erforscht ist das pleiotrope Zytokin *IL-10*, ein als nichtkovalentes Homodimer exprimiertes Polypeptid von 18 kDa. Es wird nach Aktivierung von T-Zellen oder Monozyten/Makrophagen im Entzündungsareal relativ spät gebildet und inhibiert die von Monozyten/Makrophagen abhängige T-Zellproliferation und Zytokinproduktion (Gemsa et al. 1997). Die biologische Aktivität des IL-10 als wichtiger Immunregulator des Colons wurde 1993 von Kuhn et al. in einer Studie an IL-10 defizienten Knock-Out-Mäusen untersucht. Diese entwickelten unter nicht-pathogenfreien Bedingungen generalisierte Darmentzündungen. Diese waren Zeichen einer durch stimulierende intestinale Antigene verursachten unkontrollierten Immunantwort. Eine weitere Studie aus dem Jahre 1999 (Sato et al.) stellt an Mäusen einen Zusammenhang zwischen der phasenspezifischen Infiltration von Leukozyten und Makrophagen am Wundmodell der Haut einerseits und der endogenen IL-10 Produktion im Rahmen der inflammatorischen Immunantwort andererseits dar.

Dies veranlasste uns, das Zytokinmuster von IL-10, neben dem von TGF  $\beta$ 1 und RANTES im Rahmen des unkomplizierten Heilungsverlaufes nach primärer Colonanastomosierung zu untersuchen.

## 2. Fragestellung

### 2.1 Experimentelle Fragestellung I

Die physikalischen Untersuchungen sollten folgende Fragen klären:

- 1) Lassen sich hinsichtlich des Blutflusses im Bereich der oberen und unteren Colonanastomose am Modell der Wistar ratte signifikante Veränderungen im Heilungsverlauf feststellen und gibt es signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen beim Vergleich von vier verschiedenen, monofilen Nahtmaterialien?
- 2) Wie gestaltet sich die postoperative Anastomosenheilung im Hinblick auf die Zugfestigkeit, den Berstungsdruck als auch die Berstungslokalisation zu charakteristischen Zeitpunkten und gibt es signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen beim Vergleich von vier verschiedenen, monofilen Nahtmaterialien?
- 3) Lässt sich histologisch nach Auszählung der Entzündungszellen eine charakteristische Reaktion im Zeitverlauf feststellen und gibt es signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen beim Vergleich von vier verschiedenen, monofilen Nahtmaterialien?

### 2.2 Experimentelle Fragestellung II

In den durchgeführten zytokinetischen Untersuchungen wurde folgenden Fragen nachgegangen:

- 1) Lassen die zytokinetischen Bestimmungen ein charakteristisches Expressionsmuster im Zeitverlauf erkennen und ergeben sich signifikante Unterschiede im Vergleich zum nicht-operierten Colon?
- 2) Welche Rolle lassen sich TGF  $\beta$ 1, RANTES und IL-10 im unkomplizierten Heilungsverlauf der Colonanastomose zuordnen?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere und Haltung

Die Versuche wurden gemäß der Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen der Regierung von Unterfranken nach § 8, Abs.1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehm.-Nr. 621-2531.01-69/98).

Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche Wistarratten (Wistar Unilever, Stammbez. HsdCpb:WU) der Firma Harlan Winkelmann, Borchem. Sie wurden nach Erwerb in den Tierställen der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg gehalten. Zum Zeitpunkt der Erstoperation waren die Tiere drei bis vier Monate alt und zwischen 200 und 280 g schwer. Bis zum Zeitpunkt der Operation wurden sie paarweise in vollklimatisierten Räumen gehalten. Nach erfolgter Operation wurden sie zu Zweiergruppen und ab dem 20. postoperativem Tag zu Vierergruppen in Lamina-Airflow-Schränken (Scanbur, Koge, Dänemark) in Makrolon®-Käfigen gehalten.



**Abb. 3.1:** Wistarratten im Lamina-Airflow-Schrank, 60 Tage nach Primäroperation.

Die Tiere erhielten jeden zweiten Tag frisches Einstreu, Zellstoffunterlagen sowie Altromin®-Pressfutter (Zusammensetzung siehe Anhang) und Wasser ad libitum. Ergänzend wurde einmal wöchentlich eine Ration aus Haferflocken und Sonnenblumenkernen gegeben.

Postoperativ wurden die Tiere zunächst täglich (Tage 1 bis 7) und danach in Dreitages-Abständen bis zur entgültigen Reoperation gewogen. Verhaltensauffälligkeiten der Tiere (siehe 3.2.4) wurden genau protokolliert. Beim Eintreten von postoperativen Komplikationen erfolgte die sofortige Reoperation des Tieres, um ein unnötiges Leiden zu verhindern. Die Ursache (z.B. Ileus, Anastomoseninsuffizienz) wurde intraoperativ ergründet und protokolliert (siehe Kap. 4.1.2).

## 3.2 Experimentelle Untersuchungen: Operativer Teil

### 3.2.1 Studiengruppe

Operiert wurde eine Population von 100 männlichen Wistarratten mit einem durchschnittlichem Gewicht von 276 g, wobei 8 Tiere aufgrund postoperativer Komplikationen ersetzt werden mussten.

Diese wurden entsprechend der unterschiedlichen Reoperationszeitpunkte in sechs Gruppen aufgeteilt (siehe Tab.3.2.1), wobei für die Anastomosenanfertigung pro Gruppe wiederum vier verschiedene Nahtmaterialien der Stärke 6/0 USP verwendet wurden. Diese werden unter 3.2.2 näher beschrieben. Als Kontrollgruppe diente das nicht-operierte Colon von fünf Tieren, welches im Hinblick auf Zugfestigkeit, Berstungsdruck und Zytokinetik Aussagen über den nicht-operierten Darm liefern sollte. 20 Tiere wurden zum Zeitpunkt 0 Tage (innerhalb einer Stunde nach primärer Anastomosierung), jeweils 12 weitere Tiere in Abständen von 3, 7, und 14 und jeweils 22 Tiere nach 30 und 90 Tagen nachuntersucht.

Um Zug- und Berstungsdruckmessung an zwei getrennten Anastomosen durchführen zu können, erfolgte pro Tier die Anlage zweier Handnahtanastomosen in Einzelknopfnahttechnik circa zwei Zentimeter distal der Flexura Coli sinistra sowie am Übergang Colon sigmoideum zum Rektum. Somit wurden insgesamt 200 Anastomosen angelegt (siehe Tab.3.2.1).

**Tab. 3.2.1:** Anzahl der pro Untersuchungszeitpunkt mit zwei Darmanastomosen operierten Tiere unter Berücksichtigung des jeweils verwendeten Nahtmaterials.

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90	Gesamt
Monocryl®	5	3	3	3	6	6	26
Monosyn®	5	3	3	3	5	5	24
Biosyn®	5	3	3	3	5	5	24
Maxon®	5	3	3	3	6	6	26
Gesamt	20	12	12	12	22	22	100

### 3.2.2 Verwendete Nahtmaterialien

Um das Einflussverhalten unterschiedlicher Nahtmaterialien auf den intestinalen Wundheilungsprozess zu untersuchen, wurden zur Erstellung der Darmanastomosen vier verschiedene Fäden verwendet. Dabei handelte es sich ausschließlich um vollsynthetische Fäden der Stärke 6/0 USP (US-Pharmakopöe), deren Ausgangssubstanz die Glykolsäure darstellt. Im Einzelnen handelte es sich dabei um die monofilen, resorbierbaren Fäden Maxon®, Monocryl®, Biosyn® und Monosyn®:

1. Maxon® (Davis & Geck, Wayne, N.Y., USA):

Ein mittelfristig resorbierbarer Faden, der nach vier Wochen noch 50% seiner Ausgangsreißkraft besitzt. Er stellt ein Copolymer aus den Komponenten Glykolid und Trimethylencarbonat (TMC) dar. Laut tierexperimenteller Daten ist die Resorption des Nahtmaterials bis zum 60. Tag nach der Implantation minimal. Innerhalb von sechs Monaten ist sie im wesentlichen abgeschlossen (Produktbeschreibung, Maxon/Maxon, Davis & Geck). Es wurde ein mit D&C Grün Nr. 6 gefärbter Faden verwendet.

2. Monocryl® (Ethicon, Norderstedt, Deutschland):

Ein ultra-kurzfristig resorbierbarer Faden, der nach drei Wochen bereits seine Ausgangsreißkraft voll verloren hat. Er stellt ein Copolymer aus den Komponenten Glykolid und e-Caprolacton dar. Laut tierexperimenteller Daten ist die Resorption zwischen dem 90. und 120. Tag nach der Implantation im wesentlichen abgeschlossen (Produktbeschreibung,

Monocryl®). Es wurde ein mit D&C Violett Nr. 2 gefärbter Faden verwendet.

3. Biosyn® (Auto Suture, Elancourt, France):

Ein ultra-kurzfristig resorbierbarer Faden, der nach drei Wochen noch 40% seiner Ausgangsreißkraft besitzt. Er stellt ein Copolymer aus den Komponenten Glykolid, Dioxanon und Trimethylencarbonat dar. Laut tierexperimenteller Daten ist die Resorption zwischen dem 90 und 110 Tag nach Implantation abgeschlossen (Produktbeschreibung, Biosyn®, Auto Suture). Es wurde ein violett gefärbter Faden verwendet.

4. Monosyn® (B.Braun, Meisungen, Deutschland):

Ein kurzfristig resorbierbarer Faden, der zwischen den Tagen 13 bis 16 noch 50% seiner Knotenzugfestigkeit besitzt. Aufgebaut als Copolymer aus Glykolid, ε-Caprolacton und Trimethylencarbonat ist der Faden nach 60 bis 90 Tagen im Gewebe vollständig resorbiert (Produktbeschreibung, Monosyn®, B.Braun). Es wurde violetter Faden verwendet.

### 3.2.3 Anastomosenerstellung

Alle Operationen wurden unter keimarmen Bedingungen in den eigens dafür eingerichteten Räumen der Experimentellen Chirurgie (Würzburg, Josef-Schneider-Strasse 2, Bau 6) durchgeführt.

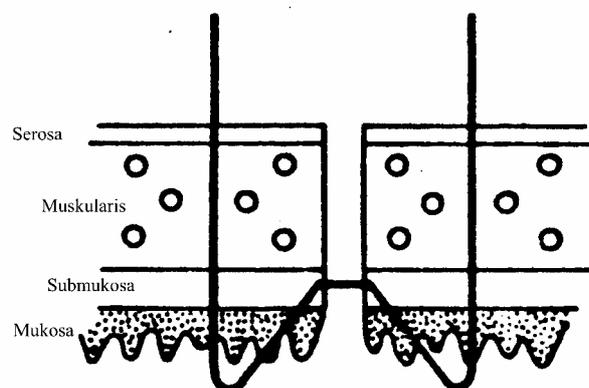
Präoperativ wurde das mikrochirurgische Operationsbesteck im Autoklaven (Autoclave-Steam Sterilizer, Modell 2540 EL, Firma Tuttnauer), bei einem Druck von 2,56 bar und einer Temperatur von 121°C, 30 Minuten dampfdrucksterilisiert. Ebenso wurde das Gewicht des zur Operation anstehenden Tieres bestimmt (Waage Heraeus®, Hanau).

Die Narkoseeinleitung der Tiere erfolgte mittels Forene® (1-Chlor-2,2,2-Trifluorethyldifluorethylether) in speziellen Narkoseboxen (Firma Gerald Büchold, Würzburg) bei einem O<sub>2</sub>-Flow von 2,5 l/min und einem Forene®-Anteil von 2-3 Vol%.

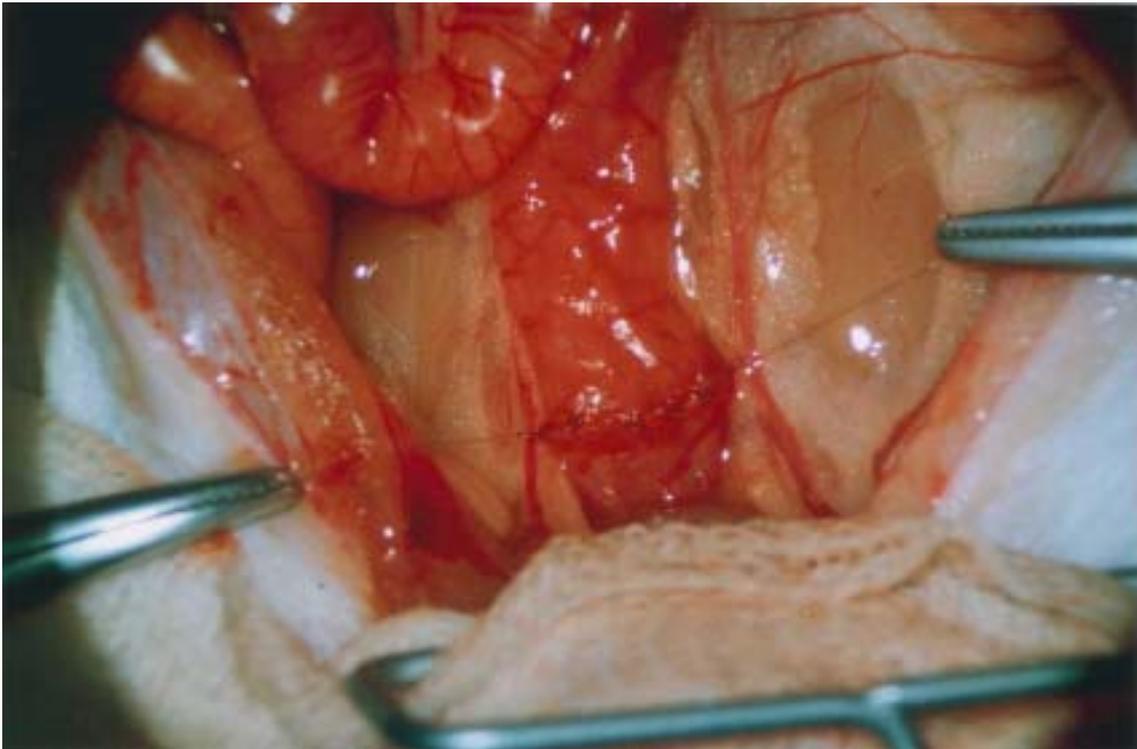
Intraoperativ erfolgte die Narkoseaufrechterhaltung bei Spontanatmung der Tiere unter Verwendung spezieller, für Ratten entworfener, Narkosekopfteile der Firma Gerald Büchold, Würzburg. Es herrschte ein O<sub>2</sub>-Flow von 1,8 l/min bei einem Forene®-Anteil von 1 bis 1,5 Vol% (Vaporisator Vapor 19.1., Firma Dräger, Lübeck). Die Operationsdauer lag im Durchschnitt bei 1,5 Stunden.

Nach Bauchdeckenrasur und Fixation der unter Narkose stehenden Ratte auf eine Korkplatte, wurde der gesamte vordere Rumpfbereich mit Kodanspray (Firma Schüller & Mayr, Norderstedt) desinfiziert. Das Operationsfeld wurde mit einem sterilen Schlitztuch abgedeckt.

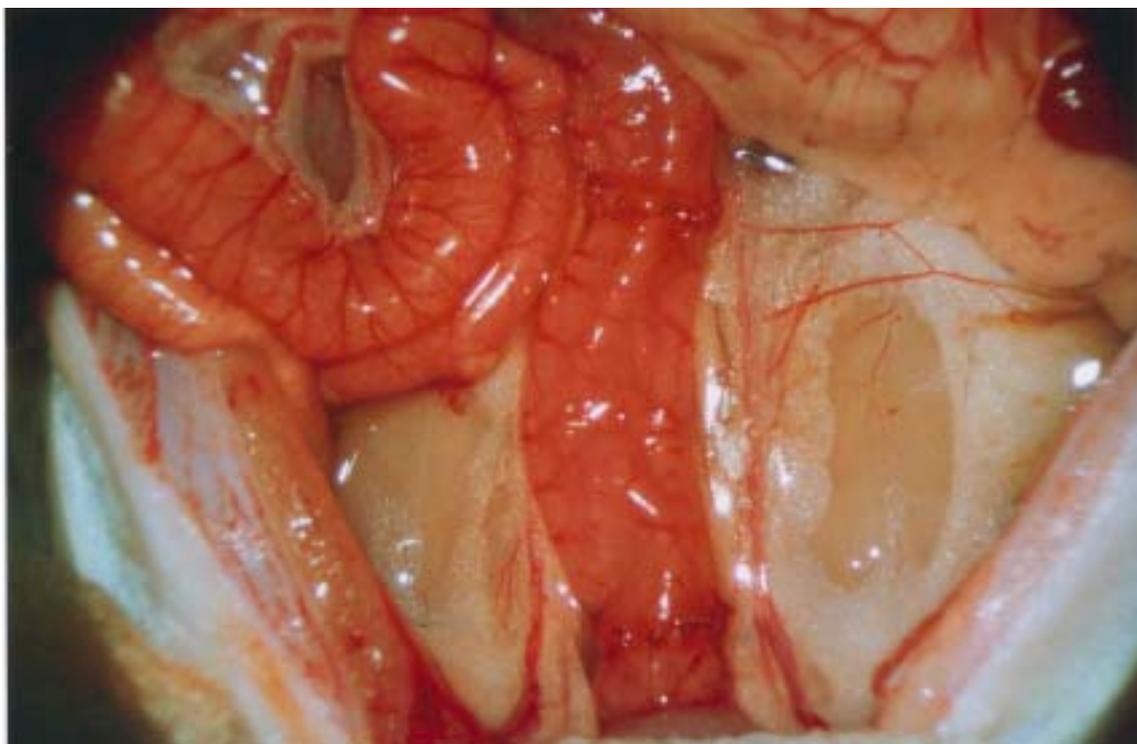
Nach medianer Laparatomie wurden Dünndarm mit Caecum außerhalb der Abdominalhöhle in Kompressen feucht gelagert. In regelmässigen Abständen erfolgte die Nachbefeuchtung sowie Spülung des Bauchraumes mit 0,9%iger, körperwarmer NaCl-Lösung. Nach Darstellung des Colon descendes und Colon sigmoideums mit Übergang ins Rektum und minimaler Skelettierung des entsprechenden Darmabschnittes, erfolgte zunächst die einfache Transsektion circa zwei Zentimeter distal der Flexura Coli sinistra zur Anfertigung der „oberen“ Anastomose. Kotballen unmittelbar im Transsektionsbereich wurden vorsichtig mit Wattestäbchen nach Außen befördert und entfernt. Ein Anschneiden der blutversorgenden Gefässarkaden im Bereich der A. mesenterica inferior konnte weitgehendst vermieden werden. Die Blutstillung mittels Elektrokauter (Minicutter® S, Firma Hüttinger) war deshalb in der Regel nicht nötig. Anschließend wurden die so entstandenen Darmenden in einem ersten Schritt durch zwei gegenüberliegende, allschichtig gestochene Einzelknopfnähte adaptiert. Durch leichten Zug an diesen Fäden wurde der Darm angespannt und die zu anastomosierenden Darmanteile für die Anastomosennaht ideal positioniert. In Knotenabständen von etwa zwei Millimetern wurde dann die hintere Anastomosennahtreihe unter 10-15 facher Vergrößerung des Operationssitus in modifizierter, allschichtig gestochener Einzelknopfnahrttechnik nach Gambee angelegt (Mikroskop: Leitz Wild, Typ M 650, Herbruggen, Schweiz). Von extraluminal eingestochen wurde darauf geachtet, dass nur der äußere Rand der Mucosa miterfasst wurde, um das Auftreten von sog. „Mucosalippen“ zu vermeiden.



**Abb. 3.2.3.a:** Anastomosen-Einzelknopfnäht in modifizierter Gambee-Technik.



**Abb. 3.2.3.b:** Foto: Intraoperativer Situs während einfacher Anastomosierung mit vollständiger vorderer Nahtreihe einer „unteren“ Anastomose. 6 fache Vergrößerung. Mikroskop Leitz Wild.



**Abb. 3.2.3.c:** Foto: Intraoperativer Situs eines frischoperierten Tieres nach zweifacher Colonanastomosierung. 6 fache Vergrößerung. Mikroskop Leitz Wild.

Die Knoten kamen abwechselnd oberhalb und unterhalb der Nahtlinie zu liegen. Nach Komplettierung auch der vorderen Nahtreihe präsentierte sich eine vollständige Anastomose aus 10 Einzelknopfnähten (siehe Abb. 3.2.3.c). In gleicher Weise erfolgte die Anfertigung der zweiten, „unteren“ Anastomose am Übergang Colon sigmoideum zum Rektum unter Schonung aller Aa. rectae.

Aufgrund der engen anatomischen Lagebeziehungen zu Harnblase und Samenrüsen gestaltete sich die Anfertigung der „unteren“ Anastomose verhältnismäßig schwieriger. Dies zeichnete sie als „Risikoanastomose“ aus und begründete postoperative Komplikationen.

Abschließend erfolgte die Kontrolle des Abdomens auf Bluttrockenheit durch wiederholte Spülung mit 0,9% iger, zimmerwarmer, Kochsalzlösung.

Die Bauchdecke wurde mit einer fortlaufenden Polypropylennaht (Prolene<sup>®</sup>, Ethicon GmbH&Co.KG, Norderstedt) der Stärke 4/0 USP, die Peritoneum, Faszie und Muskulatur erfaßte, verschlossen. Der Hautverschluss erfolgte ebenfalls fortlaufend mit Prolene<sup>®</sup> der Stärke 5/0 USP.

Postoperativ wurde den Tieren zur Schmerzprophylaxe ein Milliliter 2%iges Tramadol (Tramal<sup>®</sup>, Grünenthal GmbH, Stolberg) in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Zur rascheren Erholung und Anhebung der Körpertemperatur wurden die Tiere postoperativ für die Dauer von einer halben Stunde unter einer UV-Lampe gebettet. Danach und bis zur erneuten Operation wurden die Tiere in Lamina-Airflow-Schränken (Scanbur, Koge, Dänemark) in Makrolon<sup>®</sup>- Käfigen verbracht.

#### 3.2.4 Postoperativer Verlauf und Leckagerate

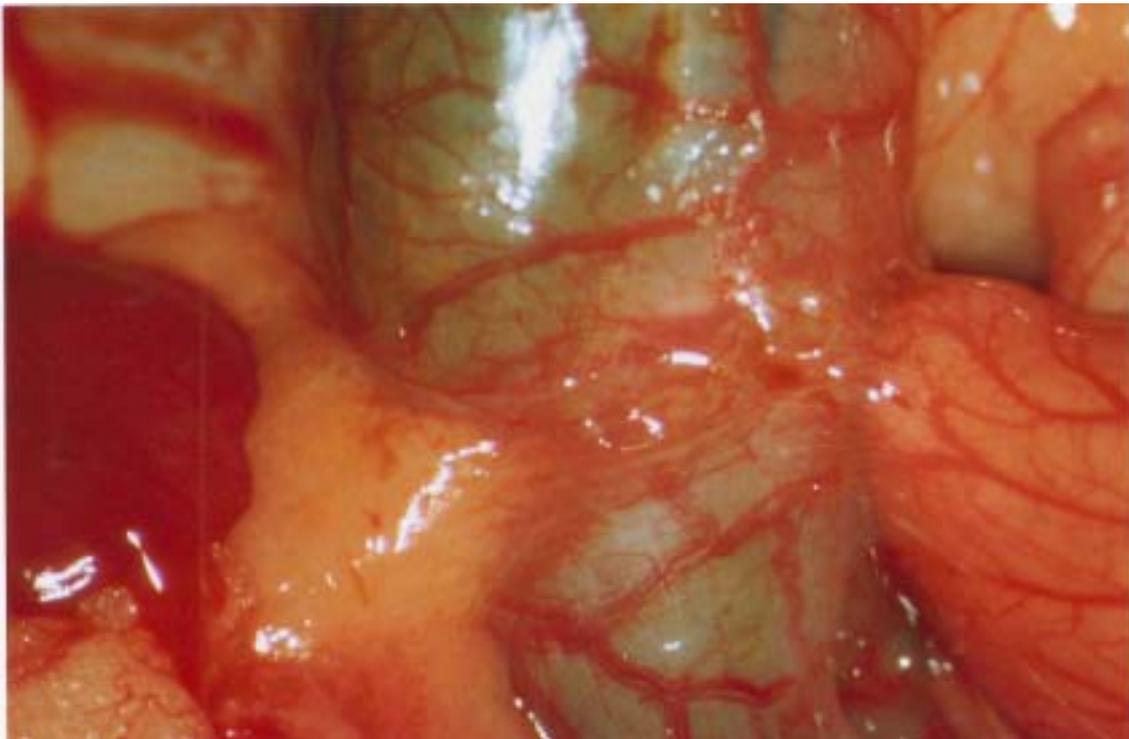
Um frühzeitig Hinweise auf eine intestinale Wundheilungsstörung zu erhalten, wurden die Tiere bis zur Reoperation täglich visitiert und Gewichtsverlauf (Waage: Heraeus<sup>®</sup>, Hanau), Nahrungsaufnahme und der Kotabsatz der Tiere kontrolliert. Auffälligkeiten wurden in einem Beobachtungsbogen protokolliert. Darüberhinaus wurde das Allgemeinbefinden der Tiere anhand des Bewegungsdranges sowie klinischer Symptome wie Schmerzen, aufgetriebenem Abdomen, Schmutzränder um den Augen durch vernachlässigte Hygiene und ein eventueller Harnverhalt kontrolliert.

Zur Beurteilung des Anastomosenbereiches wurde das anastomosentragende Darmsegment am Tag der Reoperation schonend entfernt und auf makroskopisch sichtbare Wundheilungsstörungen, Abszessbildungen und Undichtigkeiten untersucht.

### 3.2.5 Anastomosenentnahme

Zum Zeitpunkt der Reoperation der Tiere erfolgte die erneute Narkotisierung in Narkoseboxen (Firma Büchold, Würzburg) bei einem O<sub>2</sub>-Flow von 2,5 l/min unter einem Forene®-Anteil von 2-3 Vol%.

Nach medianer Laparotomie wurden Dünndarm mit Cäcum außerhalb der Bauchhöhle in Kompressen feucht gelagert. Danach erfolgte die eingehende Inspektion des Bauchraums. Es wurde besonders auf Entzündungszeichen, Stenosen, aufgetriebene Darmschlingen und Bridenbildungen geachtet. Vorhandene Verwachsungen wurden vorsichtig gelöst, wobei auf besonders schonende Präparation der anastomosenträgenden Segmente Wert gelegt wurde. Diese waren durch typische Adhäsionen von Ileum und Omentum majus im Bereich der „oberen“ Anastomose bzw. von pelvinem Fettgewebe und Samenrüsen im Bereich der „unteren“ Anastomose leicht auffindbar.



**Abb. 3.2.5:** Foto: Darstellung des intraoperativen Situs eines nach 14 Tagen reoperierten Tieres. Typische Adhäsionen im Bereich der „oberen“ Anastomose. 16 fache Vergrößerung.

Noch vor Entnahme des anastomosenträgenden Darmstückes wurde die kapilläre Perfusion im Anastomosenbereich mittels Laserflowmetrie, wie unter 3.3.2 beschrieben, gemessen.

Anschließend erfolgte die Entnahme eines Colonssegmentes unter Transsektion, zunächst möglichst tief im kleinen Becken unter Mitnahme der „unteren“ Anastomose und zum zweiten im Bereich der Flexura coli sinistra unter Mitnahme der „oberen“ Anastomose. Das so erhaltene, circa 5 cm lange, zweifach anastomosierte Darmsegment, wurde umgehend wie unter 3.2.6 beschrieben, für physikalische und zytokinetische Messungen verwertet.

In fünf weiteren Operationsgängen wurden Kontrolltiere ebenfalls median laparotomiert und nach Präparation jeweils zwei ca. 2,5 cm lange Darmsegmente im Bereich Colon descendens und sigmoideum, für die physikalischen und zytokinetischen Referenzmessungen, entnommen. Die Tötung der Tiere erfolgte unter Narkose durch Eröffnung der Thoraxhöhle mittels eines einfachen Herzschnittes und kontrolliertem Ausbluten, bis keinerlei Pulsschlag mehr zu beobachten war. Etwa eine halbe Stunde später wurde der Kadaver entsorgt.

### 3.2.6 Anastomosenaufbereitung

Nach erneuter Transsektion des entnommenen Darmstückes wurde stets die ehemals „obere“ Anastomose für die Zugfestigkeitsmessung am Instron-Tensiometer (siehe 3.3.3) verwendet.

Mit der ehemals „unteren“ Anastomose erfolgte die Bestimmung des Berstungsdruckes und der Berstunglokalisation sowie nach Möglichkeit eine zweite Zugfestigkeitsmessung in den Gruppen der nach 3, 7 und 14 Tagen operierten Tiere wie unter 3.3.4 und 3.3.5 beschrieben. So war in den einzelnen Gruppen eine für die Statistik ausreichende Datenerfassung möglich.

Anschließend wurde etwa die Hälfte der „unteren“ Anastomose (100-200 mg) für spätere zytokinetischen Bestimmungen vorbehandelt. In gleicher Weise wurde auch mit dem Darmgewebe der fünf Kontrolltiere verfahren. Dazu wurde das Anastomosienstück in ein mit 1000 µl vorbereiteten Lysispuffer, zusammengesetzt aus 50 mM Hepes (Pufferan®, Firma Carl Roth, Karlsruhe), 0,1 mM EDTA-Puffer (Firma Carl Roth, Karlsruhe), 1% Triton (Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim), 150 mosm NaCl sowie 1 Tabl. Proteinaseinhibitor pro 10 ml Lysispuffer (Complite™, Mini; Boeringer, Mannheim) gefüllten Eppendorf®-Cap gebracht und bei -20 °C eingefroren. Unter dieser Pufferung sollte ein vorzeitiger Abbau der Proteine zum Zweck der späteren Bestimmung verhindert werden. Um auch das Herauslösen intrazellulärer Proteine zu

erreichen, wurden die Proben im Eppendorf®-Cap noch einer zwei minütigen Ultraschallzertrümmerung bei einer Frequenz von 360 MHz (Ultraschallzertrümmerer, Labsonic® U, Firma B. Braun) und einem Impulstakt von 0,9/sec unterzogen. Nach Abzentrifugieren (5 min bei 14.000 U/min, Centrifuge® 5415C, Firma Eppendorf) wurden 750 µl des Überstandes in 2000 µl Eppendorf®-Caps pipettiert und mit 750 µl Lysispuffer verdünnt. Die so entstandenen 1500 µl verdünntem Anastomosenextrakt wurden zu gleichen Teilen für die Bestimmung des TGF β1, Rantes, IL-10 und Protein-Gehaltes in drei weitere Caps verteilt. Bis zur endgültigen Bestimmung erfolgte die Verwahrung wiederum bei -20 °C im Eisschrank.

Die übriggebliebene Anastomosenhälfte wurde geviertelt. Der eine Teil wurde nach Formalinfixation (Formaldehyd 3,5%ig; Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken) in einen Paraffin-Block gegossen und aus diesem am Schneidegerät (Histoslides® 2000 R, Jung; Leica, Nussloch) ein Mikrometer dicke Schnitte angefertigt. Zur Beurteilung der Histomorphologie wurden in Standardtechnik Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbungen durchgeführt. Die histologische Auswertung unter dem Aspekt der Entzündungsreaktion im Anastomosenbereich erfolgte gemäss Punkt 3.3.6.

Der andere Teil des Anastomosenviertels wurde für nicht im Rahmen dieser Arbeit stattfindende immunhistochemische Untersuchungen in zylindrischen Eppendorf®-Behältern in Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holland) eingebettet und für zehn Minuten in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte anschließend im Gefrierschrank bei -80 °C.

### 3.2.7 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation des abdominalen Situs bei Anastomosenanfertigung und am Tag der Reoperation erfolgte durch eine Kamera Typ Nikon FE2 mit Zoomobjektiv 35-70 mm unter künstlichem Mikroskoplicht. Als Film wurde ein Kodak-Ektachrom 100 verwendet.

Zur Dokumentation des Instron-Tensiometers als auch der Berstungsdruckmessvorrichtung wurde eine Kamera des Typs Minolta Dynax 700 Si verwendet. Als Film diente hier der Fuji S-100.

Histologische Präparate wurden mit dem Olympus Fotomikrographic-System (Modell PM-10AD) am Mikroskop Olympus BH-2 mit einem Fufichrome 64T-Film fotografiert.

### 3.3 Experimentelle Untersuchungen: Physikalische Studien und Histologie

#### 3.3.1 Untersuchungsmaterial

Die Darmanastomosen der nach 3.2.3 operierten Population von 100 Tieren sowie der unbehandelte Darm der 5 Referenztiere wurden im Anschluss entweder unmittelbar postoperativ (Tag 0), oder zum gegebenen Reoperationszeitpunkt (Tag 3, 7, 14, 30 und 90) nach den nun folgenden Verfahren untersucht. Tag 1 entspricht dabei dem auf die Primäroperation folgenden Tag.

#### 3.3.2 Laserflowmetrie

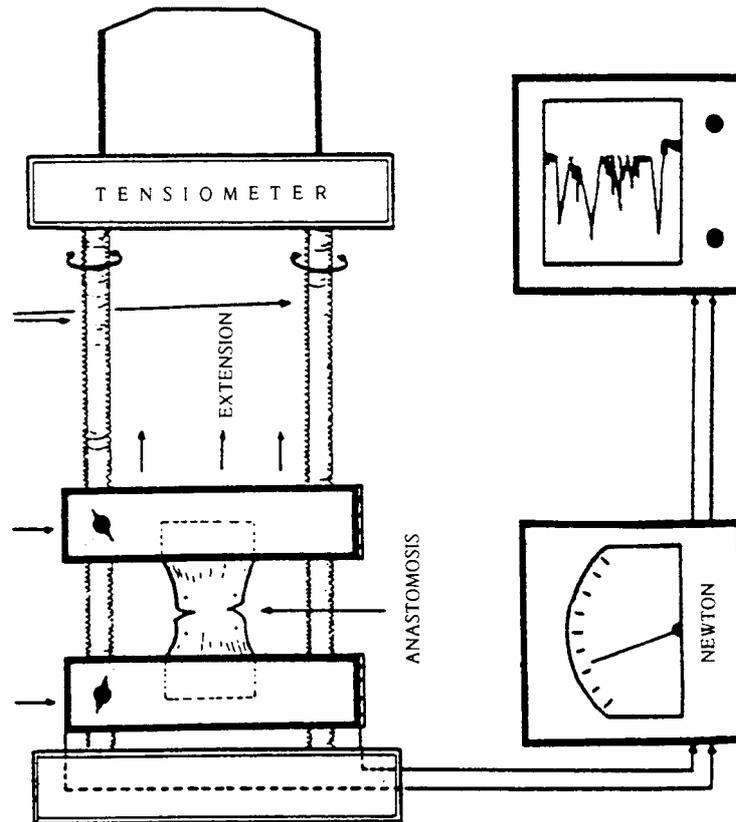
Um eine Aussage zur Anastomosenperfusion unmittelbar postoperativ (Gruppe der am Tag 0 operierten Tiere) bzw. zum Zeitpunkt der Reoperation (Gruppe der am Tag 3, 7, 14, 30 und 90 reoperierten Tiere) zu erhalten, wurde die kapilläre Durchblutung der Anastomosenregion mittels Laserflowmetrie untersucht. Mit dieser Methode ist eine nicht-invasive Echtzeit-Messung der kapillären Perfusion möglich. Sie beruht auf einer Doppler-Frequenzverschiebung von etwa 3,3 kHz des ausgestrahlten Laserlichtes (780 nm), die durch Anzahl und Geschwindigkeit korpuskulärer Anteile des strömenden Blutes verursacht und in der Einheit Flux gemessen wird (Shephard und Öberg 1990). Amplitude und Frequenz des Dopplershiftes werden neben der Geschwindigkeit und Anzahl der korpuskulären Anteile auch von Körpertemperatur und Blutdruck beeinflusst. Bei der Laserflowmetrie werden aufgrund der relativ hohen inter- und intraindividuellen Schwankungsbreite der einzelnen Messwerte von 25-50% keine absoluten Werte, sondern relative Werte gemessen (Agner und Serup 1990, Tenland et al. 1983). Die Messwerte müssen somit auf einen Referenzwert bezogen werden, der in dem untersuchten Tiermodell das unpräparierte Colon darstellte und 100% entsprach. Die übrigen Messwerte wurden auf die Referenzmessung bezogen und ebenfalls in Prozent ausgedrückt. Die Messtiefe ist nicht identisch mit der Eindringtiefe des Lichtstrahles. Sie ist abhängig vom untersuchten Gewebsareal und ist teilweise erheblichen Schwankungen unterworfen. In der Regel liegt die Messtiefe zwischen 0,6 bis 1,5 mm in der Haut, kann aber bis zu 3 mm in der Darmwand betragen (Jakobsson und Nielsson 1993, Kashiwagi 1993, Johansson et al. 1991).

Nach schonender Lösung vorhandener Verwachsungen (besonders bei den am Tag 7, 14 und 30 reoperierten Tiere) wurde der Sondenmesskopf mit seinem Eigengewicht zunächst direkt auf den oberen Anastomosenspalt unmittelbar antimesenterial gelegt. Es wurde solange gewartet, bis auf dem Monitor eine pulssynchron fluktuierende Laserflow-Kurve zu sehen war. Der jetzt registrierte Fluxwert wurde als Messwert dokumentiert. Zwei weitere Messungen erfolgten jeweils einen Zentimeter oberhalb und einen Zentimeter unterhalb des Anastomosenspaltes. In gleicher Weise wurde der Flux im Bereich der unteren Anastomose gemessen und dokumentiert. Als Referenzwert wurde die Sonde das unpräparierte Colon aufgelegt. Im Dreisatzverfahren wurden die Fluxwerte anschließend zu Prozentwerten, bezogen auf das unpräparierte Colon transversum (100%), umgerechnet. Im Folgenden wird das Wort Flux synonym für den intestinalen Blutfluss verwendet. Für die Untersuchungen wurde ein Moore DRT 4 Laser Doppler Flowmeter verwendet (Moor Instruments®, Wilmington, Del., USA; Vertrieb: Medizin-Elektronik Fred Lawrenz, Sulzbach). Dieses benutzt die Laserstrahlung einer Halbleiterlaserdiode, die mit einer Wellenlänge von 780 nm und einer maximal nutzbaren Leistung von 3 mW betrieben wird.

### 3.3.3 Zugfestigkeit

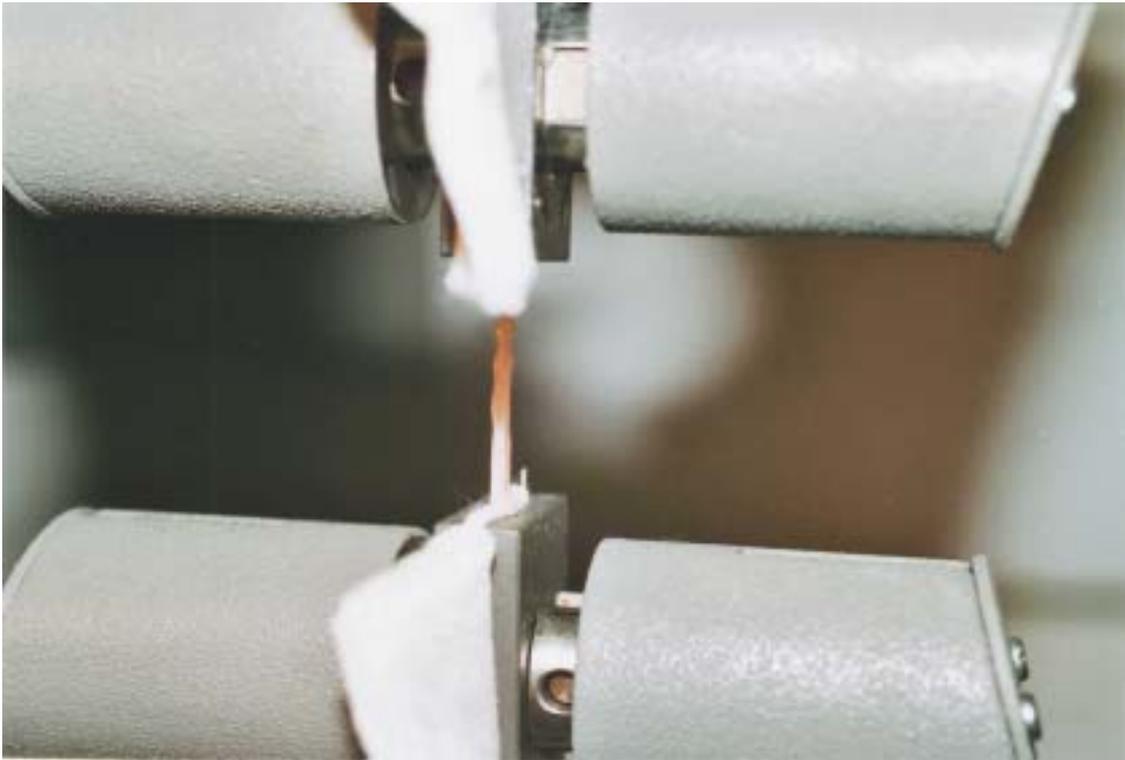
Sie stellt die Kraft in Newton dar, die notwendig war, um in diesem Fall das anastomosierte proximale Darmstück zu zerreißen. Zur Ermittlung der Messwerte wurde ein computergesteuertes Tensiometer der Marke Instron® 4502 (Instron Wolpert GmbH, Ludwigshafen) verwendet (siehe Abb. 3.3.3).

Die gemessenen Daten wurden auf einen PC übertragen, der die Auswertung vornahm. Angegeben wurde dabei sowohl die Maximalkraft in Newton als auch die Kraft bei erfolgtem Gewebebruch. Da aufgrund des Messverfahrens beide Werte sich nur gering oder gar nicht unterschieden, wird im weiteren von der Maximalkraft als Reißkraft ausgegangen.



**Abb. 3.3.3.a:** Schematische Darstellung des Tensiometers mit linksseitiger Zug- und rechtsseitiger Messvorrichtung.

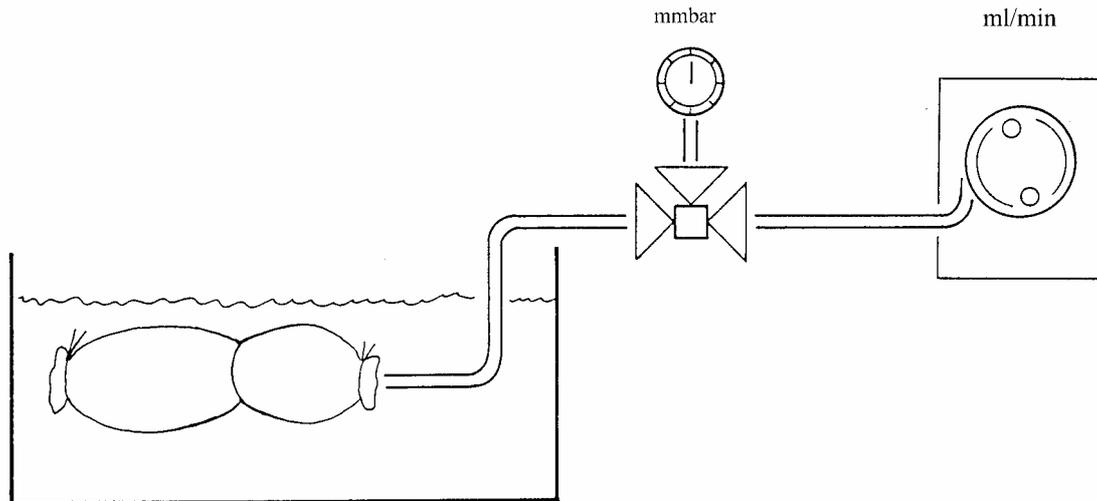
Zusätzlich wurde die Lokalisation des Gewebebruchs (innerhalb oder außerhalb des Anastomosenspaltes) notiert. Bei einem Klemmbackenabstand von einem Zentimeter wurden die beiden Enden des zur Messung verwendeten oberen Darmstückes (durchschnittliche Länge etwa drei Zentimeter), mit Kompressen rutschfest fixiert und in die Vorrichtung pneumatisch eingespannt. Die Anastomosennahtreihe kam dabei mittig zu liegen. Unter einem kontinuierlichen Zug von 20 mm/min bewegten sich nach Startgabe die Klemmbacken auseinander und bewirkten nach durchschnittlich 30 Sekunden den Gewebebruch. Die Raumtemperatur betrug 25 °C und die Luftfeuchtigkeit 60%. Die gemessenen Daten konnten zur Dokumentation ausgedruckt werden.



**Abb. 3.3.3.b:** Foto: Entnommenes Darmpräparat, in die Zugvorrichtung des Tensiometers eingespannt mit oberer und unterer Klemmbacke. Es wird die Maximalkraft in N bei Gewebebruch registriert. Zuggeschwindigkeit: 20 mm/min.

### 3.3.4 Berstungsdruck

Das zur Messung verwendete untere Darmstück wurde nach mechanischer Säuberung zunächst am unteren Ende mit einer Klemme verschlossen. In das obere Ende wurde der zuführende Schlauch einer Rollerpumpe (Typ 101 U/R; Watson-Marlow Pumps, Falmouth, England) eingeknotet. Das gesamte Präparat wurde dann in ein Wasserbad getaucht. Über die angeschlossene Rollerpumpe wurde nun kontinuierlich Luft in den verschlossenen Darm insuffliert, so dass sich der intraluminale Druck bis zur Organberstung stetig aufbaute. Der Zeitpunkt der Darmruptur war nach durchschnittlich 30 Sekunden durch das Aufsteigen von Luftbläschen im Wasserbad sichtbar. Der Berstungsdruck wurde mittels eines Druck-Handmessgerätes (Typ GMH3110, Greisinger Electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland) in mmbar registriert und notiert.



**Abb. 3.3.4:** Im Wasserbad eingelegtes Darmpräparat. Der zuführende Schlauch der Rollerpumpe ist im proximalen Darmende eingeknotet, das distale Darmende wurde mit einer Klemme luftdicht verschlossen.

Der Durchmesser des Darmlumens zur Bestimmung des Innenradius am Ort der Ruptur wurde nach längsseitiger Eröffnung des Darmstücks mit einem millimetergenauen Lineal horizontal ausgemessen. Nach dem Laplaceschen Gesetz wurde schließlich die tangentielle Wandspannung  $T$  [ $\text{N}/\text{m}^2$ ] aus dem jeweiligen Berstungsdruck  $p$  [ $\text{Pa}$ ], der konstant mit  $0,1$  cm angenommenen Wandstärke  $h$  und dem jeweiligen Innenradius  $r$  [ $\text{cm}$ ] zum Zeitpunkt der Organberstung nach folgender Formel berechnet:

$$T \text{ [N/m}^2\text{]} = p \text{ [Pa]} \cdot r \text{ [cm]} / h \text{ [cm]}$$

### 3.3.5 Berstungslokalisation

Um die mechanische Belastbarkeit der Anastomosen mit der Belastbarkeit der umliegenden gesunden Darmwand zu vergleichen, wurde die Lokalisation des Darmwandbruches, jeweils getrennt für die Berstungs- und Zugmessversuche, dokumentiert.

Hierzu wurde bei jedem Tier festgestellt, ob die Berstung im Anastomosenspalt oder außerhalb der Anastomose erfolgt war, jedoch ohne Berücksichtigung des möglichen Auftretens im proximalen oder distalen Anastomosenschenkel. Auf diese Weise war es möglich, die Entwicklung der mechanischen Belastbarkeit der Anastomosenregion zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten mit der physiologischen Festigkeit der umgebenden Darmanteile im postoperativen Verlauf zu beurteilen.

### 3.3.6 Histologie

Die Bestimmung der lokalen Entzündungsreaktion im Anastomosenbereich erfolgte in Anlehnung an Deveney und Way (1977) und Riddick et al. (1977). Es erfolgte die Auszählung der Entzündungszellzahl pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung (Mikroskop Will Wilomed®, Firma Hund, Wetzlar), wobei neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Lymphozyten und mononukleäre Zellen berücksichtigt wurden. Als Ausschnitt wurde ein Bereich der submukösen Wandschicht unmittelbar am Anastomosenrand mittels eines im Okular (Carl Zeiss®, Kpl 8x) vorhandenen Rasters (Ausschnitt 0,09 mm<sup>2</sup>) ausgelesen. Pro Präparat wurden drei Gesichtsfelder im Anastomosenbereich ausgezählt und ein Mittelwert daraus gebildet. Auf diese Weise war eine semiquantitative Bestimmung der Entzündungsreaktion möglich.

## 3.4 Experimentelle Untersuchungen: Zytokinetische Studien

### 3.4.1 Untersuchungsmaterial

Im Rahmen der nun folgenden laborchemischen Analysen wurde das in Lysispuffer gehaltene Anastomosenresektat von jeweils 12 operierten Tieren der einzelnen Gruppen sowie das Darmgewebe von fünf nichtoperierten Kontrolltieren hinsichtlich der Zytokinetik (TGF  $\beta$ 1, Rantes, IL-10), als auch des Proteingehaltes, untersucht. Die Experimente fanden im Sepsislabor der Experimentellen Chirurgie sowie in den Laboratorien von Prof. Vollmers, Pathologisches Institut in Würzburg statt.

**Tab.3.4.1:** Anzahl der pro Untersuchungszeitpunkt für laborchemische Analysen verwendeten Gewebeproben unter Berücksichtigung des jeweils verwendeten Nahtmaterials.

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90	Gesamt
Monocryl®	5	3	3	3	6	2	22
Monosyn®	5	3	3	3	/	4	18
Biosyn®	1	3	3	3	/	4	14
Maxon®	1	3	3	3	6	2	18
Kontrolle	5	/	/	/	/	/	5
Gesamt	17	12	12	12	12	12	77

### 3.4.2 Untersuchungsmethoden

Im zweiten Teil der experimentellen Untersuchungen sollten laborchemische Analysen Aufschluss über das Zytokinmuster im Wundheilungsverlauf nach Anastomosierung am Colon der Wistar ratte unabhängig vom verwendeten Nahtmaterial liefern. Im Einzelnen wurden die Faktoren TGF  $\beta$ 1, Rantes und IL-10 betrachtet. Dazu war es notwendig zum einen die Zytokinkonzentration in 500  $\mu$ l des Anastomosenextraktes, als auch deren Gesamtproteinkonzentration zu bestimmen. Im Anschluss daran konnte der Zytokingehalt als Anteil des Gesamtproteingehalts dargestellt und im Zeitverlauf evaluiert werden.

Die Bestimmung der Zytokine erfolgte mittels ELISA-Technik, bei dem die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten spezifischen Antikörper an eine Trägersubstanz (z.B. Zellulose, Polystyrol) gebunden vorliegen. An die nach Inkubation mit der Probe gebildeten Immunkomplexe lagern sich in einem nachfolgenden Schritt zugefügte Enzym-markierte Anti-Antikörper an (sog. Sandwichmethode). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht bzw. die Antigenkonzentration in der Probe über eine photometrische Bestimmung der Immunkomplexgebundenen Markerenzyme durch Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt werden (Pschyrembel, 1994).

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels eines Proteinassays. Grundlage ist die photometrische Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration durch unterschiedlich starken Farbumschlag eines Chromogens nach Bindung an Proteine im Vergleich zu einer Standardreihe bekannter Proteinkonzentration. Der Test wurde zur Messung am ELISA-Reader adaptiert. Es wurden 96-Well Mikrotiter-Platten (Nunc-Immuno Plate, InterMed, Dänemark) verwendet.

### 3.4.3 TGF $\beta$ 1-ELISA

Die Konzentration [pg/ml] an Transforming growth factor beta1 (TGF  $\beta$ 1) wurde mit käuflichen humanen TGF  $\beta$ 1-Elisa Kits (Medgenix TGF  $\beta$ 1 Elisa kit, N° KAC1681; BioSource, Belgien) bestimmt. Es handelte sich um einen kompetitiven Elisa. Alle verwendeten Chemikalien außer Aqua ad iniectabilia (Delta Pharma, Boehringer,

Ingelheim) waren im Lieferumfang enthalten und werden im Folgenden als darin enthalten gekennzeichnet (Set).

Vorgehen:

- Zur Erstellung der Standardkurve wurde aus einem TGF  $\beta$ 1-Antigen-Standard (TGF  $\beta$ 1-Antigen aus humanen Blutplättchen in Säurepuffer; Set) mit Pufferlösung (Set) eine Verdünnungsreihe angelegt. Die einzelnen Stufen betragen 1000, 200, 40, 8 und 0 pg/ml.
- Eine Kontrolllösung (Set) sorgte für die Validität der gefundenen Werte.
- Um auch das L-TGF  $\beta$ 1 (latent TGF  $\beta$ 1) aus seiner Komplexbindung zu lösen, mussten die 500  $\mu$ l Anastomosenextrakt vor Versuchsbeginn mit 50  $\mu$ l Extraktionslösung (Set) und einer 10 minütigen Inkubation unter kontinuierlichem Schütteln bei 1000 rpm (Rotamax 20, Firma Heidolph) vorbehandelt werden.
- Im ersten Schritt wurde eine anti-TGF  $\beta$ 1-Antikörper-beschichte-96-Well Mikrotiterplatte mit 100  $\mu$ l Antigen (TGF  $\beta$ 1 der verdünnten Proben, Kontrolle und Standards) unter Zusatz von 50  $\mu$ l TGF  $\beta$ 1-HRP-Konjugat (Horseradish Peroxidase) zwei Stunden bei Raumtemperatur und 700 rpm (Schüttler MTS 4; Firma IKA) inkubiert. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Dabei konkurrieren freies TGF  $\beta$ 1 (Proben, Standard, Kontrolle) und an HRP-gebundenes TGF  $\beta$ 1 um eine begrenzte Anzahl von Bindungsplätzen auf der Platte. Abzüglich der 5 Standards und der einen Kontrolle konnten 42 Anastomosenproben in Doppelbestimmung gleichzeitig verarbeitet werden.
- Nach Auswaschen (Multireagenz-Waschgerät, Firma Dynatech) und Abklopfen nicht-gebundenen Antigens erfolgte im zweiten Schritt eine 30 minütige Inkubation mit 100  $\mu$ l Chromogen TMB (Tetramethylbenzidin) bei Raumtemperatur, im Dunkeln und 700 rpm. Dieses wurde von der bereits gebundenen Peroxidase in einer Farbreaktion (Blaufärbung) umgesetzt.
- 100  $\mu$ l zugesetzte Stopplösung (3,65%ig Hydrochloric Acid) beendeten den ELISA (Farbumschlag nach Gelb).
- Der Mikrowellplattenreader (Typ THERMOmax, Firma Molecular Device) bestimmte anschließend photometrisch die TGF  $\beta$ 1-Konzentration (pg/ml) der Proben (unter Berücksichtigung der 2,1 fachen Verdünnung) in einer Endpunkt-Messung mit zwei Wellenlängen (450 nm gegen 650 nm). Dabei wurde das Programm Softmax der Firma Mikrotek Laborsysteme GmbH verwendet,

welches neben den Messergebnissen auch Standardabweichung und Mittelwert darzustellen vermochte. Die gemessene optische Dichte verhielt sich dabei indirekt proportional zu den TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen der Proben. Der absolute Gehalt in 100  $\mu$ l Probe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$m \text{ (pg)} = c \text{ (pg/ml)} \cdot v \text{ (ml)}.$$

#### 3.4.4 Rantes - ELISA

Die Konzentration [pg/ml] an Rantes (Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) wurde mit einem käuflichen murinen Elisa Kit (Rat Rantes Cytoscreen™ Immunassay kit, N° KRC 1031, Firma Biosource, Belgien) bestimmt. Es handelte sich um einen nicht-kompetitiven ELISA. Alle verwendeten Chemikalien außer Aqua ad iniectabilia waren im Set enthalten und werden im Folgenden als darin enthalten gekennzeichnet (Set).

Vorgehen:

- Zur Erstellung der Standardreihe wurde aus einem Rantes-Antigen-Standard (rekombinantes raRANTES; Set) mit Pufferlösung (15 mM Sodim Azid; Set) eine Verdünnungsreihe zu 2500, 1250, 625, 312, 156, 78.1, 39.0 und 0 pg/ml angelegt.
- Als Kontrolle diente eine willkürlich zusätzlich angefertigte Verdünnung.
- Im ersten Schritt wurde eine Anti-raRANTES-Antikörper-beschichte-96-Well Mikrotiterplatte mit 100  $\mu$ l Antigenstandard bzw. 50  $\mu$ l der Antigenproben (mit 50  $\mu$ l Pufferlösung 1:1 verdünnt) zwei Stunden bei Raumtemperatur und 700 rpm (Schüttler MTS 4; Firma IKA) inkubiert. Dabei konnte alles in Probe, Kontrolle und Standard enthaltene RANTES an den Antikörper der Trägersubstanz binden. Ein Well blieb stets leer als BLANKwert für die photometrische Referenzmessung. Dieser BLANKwert wurde später bei der Messung automatisch von der Absorption der Proben abgezogen, um nur die Absorption des untersuchten Stoffes zu erhalten. Abzüglich der 8 Standards, der einen Kontrolle und des BLANKs konnten 38 Proben in Doppelbestimmung gleichzeitig verarbeitet werden.
- Nach Auswaschen (Multireagenz-Waschgerät, Firma Dynatech) und trockenem Abklopfen nicht-gebundenen Antigens erfolgte im zweiten Schritt eine

einstündige Inkubation bei 37 °C mit 100 µl Biotin-Konjugat, welches sich an das gebundene RANTES anlagern sollte.

- Im dritten Schritt wurde, nach wiederholtem Auswaschen und Abklopfen der Platte, 100 µl Enzym (Streptavidin-Peroxidase, 100fach konzentriert) jedem Well zugegeben, welches als vierter Baustein an das Biotin-Konjugat binden sollte. Es wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Im vierten Schritt wurde 100 µl Chromogen (Tetramethylbenzidin) zugegeben (einschließlich des BLANKs) und weiter 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Blaufärbung zeigte die stattfindende Farbreaktion an.
- 100 µl zugesetzte Stopplösung (3,65%ig Hydrochloric Acid) beendeten den ELISA (Farbumschlag nach Gelb).
- Der Mikrowellplattenreader (Typ THERMOmax, Firma Molecular Device) bestimmte anschließend photometrisch die raRANTES-Konzentration (pg/ml) der Proben (unter Berücksichtigung der zweifachen Verdünnung) in einer Endpunkt-Messung mit der Wellenlänge 450 nm. Der Wert des BLANKs wurde dabei als Referenz genommen und von den gemessenen optischen Dichten abgezogen. Dabei wurde wiederum das Programm Softmax der Firma Mikrotek Laborsysteme GmbH verwendet. Die gemessene optische Dichte verhielt sich dabei direkt proportional zu den raRANTES-Konzentrationen der Proben. Der absolute Gehalt in 50 µl Probe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$m \text{ (pg)} = c \text{ (pg/ml)} \cdot v \text{ (ml)}.$$

#### 3.4.5 IL-10-ELISA

Die Konzentration [pg/ml] an IL-10 (Interleukin 10) wurde mit einem käuflichen murinen Elisa Kit (Rat IL-10 Cytoscreen™ Immunassay kit, N° KRC 0100; Firma Biosource, Belgien) bestimmt. Es handelte sich ebenfalls um einen nicht-kompetitive ELISA. Alle verwendeten Chemikalien außer Aqua ad iniectabilia waren im Set enthalten. Das Vorgehen einschließlich der verwendeten Chemikalien entsprach dem unter 3.4.3 beschriebenen. Dabei wurde eine Standardreihe mit den Verdünnungsstufen 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 und 0 pg/ml aufgestellt. Bereits im ersten Inkubationsschritt wurde das Konjugat zugegeben. Es war wiederum die gleichzeitige Doppelbestimmung von 38 Proben möglich. Der absolute Gehalt in 50 µl Probe wurde wiederum nach der Formel  $m \text{ (pg)} = c \text{ (pg/ml)} \cdot v \text{ (ml)}$  berechnet.

### 3.4.6 Protein-Assay

Nach experimenteller Ermittlung der Zytokinkonzentrationen (TGF  $\beta$ 1, Rantes und IL-10) in 500  $\mu$ l Anastomosenextrakt wurden nun in einem zweiten Schritt die Gesamtproteinkonzentrationen derselben Proben zur Berechnung des jeweiligen Zytokingehaltes bestimmt.

Für diesen Zweck wurde ein Proteinassay der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) verwendet. Dieser beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum des sauren Coomassie Brilliant Blau (G-250, N° 5000007) Farbstoffs von 495 nm nach 595 nm nach Bindung an Proteine ändert. Aus dem mitgelieferten Proteinstandard Rinderplasmaalbumin ( $c=1380 \mu\text{g/ml}$ , N°5000006) wurde eine Standardreihe mit den Verdünnungsstufen 138, 69, 46, 34.5, 17.3, 8.63, 4.31 und 2.16  $\mu\text{g/ml}$  hergestellt. Anhand dieser Eichgerade konnte nach 60facher Verdünnung der Anastomosenproben die Gesamtproteinkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) im Mikrowellplattenreader einfach photometrisch bei 650 nm bestimmt werden. Verwendet wurden 96-Well Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Plate; Firma InterMed, Dänemark), wobei in Doppelbestimmung jeweils 100  $\mu$ l Standard bzw. 100  $\mu$ l verdünnte Probe mit 20  $\mu$ l Farbreagenz (G-250) versetzt wurden. Als Referenzwert (BLANK) diente die optische Dichte von 100  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia mit 20  $\mu$ l Farbreagenz. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD (Optical Density) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt. Zur Auswertung wurde wiederum das Programm Softmax verwendet. Der absolute Gehalt in 100  $\mu$ l Probe wurde nach der Formel  $m \text{ (pg)} = c \text{ (pg/ml)} \cdot v \text{ (ml)}$  berechnet.

Um eine direkte Vergleichbarkeit der einzelnen Anastomosenproben bezüglich der gefundenen Zytokinwerte im Zeitverlauf zu ermöglichen, wurde der Mittelwert des Proteingehalts aller Anastomosen als Bezugswert für die Berechnung des jeweiligen Zytokingehalts verwendet (Ergebnisse, Kap. 4.3.1).

### 3.5 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der experimentellen Daten wurde mit dem Wilcoxon Test für nicht-gepaarte Stichproben durchgeführt, wobei zunächst der Kruskal-Wallis-Test (verallgemeinerter Wilcoxon-Test für mehr als zwei Gruppen) jeder Variablen im

Gruppenvergleich angewandt wurde. Bei signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ) wurde anschließend jede Variable mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (Wilcoxon Rank Sum) verglichen, wobei ein p-Wert von  $< 0,05$  als signifikant, ein p-Wert  $< 0,01$  als hochsignifikant galt.

Die Analysen wurden mit Hilfe der Statistik-Software SPSS 10.0 für Windows (Statistical package for social science) durchgeführt.

Bei bis zu 9 Datensätzen pro Gruppe und bei großer Streuung wurde der Medianwert mit dessen Bereich angegeben. Waren die Gruppen größer, wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung (s.d.) angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse aus den Experimentellen Untersuchungen: Operativer Teil

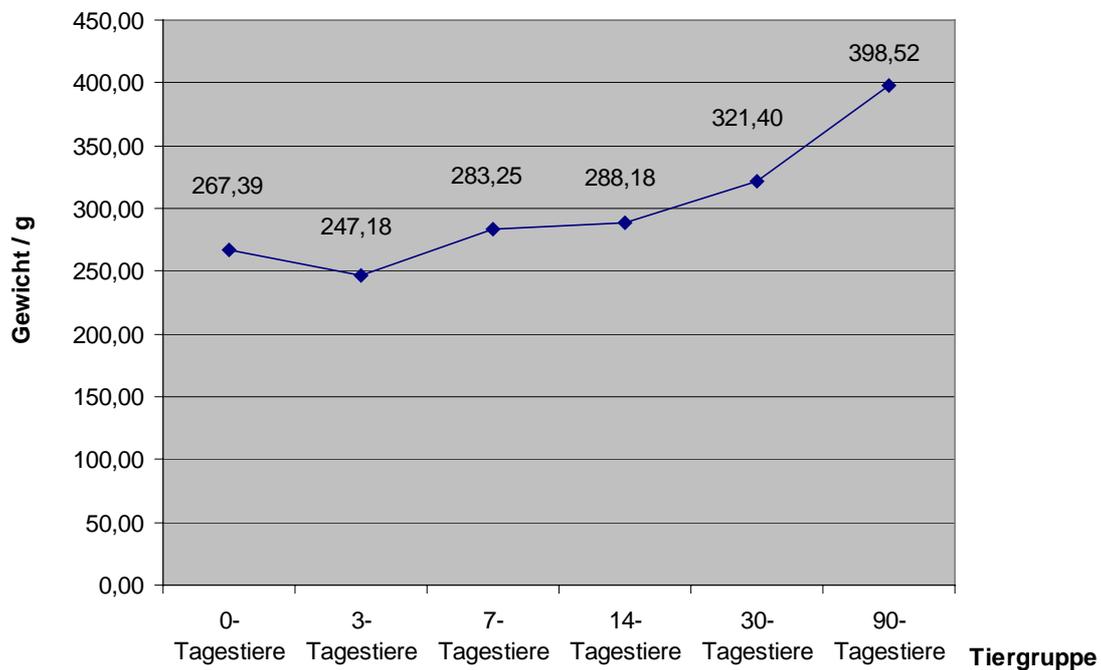
#### 4.1.1 Gewichtsverlauf

Im Rahmen der postoperativen Beobachtung zeigte sich, dass die Tiere nach durchschnittlich einer Woche ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht hatten. Lediglich für 6 der am Tag 7 reoperierten Tiere sowie für alle nach drei Tagen reoperierten Tiere war dies nicht möglich.

**Tab. 4.1.1:** Anzahl der Tiere n, die postoperativ nach durchschnittlich 7 Tagen ihr Ausgangsgewicht wieder erreichen konnten.

Reoperationszeitpunkt	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90
Ausgangsgewicht	Nicht Erreicht	Nach 6 Tagen	Nach 7 Tagen	Nach 7 Tagen	Nach 8 Tagen
Tierzahl n	0 von 12	6 von 12	12 von 12	22 von 22	22 von 22

Bei einem Ausgangsgewicht von durchschnittlich 267 g betrug der Gewichtsverlust innerhalb der ersten drei Tage im Mittel 20 g (7,5% des Körpergewichtes). Nach dieser kritischen Phase folgte im unkomplizierten Fall ein stetiger Gewichtsanstieg, wobei die nach 90 Tagen reoperierten Tiere eine Gewichtszunahme von im Mittel 122 g gegenüber dem Ausgangswert zeigten. Bei einem maximalen Gewicht von 450–460 g (das schwerste Tiere der 90-Tagesgruppe), zeigte sich keine weitere Gewichtszunahme. Demgegenüber betrug die Gewichtszunahme in den übrigen Gruppen etwa 54 g nach 30 Tagen, 21 g nach 14 Tagen und 16 g nach 7 Tagen.



**Abb. 4.1.1:** Postoperativer Gewichtsverlauf: Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 12 operierten Tieren jeder Gruppe.

#### 4.1.2 Postoperativer Verlauf und Leckagerate

Die Tiere mit einer Überlebenszeit von drei und sieben Tagen zeigten einen nur mäßigen Appetit und kaum Kotabsatz. Darüberhinaus war ihr Allgemeinbefinden nicht eingeschränkt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle fielen in allen Fällen diskrete perianastomotische Verwachsungen auf, die leicht zu lösen waren. Der Bereich des operierten Colons zeigte regelmäßig eine Umfangsvermehrung sowie dünnbreiige Faeces, ohne dass dafür pathologische Anhaltspunkte gefunden werden konnten.

Die Tiere mit einer Überlebenszeit von 14 und mehr Tagen zeigten nach Gewichtsnormalisierung einen regelrechten Kotabsatz. Die Verwachsungen präsentierten sich in der Mehrzahl der Fälle als ausgeprägter und schwieriger zu lösen als bei den nach drei und sieben Tagen reoperierten Tieren.

Im Zeitverlauf war ein deutliches Nachlassen des perianastomotischen Verwachsungsgrades auffällig. Besonders die nach 90 Tagen betrachteten Tiere zeigten den nicht-operierten Tieren ähnliche Darmverhältnisse mit geringen oder fehlenden

Verwachsungserscheinungen. Die anastomosenträgenden Darmregionen waren hier makroskopisch nur schwer zu identifizieren.

Jedoch kam es bei sechs Tieren der 90-Tagesgruppe und bei zwei Tieren der 30-Tagesgruppe zu postoperativen Komplikationen, die eine vorzeitige Reoperation und Tötung der Tiere erforderlich machten (Tab. 4.1.2).

**Tab. 4.1.2:** Anzahl n, Reoperationszeitpunkt und Komplikationsart ausgefallener Tiere. O.A. = obere Anastomose, U.A. = untere Anastomose.

Tierzahl n	Reoperationszeitpunkt nach Anastomosenerstellung	Aufgetretene Komplikation	
	2	12 Tage postop.	Ileus U.A.
	2	9 Tage postop.	Ileus U.A.
	1	6 Tage postop.	Ileus U.A.
	2	5 Tage postop.	Ileus U.A.
	1	4 Tage postop.	Insuffizienz O.A.

In sieben Fällen präsentierte sich dabei ein volumenvermehrtes und offensichtlich druckdolentes Abdomen, bei gleichzeitig deutlichem Gewichtsverlust und reduziertem Allgemeinzustand des Tieres. Dieser äußerte sich in herabgesetztem Bewegungsdrang, fehlendem Putzhabitus und mangelndem Appetit. Nach Eröffnen des Bauchraums zeigte sich ein massiv dilatierter Dickdarm, der in allen Fällen auf einen Kotstau vor der unteren Anastomose zurückzuführen war. Ob dieser durch postoperative Bridenbildungen oder einen Operationsfehler bedingt war, ließ sich nicht eindeutig feststellen.

Bei einem weiteren Tier musste aufgrund einer Insuffizienz der oberen Anastomose die Diagnose einer fulminanten Peritonitis gestellt werden.

Insgesamt betrug die Komplikationsrate bei 100 operierten Tieren 8%. Es muss noch bemerkt werden, dass die zu den beiden Langzeitgruppen gehörenden und vorzeitig verendeten Tiere, zu Beginn der Versuchsreihe operiert wurden. Postoperative Komplikationen könnten deshalb auf einem, zu diesem Zeitpunkt, noch mangelndem Operationsgeschick basieren.

## 4.2 Ergebnisse aus den Experimentellen Untersuchungen: Physikalische Studien und Histologie

Vorausschickend muss gesagt werden, dass sich die in den einzelnen Experimenten erscheinenden Tierzahlen von der Gesamtzahl der angefertigten Anastomosen (Tab. 3.2.1) unterscheiden. Ursächlich sind hier Komplikationen während der Auswertung zu nennen, wie etwa starke perianastomotische Verwachsungen mit pelvinem Fettgewebe, oder Samensträngen, die ein Aufsetzen des Laserflowmesskopfes unmöglich machten. Weiterhin kam es bei der Anastomosenentnahme zur akzidentiellen Verletzung von Darmwandabschnitten, so dass sich die Zahl der durchführbaren Zug- und Berstungsdruckmessungen reduzierte. Diese Anastomosen tauchen deshalb in der Auswertung nicht auf und entfallen bei der statistischen Auswertung. Hinsichtlich der Aussagefähigkeit der Experimente wurde jedoch stets auf eine statistisch ausreichende Datenzahl geachtet.

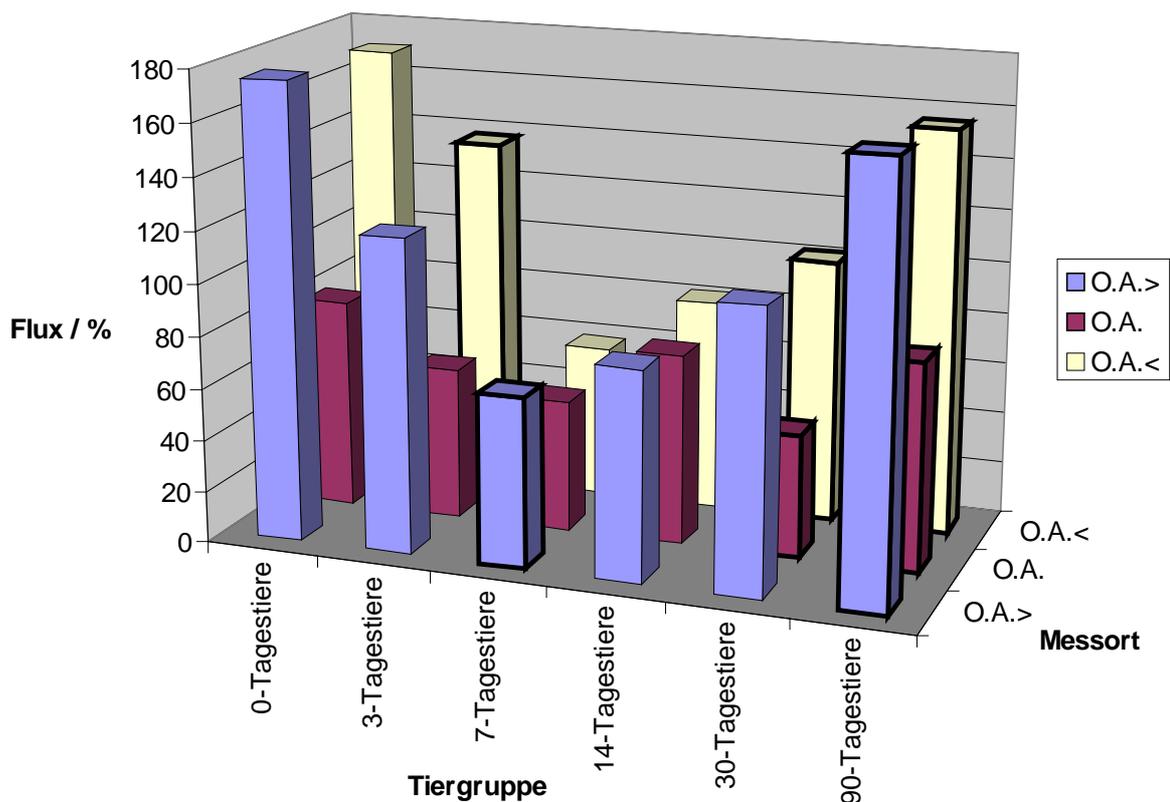
### 4.2.1 Laserflowmetrie

Die Untersuchung des Blutflusses im oberen Darmanastomosenbereich unabhängig vom verwendeten Nahtmaterial mittels Laserflowmetrie ergab bei den 0-, 3- und 7-Tagestiergruppen eine kontinuierliche, nur in zwei Intervallen signifikante Abnahme der mittleren Fluxwerte. Anschließend stiegen die Messwerte über den 14., 30. und 90. Tag wieder kontinuierlich, vom 30. auf den 90. Tag signifikant an.

*Proximal der oberen Anastomose* zeigte sich vom Tag 0 auf Tag 3 eine signifikante Abnahme der Fluxwerte ( $p=0,027$ ) von 175,3% auf 120,7% und ebenso für den Bereich distal der oberen Anastomose vom Tag 3 auf Tag 7 ( $p=0,021$ ) von 137,5% auf 59,1%. Die Werte stiegen anschließend über die 14-, 30- und 90 Tagestiergruppe wieder kontinuierlich bis zum Erreichen des Ausgangsfluxes (Tag 0) an. Es zeigten sich hier signifikante Änderungen der Fluxwerte vom Tag 14 zum Tag 90 sowohl auf der oberen Anastomose als auch proximal davon. Hochsignifikant stellte sich dabei der Anstieg des gemessenen Blutflusses vom 30ten auf den 90ten postoperativen Tag dar ( $p<0,01$ ).

*Auf dem oberen Anastomosenspalt* selbst zeigten sich bis zum Tag 14 keine signifikanten Fluxänderungen gegenüber den Vortagen. Erst vom Tag 14 auf Tag 30 fiel der Blutfluss erst wenig signifikant ( $p=0,047$ ) von 73,2% auf 47,4% ab und stieg anschließend vom Tag 30 auf Tag 90 hochsignifikant auf 80,0% an.

*Distal der oberen Anastomose* zeigte sich vom Tag 3 auf Tag 7 eine signifikant Fluxminderung von 137,5% auf ein Minimum von 59,1%. Danach stiegen die Werte wiederum über die 14-, 30- und 90 Tagestiergruppe kontinuierlich an. Ebenso wie auf der proximalen Messstelle sowie dem oberen Anastomosenspalt war der Anstieg des Fluxes von 101,7% auf 155,8% (Tag 30 auf 90) wiederum in diesem letzten Intervall hochsignifikant (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.1.a im Anhang).



**Abb. 4.2.1.a:** Gemessener Flux auf der oberen Anastomose in Abhängigkeit von der Tiergruppe: Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Tiergruppe. Signifikanzen wurden schwarz umrahmt.

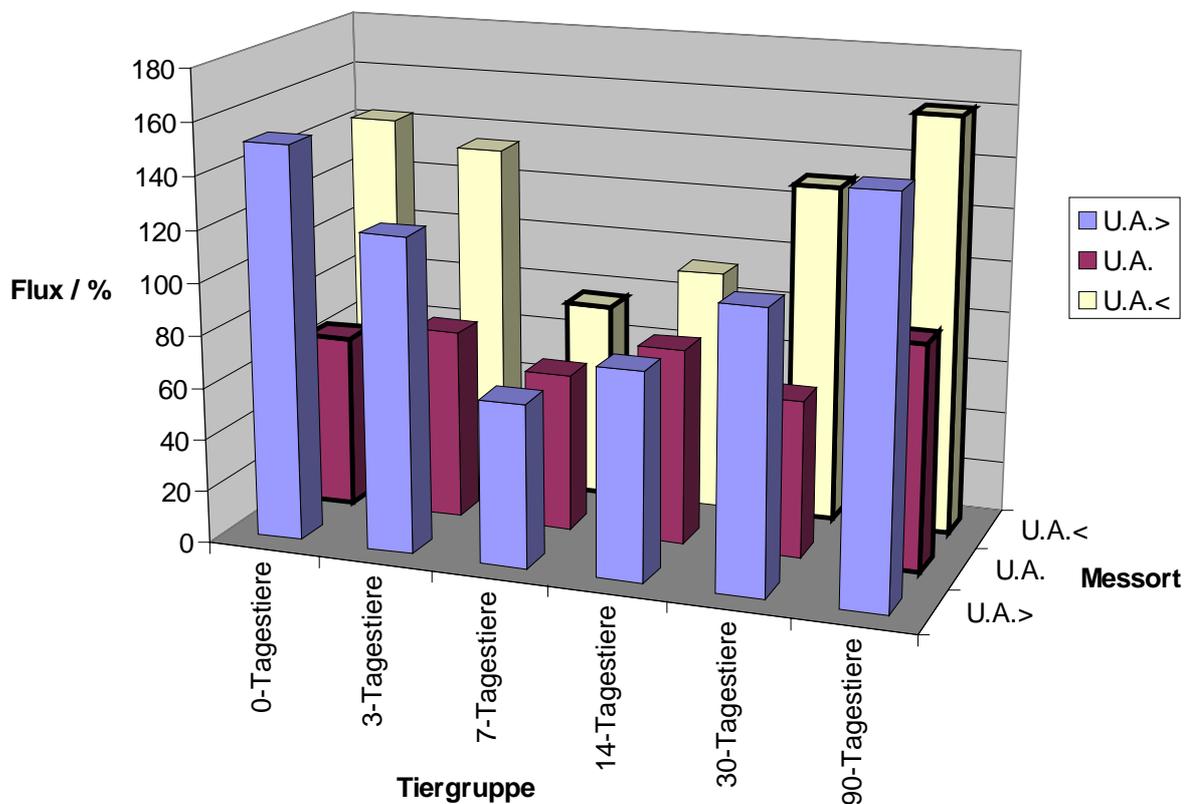
Auch bei der Untersuchung der am Übergang Sigma-Rektum gelegenen unteren Darmanastomose zeigte sich, unabhängig vom verwendeten Faden, eine kontinuierliche Abnahme der Fluxwerte in den Gruppen 0, 3 und 7 mit anschließendem Wiederanstieg über den 14., 30. zum 90. Tag.

Für den Bereich *proximal der unteren Anastomose* war diese Abnahme von Tag 3 auf Tag 7 von 120,8% auf 62,7% signifikant ( $p=0,027$ ). Hier fiel weiterhin ein signifikanter

Wiederanstieg der Messwerte vom 14. auf den 30. Tag (79,7% auf 107,0%), sowie vom 30. auf den 90. postoperativen Tag (107,0% auf 151,6%) auf.

Unmittelbar *auf dem unteren Anastomosenspalt* zeigten sich vom 30. auf den 90. Tag signifikante Änderungen der Messwerte mit einer Zunahme von 60,4% am Tag 30 auf 86,5% am Tag 90 ( $p=0,012$ ).

*Distal der unteren Anastomose* konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung des Blutflusses bei Betrachtung der gemessenen Fluxwerte beobachtet werden (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.1.b im Anhang).



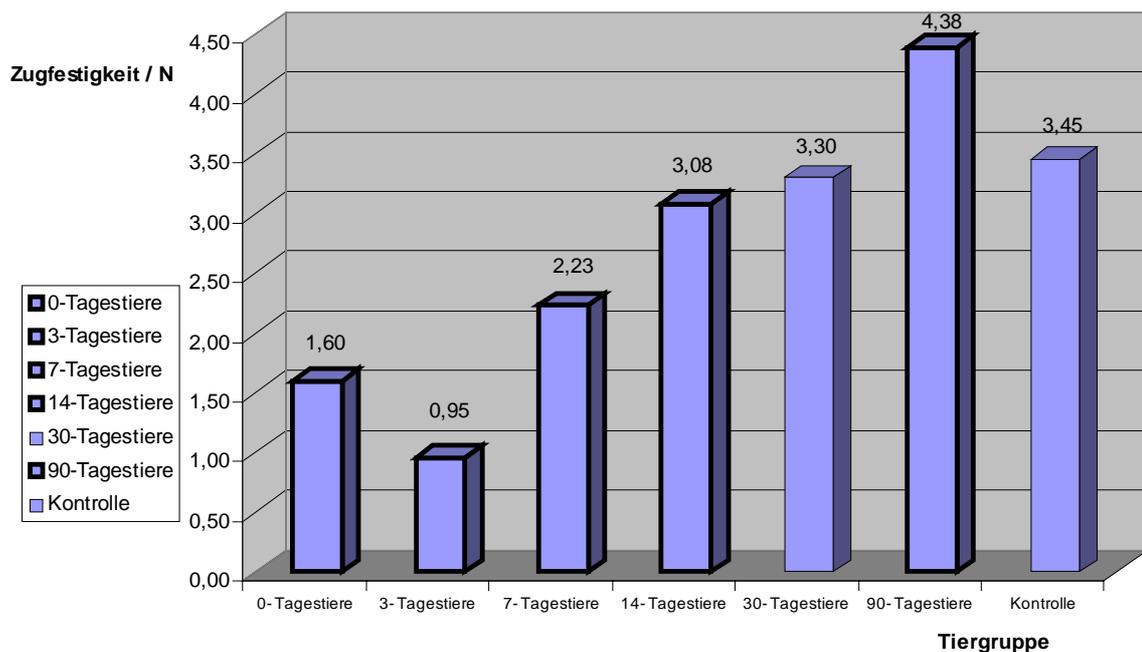
**Abb. 4.2.1.b:** Gemessener Flux auf der unteren Anastomose in Abhängigkeit von der Tiergruppe: Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Tiergruppe. Signifikanzen wurden schwarz umrahmt.

Die verwendeten unterschiedlichen Nahtmaterialien führten zu keinen messbaren Unterschieden in der Anastomosendurchblutung.

#### 4.2.2 Zugfestigkeit und Berstungslokalisation

##### a) In Abhängigkeit von der Tiergruppe

Die mittlere Zugfestigkeit der erstellten Darmanastomosen lag bei den Tieren der 0-Tagesgruppe unabhängig vom verwendeten Nahtmaterial bei 1,6 N. Sie stieg von einem Tiefpunkt am Tag 3 (0,95 N) kontinuierlich und signifikant auf einen Wert von 4,38 N an. Die Zugfestigkeiten in der Gruppe der 30- und 90-Tagestiere unterschieden sich nicht-signifikant von der Kontrollgruppe (nicht-operierte Tiere). Höchste Zugwerte wurden in der Gruppe der 90-Tagestiere mit einem Mittelwert von 4,38 N erreicht (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.2.a im Anhang).

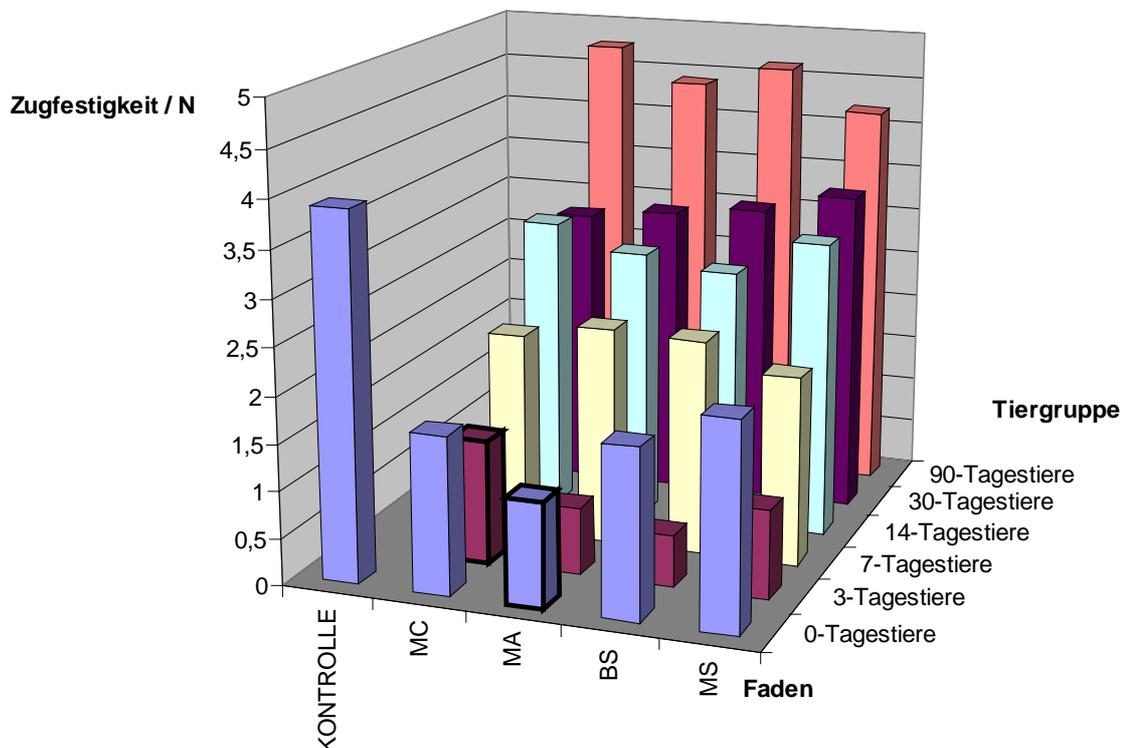


**Abb. 4.2.2.a:** Mittlere Zugfestigkeit in Abhängigkeit von der Tiergruppe. Signifikanzen wurden schwarz umrahmt.

##### b) In Abhängigkeit von der Tiergruppe und dem verwendeten Faden

Betrachtet man zusätzlich den postoperativen Verlauf der Zugfestigkeiten unter Berücksichtigung des jeweils verwendeten Nahtmaterials, so ergaben sich zum

Zeitpunkt  $t = 0$  Tage signifikante Unterschiede beim Vergleich der im Median höheren Zugfestigkeiten von Biosyn® (1,8 N) gegenüber Maxon® (1,12 N) mit  $p = 0,009$ , sowie Monosyn® (2,19 N) gegenüber Maxon® (1,12 N) mit  $p = 0,047$ . Zum Zeitpunkt  $t = 3$  Tage zeigten sich Signifikanzen beim Vergleich Monocryl® (1,32 N) gegenüber Biosyn® (0,55 N) mit  $p=0,02$ , sowie Monocryl® (1,32 N) gegenüber Monosyn® (0,94) mit  $p=0,034$ . Die Gruppen der 7-, 14-, 30- und 90-Tagestiere zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Zugfestigkeiten in Abhängigkeit vom implantierten Faden ( $p$  stets  $>0,05$ ). Die im Median höchsten Zugwerte zeigten nach  $t = 90$  Tagen die mit Monocryl® angefertigten Anastomosen mit 4,77 N (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.2.b im Anhang).



**Abb. 4.2.2.b:** Medianwerte der Zugfestigkeit in Abhängigkeit von Faden und Tiergruppe. Signifikanzen wurden schwarz umrahmt.

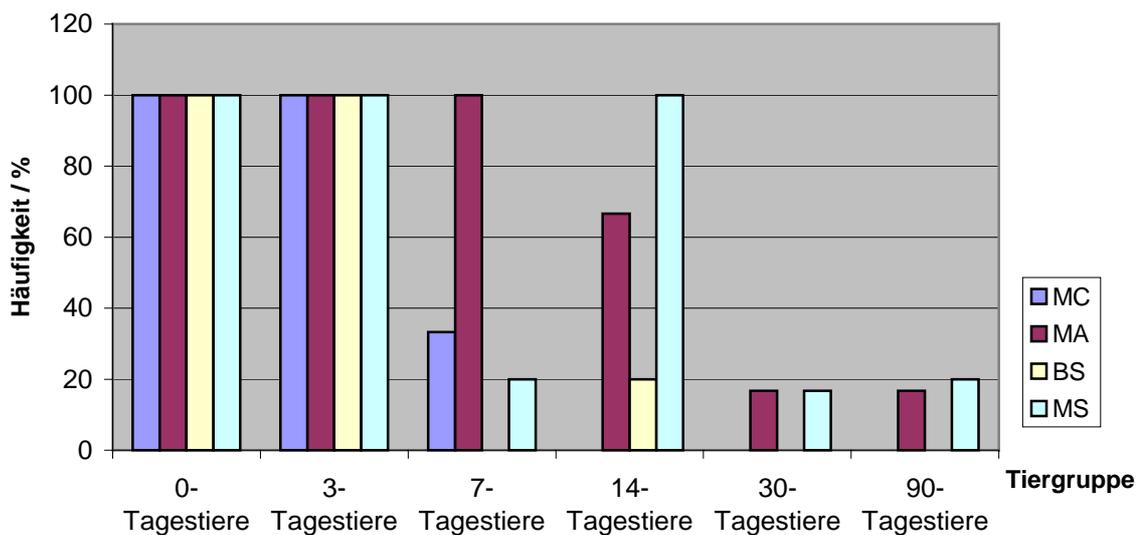
Nicht dargestellt ist der postoperative, statistische Vergleich der Zugfestigkeiten der Darmanastomosen unter Berücksichtigung des verwendeten Fadens und der verschiedenen Zeitpunkte im Vergleich zur nicht-operierten Kontrollgruppe. Es zeigten sich nach 0-, 3-, 7- und 14-Tagen durchgehend signifikante Unterschiede. Lediglich die

Gruppe der 30-, und 90-Tagestiere unterschied sich dahingehend nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

c) In Abhängigkeit von der Berstungslokalisierung

Alle zum Zeitpunkt 0 und 3 Tage untersuchten Gewebeproben barsten bei den Zugmessungen unmittelbar in der Anastomosennaht. Nach 7 und 14 Tagen war dies nur noch bei 30% bzw 35%, nach 30 und 90 Tagen nur noch bei 8% bzw. 9% der untersuchten Darmsegmente unabhängig vom verwendeten Faden der Fall (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.2.c im Anhang).

Die prozentuale Häufigkeit der Berstungslokalisierung innerhalb der Anastomose bei den Zugmessungen in Abhängigkeit vom verwendeten Faden zeigt Abb. 4.2.2.c:



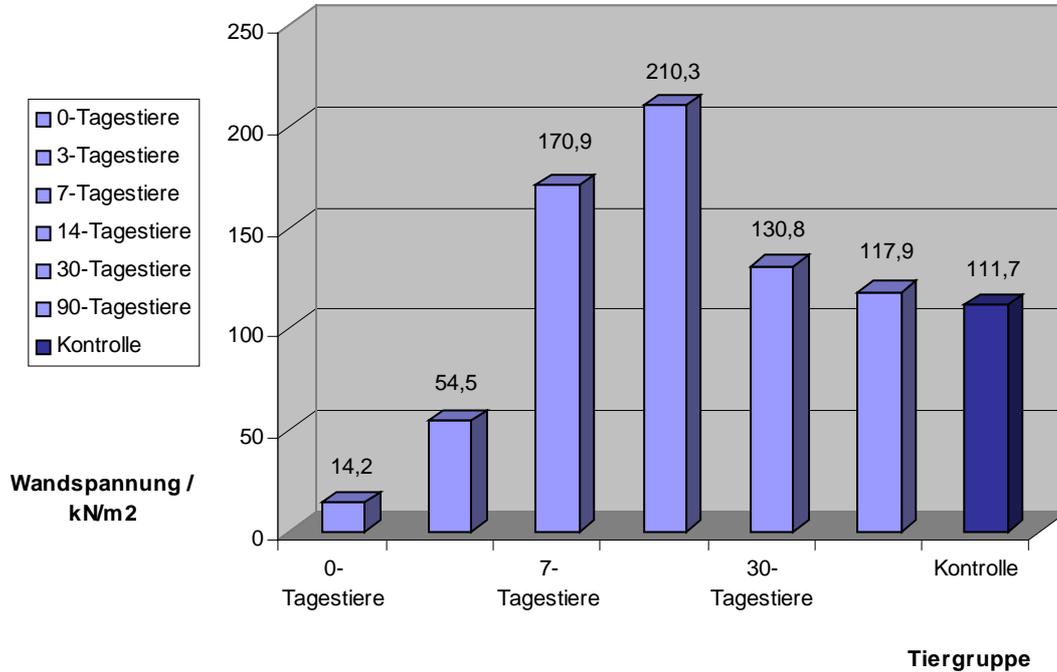
**Abb. 4.2.2.c:** Berstung innerhalb der Anastomose bei den Zugmessungen unter Berücksichtigung des verwendeten Fadens.

#### 4.2.3 Berstungsdruck und Berstungslokalisierung

##### a) In Abhängigkeit von der Tiergruppe

Die tangentielle Wandspannung, bei der das anastomosentragende Darmsegment nach Luftinsufflation barst (Berstungsdruck), wurde entsprechend dem Laplaceschen Gesetz ermittelt (s. Kap. 3.3.4).

Sowohl im Zeitverlauf als auch im Vergleich zu der Kontrollgruppe stieg die mittlere Wandspannung unabhängig vom verwendeten Faden von einem Tiefstwert am Tag 0 (14,2 kN/m<sup>2</sup>), bis zu einem Maximalwert am Tag 14 (210,3 kN/m<sup>2</sup>) kontinuierlich und signifikant ( $p$  stets  $< 0,05$ ) an. Die Tiere der 30- und 90-Tagesgruppe unterschieden sich anschließend nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe. Am 90. postoperativen Tag wurde eine mittlere Wandspannung von 117,9 kN/m<sup>2</sup> gemessen ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.3.a im Anhang).

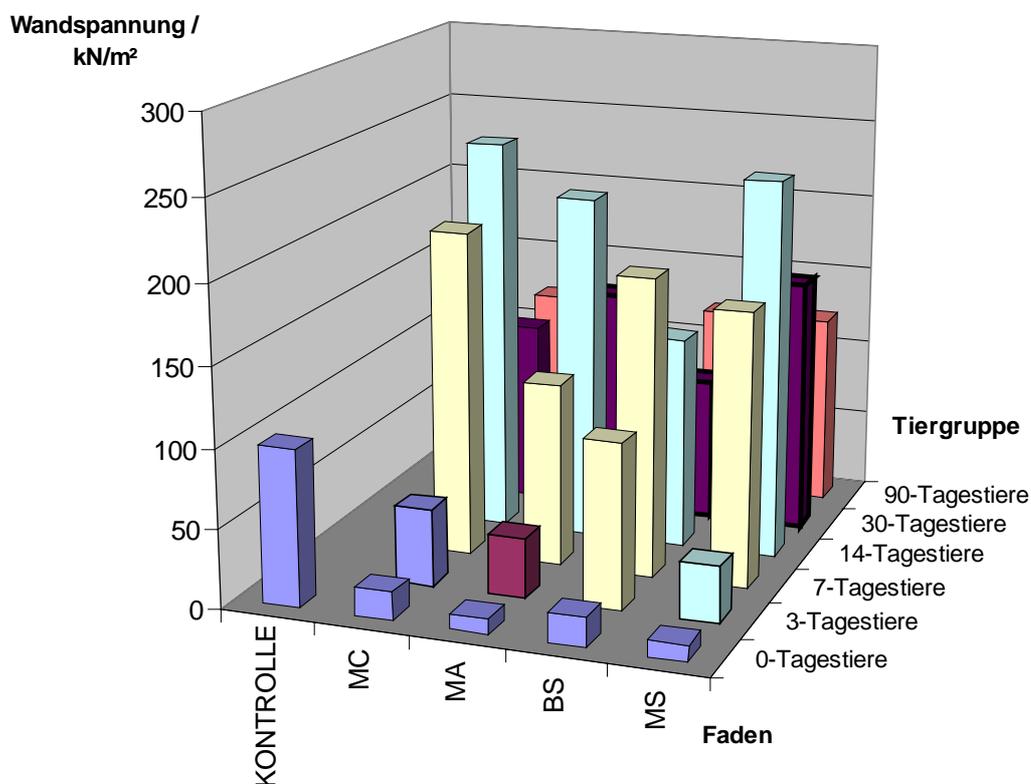


**Abb. 4.2.3.a:** Mittlere Tangentielle Wandspannung in Abhängigkeit von der Tiergruppe und unabhängig vom verwendeten Faden. Signifikanzen wurden schwarz umrahmt.

## b) In Abhängigkeit von der Tiergruppe und dem verwendeten Faden

Der Vergleich der einzelnen Fäden im Zeitverlauf zeigte hinsichtlich der tangentialen Wandspannung lediglich in der Gruppe der 30-Tagestiere signifikante Unterschiede. Die mit Monosyn® operierten Tiere wiesen bei einer mittleren Wandspannung von 161,1 kN/m<sup>2</sup> signifikant ( $p=0,009$ ) höhere Werte auf, als die mit Biosyn® operierten Tiere ( $T_{max} = 90,7$  kN/m<sup>2</sup>). Ebenso unterschieden sich die mit Maxon® operierten Tiere bei einer mittleren Wandspannung von 142,9 kN/m<sup>2</sup> signifikant ( $p=0,028$ ) von den „Biosyn®-Tieren“.

Wiederum zeigten die am 14. Tag reoperierten Tiere die höchsten mittleren Wandspannungswerte, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Nahtmaterialien nachweisen ließen. Monocryl® zeigte zu diesem Zeitpunkt bei einer mittleren maximalen Wandspannung von 250,2 kN/m<sup>2</sup> von allen Gruppen den höchsten Wert (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.3.b im Anhang)



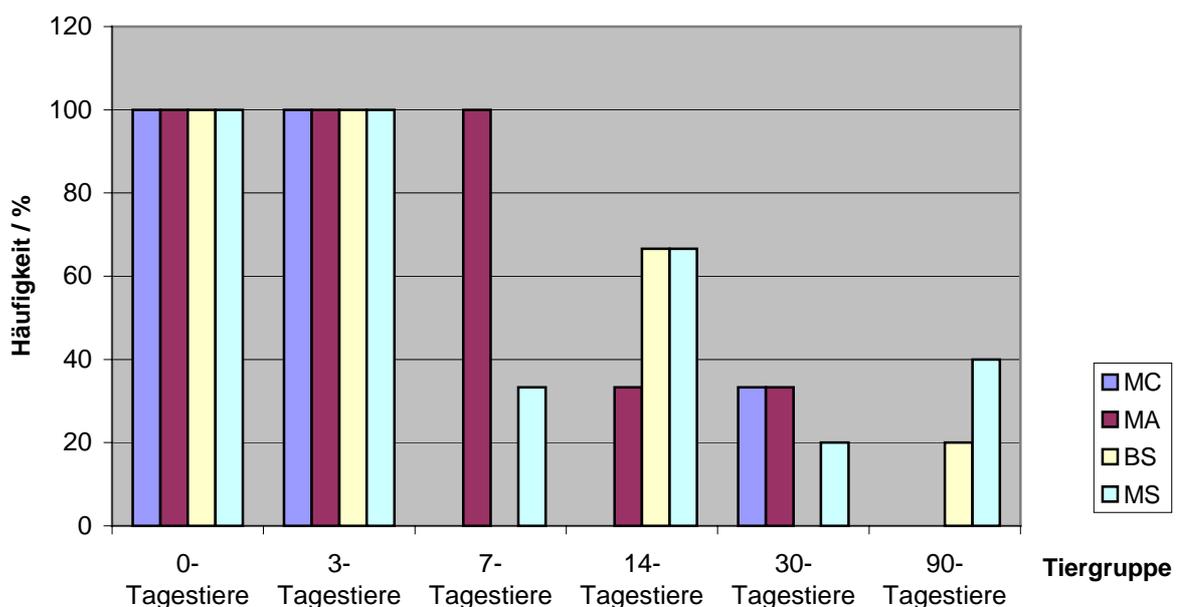
**Abb. 4.2.3.b:** Medianwerte der Tangentialen Wandspannung in Abhängigkeit von Faden und Tiergruppe. Signifikanzen wurden schwarz umrahmt.

Nicht dargestellt ist der postoperative statistische Vergleich der gemessenen Wandspannungen der Darmanastomosen unter Berücksichtigung des verwendeten Fadens und der verschiedenen Zeitpunkte im Vergleich zur nicht-operierten Kontrollgruppe. Es zeigten sich nach 0-, 3-, 7- und 14-Tagen durchgehend signifikante Unterschiede. Lediglich die Gruppe der 30-, und 90-Tagestiere unterschied sich dahingehend nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

### c) In Abhängigkeit von der Berstungslokalisation

Hinsichtlich der Lokalisation der Organberstung im Druckmessversuch ergab sich folgendes Bild: Zum Zeitpunkt 0 und 3 Tage barsten wiederum alle Gewebeprobe bei Luftinsufflation unmittelbar im Anastomosenbereich. Nach 7 und 14 Tagen war dies nur noch bei 33% bzw. 42%, nach 30 und 90 Tagen nur noch bei 23% bzw. 14% der untersuchten Anastomosensegmente der Fall (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.3.c im Anhang).

Die prozentuale Häufigkeit der Berstungslokalisation innerhalb der Anastomose bei den Druckmessungen in Abhängigkeit vom verwendeten Faden zeigt Abb. 4.2.3:

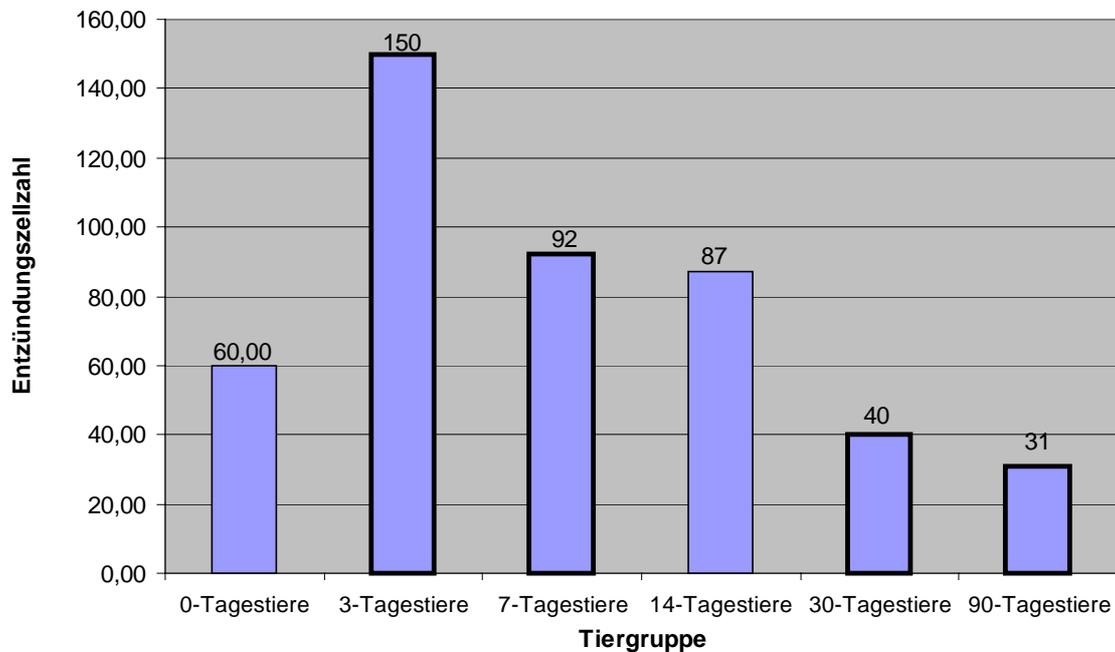


**Abb. 4.2.3.c:** Berstung innerhalb der Anastomose bei den Druckmessungen unter Berücksichtigung des verwendeten Fadens.

#### 4.2.4 Histologie

##### a) In Abhängigkeit von der Tiergruppe

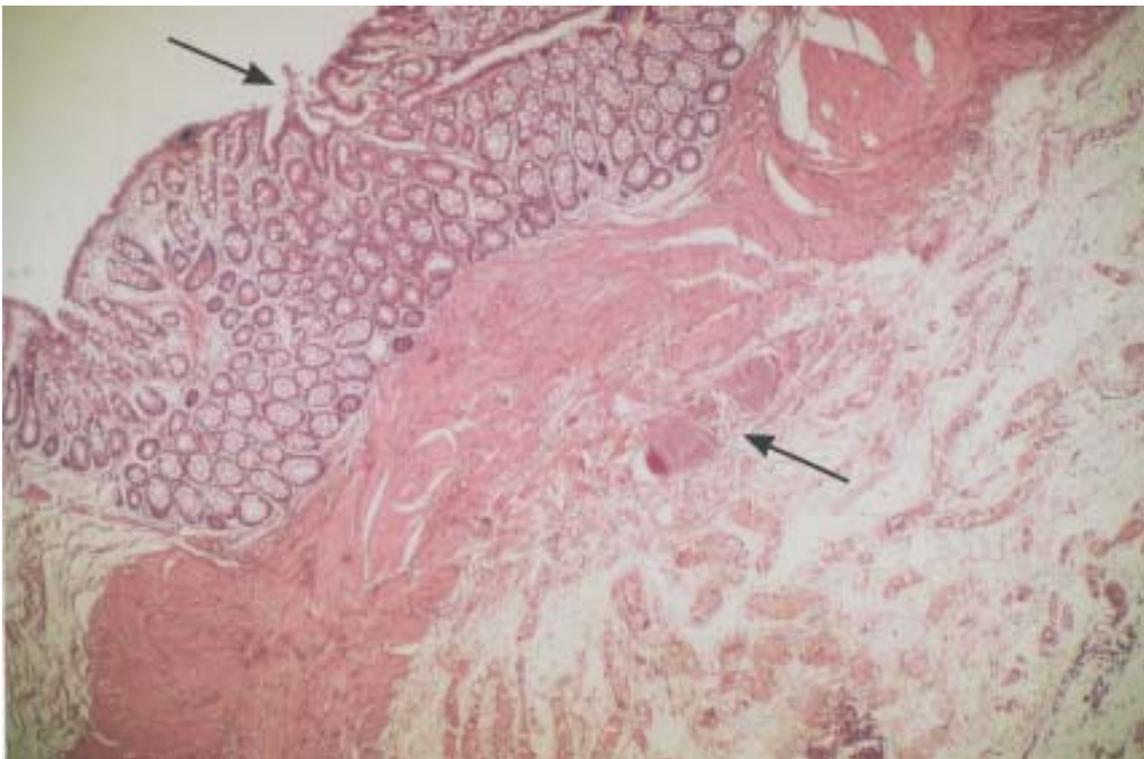
Um die Ausprägung der Entzündungsreaktion nach Anastomosenerstellung zu evaluieren, wurde die Gesamtzahl an Entzündungszellen (EZZ) im perianastomotischen Bereich zu den Zeitpunkten 0-, 3-, 7-, 14-, 30- und 90 Tagen am HE-gefärbten Schnitt ausgezählt. Als Ausschnitt der Darmwand wurde die Submukosa unmittelbar am Anastomosenrand gewählt. Bei der Auswertung wurden polymorphkernige Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten berücksichtigt und jeweils der Mittelwert aus drei Zählungen eines Präparates notiert. Unabhängig vom verwendeten Faden ergab sich folgendes Bild: Vom Tag 0 auf Tag 3 stieg die absolute Zahl an Entzündungszellen signifikant von  $60 \pm 30$  auf  $150 \pm 32$  Zellen an. Dies stellte gleichzeitig das Maximum an gefundenen Entzündungszellen im Zeitverlauf dar. Danach fiel der gefundene Wert subsequent vom 3. bis zum 90. Untersuchungstag auf ein Minimum von  $31 \pm 13$  Zellen am Tag 90 ab. Diese Änderungen der Zellzahlen waren bis auf das Intervall 7 auf 14 Tage stets signifikant (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.4.a im Anhang).



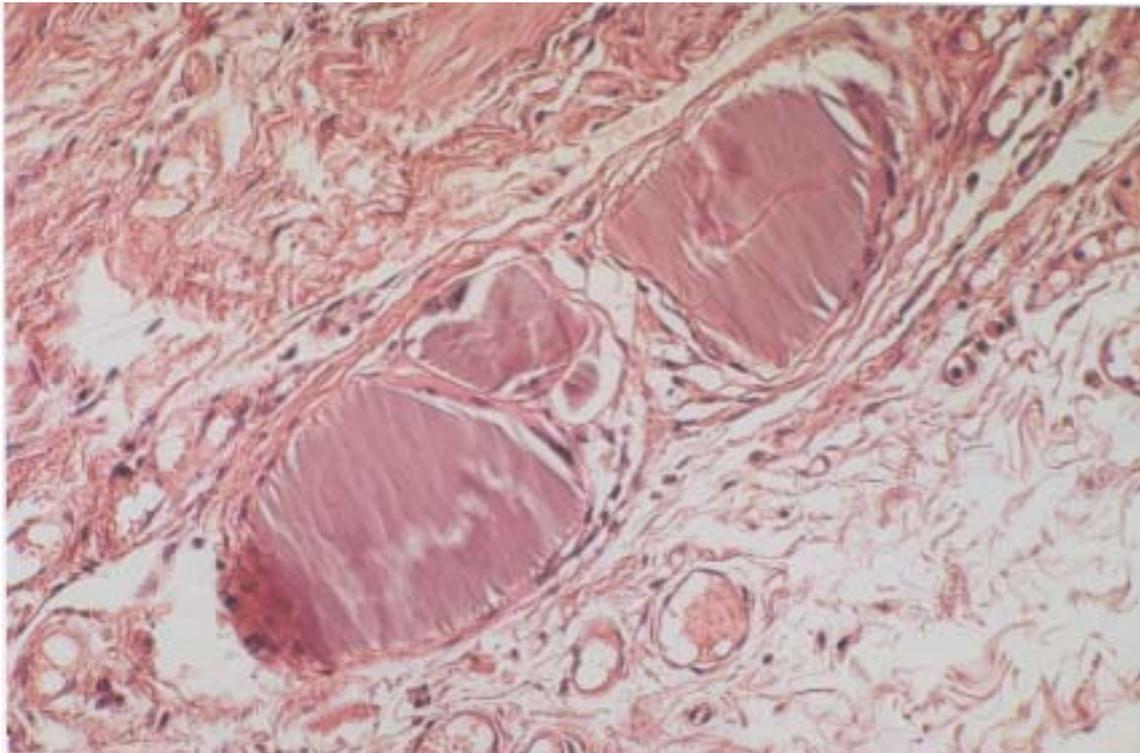
**Abb. 4.2.4.a:** Histologische Entzündungsreaktion im Zeitverlauf, unabhängig vom verwendeten Faden. Signifikanzen wurden schwarz umrahmt.

b) In Abhängigkeit von der Tiergruppe und dem verwendeten Faden

Betrachtet man zusätzlich den bei der Anastomosenerstellung verwendeten Faden, so ergibt sich nach statistischer Auswertung folgendes Bild: Es lassen sich zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten keine durchgehend signifikanten Unterschiede in der ausgezählten Zahl an Entzündungszellen beim Vergleich der Fäden Monocryl®, Maxon®, Biosyn® und Monosyn® feststellen. Lediglich am Tag 30 zeigen die mit dem Faden Maxon® angefertigten Anastomosen mit einer EZZ von  $43 \pm 12$  gegenüber dem Faden Monosyn® mit einer EZZ von  $35 \pm 16$  eine wenig signifikant stärkere Entzündungsreaktion ( $p=0,045$ ) im betrachteten Wandbereich (Einzelwerte siehe Tab. 4.2.4.b im Anhang).



**Abb. 4.2.4.a:** Histologie einer Colonanastomose am Tag +90. Nahtmaterial Monosyn®. H&E Färbung. Vergr. 40X. Die Gewebeintegrität ist vollständig wiederhergestellt ohne Hinweise auf erhöhte EZZ. Das Nahtmaterial ist noch nicht vollständig resorbiert. Der obere Pfeil weist auf den ehemaligen Anastomosenspalt. Der untere Pfeil auf das implantierte Nahtmaterial.



**Abb. 4.2.4.b:** Ausschnitt aus Abb. 4.2.4.a; Histologie einer Colonanastomose am Tag +90; Nahtmaterial Monosyn®; H&E Färbung; Vergr. 200X; der Faden ist noch nicht vollständig resorbiert; wenige Entzündungszellen sichtbar.

### 4.3 Ergebnisse aus den Experimentellen Untersuchungen: Zytokinetische Studien

Vorausschickend muss wiederum gesagt werden, dass sich die in den einzelnen Experimenten erscheinenden Tierzahlen  $n$  von der möglichen Gesamtzahl an ausgewerteten Anastomosenproben (Tab. 3.4.1) unterscheiden. Hinsichtlich der Aussagefähigkeit der Experimente wurde jedoch mit 9 bis 12 Messergebnissen pro Zeitpunkt auf eine statistisch ausreichende Datenzahl geachtet.

#### 4.3.1 Proteingehalt

Die Auswertung des gemessenen Proteingehaltes in den einzelnen Anastomosenproben ergab für die spätere Berechnung des Zytokingehaltes einen mittleren Gehalt von 430  $\mu\text{g}$  Protein pro Anastomose. Es wurde jeweils jede der drei für die zytokinetischen Messungen von einer Anastomose angefertigten Proben (500  $\mu\text{l}$  für TGF  $\beta$ 1, Rantes und

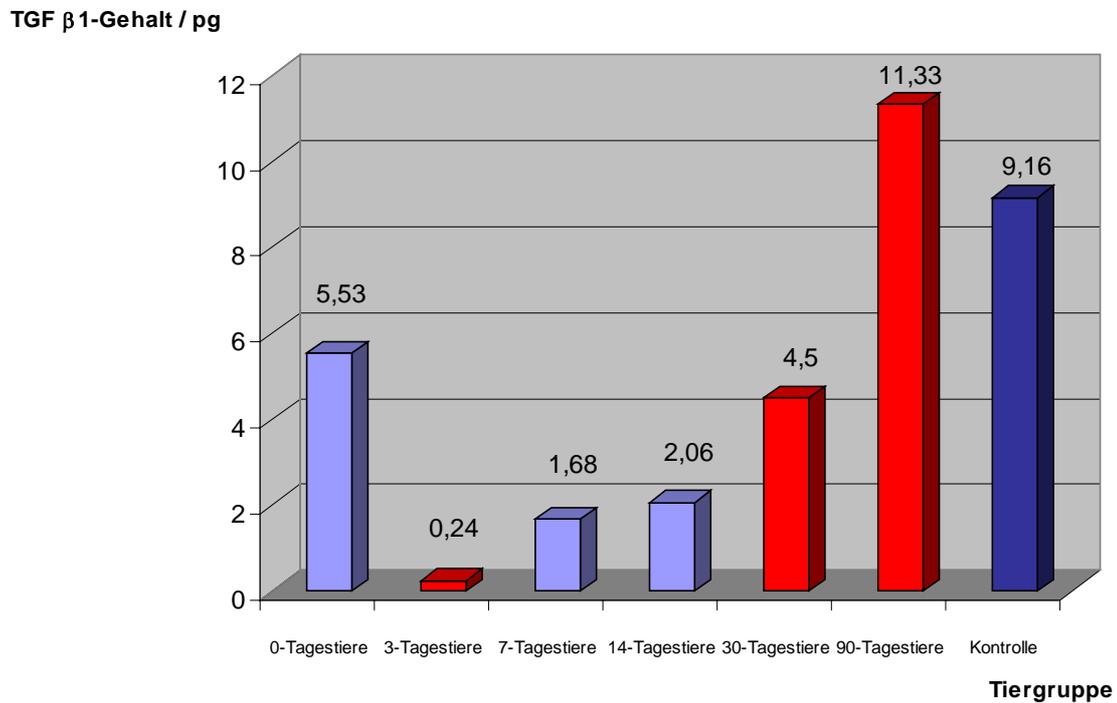
IL-10) untersucht, um eine größtmögliche Genauigkeit zu erzielen. Dieser durchschnittliche Proteingehalt war die Grundlage für die Berechnungen der in 4.3.2 bis 4.3.4 dargestellten Zytokinmesswerte.

**Tab. 4.3.1:** Durchschnittlicher Proteingehalt in  $\mu\text{g}$  der ausgewerteten Anastomosenproben unter Berücksichtigung von Probenverwendung, Faden und Tiergruppe. Die jeweiligen Werte sind Mittelwerte aus 2 bis 6 Einzelbestimmungen.\* Es wurde kein Probenmaterial ausgewertet.

Probe	Faden	0-Tagestiere	3-Tagestiere	7-Tagestiere	14-Tagestiere	30-Tagestiere	90-Tagestiere
IL-10	MC	641,22	696,3	546,97	638,17	308,3	335,7
	MA	718,4	620,67	795,73	622,5	314,02	212,35
	BS	67,6	773,53	617,6	594,53	*	186,05
	MS	115,42	585,27	786,57	681,53	*	244,68
RANTES	MC	443,65	850,03	546,5	463,67	322,28	257,99
	MA	539,15	799,1	928,4	469,03	282,91	124,05
	BS	61,37	874,5	495,6	470,8	*	206,33
	MS	101,02	762,4	866,1	669,87	*	239,68
TGF $\beta$ 1	MC	265,2	661,17	155,67	159,6	139,6	93,85
	MA	583,7	633,1	647,6	172,9	217,92	24,9
	BS	137,27	758,05	158,9	182,6	*	69,98
	MS	110,08	566,13	320,07	283,43	*	112,75

#### 4.3.2 TGF $\beta$ 1- Zytokinetik

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben ergab sich für den TGF  $\beta$ 1-Gehalt einer durchschnittlichen Anastomosenprobe von  $430 \mu\text{g}$  Proteingehalt folgendes Bild: Die Werte am Tag 0 unterschieden sich nicht-signifikant von den Werten der Kontrollgruppe. Bei einem p-Wert von  $< 0,01$  fiel der mittlere TGF  $\beta$ 1-Gehalt dann bis zum Tag 3 hochsignifikant von  $5,53 \text{ pg}$  am Tag 0 auf  $0,24 \text{ pg}/430 \mu\text{g}$  Protein gegenüber der Vorgruppe ab. Anschließend folgte der Wiederanstieg mit einem signifikanten Sprung jeweils von Tag 14 auf Tag 30 von  $2,44 \text{ pg}$  sowie von Tag 30 auf Tag 90 von  $6,83 \text{ pg}$ . Die operierten Tiere unterschieden sich zu den Zeitpunkten 3, 7, 14 und 30 jeweils durchgehend signifikant von der Kontrollgruppe. Der Gehalt am Tag 0 und 90 wies gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede auf (Einzelwerte siehe Tab. 4.3.2 im Anhang).

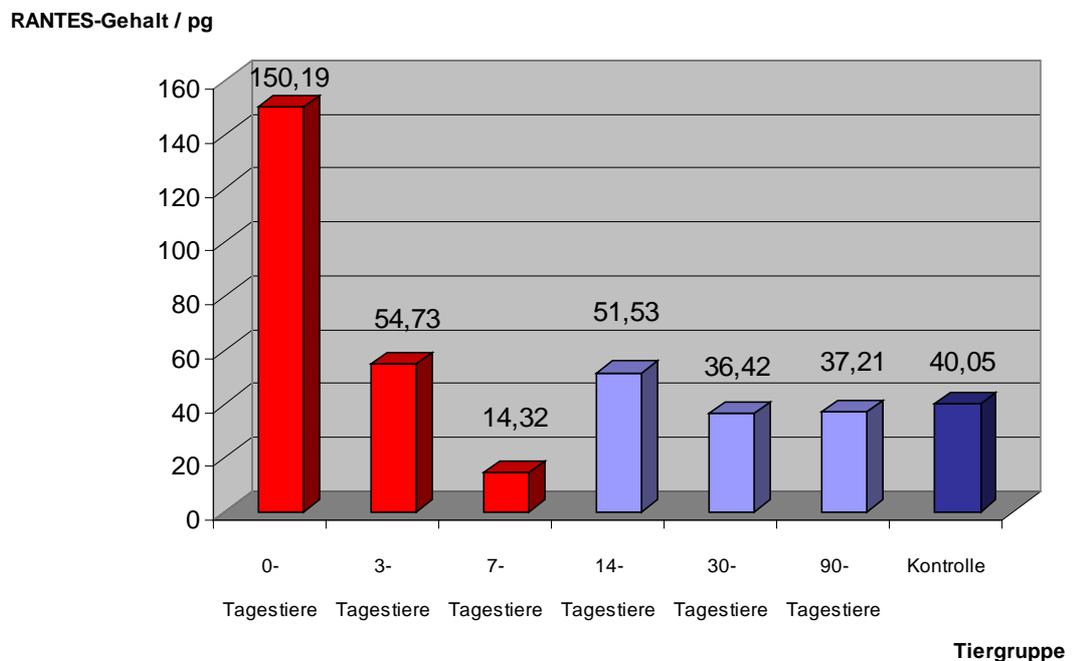


**Abb. 4.3.2:** Mittelwerte des TGF-  $\beta$ 1-Gehaltes in pg in Abhängigkeit von der Tiergruppe - rot markiert wurden signifikante Veränderungen gegenüber der Vorgruppe oder Kontrolle.

#### 4.3.3 Rantes-Zytokinetik

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben ergab sich für den Rantes-Gehalt einer durchschnittlichen Anastomosenprobe von 430  $\mu$ g folgendes Bild: Der RANTES-Gehalt im Anastomosenbereich zeigte unmittelbar am Tag 0 einen mit  $p = 0,01$  gegenüber der Kontrollgruppe signifikanten Anstieg um mehr als das dreifache des Kontrollwertes auf 150,19 pg/430  $\mu$ g Protein. Im weiteren Verlauf fiel der Gehalt am Tag 3 zwar signifikant gegenüber dem Tag 0 auf 54,73 pg ab, war gegenüber der Kontrollgruppe aber nicht-signifikant verändert. Am Tag 7 folgte dann ein weiterer Abfall der Messwerte jeweils signifikant gegenüber der Vorgruppe als auch gegenüber der Kontrollgruppe auf 14,32 pg. Die 14-Tagestiergruppe zeigte einen mit  $p = 0,007$  gegenüber der Vorgruppe hochsignifikanten Wiederanstieg auf 51,53 pg, welcher aber gegenüber der Kontrollgruppe nichtsignifikant ausfiel. Die Werte der am 14., 30., und

90. Tag reoperierten Tiere unterschieden sich dann weder im Zeitverlauf noch zur Kontrollgruppe signifikant voneinander (Einzelwerte siehe Tab. 4.3.3 im Anhang).



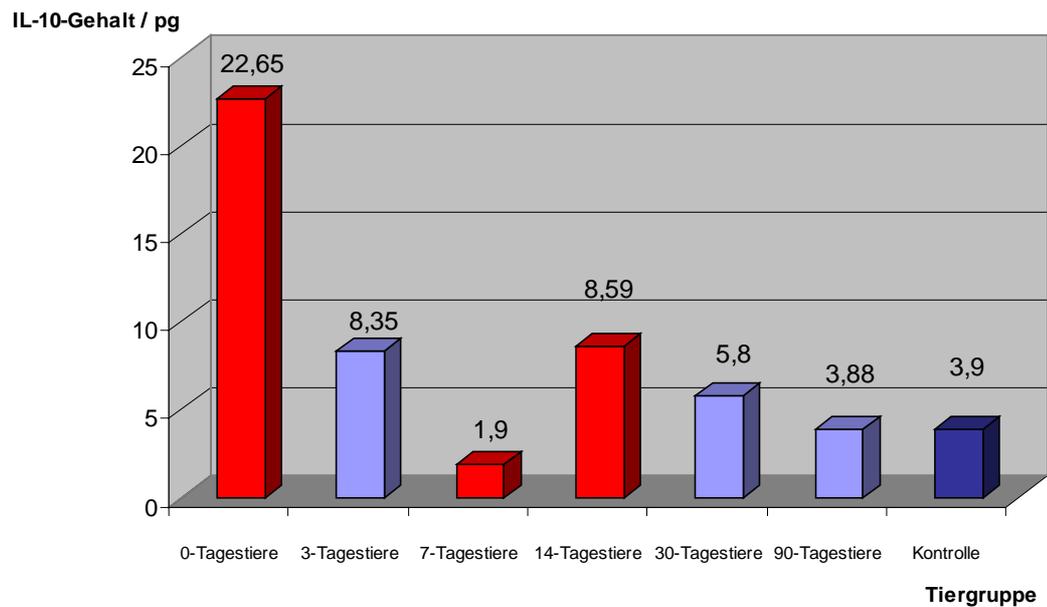
**Abb. 4.3.3:** Mittelwerte des Rantesgehaltes in pg in Abhängigkeit von der Tiergruppe - rot markiert wurden signifikante Veränderungen gegenüber der Vorgruppe oder Kontrolle.

#### 4.3.4 IL-10-Zytokinetik

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben ergab sich für den IL-10-Gehalt einer durchschnittlichen Anastomosenprobe von 430 µg folgendes Bild:

Der IL-10-Gehalt im Anastomosenbereich stieg am Tag 0 bei einem Mittelwert von 22,65 pg/430 µg Protein statistisch signifikant gegenüber dem Kontrollwert des unbehandelten Darms von 3,9 pg an. Am Tag 3 fiel der gemessene Gehalt dann mit 8,35 pg/430 µg Protein auf ein gegenüber der Kontrollgruppe nicht-signifikantes Niveau zurück. Am Tag 7 zeigte sich im weiteren Verlauf bei einem mittleren Wert von 1,9 pg/430 µg Protein ein sowohl gegenüber der Vorgruppe als auch der Kontrollgruppe signifikant erniedrigter IL-10 Gehalt im Anastomosenbereich. Dieser Wert stieg zum Tag 14 zu einem Mittelwert von 8,59 pg signifikant gegenüber der Vorgruppe an,

unterschied sich bis zum Tag 90 jedoch nicht mehr signifikant von den Werten der Kontrollgruppe (Einzelwerte siehe Tab. 4.3.4 im Anhang).



**Abb. 4.3.4:** Mittelwerte des IL-10-Gehaltes in pg in Abhängigkeit von der Tiergruppe. Rot markiert wurden signifikante Veränderungen gegenüber der Vorguppe oder Kontrolle.

## 5. Beantwortung der Fragen

### 5.1 Experimentelle Fragestellung I

- 1) *Lassen sich hinsichtlich des Blutflusses im Bereich der oberen und unteren Colonanastomose am Modell der Wistar ratte signifikante Veränderungen im Heilungsverlauf feststellen und gibt es signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen beim Vergleich von vier verschiedenen, monofilen Nahtmaterialien?*

In den durchgeführten Untersuchungen ließen sich statistisch signifikante Änderungen des Blutflusses sowohl im Bereich der oberen, als auch der unteren Darmanastomose zu den Zeitpunkten +0, +3, +7, +14, +30 und +90 postoperativ finden. Diese zeigten sich laserflowmetrisch in Form eines charakteristischen Fluxmusters mit einem kurvenförmigen ab- und wiederansteigenden Verlauf und einem registriertem Blutflussminimum am Tag 7. Auffällig waren dabei signifikante Anstiege der Fluxwerte vom 30. auf den 90. postoperativen Tag im gesamten oberen Darmanastomosenbereich, sowie proximal und unmittelbar auf der unteren Anastomose. Am 90. postoperativen Tag unterschieden sich die Flusswerte nicht mehr signifikant von den Werten am Tag 0. Die verwendeten unterschiedlichen Nahtmaterialien führten darüberhinaus zu keinen messbaren Unterschieden in der Anastomosendurchblutung.

- 2) *Wie gestaltet sich die postoperative Anastomosenheilung bei Registrierung der Zugfestigkeit, des Berstungsdruckes als auch der Berstungslokalisation zu charakteristischen Zeitpunkten und gibt es signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen beim Vergleich von vier verschiedenen, monofilen Nahtmaterialien?*

Sowohl die lineare Zugfestigkeit als auch die tangentielle Wandspannung zeigten im Zeitverlauf ein charakteristisches Muster. Während die Zugfestigkeit der Colonanastomosen unabhängig vom verwendeten Faden nach einem Tief am Tag +3 kontinuierlich und signifikant bis zum Tag +90 wiederanstieg, zeigte die tangentielle Wandspannung im Anastomosenbereich einen kurvenförmigen Verlauf, mit Maximum am Tag +14 und anschließendem Wiederabfall bis zum Tag +90. Auffällig war ein statistisch signifikanter Anstieg der linearen Zugfestigkeit der Anastomose vom Tag +30 auf +90. Sowohl die lineare Zugfestigkeit, als auch die tangentielle Wandspannung unterschieden sich ab dem 30. postoperativen Tag nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe.

Bei Betrachtung der verwendeten Fäden stellten sich einzig Monocryl® in der frühen Phase der Anastomosenheilung mit signifikant höheren Zugergebnissen dar als Biosyn® und Monosyn®. Der Faden Maxon® fiel in der Berstungslokalisation, sowohl bei den Zug- als auch den Berstungsdruckversuchen mit bis zum 7. postoperativen Tag durchgehend auftretenden Rupturen im Anastomosenspalt auf.

In der späten Phase der Anastomosenheilung konnte dagegen der Faden Monosyn® gegenüber dem Faden Biosyn® mit einer signifikant höheren mechanischen Stabilität in den Berstungsdruckversuchen überzeugen.

*3) Lässt sich histologisch nach Auszählung der Entzündungszellen eine charakteristische Reaktion im Zeitverlauf feststellen und weisen die verschiedenen Fäden darin signifikante Unterschiede auf?*

Auch nach Auswertung der histologischen Anastomosenschnitte zeigte sich ein charakteristischer Verlauf der Entzündungsreaktion im Wundbereich. Die Gesamtzahl an mikroskopisch ausgezählten Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten stieg vom Tag 0 an kurvenförmig über ein Maximum am Tag +3 an und erreichte zum 30. und 90. postoperativen Tag wieder Werte, die auch am nativen Colon gefunden werden konnten.

Im Einzelvergleich der Fäden zeigten lediglich die mit Maxon® gegenüber Monosyn® angefertigten Anastomosen am Tag +30 eine schwach signifikant geringere Entzündungsreaktion.

## 5.2 Experimentelle Fragestellung II

*1) Lässt sich nach Abschluss der zytokinetischen Bestimmungen ein charakteristisches Muster im Zeitverlauf erkennen und ergeben sich signifikante Unterschiede im Vergleich zum nativen Colon?*

Für die Zytokine TGF  $\beta$ 1, RANTES und IL-10 konnten charakteristische Zytokinmuster im Heilungsverlauf der handgenähten Colonanastomose nachgewiesen werden. Dabei fielen besonders die im Vergleich zur Kontrollgruppe unterschiedlichen Werte zu charakteristischen Zeitpunkten des Heilungsverlaufes auf. TGF  $\beta$ 1 zeigte nach einer suppressiven Phase am Tag +3 über den 7. bis zum 90. postoperativen Tag einen signifikanten Anstieg. Bei RANTES dagegen fiel am Tag 0 eine „Upregulation“ und am Tag 7 eine „Downregulation“ auf. Ein ähnliches Muster konnte auch bei dem Zytokin IL-10 registriert werden.

2) *Welche Rolle lassen sich TGF  $\beta$ 1, RANTES und IL-10 im unkomplizierten Heilungsverlauf der Colonanastomose zuordnen?*

TGF  $\beta$ 1 beeinflusst den Kollagenmetabolismus der heilenden Wunde durch seine fördernde Wirkung auf die Syntheserate an kollagenen Fasern und seinen chemotaktischen Effekt auf bindegewebsbildende Fibroblasten. Im initialen resorptiven Stadium der Wundheilung ließen sich analog niedrige Werte zum Tag 3 nachweisen, während im anschließenden reparativen Heilungsstadium der Gehalt an TGF  $\beta$ 1 kontinuierlich und signifikant bis zum Ausgangswert am Tag 90 wiederanstieg. Die zytokinetischen Messungen ergaben für TGF  $\beta$ 1 auch nach dem 30. postoperativen Tag signifikante Änderungen der Messwerte, die auf den wundheilungsfördernden Einfluss dieses Zytokins auch noch in dieser späten Phase hinweisen.

Der sprunghafte Anstieg des RANTES-Gehaltes im Anastomosenbereich am Tag 0 könnte die Funktion des Chemokins RANTES als leukotaktisches Peptid bestätigen. Auch histologisch konnte initial ein signifikanter Anstieg der Entzündungszellzahl festgestellt werden. Im folgenden nimmt der Entzündungsreiz ab und so erreicht der RANTES-Gehalt am Tag 14 wieder Ausgangswerte.

Dagegen könnte der parallele initiale Anstieg von IL-10 durch seine Rolle als Inhibitor einer überschießenden Entzündungsreaktion erklärt werden. Der dann abfallende IL-10-Gehalt lässt sich nicht eindeutig schlüssig erklären und könnte als physiologische Aktivitätsminderung bei Stabilisierung der Wunde auf ein normales Niveau verstanden werden.

## 6. Diskussion

Wie bereits einleitend aufgezeigt, stellen Colonanastomosen Risikoeingriffe dar, mit oftmals erst spät auftretenden Anastomosendehiszenzen. Ursächlich ist hier eine hohe intraluminale Keimbelastung mit der Gefahr der Anastomoseninfektion, die nach aboral zunehmend kritisch werdende Durchblutung aufgrund spärlich werdender Randarkaden sowie der im Vergleich zum Jejunum geringere intramurale Kollagengehalt der submucösen Schicht (Cronin et al. 1968a, Wise et al. 1975, Jiborn et al. 1980) zu nennen. Die Folgen einer nicht rechtzeitig erkannten Anastomoseninsuffizienz können den Tod des Patienten bedeuten. Um den Heilungsverlauf gezielt zu beeinflussen und zu verbessern, steht der intestinale Wundheilungsprozess seit Beginn operativer Eingriffe am Intestinum des Menschen im Mittelpunkt klinischer und experimenteller Forschung.

Einerseits konzentriert sich die Forschung auf die Verbesserung der angewendeten Anastomosentechnik. Hierbei spielen unterschiedliche Nahtmaterialien, Klammernähte, Fibrinkleber sowie Kompressionssysteme wie AKA-2 Geräten, magnetischen Ringe und der BAR (Biofragmentierbarer Anastomosenring) eine Rolle (Debus 1998). Andererseits stellt die systemische Applikation von wundheilungsfördernden Zytokinen und Wachstumsfaktoren einen hochinteressanten neueren Ansatz als potentielle Erweiterung des therapeutischen Armamentariums zur Optimierung der intestinalen Wundheilung dar.

Im folgenden werden die Ergebnisse der hier dargestellten Studien unter Verwendung unterschiedlicher, monofiler, resorbierbarer Nahtmaterialien zur Colonanastomosierung diskutiert. Als klinisch interessante und repräsentative Phasen wurde die Anastomosenheilung zu den Zeitpunkten 0, 3, 7, 14, 30 und 90 Tagen nach Anfertigung gegenüber einer nichtoperierten Kontrollgruppe physikalisch und histologisch untersucht. Anschließend wird das Zytokinmuster von TGF  $\beta$ 1, RANTES und IL-10 zu den besagten Zeitpunkten als bisher in diesem Zusammenhang wenig untersuchte Mediatoren des unkomplizierten Heilungsverlaufes nach primärer Darmnaht dargestellt und gegenüber bisherigen Erkenntnissen zur Zytokinkinetik in der Wundheilung abgegrenzt und diskutiert. Dabei werden auch die Ergebnisse der physikalischen Messungen in Zusammenhang gebracht und mit einbezogen.

### 6.1 Der postoperative klinische Verlauf

Betrachtet man das postoperative klinische Bild aus chirurgischer Sicht, so ergab sich bei den durchgeführten Operationen eine mit 8% im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Komplikationsraten nach Colonanastomosierung von 0,1 bis 30% (Genzini et al. 1992) geringe Ausfallquote an Tieren. Zudem muss man bedenken, dass das Colon dieser Tiere zweifach anastomosiert wurde. Bei der Inspektion des Bauchraumes am Tag der Reoperation fanden sich in der Gruppe der 0-, 3- und 7-Tagestiere, unabhängig vom verwendeten Nahtmaterial, regelmäßig leicht lösbare Adhäsionen zwischen der Anastomosen sowie dem Hodengewebe, Samenblasen und vereinzelt Dünndarmschlingen. Am 14. und 30. postoperativen Tag ließen sich diese am schwersten lösen, wohingegen der Darm am 90. Explantationstag wieder nahezu unauffällige Verhältnisse zeigte. Davon abweichende Resultate berichteten Nöthinger et al. (1980), die ebenfalls verschiedene Nahtmaterialien bei Darmanastomosierung zu zwei Zeitpunkten miteinander verglichen und am 7. Tag schwer lösbare, am 14. Tag dagegen eher leicht lösbare Adhäsionen beschrieben.

Zu einer Striktur mit nachfolgendem Ileus kam es in der vorliegenden Untersuchung bei sieben Tieren ausschließlich im Bereich der tief distal, am Übergang zum Rektum gelegenen Anastomose. Die topographische Lage dieser Anastomosenregion durch ihre Lokalisation im kleinen Becken stellte besondere technische Anforderungen dar, da sowohl die Präparationsarbeit als auch die Anastomosenanfertigung erschwert waren. Die Wundränder mussten, um einen genügenden Abstand zur höher gelegenen Erstanastomose zu wahren, in der Regel unter leichtem Zug adaptiert werden. Anschließend aufgetretene inapparente Nahtinsuffizienzen könnten durch eine reaktiv überschießende Narbenbildung zu den besagten Stenosen geführt haben. Das Greifen einer zu großen Gewebemenge bei der Nahtanfertigung, wie auch die Entwicklung von Briden könnten dafür ebenfalls schuldhaft gemacht werden. Die Tiere wurden in allen Fällen innerhalb von 12 Stunden nach Auftreten erster Symptome explorativ relaparotomiert und unter Inhalationsnarkose getötet. Ein Tier zeigte vier Tage postoperativ das Bild einer eitrigen Peritonitis mit hochroten, fragilen und serös-eitrig belegten Darmschlingen, wobei die Diagnose einer Nahtinsuffizienz der oberen Anastomose gestellt wurde. Im Studienverlauf handelte es sich um ein sehr früh operiertes Tier. Deshalb könnte von einem Operationsfehler ausgegangen werden, der

zur Nahtinsuffizienz führte, noch ehe eine Defektdeckung beispielsweise durch das große Netz die Nahtdehiszenz mit Entwicklung einer Peritonitis verhindern konnte.

Abgesehen von den frühzeitig reoperierten Tieren, erreichten alle Versuchstiere nach durchschnittlich einer Woche ihre Ausgangsgewicht zurück. Die beobachtete durchschnittliche 7,5%ige Gewichtsabnahme innerhalb der ersten drei postoperativen Tage ist durch eine zu erwartende Darmträgheit sowie den durch Schmerzen geminderten Fressdrang der Tiere zu erklären. Erst danach konnten sie in der Erholungsphase ihr Gewicht wieder kontinuierlich bis auf maximal 150% des Ausgangsgewichtes (Gruppe der 90-Tagestiere) steigern.

## 6.2 Physikalische Auswertungen: Laserflowmetrie, Zugfestigkeit und Berstungsdruck sowie Histologie

Zur Beurteilung der Anastomosenheilung wurde intraoperativ am Tag der durchgeführten Reoperation der Blutfluss im Bereich der oberen und unteren Anastomose mittels *Laserflowmetrie* bestimmt. Dies stellt eine einfache, nicht-invasive und gut reproduzierbare Methode dar, die in den letzten Jahren experimentell und klinisch zunehmend zur Messung des intestinalen Blutflusses verwendet wird (Hallböök et al. 1996, Sigurdsson et al. 1996, Kashiwagi 1993). Anschließend erfolgte die Entnahme des circa fünf Zentimeter langen, zweifach anastomosierten Colonsegmentes, zur Bestimmung der tangentialen Wandspannung im Berstungsversuch und der linearen Zugfestigkeit am Tensiometer. Beide Methoden stellen etablierte Verfahren zur Beurteilung der Anastomosensicherheit im Tierexperiment dar und sollen physiologische Beanspruchungen des Darmes imitieren, denen die Anastomose in vivo ausgesetzt ist (Raab et al. 1980, Jiborn et al 1978a und b, Nelson und Anders 1966). Die Entzündungsreaktion im Anastomosenbereich wurde mikroskopisch am HE-gefärbten Schnitt durch Auszählen der Entzündungszellen bestimmt, was aufgrund der mangelnden Skalierbarkeit und Objektivität jedoch nur semiquantitative Aussagen diesbezüglich zulässt (Debus 1998).

Das Aufrechterhalten eines adäquaten Blutflusses ist von fundamentaler Bedeutung für das erfolgreiche Heilen einer Anastomose. Dies spielt insbesondere am Colon mit seinen zarten, variablen und teilweise auf nur eine einzige Randarkade beschränkten Gefäßversorgung eine wichtige Rolle (Stelzner 1982). Im Bereich der rektalwärts

gelegenen unteren Anastomose stellt sich die Gefäßversorgung im Vergleich zu den gut kollateralisierten übrigen Darmabschnitte noch ungünstiger dar und unterliegt darüberhinaus großen Variationen (Kühnel 1983). Im Verlauf der Heilung nach Wundsetzung am Darm bildet sich zunächst reaktives kollagenes Narbengewebe. Hydroxyprolinuntersuchungen am Colon der Ratte (Jiborn et al. 1980, Cronin 1968b) zeigen einen erhöhten Kollagenmetabolismus während der ersten postoperativen Woche mit einem Maximum im Anstomosenbereich und der Colonwand 0 bis 2,5 cm oberhalb der Anastomosenlinie. Die Kollagensynthese ist außerhalb dieses Bereiches und insbesondere analwärts der Anastomosenlinie weniger stark ausgeprägt. Die höchste Rate an Kollagensynthese im Anastomosenbereich wird am 7. postoperativen Tag erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist sie sechs bis zehn mal höher als beim Vergleich mit einer Kontrollgruppe (Jiborn et al. 1980).

Die durchgeführten Messungen ergaben bezüglich der Laserdopplerflowmetrie eine subjektive, jedoch nicht-signifikante Perfusionsabnahme jeweils einen Zentimeter proximal und distal der beiden Anastomosen von rund 60% innerhalb der ersten sieben postoperativen Tage.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Sailer et al. im Jahre 2000, die den intestinalen Blutfluss ebenfalls in Laserflowtechnik zur Evaluation verschiedener Anastomosentechniken bei Anlage eines coloanalen J-Pouches an Göttinger Mini-pigs bestimmten. Sie stellten einen insgesamt 50%igen Abfall des Flusses im distalen Anastomosensegment fest, jedoch keine signifikanten Abfälle im proximalen.

Unmittelbar auf den Anastomosen zeigte sich in der hier vorliegenden Studie für den Zeitraum bis zum 7. Tag, eine Abnahme des Fluxes von rund 40% auf dem oberen und von 10% auf dem unteren Anastomosenspalt, insgesamt jedoch verbunden mit nur geringen Schwankungen und nach statistischer Auswertung zudem auch ohne statistische Signifikanz. Auffällig waren jedoch die hochsignifikanten Änderungen der Messwerte vom 30. auf den 90. postoperativen Tag für den gesamten oberen Anastomosenbereich sowie für den Bereich proximal und unmittelbar auf der unteren Anastomose.

Insgesamt widersprechen diese Beobachtungen der Annahme, dass die Anastomosenheilung bis zum 14. postoperativen Tag abgeschlossen sei und die Anastomose eine der gesunden Darmwand vergleichbare Konstitution wiedererlangt hat (Lünstedt und Debus 1990, Foster et al. 1985, Högström und Haglund 1985). Offenbar spielen sich auch über den 30. postoperativen Tag hinaus noch entscheidende

Reparaturvorgänge in der Colonwand ab, die sich in den hier gemessenen signifikanten Fluxschwankungen widerspiegeln. Die Wichtigkeit einer suffizienten Perfusion für den intestinalen Wundheilungsprozess wurde insbesondere von Kashiwagi (1993) dargestellt. In seinen Versuchen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Absinken des Hydroxyprolinegehaltes als Parameter der Kollagenbildung und einer systematischen Devaskularisation am Colon der Ratte nach Anastomosierung hergestellt werden. Ein zu starkes Absinken des Blutflusses kann demnach mit der Gefahr früher Anastomosendehiszenzen verbunden sein.

Zahlreiche Studien haben sich mit der Messung des *Berstungsdruckes* und der *linearen Zugfestigkeit* beschäftigt, um Aufschluss über die mechanische Festigkeit einer Darmanastomose zu erlangen. Eine hierfür sehr gute Übersichtsarbeit publizierte Braskén im Jahre 1991, der eingehend das Heilungsverhalten von Colonanastomosen auch hinsichtlich des Energiestoffwechsels, des Kollagenmetabolismus und der lokalen Genexpression studierte.

Die lineare Zugfestigkeit der Colonanastomose als physikalischer Parameter der mechanischen Stabilität der Anastomose wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Debus et al. 1995, Koruda und Rolandelli 1990, Nelson und Anders 1966). Zum einen ist es schwierig in einem Tensiometer an der gesamten Zirkumferenz des Darmes die gleiche Zugspannung zu erreichen, wodurch es zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Zugspannung kommen kann. Darüberhinaus stellt die Zugfestigkeit der Darmwand eine in Längsrichtung auf den Darm einwirkende Kraft dar, die im Organismus von untergeordneter Bedeutung ist (Koruda und Rolandelli 1990, Peacock 1984). Alle intestinalen Anastomosen verlieren einen großen Teil ihrer ursprünglichen Reißfestigkeit innerhalb der ersten drei Tage nach Operation (Högström 1985, Jönsson et al. 1983, Greenstein et al. 1978, Cronin 1968a). Für den Dünndarm beträgt dieser Verlust etwa 70% bis 85% (Högström und Haglund 1985, Jönsson et al. 1983), für das Colon etwa 72% bis 95% (Högström und Haglund 1985, Jiborn 1978b).

In Bezug auf die durchgeführten Berstungsdruckuntersuchungen ist seit den Studien von Jiborn et al. aus dem Jahre 1978 (a und b) bekannt, dass die Darmwand bei Druckerhöhung von innen nicht regelhaft in der Anastomose selbst einreißen muss, sondern dass es ebenso auch außerhalb der Anastomose zum Organbruch kommen kann. Diese Hypothese wurde zwei Jahre später in einer weiteren Studie von Jiborn et al. (1980) untermauert, deren Untersuchungen zeigten, dass beide

Anastomosenschenkel in den Kollagenabbau- und Kollagenumbauvorgang während des Heilungsprozesses miteinbezogen sind. Kritisch muss jenen Untersuchungen jedoch entgegengehalten werden, dass nicht der Berstungsdruck, sondern die tangentielle Wandspannung bei Organberstung entscheidend ist. Diese ist nach dem Laplaceschen Gesetz neben der Wanddicke des Darmes am Ort der Berstung wesentlich von dem Organdurchmesser bei Berstung abhängig: je größer der Radius und je schmaler die Darmwand, desto höher ist die tangentielle Wandspannung bei gleichem intraluminalen Druck. Auch muss angemerkt werden, dass der Berstungsdruck nur als Maßstab für die aktuelle Anastomosenfestigkeit während der ersten Heilungstage gelten kann, da ab dem 7. postoperativen Tag der Darm auch regelmässig außerhalb der Anastomosennaht zu bersten beginnt (Hesp et al. 1984, Jiborn et al. 1978a). Während die Höhe der Zugfestigkeit unmittelbar mit dem Einsetzen der Kollagensynthese am vierten postoperativen Tag korreliert (Gottrup 1981, Jiborn et al. 1978b, Sandberg und Zederfeldt 1968), gibt es keinen direkten Zusammenhang zwischen dem gemessenen Berstungsdruck und der Kollagenkonzentration im Anastomosenbereich (Jiborn et al. 1978a). Der Berstungsdruck ist am zweiten bis dritten Tag nach Operation am niedrigsten (Hesp et al. 1984, Wise et al. 1975), während die Zugfestigkeit von da an rasch zunimmt. Im Vergleich zum nicht-beschädigten Darm hat der Berstungsdruck bei Dünndarmanastomosierung zu diesem Zeitpunkt um etwa 50% abgenommen (Hesp et al. 1984, Jiborn et al. 1978a, Wise et al. 1975). Eine Woche nach Anastomosierung ist der Berstungsdruck mit dem nicht-operierter Tiere vergleichbar und die Anastomose bricht generell außerhalb der Nahtlinie (Jiborn et al. 1978a). Zehn Tage postoperativ entspricht dagegen die Zugfestigkeit der Anastomose lediglich 50% der Zugfestigkeit des nicht-operierten Colons (Jiborn et al. 1978b).

Die eigenen Untersuchungen ergaben ein kontinuierliches und stets im Vergleich zur Vorgruppe signifikantes Ansteigen und Abfallen des *Berstungsdruckes* mit einem Maximum am 14. postoperativen Tag. Dieser am Tag 14 erreichte Wert ist nahezu doppelt so groß wie der am unbehandelten Darm der Kontrollgruppe gemessene. Dies unterstützt die Ergebnisse von Jiborn et al. (1987a). Die gemeinsamen Beobachtungen lassen sich als Hinweise werten, dass die Anastomose selbst im Verlauf der Anastomosenheilung durch überschießende Kollagenbildung oder auch durch noch liegendes Nahtmaterial die Festigkeit der Umgebung überschreiten kann. Betrachtet man zusätzlich die Lokalisation der Organberstung im Zugversuch mit jeweils

durchgehendem Auftreten innerhalb der Anastomose am 0. und 3. postoperativen Tag bei allen Fäden, so bestätigt sich die eingangs gemachte Aussage, dass dem Nahtmaterial in der frühen Phase der intestinalen Wundheilung eine wesentliche Haltefunktion zukommt. Die Analyse der Berstungslokalisation in den Zug- und Berstungsdruckmessungen können jedoch die von Jiborn et al. (1978a) gemachten Aussagen nicht bestätigen, da die Anastomose auch nach 14, 30 und 90 Tagen noch innerhalb der Nahtlinie reißt, jedoch mit kontinuierlich abnehmender Häufigkeit im Zeitverlauf.

Die Analyse der Daten aus den *Zugmessungen* zeigt nach einem initialen Abfall der linearen Anastomosenzugfestigkeit ein kontinuierliches Wiederansteigen der Werte sogar über den Ausgangswert am 90. postoperativen Tag. Dies entspricht den schon von Nöthinger et al. (1980) veröffentlichten Ergebnissen im Hinblick auf ihre Zugmessungsversuche am Colon der Wistar ratte. Sie fanden eine in den ersten vier postoperativen Tagen abfallende Zugfestigkeit, die dann vom 4. bis 15. Tag in der proliferativen Heilungsphase schnell ansteigt und sich in der Phase der Reorganisation und Adaptation etwa bis zum 120. Tag langsam dem Ausgangswert annähert.

Auch wurden zwischen dem 7. und 14. postoperativen Tag die von Jiborn et al. (1978b) am 10. Tag postulierten 50% Zugfestigkeit einer Colonanastomose im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht und sogar überschritten.

Die Beobachtung, dass in den vorliegenden Untersuchungen vom 30. auf den 90. Tag eine mit  $p=0,002$  signifikante Steigerung der Anastomosenzugfestigkeit gemessen wurde, wohingegen vom 14. auf den 30. Tag keine Signifikanz auftrat, spricht wiederum für die bereits geschilderte Beobachtung, dass sich auch zu diesem späten Zeitpunkt der Wundheilung noch entscheidende Reparaturvorgänge abspielen, was im Zusammenhang mit den gemessenen Zytokinwerten noch in Diskussion gebracht werden wird.

Bei genauerer Betrachtung des verwendeten Nahtmaterials erwieß sich in der am Tag 3 reoperierten Tiergruppe, dass die mit dem Faden Monocryl® angefertigten Colonanastomosen gegenüber den mit Biosyn® oder Monosyn® angefertigten Anastomosen, statistisch signifikant zugstabiler waren. Insgesamt jedoch ließen sich in den einzelnen Gruppen keine weiteren Signifikanzen bezogen auf eine bessere oder schlechtere Ana-stomosenzugfestigkeit verzeichnen. Im Zeitverlauf konnten bei keinem der untersuchten Fäden durchgehend Unterschiede in der Anastomosenheilung anhand der Zug- und Berstungsdruckwerte ermittelt werden. Als abschließendes Urteil zeigte

lediglich Monocryl® am Tag 3 höhere Werte bei Betrachtung der linearen Zugfestigkeit im Einzelvergleich der Fäden und könnte deshalb bei der Anastomosenanfertigung gegenüber den übrigen Fäden bevorzugt werden.

Bei der Analyse der *Berstungslokalisation* im Zugversuch wurde weiterhin deutlich, dass Maxon® nach 7 Tagen und Monosyn® nach 14 Tagen, noch zu 100% auf der Anastomose rissen. Auch im Berstungsversuch rupturierte der Darm bei den mit Maxon® operierten Tieren noch am 7. postoperativen Tag durchgehend auf der Anastomose. Die Betrachtung der gemessenen Wandspannungswerte nach Luftinsufflation dagegen zeigte keine eindeutigen Unterschiede im Berstungsverhalten der Anastomose in Abhängigkeit vom verwendeten Faden. Lediglich in der Gruppe der 30-Tagestiere stellte sich der erst kürzlich auf den Markt gebrachte Faden Monosyn® mit einer erreichten medianen Wandspannung von 161,1 kN/m<sup>2</sup> gegenüber Biosyn® als hochsignifikant anastomosenstabilisierender dar. Im Vergleich zum Berstungsdruck des nicht-operierten Darms war hier ein rund 60%ig höherer Wert zu verzeichnen. Insgesamt jedoch zeigten die Ergebnisse aus den Zug- und Berstungsdruckmessungen keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich der Wahl des zur Anastomosierung verwendeten Nahtmaterials auf. Deshalb werden die Fäden im Hinblick auf die zytokinetischen Messungen im folgenden gemeinsam behandelt.

Bisherige tierexperimentelle Versuche zur Analyse der Fadenzugfestigkeit am Rattenmodell erfolgten durch Implantation der Fäden entweder in Muskeln wie den M. gluteus maximus bei Maxon® (Knoop et al. 1987) oder in die Subcutis bei Monocryl® (Rao et al. 1995). Für Maxon wurde dabei eine messbare Zugfestigkeit über 42-49 Tage, für Monocryl eine nach 14 Tagen noch bestehende Zugfestigkeit von 20% bis 30% angegeben. Diese Ergebnisse lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Gewebebezüge allerdings nicht mit den nun gefundenen Messergebnissen bei Verwendung als Anastomosenmaterial am Colon vergleichen. Eine weitere Studie von Diener aus dem Jahr 2001 untersuchte das unterschiedliche Abbauverhalten der intestinalen Keimflora von Dünndarm und Dickdarm auf implantierte mono- und polyfile Fäden. Es konnte gezeigt werden, dass E. coli und Proteus eine entscheidende Einflussnahme auf den hydrolytischen Abbau insbesondere der verwendeten polyfilen und im geringeren Maße auch auf die monofilen Nahtmaterialien haben.

Als Parameter der stattgefundenen *Entzündungsreaktion* unmittelbar im Anastomosenbereich, wurde die absolute Zahl an eingewanderten Entzündungszellen

am HE-gefärbten Schnitt herangezogen. Dabei zeigte sich histologisch ein Maximum an polymorphkernigen Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten am dritten postoperativen Tag. Gegenüber dem Tag der Primäroperation stieg also das Auftreten von Entzündungszellen im submukösen Teil der Darmwand innerhalb der ersten drei Tage um 150% an. Diese Beobachtung deckt sich sehr gut mit dem einleitend angesprochenen resorptiven Stadium der Wundheilung (zweiter bis vierter Tag nach Wundsetzung). In diesem wird durch einwandernde Gewebsmakrophagen und chemotaktisch angelockte Blutleukozyten nekrotisches Zellmaterial entfernt, um so die Möglichkeit für Gewebsneubildung zu schaffen. Auch Verhofstad et al. (2001) beobachtete in seinen mikroskopischen Untersuchungen zur intestinalen Anastomosenheilung am Colon normaler und diabetischer Ratten, einen zeitweiligen Anstieg polymorphkerniger Zellen am dritten postoperativen Tag in der nicht-diabetischen Gruppe. Zwischen den Tagen 7 und 14 zeigen sich in der jetzigen Studie konstant hohe Entzündungszellzahlen, die erst zum 30. und 90. Tag hin signifikant abnehmen. Dieser persistierende Entzündungsreiz trägt offensichtlich zum reparativen Heilungsprozess der Colonwand bei und könnte durch lokal-chemotaktische Faktoren aufrechterhalten werden.

Untersucht man nun mögliche Unterschiede im verwendeten Nahtmaterial bezüglich der hervorgerufenen Entzündungsreaktion, so lassen sich keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Das gemeinsame, vollständig hydrolytische Abbauverhalten der gewählten Fäden Maxon®, Monocryl®, Biosyn® und Monosyn®, wirkt sich im Anastomosenbereich offensichtlich mit annähernd gleichen, milden Gewebsreaktionen aus. Die in früheren Zeiten oftmals aufgetretenen Abszessbildungen und allergische Fadenunverträglichkeiten des ersten resorbierbaren Fadens Catgut® (Knopp und Keck 1990) wurden auch in dieser Studie nicht beobachtet und gehören wohl nach Einführung der neuen, monofilen Produkte, der Vergangenheit an. Die gemachten Beobachtungen veranlassten uns in den folgenden zytokinetischen Untersuchungen nicht mehr spezifisch auf den Einfluß der einzelnen Fäden einzugehen.

### 6.3 Zytokinetische Auswertungen: TGF $\beta$ 1, RANTES und IL-10

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit die Erkenntnisse der physikalischen Untersuchungen zur normalen Colonanastomosenheilung am Modell der Wistarratte diskutiert wurden, soll nun das Zytokinmuster von TGF  $\beta$ 1, RANTES und IL-10 im

Zeitverlauf 0 bis 90 Tage postoperativ dargestellt und diskutiert werden. Eine zytokinetische Analyse des unkomplizierten Heilungsverlaufes der Colonanastomose wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Ziel ist es, Aufschluss über den komplexen Regelmechanismus der intestinalen Wundheilung zu erlangen, da das Interesse der klinischen Forschung, diesen Prozess auch auf Transmitterebene zu beeinflussen, wächst.

Eingangs wurde schon auf die biologischen Funktionen der hier untersuchten Zytokine hingewiesen. Darin wurde die chemotaktische Aktivität von RANTES, die leukozytenmodellierende Wirkung von IL-10 und die Rolle von TGF  $\beta$ 1 im Kollagenmetabolismus der Wunde deutlich. Bislang ist eine nahezu unüberschaubare Vielfalt von Zytokinen bekannt und klinisch erforscht. Mit dem Oberbegriff der Zytokine werden uneinheitliche Gruppen verschiedenster Faktoren wie Chemokine, Lymphokine, Interferone, Interleukine, aber auch die klassischen Wachstumsfaktoren zusammenfassend bezeichnet. Sie binden durch Bildung eines Zytokin-Rezeptor-Komplexes an spezifische Rezeptoren ihrer Zielzellen. Über eine intrazelluläre Signalkaskade reagiert die aktivierte Zelle entweder mit Chemotaxis, Zellmotilität, Proliferation oder Proteinsynthese. Die gebundenen Faktoren wirken als Mediatoren oft auch außerhalb ihrer Zielzelle und regulieren so verschiedene biologische Vorgänge innerhalb des Wundmilieus (Vogt et al. 1998). Dabei kann der gleiche Faktor in bestimmten, aufeinanderfolgenden Phasen des Heilungsprozesses stimulierend, in anderen Phasen aber auch inhibierend auf den Metabolismus der Wunde wirken. Letztendlich kann erst die Zusammenschau der einzelnen Komponenten klinisch sinnvolle Ergebnisse zur Verbesserung der intestinalen Wundheilung liefern.

Die für den Wundheilungsprozess wichtigsten Wachstumsfaktoren sind nach einer Übersichtsarbeit von Debus et al (2000) der bereits 1962 entdeckte Epidermal Growth Factor (EGF), die hier näher untersuchten Transforming Growth Factors (TGF) mit ihrem Vertreter TGF  $\beta$ 1, die Insulin-like Growth Factors (IGF), die Platelet-derived Growth Factors (PDGF), den Fibroblast Growth Factor (FGF), den Keratinocyte Growth Factor (KGF) und die Colony-stimulating Factors (CSF).

Bisherige klinische Studien zeigten die erfolgreiche Anwendung von KGF und IGF bei singulärer Gabe oder in Kombination hinsichtlich einer Verbesserung der intestinalen Wundheilung linksseitiger Colonanastomosen (Egger et al. 1998 und 2001). In ihrem Modell wurden Ratten nach Laparatomie und Anfertigen einer Sigma-Sigmaanastomose

zu definierten Zeitpunkten intraperitoneal eine bestimmte Menge KGF, IGF oder die Kombination appliziert. Die Untersuchungen der Anastomosen nach Relaparotomie ergaben bei Vergleich der Berstungsdrücke, histologischen und morphologischen Analysen sowie der Bestimmung des Kollagengehaltes, eine signifikante Verbesserung der Anastomosenheilung bei alleiniger KGF oder IGF Applikation, nicht jedoch bei deren kombinierten Gabe. KGF scheint die Proliferation des Colonepithels zu stimulieren und die lokale Entzündungsreaktion zu reduzieren (Egger et al 1998). IGF scheint das intestinale Epithel ebenso zu beeinflussen, andererseits aber auch die Bildung wichtiger Matrixproteine zu fördern (Egger et al. 2001). Darüberhinaus beschrieben Petersen et al. schon 1996 eine signifikante Steigerung des Körpergewichtes und des Kollagengehaltes, nicht jedoch eine verbesserte Festigkeit im Bereich der Colonanastomose bei Ratten nach systemischer Gabe von IGF-I. Die Expression dieser Wachstumsfaktoren im Zeitverlauf wurde nicht berücksichtigt, so dass eine gezielte phasenspezifische Beeinflussung nicht erfolgen konnte. Ebenso wurde in den Versuchen mit festen Dosierungen an KGF und IGF gearbeitet (5 mg/kg KGF in der Studie aus dem Jahr 1998, 1 mg/kg KGF bzw. IGF in der Studie aus dem Jahr 2001). Ob diese in anderen Konzentrationen ähnliche, oder sogar noch bessere Ergebnisse liefern könnten, bleibt offen.

Andere, ebenfalls Wachstumsfaktoren betreffende Studien, befassten sich am Rattenmodell mit den Auswirkungen der systemischen Gabe von bHGH (biosynthethetic human growth hormon) und der Bruchfestigkeit von linksseitigen Colonanastomosen im unkomplizierten Heilungsverlauf gesunder Tiere (Christensen und Oxlund 1994, Christensen und Flyvbjerg 1992) und anhand von diabetischen Ratten (Seyer-Hansen et al. 1999). Sie stellten eine Steigerung der Anastomosenfestigkeit durch vermehrte Kollagenablagerung nach Gabe von bHGH während der Heilungsphase fest, während in diabetischen Tieren die Gabe dieses Wachstumsfaktors zu keiner signifikanten Verbesserung der Anastomosenheilung führen konnte. Auch in diesen Untersuchungen sind jedoch keine Angaben über die physiologischen GH Konzentrationen im Anastomosenbereich sowie deren Konzentrationen im Heilungsverlauf gemacht worden, so dass offen bleibt, inwieweit bHGH an der Anastomose selbst Einfluss am positiven Heilungsprozess nimmt.

Ein insbesondere für die intestinale Wundheilung eingehend erforschter Wachstumsfaktor ist der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). Er wird von Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten und Lymphozyten produziert und bewirkt eine reversible Hemmung des Zellwachstums, insbesondere solchen ektodermalen Ursprungs. Seine fünf Isoformen, von denen nur TGF  $\beta$  1-3 beim Menschen vorkommen, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer biologischen Wirkungen nicht grundsätzlich voneinander. Sie weisen innerhalb verschiedener Säugetierspezies wie Mensch und Ratte Sequenzhomologien von nahezu 100% auf. TGF  $\beta$  stimuliert das Fibroblastenwachstum sowie die Produktion der wichtigsten Matrixproteine (Kollagene, Proteoglykane, Fibronectin, Integrin, Glycosaminoglykane etc.). In der Regulation der Entzündungsreaktion spielt TGF  $\beta$  1 die Rolle eines anti-inflammatorischen Faktors, im Rahmen der Wundheilung stimuliert es sehr potent die Kollagensynthese und hemmt den Kollagenabbau (Kramer et al. 2001). TGF  $\beta$  wirkt darüber hinaus chemotaktisch und inhibiert die Proliferation von T-Lymphozyten. In Konzentrationen von zwei fg/Zelle stellt TGF  $\beta$  einen Wachstumshemmer für glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Chondrozyten dar, in höheren Konzentrationen stimuliert er das Wachstum derselben (Ibelgauft 1999, TGF- $\beta$ ). Gleichsam bimodal wirkt TGF  $\beta$  auch auf die Synthese von PDGF, einem weiteren wichtigen Wachstumsfaktor.

Die heilungsfördernde Wirkung von TGF  $\beta$  wurde schon in zahlreichen Studien, sowohl im Rahmen der normalen als auch der beeinträchtigten Wundheilung, belegt. Mustoe et al. untersuchten bereits im Jahre 1987 das Heilungsverhalten linearer Hautinzisionen an der Ratte nach einmaliger Gabe von gereinigtem TGF  $\beta$  aus Blutplättchen. Sie beobachteten nach nur 5 Tagen eine 220% ige Steigerung der Gewebereißkraft gegenüber einer Kontrollgruppe, wobei eine Migration mononukleärer Zellen und Fibroblasten begleitet von einer merklichen Erhöhung der Ablagerungsrate an Kollagen auffielen. Diese Resultate wurden drei Jahre später in ähnlicher Form auch für die intestinale Wundheilung bestätigt (Mustoe et al. 1990). Hier konnte durch topische Applikation von TGF  $\beta$  an Inzisionswunden des Rattenmagens eine dosisabhängige Verbesserung des Heilungsverlaufes, einsetzend am siebten postoperativen Tag, beobachtet werden. Die Vermutung, TGF  $\beta$  könnte direkt die Kollagensynthese in Inzisionswunden der Rattenhaut stimulieren und auf Fibroblasten chemotaktisch wirken, hatten Pierce et al. 1989 nach ihren physikalischen und histologischen Untersuchungen. Den Einfluss von verabreichtem TGF  $\beta$  1 auf das Migrationsverhalten intestinaler Epithelzelllinien, demonstrierten Basson et al. dann im Jahre 1992 (an der

humanen Caco-2 Enterozyten-Zelllinie) sowie Ciacci et al. im Jahre 1993 (an der tierischen IEC-6 Enterozyten-Zelllinie). Ihre Resultate postulierten einen entscheidenden chemotaktischen Einfluss von TGF  $\beta$  im Rahmen der Regeneration und Restitution der epithelialen Integrität. Weitergehende Studien zur Expression und Funktion wichtiger extrazellulärer Matrixproteine, ebenfalls an tierischen IEC-6 Enterozyten-Zelllinien durchgeführt, zeigten Fibronectin und Kollagen IV als wichtige Proteine in der Wiederherstellung der intestinalen Zellintegrität. Deren Downregulation und Transkription wird durch TGF  $\beta$ 1 reguliert (Goke et al. 1996). Eine amerikanische (Beck et al. 1993) und eine englische (Slavin et al. 1992) Studie wiesen auf den positiven Einfluss von systemisch oder lokal verabreichtem TGF  $\beta$ 1, auf die Wundheilung nach Steroidapplikation im Rattenmodell hin. Slavin et al. (1992) dokumentierten eine Verbesserung der ilealen Wundheilung steroidbehandelter Ratten sieben Tage nach Wundsetzung im Vergleich zu einer nur mit Kollagensuspension behandelten Kontrollgruppe. Beck et al. (1993) dagegen stellten den förderlichen Einfluss einer intravenösen Gabe an rekombinanten humanen TGF  $\beta$  im Heilungsprozess von Hautwunden steroidbehandelter Ratten gegenüber unbehandelten Tieren fest. Bezogen auf das Inzisionsmodell der Rattenhaut konnte dann O'Kane und Ferguson im Jahre 1997 einen TGF  $\beta$ 1 Anstieg eine Stunde nach Wundsetzung mit anschliessendem Abfall nach 48 Stunden nachweisen. Ein zweiter Anstieg wurde sieben Tage nach Wundsetzung beobachtet. 1996 zeigten Dignass et al. durch immunhistochemische Untersuchungen nach Wundsetzung am Rattendünndarm mittels Phytohaemagglutinin (PHA) ein gesteigertes Vorkommen von TGF  $\beta$  und TGF  $\alpha$  im Epithelzellkompartiment, welches als Kompensationsmechanismus des Organismus gedeutet wurde. Eine signifikante Steigerung der intestinalen TGF  $\beta$ 1-Genexpression in Korrelation mit einer gesteigerten Expression des Procollagen Typ 1-Gens (PROC 1) konnte anschließend durch die Arbeitsgruppe um Buckmire et al. (1998) gezeigt werden. Nach Transsektion und Reanastomosierung des deszendierenden Rattencolons zeigten ihre Messungen den Einfluss von TGF  $\beta$ 1 im Kollagenmetabolismus heilender Colonanastomosen durch eine nachweisbare Steigerung der Kollagensynthese im Anastomosenbereich.

Aktuelle Literatur aus dem Jahre 2001 bringt den Wachstumsfaktor TGF  $\beta$ 1, abgesehen von seiner Rolle im Kollagenmetabolismus der Wundheilung, mit der Entstehung pulmonaler Erkrankungen in Zusammenhang (Pittet et al. 2001, Sheppard 2001). Ihre Studien zeigten, dass die lokale und durch Integrin-vermittelte Aktivierung von TGF  $\beta$

ein kritischer Schritt in der Entwicklung eines pulmonalen Ödems nach akuter Lungenschädigung (Pittet et al. 2001) bzw. in der Entwicklung einer Lungenfibrose nach Bleomycinbehandlung (Sheppard 2001) darstellt. Auch im Rahmen der Karzinogenese hat sich TGF  $\beta$  und insbesondere der Rezeptor TGF  $\beta$  RII als potenter Angriffspunkt für die therapeutische Tumorintervention erwiesen (Oft et al. 1998). Epitheliales Tumorstadium ist demnach stets mit einem Verlust an Zell-Zellkontakten und Dedifferenzierung verbunden, in dessen Ablauf TGF  $\beta$  als sehr potenter Tumorsuppressor in Erscheinung tritt, da er den Ablauf des Zellzyklus stört und Tumorstadium hemmen kann.

TGF  $\beta$  stellt sich also als pleiotropes Zytokin dar mit Einflussnahme in zahlreiche biologische Prozesse wie Modulation der extrazellulären Matrix, kutane und intestinale Wundheilungsprozesse, Immunsuppression, Karzinogenese und auch Pathogenese wichtiger Krankheitsbilder. Im Rahmen dieser Studie wurde nun erstmalig erfolgreich der Gehalt an TGF  $\beta$ 1 im Heilungsverlauf der handgefertigten Colonanastomose untersucht.

Dabei zeigte sich initial ein hochsignifikanter und über 90%iger Abfall des TGF  $\beta$ 1 Gehaltes im Anastomosenbereich innerhalb der ersten drei postoperativen Tage. In dieser frühen Phase der intestinalen Wundheilung stehen resorptive Prozesse mit Kollagenolyse und fehlender Kollagensynthese im Vordergrund des Geschehens. Eine Suppression der von Mustoe et al. (1990) sowie Pierce et al. (1989) angenommenen und durch die Arbeitsgruppe um Buckmire im Jahre 1998 auf Genebene nachgewiesenen Förderung der Produktions- und Ablagerungsrate an wundstabilisierenden kollagenen Fasern durch TGF  $\beta$ 1, ist zu diesem Zeitpunkt des Heilungsprozesses durchaus erwünscht. In den Wundbereich migrierte Thrombozyten und Makrophagen, die zusammen mit Fibrin, Blut und Lymphsekret für den primären Wundverschluss sorgen, produzieren im weiteren Verlauf TGF  $\beta$ 1. So erklärt sich der über die Tage 7 bis 14 kontinuierliche Wiederanstieg des TGF  $\beta$ 1-Gehaltes im Anastomosenbereich. Dieses TGF  $\beta$ 1 wirkt offensichtlich chemotaktisch auf jetzt in der proliferativen Phase der Wundheilung vermehrt einwandernde, bindegewebsbildende Fibroblasten, die ihrerseits den TGF  $\beta$ 1-Gehalt durch Eigenproduktion weiter erhöhen. Auffällig ist dabei der signifikante Sprung zwischen dem 14. und 30. postoperativen Tag. Dies entspricht einem Anstieg der TGF  $\beta$ 1-Produktion um 60% für dieses Zeitintervall. Im Anschluss

daran kommt es zu einem weiteren, ebenfalls signifikanten Anstieg des TGF  $\beta$ 1-Gehaltes um über 60% zwischen dem 30. und 90. postoperativen Tag. Der am 90. Tag erreichte Wert unterscheidet sich dann nicht mehr signifikant vom Kontrollwert und entspricht dem Ausgangsgehalt an TGF  $\beta$ 1 in der Colonwand.

Die Tatsache, dass bei den hier vorliegenden Messungen ein über den 30. postoperativen Tag hinaus signifikanter Anstieg des TGF  $\beta$ 1-Gehaltes gemessen wurde, wirft wiederum die Frage auf, wann es denn letztendlich zu einem Abschluss des Heilungsprozesses kommt. Bisherige Studien umfassten zumeist einen Beobachtungszeitraum von maximal 30 postoperativen Tagen. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Anastomosenheilung bis zum 14. postoperativen Tag abgeschlossen sei und die Anastomose eine der gesunden Darmwand vergleichbare Konstitution wiedererlangt hätte (Lünstedt und Debus 1990, Foster et al. 1985, Högström und Haglund 1985). Das TGF  $\beta$ 1 in der heilenden Wunde Fibroblasten anlockt und für die Neusynthese kollagener Fasern mitverantwortlich ist, wurde bereits durch zahlreiche Studien am Wundmodell der Haut und des Darmes belegt (Buckmire et al. 1998, O’Kane et al. 1997, Mustoe et al. 1990, Pierce 1989, Sporn et al. 1986). In den eingangs diskutierten physikalischen Untersuchungen zeigen sich zudem über den 30. postoperativen Tag hinaus hochsignifikante Veränderungen der Blutflusswerte im gesamten Anastomosenbereich, sowie ebenfalls eine hochsignifikante Zunahme der linearen Zugfestigkeit bei Betrachtung des Intervalls vom 30. auf den 90. Tag. Der Berstungsdruck im Anastomosenbereich zeigt dagegen ein Maximum am 14. Tag. In diesem Zusammenhang wurde bereits festgestellt, dass die Zugfestigkeit der Anastomose unmittelbar mit dem Einsetzen der Kollagensynthese am vierten postoperativen Tag korreliert (Gottrup 1981, Jiborn et al. 1978b, Sandberg und Zederfeldt 1968), während es keinen Zusammenhang zwischen dem gemessenen Berstungsdruck und der Kollagenkonzentration im Anastomosenbereich (Jiborn et al. 1978a) gibt. Die nach dem 30. Tag noch signifikant ansteigenden Messwerte der mittleren Zugfestigkeit im Anastomosenbereich lassen sich jedoch, mit der vom 14. bis 90. Tag gemessenen signifikanten Erhöhung des TGF  $\beta$ 1-Gehalt erklären. Insgesamt hält also der Kollagenmetabolismus der heilenden intestinalen Wunde insbesondere am Colon sehr lange und weit über den 14. postoperativen Tag an, was durch die zytokinetischen Messungen als auch die physikalischen Studien belegt werden könnte.

Neben dem Wachstumsfaktor TGF  $\beta$ 1 wurde der Gehalt des Chemokins **RANTES** (Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted) im postoperativen Verlauf nach Colonanastomosierung untersucht. RANTES ist ein C-C Chemokin, welches die Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen wie Monozyten (Meurer et al. 1993), Lymphozyten (Schall et al. 1990), Mastzellen (Conti et al. 1998) und Eosinophilen (Das et al. 1999) steuert. Chemokine im Allgemeinen scheinen die kontinuierliche Zirkulation der Leukozyten in den verschiedenen Geweben zu kontrollieren und direkt richtungsweisend zu agieren (Luster 1998). RANTES ist Ligand an den Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5, und es zeigen sich 90%ige Sequenzhomologien zwischen tierischem und menschlichem RANTES auf Proteinebene (Ibelgauff 1999, RANTES). Eine gesteigerte RANTES-Expression wurde bislang beobachtet im Rahmen entzündlicher Geschehen wie Glomerulonephritis (Panzer et al. 1999), adjuvant-induzierter Arthritis (Barnes et al. 1998), granulomatösen Entzündungen (Chensue et al. 1999) sowie chronischen Entzündungen des Dickdarms (Ajebor et al. 2001, 1999a, 1999b). Auch an der zellvermittelten Transplantatabstoßung von Nierengewebe scheint RANTES beteiligt zu sein (Pattison et al. 1994).

Produziert wird das leukotaktische Zytokin nach Experimenten mit Zellkulturen von zirkulierenden T-Zellen und T-Zellklonen. Seine Synthese wird durch verschiedene Zytokine (TNF alpha, IL 1-alpha), nicht jedoch TGF  $\beta$  induziert (Ibelgauff 1999, TGF- $\beta$ ).

Eine Veröffentlichung aus dem Jahre 1994 weist im Zusammenhang mit Wachstumsprozessen auf die mögliche Funktion der Chemokine als Costimulatoren des Zellwachstums hin (Taub und Oppenheim 1994). 1998 wurde der Faktor RANTES im Heilungsverlauf der kutanen Wunde am Rattenmodell studiert (Engelhardt et al. 1998). Es ließ sich eine bestimmte phasenspezifische Expression einzelner Chemokine (IL-8, GRO alpha, MCP-1, IP-10 Mig) nachweisen. RANTES zeigte dabei zwischen dem 3. und 21. Untersuchungstag eine nur sehr geringe Nachweisbarkeit und wurde deshalb in der Funktion eines Monozyten- und Lymphozytentaktischen Proteins im kutanen Wundheilungsverlauf als eher unbedeutend eingestuft. Dagegen fand die Arbeitsgruppe um Frank et al. im Jahr 2000 Hinweise, dass vom Wundrand emigrierende Keratinozyten, die Hauptproduzenten von RANTES am Modell der kutanen Wundheilung der Maus darstellen. Sie registrierten 24 Stunden nach Inzision der Haut einen raschen und starken Anstieg der RANTES-mRNA-Expression und im Verlauf durchgehend 20 bis 30 fach erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe bis zum

siebten Tag. Ein zeitweiliger Höchstwert wurde am dritten Tag registriert, und auch am 13. Tag konnten noch hohe Werte an RANTES-mRNA gemessen werden.

Da wie einleitend erwähnt, die intestinale Wundheilung den Prinzipien der kutanen Wundheilung folgt mit deren typischen Phasen von Homöostase, Entzündung, Proliferation und Reparatur, sollte nun der Gehalt des Chemokines RANTES auch im Verlauf der unkomplizierten Colonanastomosenheilung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde erstmals sein Zytokinmuster im Zeitverlauf nach primärer Anastomosenanfertigung erstellt.

Es zeigte sich initial ein deutlicher Anstieg des RANTES-Gehaltes um das über 3,5 fache des Kontrollwertes. Dieser Wert entspricht dem RANTES Gehalt im Anastomosenbereich unmittelbar nach Anastomosierung am Tag 0. Er korreliert mit dem auch von Frank et al. (2000) gemessenen, schlagartigen Anstieg an RANTES-mRNA am Inzisionsmodell der Mäusehaut. Im Verlauf fällt bei den jetzigen Untersuchungen der mittlere RANTES Gehalt am Tag 3 signifikant gegenüber dem Tag 0 ab. Dieser Wert unterscheidet sich jedoch statistisch nicht-signifikant vom Wert der Kontrollgruppe und kann als Rückkehr zum Ausgangswert des unberührten Colon betrachtet werden. Anschließend fällt eine zweite signifikante Änderung im Zytokinmuster auf. Am Tag 7 kommt es im Sinne einer „Downregulation“ zu einem gegenüber der Vorgruppe als auch der Kontrolle signifikanten Abfall des mittleren RANTES-Gehaltes. Dies entspricht weniger als 40% des Kontrollwertes. Diese Kinetik konnte im Hautmodell von Frank et al. (2000) nicht beobachtet werden. Die RANTES mRNA Expression nimmt bei ihren Untersuchungen schrittweise über ein Maximum am Tag 3 zum 5., 7. und 13. Tag hin kontinuierlich ab.

Der sprunghafte Anstieg des RANTES-Gehaltes im Anastomosenbereich am Tag 0 könnte die Funktion des Chemokins RANTES als leukotaktisches Peptid bestätigen. Es ist bekannt, dass Granulozyten im Anastomosengebiet bereits drei Stunden nach Gewebsdurchtrennung gesehen werden und nach 12 bis 24 Stunden ein Maximum erreichen (Hendriks et al. 1985, Hesp et al. 1985). Während am Tag 7 der Anteil an Leukozyten im Wundgebiet der Darmanastomose stark abgenommen hat (Hesp et al. 1985) und dies den gemessenen starken Abfall im RANTES-Gehalt zu diesem Zeitpunkt erklären könnte, erscheinen jetzt in immer größer werdender Zahl bindegewebsbildende Fibroblasten. Deren Wachstum wird wiederum durch den jetzt beginnenden Anstieg des TGF  $\beta$ 1-Gehaltes im Anastomosenbereich stimuliert.

Insgesamt zeigt das Chemokin RANTES im Modell der intestinalen Wundheilung des Colons eine deutliche zweiphasige Kinetik, mit einem Stadium der „Up-Regulation“ am Tag 0 und einem Stadium der „Down-Regulation“ am Tag 7. Nach dem 14. postoperativen Tag konnten keine signifikanten Änderungen des RANTES-Gehaltes mehr festgestellt werden.

Als weiteres, immunregulatorisch wirkendes Zytokin, wurde das Muster von **Interleukin-10** im Heilungsverlauf der unkomplizierten Colonanostomose untersucht. Dabei handelt es sich weder um einen Wachstumsfaktor wie TGF  $\beta$ 1, noch um ein leukotaktisch wirkendes Chemokin wie RANTES, sondern um einen Regulator der Immunantwort akzessorischer Zellen des Immunsystems. Tierisches und humanes IL-10 zeigen eine über 80%ige Sequenzhomologie auf Proteinebene. IL-10 blockiert die Zytokinsynthese sowie verschiedene Funktionen von Makrophagen und ist damit ein Suppressor der Effektorfunktion von Makrophagen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (Gemsa et al. 1997). Bei Menschen wird IL-10 im Verlauf der Immunreaktion erst relativ spät durch aktivierte Blutlymphozyten vom T-Typ gebildet und inhibiert die von Monozyten/Makrophagen abhängige T-Zellproliferation und Zytokinproduktion (Gemsa et al. 1997). Darüberhinaus ist er aber auch als ein Hauptregulator bei der Unterdrückung von Entzündungsreaktionen bekannt (Moore et al. 1993). IL-10 inhibiert die Leukozytenmigration durch das Blockieren der Synthese wichtiger proinflammatorischer Chemokine wie MCP-1 und MIP-1 alpha (Ajuebor et al. 1999 a, 1999 b). Auch wird ihm eine autoregulatorische Aktivität nachgesagt, indem er, unter gewissen Umständen, seine eigene Produktion hemmt.

An IL-10-defizienten Mäusen konnte bereits 1993 durch Kuhn et al. der Einfluss von IL-10 als essentieller Immunregulator im Intestinaltrakt nachgewiesen werden. Diese Mäuse entwickelten eine chronische Enterocolitis verbunden mit einer exzessiven Mucosahyperplasie. Die Bedeutung von IL-10 im Reparaturprozess nach unspezifischer Schädigung der Darmschleimhaut, konnte anschließend auch im Zusammenhang mit anderen wichtigen Immunregulatoren (IL-1, IL-6, TNF-alpha, MIP-1) ebenfalls im Tiermodell bestätigt werden (Dielman et al. 1996). 1999 wurde dann erstmals IL-10 im Rahmen der kutanen Wundheilung der Maus untersucht (Sato et al.). Nach dieser Studie erreichte die Expression von IL-10 ein Maximum drei Stunden nach Inzision der Mäusehaut, kehrte anschließend wieder innerhalb von 24 Stunden auf den Ausgangswert zurück. Nach 72 Stunden wurde ein erneuter Anstieg verzeichnet. Da

nach Untersuchungen von Moore et al. (1993) bekannt ist, dass IL-10 auch von residenten Hautzellen wie Keratinozyten produziert wird, sahen Sato et al. (1999) in IL-10 einen wichtigen Regulator im Wundheilungsprozess der Haut. Bezogen auf die Schleimhaut des Colons wurde IL-10 bisher lediglich im Zusammenhang mit Entzündungserscheinungen säugender gegenüber nicht-säugender junger Ratten nach induzierter Schleimhautschädigung gebracht (Adams und Tepperman 2001). IL-10 scheint hier auch im Rahmen von Entzündungsreaktionen der Colonschleimhaut eine Rolle zu spielen.

Da jeder Wundheilungsprozess immer auch mit einer zeitlich und örtlich begrenzten Entzündungsreaktion gekoppelt ist, wurde im Rahmen dieser Studie erstmalig der IL-10-Gehalt im Rahmen des Heilungsverlaufes nach primärer Colonanastomosierung im Zeitverlauf untersucht.

Es zeigte sich initial am Tag 0 ein steiler und statistisch signifikanter Anstieg im gemessenen mittleren IL-10-Gehalt. Dieser war fast 6 mal so hoch wie der Gehalt der Kontrollgruppe. Dieser Befund steht in Übereinklang mit den dokumentierten, nach drei Stunden deutlich erhöhten IL-10-Werten, die am Inzisionsmodell der Mäusehaut gefunden wurden (Sato et al. 1999). Auch im Rahmen der Wundheilung des Colons könnte IL-10 hier im frühen Stadium eine tragende Rolle als Inhibitor einer überschießenden Entzündungsreaktion zukommen. Betrachtet man allerdings die gleichzeitig gemessenen hohen Werte des Chemokins RANTES, so kann man schlussfolgern, dass IL-10, im Gegensatz zu anderen proinflammatorischen Chemokinen (Ajuebor et al. 1999 a, 1999 b), RANTES in seiner Expression nicht oder nur bedingt zu supprimieren vermag. Im weiteren Beobachtungsverlauf sinkt der IL-10-Gehalt wieder auf einen, dem unbehandelten Darm entsprechenden Wert, am Tag 3 ab. Hier ergeben sich keine signifikanten Messunterschiede gegenüber der Kontrollgruppe. Erst am Tag 7 zeigt sich eine weitere signifikante Auffälligkeit im Zytokinmuster vom IL-10 in Form eines zeitweiligen Abfalls. Gegenüber der Kontrollgruppe stellte sich nur eine geringe Signifikanz dar, während sich der Gehalt zu diesem Zeitpunkt hochsignifikant vom Wert der 3-Tagesgruppe unterschied. Es ist schwierig zu sagen, worin sich dieser Abfall im IL-10-Gehalt gründet. Einerseits könnte IL-10 sich autoregulatorisch bei bisherig hohen Spiegel selbst supprimieren, andererseits könnte die Produktion von IL-10 aber auch durch nachlassende Aktivität akzessorischer Zellen des Immunsystems eingeschränkt sein. Schließlich stabilisiert sich der IL-10-Gehalt im

Anastomosensbereich nach einem signifikantem Wiederanstieg vom 7. auf den 14. Tag, auf einen Wert, der sich am 30. und 90. Untersuchungstag wiederum nicht-signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet und als Rückgang zum „Ausgangswert“ betrachtet werden kann.

Nach Zusammenschau der gefundenen Daten ergeben sich neue, interessante Aspekte, um letztendlich dem komplexen Regelmechanismus des Wundheilungsprozesses am Colon näherzukommen. Die Untersuchungen zeigten, dass die Zytokine TGF  $\beta$ 1, RANTES und IL-10 während der verschiedenen Phasen der primären Anastomosensheilung, mittels ELISA-Technik nachweisbar sind und ihre Kinetik deutlichen Schwankungen unterworfen sind. Die Experimente waren am Modell der Wistar ratte gut reproduzierbar und die gefundenen Messwerte zeigten statistische Signifikanzen im Verlauf. Zudem wurde der Versuch unternommen, einen Zusammenhang mit Befunden aus physikalischen Messungen zur Anastomosensicherheit herzustellen. Hier trat besonders der schon seit längerer Zeit im Mittelpunkt klinischer Forschung stehende Wachstumsfaktor TGF  $\beta$ 1 in den Vordergrund.

Es müssen jedoch immer noch eine Reihe von Fragen beantwortet werden, bis Zytokine oder ihre Inhibitoren gezielt zur Verbesserung der Anastomosensheilung am Colon eingesetzt werden können. Das Zytokinmuster weiterer am Wundheilungsprozess beteiligter Mediatoren, wie in jüngster Zeit MCP-1 oder TNF-alpha, müssen untersucht werden. Erst dann kann begonnen werden, den Einfluss der einzelnen Zytokine oder auch Zytokinrezeptorblocker bei kombinierter Gabe oder unter Zusatz von Proteaseinhibitoren zu erfassen.

Die augenblicklich dokumentierten Befunde scheinen aber darauf hinzuweisen, dass in Zukunft eine Verbesserung der Anastomosensheilung am Colon nicht mehr nur durch die Entwicklung weiterer Nahtmaterialien erreicht werden wird. Bei einem immer größer werdenden Armamentarium an immunhistochemischen Untersuchungsmethoden kann der intestinale Wundheilungsprozess auch auf molekularer Ebene zunehmend verstanden werden, um diesen dann gezielt im Sinne einer Heilungsverbesserung und – beschleunigung zu beeinflussen.

## 7. Zusammenfassung

Wundheilungsstörungen nach primärer Colonanastomosierung sind häufig und fordern vom viszeralchirurgisch tätigen Arzt fundierte Kenntnisse sowohl über das geeignetste Anastomosierungsverfahren als auch über den physiologischen Wundheilungsablauf.

Neben der Entwicklung geeigneter resorbierbarer Nahtmaterialien stützt sich die klinische Forschung in den letzten Jahren zunehmend auf die Untersuchung des Wundheilungsablaufes auch auf molekularer Ebene mit dem Gedanken, diesen Prozess durch den gezielten Einsatz heilungsfördernder Zytokine zu beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im ersten Teil der unkomplizierte Heilungsverlauf nach handgenähter Colonanastomosierung am Modell der Wistarratte zu charakteristischen Zeitpunkten (+0, +3, +7, +14, +30 und +90 Tage postoperativ) in Abhängigkeit von vier verschiedenen, resorbierbaren, monofilen Nahtmaterialien (Monocryl®, Maxon®, Biosyn® und Monosyn®) untersucht. Die Studiengruppe bestand aus 105 männlichen Wistarratten, die auf die Untersuchungszeitpunkte sowie eine nicht-operierte Kontrollgruppe aufgeteilt wurden. Es wurden pro Tier zwei Colonanastomosen im Bereich der linken Flexur (obere Anastomose) sowie am rektosigmoidalen Übergang (untere Anastomose) angefertigt. Im Rahmen der physikalischen Untersuchungen wurde laserflowmetrisch der Blutfluss im Anastomosengebiet zu den jeweiligen Zeitpunkten vor Entnahme des Anastomosensegments registriert. Anschließend konnte, nach Entnahme der anastomosierten Darmstücke, die tangentielle Wandspannung zum Zeitpunkt der Organberstung bei Luftinsufflation im Wasserbad sowie die lineare Zugfestigkeit an einem Instron®-Tensiometer ermittelt werden. Zusätzlich wurde die Lokalisation der Organberstung im Berstungs- und Zugversuch notiert und mit H&E-gefärbte Gewebeschnitte zur histologischen Auszählung der Gesamtzahl an Entzündungszellen angefertigt.

Im zweiten Teil dieser Studie wurde nach Aufbereitung der im ersten Teil gewonnenen Gewebeproben das Zytokinmuster des Wachstumsfaktors TGF  $\beta$ 1, des Chemokins RANTES und des leukotaktischen Peptides IL-10 im Heilungsverlauf nach primärer Colonanastomosierung bestimmt. Dazu wurde in einem ersten Schritt der Proteingehalt der einzelnen Anastomosenproben mittels eines Bio-Rad®-Protein-Assays ermittelt. Im zweiten Schritt wurde dann die Zytokinkonzentration der gleichen Proben unter

Verwendung spezieller Biosource®-ELISA-Kits gemessen und der Zytokingehalt bezogen auf einen durchschnittlichen Gesamtproteingehalt von 430 µg im Zeitverlauf der Anastomosenheilung dargestellt.

Es zeigten sich charakteristische Verläufe der gemessenen Blutflusswerte, Wandspannungswerte und Zugfestigkeiten sowie der ausgezählten Entzündungszellzahlen und immunochemisch bestimmten Zytokinmuster im Anastomosenbereich.

Der Blutfluss fiel dabei, unabhängig vom verwendeten Faden, vom Tag 0 zum Tag 7 im oberen und unteren Anastomosenbereich kontinuierlich ab und kehrte anschließend wieder über den 14. zum 90. postoperativen Tag auf seine Ausgangswerte zurück. Statistisch signifikante Erhöhungen der Fluxwerte vom 30. auf den 90. Tag lassen auf über den 14. postoperativen Tag hinaus andauernde Umbauvorgänge in der Darmwand schließen.

Die lineare Zugfestigkeit der Colonanastomosen stieg, unabhängig vom verwendeten Faden, nach einem Tief am Tag +3 kontinuierlich und signifikant bis zum Tag +90 wieder an. Im Einzelvergleich zeigte Monocryl® in der frühen Phase der Anastomosenheilung (Tag +3) signifikant bessere Zugfestigkeitsergebnisse als die Fäden Biosyn® und Monosyn®.

Die Werte der registrierten tangentialen Wandspannung im Anastomosenbereich zeigten dagegen einen kurvenförmigen Verlauf, mit einem Maximum am Tag +14 und anschließendem Wiederabfall bis zum 90. postoperativen Tag. Nur der Faden Monosyn® zeigte in der Gruppe der 30-Tagestiere signifikant höhere maximale Wandspannungswerte als der Faden Biosyn®. Die Fäden wiesen jedoch im gesamten Zeitverlauf im Hinblick auf die Anastomosenstabilität keine Unterschiede auf. Lediglich der Einzelvergleich zeigte zu bestimmten Zeitpunkten statistisch nachweisbare Unterschiede.

Der Verlauf der tangentialen Wandspannungswerte im Anastomosenbereich steht in Einklang mit einer am Tag +14 überschüssigen Kollagenfaserbildung, die für die besonders hohen Messwerte zu diesem Zeitpunkt verantwortlich ist. Die noch vom 30. auf den 90. Tag signifikante Steigerung der linearen Zugfestigkeit der Anastomose, zeigt ebenso wie die Blutflussmessungen im Vergleich zu anderen Studien noch Umbauvorgänge in der Darmwand zu einem sehr späten Zeitpunkt der Anastomosenheilung an.

Betrachtet man noch die Lokalisation des Darmwandbruches bei den Zug- und Berstungsdruckmessungen im Einzelvergleich der Fäden, so rupturieren alle mit Maxon® operierten Anastomosen noch am 7. postoperativen Tag unmittelbar auf dem Anastomosenspalt. Dies spricht gegen die Verwendung dieses Fadens zur Erstellung von Handnahtanastomosen am Colon.

Schließlich zeigte das Auszählen der mit H&E-gefärbten Anastomosenschnitte ein für den physiologischen Wundheilungsverlauf charakteristisches Maximum an polymorphkernigen Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten am dritten postoperativen Tag. Keiner der Fäden zeigte in der histologischen Betrachtung ein auffällig geringeres oder größeres Entzündungsverhalten im Zeitverlauf.

Neben der Betrachtung des Heilungsverhaltens der Colonanastomose unter Verwendung etablierter physikalischer Messmethoden, wurde jetzt auch erstmals das Zytokinmuster einiger am Wundheilungsprozess beteiligter und untersuchter Faktoren bestimmt. Der in den Kollagenmetabolismus der heilenden Wunde eingreifende Wachstumsfaktor TGF  $\beta$ 1 zeigte nach einer suppressiven Phase am Tag +3 einen Wiederanstieg über den 7. bis zum 90. postoperativen Tag. Der vom 30. zum 90. postoperativen Tag noch signifikant ansteigende TGF  $\beta$ 1-Gehalt im Anastomosenbereich spricht wiederum für wesentliche Umbauvorgänge, die noch über den 30. Tag der Wundheilung in der Darmwand stattfinden. Diese könnten die hier ebenfalls noch ansteigenden Zugfestigkeitswerte aus den physikalischen Messungen erklären.

Für Wundheilungsprozesse am Colon weniger gut erforscht sind die beiden Zytokine RANTES und IL-10, die im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen wichtige Regulatoren darstellen. Ihr gemeinsame zweiphasige Kinetik zeigt unmittelbar am Tag 0 eine Upregulation, wobei RANTES hier initial eine leukotaktische Funktion zukommen könnte. IL-10 dagegen scheint durch sein vermehrtes Auftreten im Anastomosenspalt eine antagonistische Funktion hierzu zu übernehmen. Am Tag +7 dagegen zeigen beide Zytokine ein Stadium der Downregulation bei abfallenden Spiegeln und stabilisieren sich dann bis zum 90. Tag auf Werte des nicht-operierten Darmes. Eine überschießende RANTES-Expression wäre zu diesem Zeitpunkt der Wundheilung kontraproduktiv gegenüber nun geforderten stabilen Wundverhältnissen. Der abfallende IL-10-Gehalt lässt sich nicht eindeutig schlüssig erklären und könnte als

physiologische Aktivitätsminderung bei Stabilisierung der Wunde auf ein normales Niveau verstanden werden.

Die durchgeführten Untersuchungen stellen also einen Baustein im Verständnis des molekularen Wundheilungsprozesses der Colonanastomose dar. Erst wenn aber dieser Ablauf vollständig verstanden wurde, erscheint ein gezielter Eingriff in den Heilungsprozess durch den Einsatz rekombinanter Zytokine oder Zytokinrezeptorblockern zu bestimmten Zeitpunkten potentiell sinnvoll.

## 8. Literaturverzeichnis

**Adams J.K.**, Tepperman B.L.: Colonic production and expression of IL-4, IL-6 and IL-10 in neonatal suckling rats after LPS challenge. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2001, Apr), 280(4):G755-762

**Agner T.**, Serup J.: Individual and instrumental variations in irritant patch-test reactions – clinical evaluation and quantification by bioengineering methods. *Clin Exp Dermatol* (1990), 15:29-33

**Amento E.P.**, Beck L.S.: TGF-beta and wound healing. *Ciba Found Symp* (1991), 157:115-123

**Ajuebor M.N.**, Das A.M., Virag L., Szabo C., Perretti M.: Regulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression and function by endogenous interleukin-10 in a model of acute inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* (1999a, Feb), 16;255(2):279-82

**Ajuebor M.N.**, Das A.M., Virag L., Flower R.J., Szabo C., Perretti M.: Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol* (1999b, Feb), 1;162(3):1685-91

**Ajuebor M.N.**, Hogaboam C.M., Kunkel S.L., Proudfoot A.E., Wallace J.L.: The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *J Immunol* (2001, Jan), 166(1): 552-558

**Aszodi A.**, Ponsky J.L.: Effect of corticosteroids on the healing of bowel anastomosis. *Am J Surg* (1984), 50:546-548

**Barnes D.A.**, Tse J., Kaufhold M., Owen M., Hesselgesser J., Strieter R., Horuk R., Perez H.D.: Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. *J Clin Invest* (1998), 101:2910

**Basson M.D.:** Mucosal healing and adaptation in the small intestine. *Curr Opin Gen Surg* (1994), p 138-146

**Basson M.D.,** Modlin I.M., Flynn S.D., Jena B.P., Madri J.A.: Independent modulation of enterocyte migration and proliferation by growth factors, matrix proteins and pharmacologic agents in an vitro model of mucosal healing. *Surgery* (1992, Aug), 112(2): 299-307

**Beck L.S.,** DeGuzman L., Lee W.P., Xu Y., Siegel M.W., Amento E.P.: One systemic administration of transforming growth factor-beta reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest* (1993, Dec), 92(6):2841-2849

**Braskén P.:** Healing of experimental colon anastomosis. *Eur J Surg Suppl* (1991), 566:1-51

**Buckmire M.A.,** Parquet G., Greenway S., Rolandelli R.H.: Temporal expression of TGF-beta1, EGF and PDGF-BB in a model of colonic wound healing. *J Surg Res* (1998, Nov), 80(1):52-57

**Chen M.M.,** Lam A., Abraham J.A., Schreiner G.F., Loly A.H.: CTGF expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* (2000), 32:1805-1819

**Chensue S.W.,** Warmington K.S., Allenspach E.J., Lu B., Gerard C., Kunkel S.L., Lukacs N.W.: Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J Immunol* (1999), 163:165

**Chlumsky V.:** Experimentelle Untersuchungen über die verschiedenen Methoden der Darmvereinigung. *Bruns' Beitr Klin Chir* (1899), 25:539ff

**Christensen H.,** Flyvbjerg A.: Dose-dependent stimulatory of human growth hormone on the strength and collagen deposition of colonic anastomoses in the rat. *Acta Endocrinol Copenh* (1992, May), 126(5):438-443

**Christensen H.**, Oxlund H.: Growth hormone increases the collagen deposition rate and breaking strength of left colonic anastomoses in rats. *Surgery* (1994, Sep), 116(3):550-556

**Ciacci C.**, Lind S.E., Podolsky D.K.: Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* (1993, Jul), 105(1):93-101

**Conti P.**, Reale M., Barbacane R.C., Letourneau R., Theoharides T.C.: Intramuscular injection of hrRANTES causes mast cell recruitment and increased transcription of histidine decarboxylase in mice: lack of effects in generally mast cell-deficient W/WV mice. *FASEB j* (1998), 12:1693

**Cronin K.**, Jackson D.S., Dunphy J.E.: Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. *Surg Gynecol Obstet* (1968a), 126:747-756

**Cronin K.**, Jackson D.S., Dunphy J.E.: Specific activity of hydroxyproline-tritium in healing colon. *Surg Gynecol Obstet* (1968b), 126:1061-1065

**Das A.M.**, Ajuebor M.N., Flower R.J., Peretti M., McColl S.R.: Contrasting roles for RANTES and macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in a murine model of allergic peritonitis. *Clin Exp Immunol* (1999), 117:223

**Debus E.S.**: Experimentelle und Klinische Untersuchungen zum Biofragmentierbaren Anastomosenring am Extraperitonealen Rektum. Medizinische Habilitation, Universität Würzburg; (1998), S 12-16 und 99

**Debus E.S.**, Geiger D., Lünstedt B., Schultz U., Thiede A.: Biofragmentable anastomosis ring, stapler and hand suture: a comparison of three different anastomotic procedures in the large bowel of pigs. In: *Compression Anastomosis by Biofragmentable Rings*. Engemann R, Thiede A (Eds), Springer-Verlag (1995), pp 25-34

**Debus E. S.**, Schmidt K., Ziegler U. E., Thiede A.: Wachstumsfaktoren in der Wundheilung - die Kluft zwischen Experiment und klinischem Einsatz. Zeitschrift für Wundheilung (2000, Feb), 5(12):14-33

**Deveney K.D.**, Way L.W.: Effect of different absorbable sutures on healing of gastrointestinal anastomoses. Am J Surg (1977), 133:86-94

**Dieleman L.A.**, Elson C.O., Tennyson G.S., Beagley K.W.: Kinetics of cytokine expression during healing of acute colitis in mice. Am J Physiol (1996, Jul), 271:G130-136

**Diener H.**: Abbauverhalten der in der Viszeralchirurgie gängigsten Nahtmaterialien in unterschiedlichen Geweben und deren Abbau beeinflussende Faktoren - Eine experimentelle Studie in vivo und in vitro. Inaugural Dissertation, Universität Würzburg; (2001) S 116 und S 125

**Dignass A.U.**, Stow J.L., Babyatsky M.W.: Acute epithelial injury in the rat small intestine in vivo is associated with expanded expression of transforming growth factor alpha and beta. Gut (1996, May), 38(5):687-693

**Egger B.**, Inglin R., Zeeh J., Dirsch O., Huang Y., Buchler MW.: Insulin-like growth factor I and transduced keratinocyte growth factor accelerate healing of left-sided colonic anastomoses. British Journal of Surgery (2001, Jan), 88(1):90-98

**Egger B.**, Tolmos J., Procaccino F., Sarosi I., Friess H., Buchler M.W., Stamos M., Eysselein V.E.: Keratinocyte growth factor promotes healing of left-sided colon anastomoses. Am J Surg (1998, Jul), 176(1):18-24

**Engelhardt E.**, Tokosoy A., Goebeler M., Debus S., Bröcker E.-B., Gillitzer R.: Chemokines IL-8, GRO $\alpha$ , MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. Am J Path (1998), 153:1849-1860

**Foster M.E.**, Brennan S.S., Morgan A., Leaper D.J.: Colonic ischaemia and anastomotic healing. *Eur Surg Res* (1985), 17:133

**Frank S.**, Kampf H., Wetzler C., Stallmeyer B., Pfeilschifter J.: Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for the nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J* (2000, Apr), 347 Pt 1:265-273

**Gemsa D.**, Kahlen J.R., Resch K.: Zytokine. In: *Immunologie: Grundlagen-Praxis-Klinik*. Thieme; Stuttgart; (1997), S 56-64

**Genzini T.**, D'Albuquerque LA, de Miranda MP, Scafuri MP, de Oliveira e Silva A.: Intestinal anastomoses. *Rev Paul Med* (1992, Jul-Aug), 110(4):183-192

**Gilmour L.C.**, Roe R.D., Aitkenhead A.R., Hothersall A.P.: The effect of hypovolemia on colonic blood flow in the dog. *Br J Surg* (1980), 67:82-84

**Goke M.**, Zuk A., Podolsky D.K.: Regulation and function of extracellular matrix intestinal epithelial restitution in vitro. *Am J Physiol* (1996, Nov), 271(5 Pt 1):G729-740

**Gottrup F.**: Healing of incisional wounds in stomach and duodenum. Collagen distribution and relation to mechanical strength. *Am J Surg* (1981), 141:222-227

**Greenstein A.**, Rogers P., Moss G.: Doubled fourth-day colorectal anastomotic strength with complete retention of intestinal mature wound collagen and accelerated deposition following full enteral nutrition. *Surg Forum* (1978), 29:78-81

**Hallböök O.**, Johanssen K., Sjö Dahl R.: Laser Doppler flow measurement in rectal resection for carcinoma – comparison between the straight and colonic J pouch reconstruction. *Br J Surg* (1996), 83:389-392

**Hendriks T.**, Vereecken T.H.L.B., Hesp W.L.E.M., Schillings P.H.M., deBoer H.H.M.: Loss of collagen from experimental intestinal anastomoses: early events. *Exp Mol Pathol* (1985), 42:411-418

**Herrmann J.B.**, Woodward S.C., Pulaski E.J.: Healing of colonic anastomoses in the rat. *Surg Gynec Obstet* (1964), 119:269

**Hesp F.L.E.M.**, Hendriks T., Lubbers E.-J.C., deBoer H.H.M.: Wound healing in the intestinal wall. A comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. *Dis Colon Rectum* (1984), 27:99-104

**Hesp F.L.E.M.**, Hendriks T., Schilling P.H., Lubbers E.J., deBoer H.H.M.: Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. *Br J Exp Pathol* (1985), 66:511-518

**Högström H.**, Haglund U.: Postoperative decrease in suture holding capacity in laparotomy wounds and anastomoses. *Acta Chir Scand* (1985), 151:533-535

**Ibelgauft H.**: IL-10. In: Horst Ibelgaufts' Hypertext Information Universe of Cytokines. Version 4.0. (1999, Aug), [www.copewithcytokines.de/cope.cgi?3267](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?3267), 1-8

**Ibelgauft H.**: RANTES. In: Horst Ibelgaufts' Hypertext Information Universe of Cytokines. Version 4.0. (1999, Aug), [www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5293](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5293), 1-4

**Ibelgauft H.**: TGF-beta. In: Horst Ibelgaufts' Hypertext Information Universe of Cytokines. Version 4.0. (1999, Aug), [www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5932](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5932), 1-15

**Ibelgauft H.**: Wound Healing. In: Horst Ibelgaufts' Hypertext Information Universe of Cytokines. Version 4.0. (1999, Aug), [www.copewithcytokines.de/cope.cgi?006551](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?006551), 1-7

**Irvin T.T.**: Effects of malnutrition and hyperalimentation on wound healing. *Surg Gynecol Obstet* (1978), 146:33-37

**Jakobsson A.**, Nielsson G.E.: Prediction of sampling depth and photon pathlength in laser Doppler flowmetry. *Med Biol Eng Comput* (1993), 31:301-307

**Jiborn H.**, Ahonen J., Zederfeld B.: Healing of experimental colonic anastomoses. I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg* (1978a), 136:587-594

**Jiborn H.**, Ahonen J., Zederfeld B.: Healing of experimental colonic anastomoses. II. Breaking strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg* (1978b), 136:595-599

**Jiborn H.**, Ahonen J., Zederfeld B.: Healing of experimental colonic anastomoses. III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. *Am J Surg* (1980), 139:398-405

**Jönsson K.**, Jiborn H., Zederfeldt B.: Breaking strength of small intestinal anastomosis. *Am J Surg* (1983), 145:800-803

**Johansson K.**, Jakobsson A., Lindahl K., Lindhagen J., Lundgren O., Nilsson G.E.: Influence of fibre diameter and probe geometry on the measuring depth of laser Doppler flowmetry in the gastrointestinal application. *Int J Microcirc Clin Exp* (1991), 10:219-229

**Karahasanoglu T.**, Altinli E., Hamzaoglu I., Paksoy M., Yesildere T., Alemdaroglu K.: Effect of growth hormone treatment on the healing of left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. *Br J Surg* (1998), 85:931-933

**Karanjia N.D.**, Corder A.P., Bearn P., Heald R.J.: Leakage from stapled anastomosis after total mesorectal excision for carcinoma of the rectum. *Br J Surg* (1994), 81:1224-1226

**Kashiwagi H.**: The lower limit of tissue blood flow for safe colonic anastomosis: an experimental study using laser Doppler velocimetry. *Surg Today* (1993), 23:430-438

**Kilam S.K.**, Jackson F.L., Williams H.T.: Bacterial peritonitis and the bursting strength of intestinal anastomoses. *Can J Surg* (1975, Jul), 18(4):372-375

**Knoop M.**, Keck H.: Monofile absorbierbare Nahtmaterialien. *Zent bl Chir* (1990), 115:1339-1342

**Knoop M.**, Lünstedt B., Thiede A.: Maxon und PDS - Bewertung physikalischer und biologischer Eigenschaften monofiler, absorbierbarer Nahtmaterialien. *Langenbecks Arch Chir* (1987), 371:13-28

**Kontic M.M.:** Sutures in surgery of the colon. *Acta Chir Jugosl* (1994), 41(2Suppl2):253-255

**Koruda M.J.**, Rolandelli R.H.: Experimental studies in the healing of colonic anastomoses. *Surg Res* (1990), 48:504-515

**Kostic L.L.:** Sutures in digestive surgery. *Acta Chir Jugosl* (1994), 41(2Suppl2): 211-220

**Kramer A.**, Piatek S., Schulz H.-U., Tautenhahn J., Wagemann W.: Wachstumsfaktoren. In: Lippert H.: *Wundatlas-Wunde, Wundbehandlung und Wundheilung*. J. A. Barth; Heidelberg (2001), S 77-81

**Kühnel W.:** Anatomie des Rektums. In: *Rektumkarzinom*. Reifferscheidt M (Hrsg), Springer-Verlag (1983), S 14-17

**Kuhn R.**, Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W.: Interleukin-10-deficient mice develop chronic colitis. *Cell* (1993, Oct), 75(2):203-205

**Lange R.**, Lütgens S.: Komplikationen der Anastomosenheilung nach Resektion wegen Morbus Crohn – eine retrospektive Studie. In: *Die Anastomose am Gastrointestinaltrakt*. Eigler FW, Gross E, Vogt E (Hrsg). TM-Verlag (1990), S 145-147

**Lünstedt B.**, Debus E.S.: Wundheilungsdauer und Gewebewiderstand als wichtige Kriterien für die Wahl des Nahtmaterials in der Colonchirurgie. *Chirurg* (1990), 61:717-719

**Luster A.D.:** Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med* (1998, Feb), 333(7):436-445

**Mann B.**, Kleinschmidt S., Stremmel W.: Prospective study of hand-sutured anastomosis after colorectal resection. *Br J Surg* (1996, Jan), 83(1):29-31

**Matsusue S.**, Walser M.: Healing of intestinal anastomoses in adrenalectomized rats given corticosterone. *Am J Physiol* (1992), 263:164-168

**McGee G.S.**, Broadley K.N., Buckley A., Aquino A., Woodward S.C., Demetriou A.A., Davidson J.M.: Recombinant transforming growth factor beta accelerates incisional wound healing. *Curr Surg* (1989), 46:103-106

**Meurer R.**, Van Riper G., Feeney W., Cunningham D., Hora D., Springer M.S., MacIntyre D.E., Rosen H.: Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1alpha, or human interleukin 8. *J Exp Med* (1993), 178:1913

**Mickley V.**, Neitzel J. R., Reismann B.: Fortlaufende Darmnaht mit Polydioxanon. *Zent Bl Chir* (1991), 116:593-600

**Moore K.W.**, O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P, Mosmann T.R.: Interleukin 10. *Annu Rev Immunol* (1993), 11:165-190

**Mustoe T.A.**, Landes A., Cromack D.T., Mistry D., Griffin A., Deul T.F., Pierce G.F.: 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, Aug), 108(2):329-330

**Mustoe T.A.**, Pierce G.F., Thomason A., Gramates P., Sporn M.B., Deuel T.F.: Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor beta. *Science* (1987, Sep), 237(4820):1333-1336

**Mutter D.**, Aprahamian M., Damge C., Sonzini P., Marescaux J.: Biomaterial supports for colonic wall defect healing – an experimental study in the rat. *Biomaterials* (1996, Jul), 17(14):1411-1415

**Nelsen T.S.**, Anders C.J.: Dynamic aspects of small intestinal rupture with special consideration of anastomotic strength. *Arch Surg* (1966), 93:309-314

**Nöthinger F.**, Ziegler W.J., Finger J., Kaufmann R.: Nahtmaterial in der Darmanastomose. *Helvetica Chirurgica Acta Suppl* 14 (1980), 5-42

**Oft M.**, Heider K.-H., Beug H.: TGF beta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Bio* (1998), 8:1243-1252

**Okada M.**, Bothin C., Kanazawa K., Midtvedt T.: Experimental study of the influence of the intestinal flora on the healing of intestinal anastomoses. *Br J Surg* (1999, Jul), 86(7):961-965

**O’Kane S.**, Ferguson M.W.: Transforming growth factor beta and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* (1997, Jan), 29(1):63-78

**Panzer U.**, Schneider A., Wilken J., Thompson D.A., Kent S.B., Stahl R.A.: The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* (1999), 56:2107

**Pattison J.**, Nelson P.J., Huie P., von Leuttichau I., Farshid G., Sibley R.K., Krensky A.M.: RANTES chemokine expression in cell mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet* (1994), 343(8891):209-211

**Raju T.N.**: The Nobel chronicles. 1986: Stanley Cohen (b 1922); Rita Levi-Montalcini (b 1909). *Lancet* 2000 Feb 5;355(9202):506

**Paul R.G.**, Tarlton J.F., Purslow P.P.: Biomechanical and biochemical study of a standardized wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* (1997), 149:600-608

**Peacock E.E.**: Wound repair. Saunders, 3<sup>rd</sup> edition (1984)

**Petersen T.I.**, Kissmeyer-Nielsen P., Flyvbjerg A., Laurberg S., Christensen H.: Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) administration on the healing of colonic anastomoses in rats. *Int J Colorectal Dis* (1996), 11(1):19-24

**Pierce G.F.**, Mustoe T.A., Lingelbach J., Masakowski V.R., Griffin G.L., Senior R.M., Deuel T.F. : Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* (1989, Jul), 109(1):429-440

**Pittet J.-F.**, Griffiths M.J.D., Geiser T., Kaminski N., Dalton S.L., Huang X., Brown L.A.S., Gotwals P.J., Koteliansky V.E., Matthay M.A., Sheppard D. : TGF beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* (2001), 107:1537-1544

**Popovic M.R.**: Characteristics of surgical sutures in the duodenum and small intestine. *Acta Chir Jugosl* (1994), 41(2Suppl 2):239-242

**Postlethwait R.W.**, Willigan D.A., Ulin A.W.: Human tissue reaction to sutures. *Ann Surg* (1975), 181:144-150

**Pschyrembel W.**: *Klinisches Wörterbuch*. 257. Aufl. Walter de Gruyter. Berlin, New York (1994), S 391

**Raju T.N.**: The Nobel chronicles. 1986: Stanley Cohen (b 1922); Rita Levi-Montalcini (b 1909). *Lancet* (2000, Feb 5), 355(9202):506

**Rao S.**, Bezwada, Dennis D., Jamiolkowski, In-Young Lee, Vishvaroop Agarwal: Monocryl suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture. *Biomaterials* (1995, Jan), 16(15):1141-1148

**Raab M.**, Junginger Th., Schüchten H., Pichlmaier H.: Auswirkungen verschiedener Nahtmaterialien und Nahttechniken auf die Belastbarkeit von Gastrotomien. *Therapiewoche*. (1980), 30:1705-1709

**Riddick D.H.**, DeGrazia C.T., Maenza R.M.: Comparison of polyglactic and polyglycolic acid sutures in reproduction tissue. *Fert Steril* (1977), 28:1220-1225

**Sailer M.**, Debus E.S., Fuchs K.-H., Beyerlein J., Thiede A.: Comparison of anastomotic microcirculation in coloanal J-pouches versus straight and side-to-end coloanal reconstruction: an experimental study in the pig. *Int J Colorectal Dis* (2000), 15: 114-117

**Sandberg N.**, Zederfeldt B.: The tensile strength of healing wounds and collagen formation in rats and rabbits. *Acta Chir Scand* (1968), 126:187-196

**Sato Y.**, Ohshima T, Kondo T.: Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* (1999, Nov), 265(1):194-199

**Schall T.J.**, Bacon K., Toy K.J., Goeddel D.V.: Selective attraction of monocytes and T- lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* (1990), 347:669

**Schardey H.M.**, Joosten U., Finke U., Staubach K.H., Schauer R., Heiss A., Kooistra A., Rau H.G., Nibler R., Lüdeling S., Unertl K., Ruckdeschel G., Exner H., Schildberg F.W.: The prevention of anastomotic leakage after total gastrectomy with local decontamination. *Ann Surg* (1997), 225:172-180

**Scheele J.**, Heesemann B., Pesch H.J.: Kolonanastomosen im Tierexperiment. Mechanische und morphologische Befunde. *Z Exp Chir* (1978), 11:110-120

**Seyer-Hansen M.**, Andreassen T.T., Christensen H., Oxlund H.: Effect of experimental diabetes and growth hormone administration on the strength of colonic anastomoses in rats. *Eur Surg Res* (1999), 31(5):419-428

**Shephard A.P.**, Öberg P.A.: Laser Doppler Flowmetry. Norwell (1990): Kluwer Academic Publishers Group

**Sheppard D.**: Integrin-mediated activation of transforming growth factor-beta 1 in pulmonary fibrosis. *Chest* (2001, July), 120(1):49S-53S

**Sigurdsson G.H.**, Banic A., Christenson J.T.: Microcirculation in the gastrointestinal tract. *Dig Surg* (1996), 13:250-254

**Slavin J.**, Nash J.R., Kingsnorth A.N.: Effect of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor on steroid-impaired healing of intestinal wounds. *Br J Surg* (1992, Jan), 79(1):69-72

**Smit I.B.**, Witte E., Brand R., Trimbos J.B.: Tissue Reaction to Suture Materials Revisited: Is There Argument to Change Our Views? *Eur Surg Res* (1991), 23:347-354

**Sporn M.B.**, Roberts A.B., Wakefield L.M., Assoian R.K.: Transforming growth factor beta: biological function and chemical structure. *Science* (1986), 223:532-534

**Stelzner F.**: Vorbeugung der intraperitonealen Nahtinsuffizienz. *Langenbecks Arch Chir* (1982), 358:259-263

**Stone I.K.**: Suture Materials. *Clin Obst And Gyn* (1988, Sep), 31(3):712-718

**Taub D.D.**, Oppenheim J.J.: Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol* (1994, Aug), 1(4):229-246

**Tenland T.**, Salerud E.G., Nilsson G.E., Öberg P.A.: Spatial and temporal variations in human skin blood flow. *Int J Microcirc* (1983), 2:81-90

**Thiede A.**, Jostarndt L., Schröder D., Schubert G., Hamelmann H.: Prospective and controlled studies in colorectal surgery: a comparison of hand-sutured and stapled rectal anastomoses. In: Principles and practice of surgical stapling. Ravitch MM, Steichen FM (Eds), (1987), Year Book Medical Publishers, pp 432-462

**Thornton F.J.**, Barbul A.: Healing in the gastrointestinal tract. Surg Clin North Am (1997, Jun), 77(3):549-573

**Van der Ham A.C.**, Kort W.J., Weijma I.M., van den Ingh H.F., Jeekel H.: Healing of ischemic colon anastomoses: fibrin sealant does not improve wound healing. Dis Colon Rectum (1992, Sep), 35(9):884-891

**Verhofstad M.H.J.**, Lange W.P., Jeroen A.W., van der Laak M., Verhofstad A.A.J., Hendriks T. : Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rat. Dis Colon Rectum (2001, March), 44 :423-431

**Vogt P.M.**, Peter F.W., Topskal E., Torres A., Steinau H.U.: Zum Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Therapie chronischer Wunden. Chirurg (1998), 69:1197

**Wise L.**, Mc Alister W., Stein T., Schuck P.: Studies on the healing of anastomoses of small and large intestine. Surg Gynecol Obstet (1975), 141:190-194

## 9. Anhang

## Tabellen zum Ergebnissteil

**Tab. 4.2.1.a:** Intestinaler Blutfluss (Flux) dargestellt als prozentualer Anteil von der Durchblutung des unpräparierten Colon transversum (=100 %) einen Zentimeter proximal der oberen Anastomose (>O.A.), auf der oberen Anastomose (O.A.) und einen Zentimeter distal der oberen Anastomose (<O.A.). n = Zahl untersuchter Tiere. Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ .

<b>&gt;O.A.</b>	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90
<b>Tierzahl n</b>	20	8	8	12	19	22
<b>Mittelwert Flux / %</b>	175,3	120,7	65,4	80,6	108,1	164,1
<b>Standardabw.</b>	61,5	76,4	39,5	41,1	40,1	46,9
<b>Signifikanz p versus Vortag</b>	0,811 versus 90	<b>0,027</b>	n.s.	n.s.	<b>0,032</b>	<b>&lt; 0,01</b>
<b>O.A.</b>	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90
<b>Mittelwert Flux / %</b>	80,9	58,5	50,8	73,2	47,4	80,0
<b>Standardabw.</b>	32,8	13,6	27,3	35,4	21,1	26,9
<b>Signifikanz p versus Vortag</b>	0,87 versus 90	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,047</b>	<b>&lt; 0,01</b>
<b>&lt;O.A.</b>	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90
<b>Mittelwert Flux / %</b>	171,0	137,5	59,1	81,8	101,7	155,8
<b>Standardabw.</b>	54,8	72,7	32,1	45,6	35,8	45,4
<b>Signifikanz p versus Vortag</b>	0,358 versus 90	n.s.	<b>0,021</b>	n.s.	n.s.	<b>&lt; 0,01</b>

**Tab. 4.2.1.b:** Intestinaler Blutfluss (Flux) dargestellt als prozentualer Anteil der Durchblutung des unpräparierten Colon transversum (=100%) einen Zentimeter proximal der unteren Anastomose (>U.A.), auf der unteren Anastomose (U.A.) und einen Zentimeter distal der unteren Anastomose (<U.A.). n = Zahl untersuchter Tiere. Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ .

>U.A.	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90
<b>Tierzahl n</b>	20	8	8	12	19	22
<b>Mittelwert Flux / %</b>	151,5	120,8	62,7	79,7	107,0	151,6
<b>Standardabw.</b>	50,0	53,1	42,5	42,1	43,8	31,2
<b>Signifikanz p versus Vortag</b>	0,920 versus 90	n.s.	<b>0,027</b>	n.s.	<b>0,032</b>	<b>0,001</b>
U.A.	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90
<b>Mittelwert Flux / %</b>	66,4	73,1	60,6	75,0	60,4	86,5
<b>Standardabw.</b>	18,3	24,0	26,5	49,1	37,0	22,5
<b>Signifikanz p versus Vortag</b>	<b>0,005</b> versus 90	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,012</b>
<U.A.	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90
<b>Mittelwert Flux / %</b>	143,3	134,7	76,0	93,0	130,3	160,4
<b>Standardabw.</b>	50,5	58,0	43,4	43,9	58,4	41,3
<b>Signifikanz p versus Vortag</b>	0,194 versus 90	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

**Tab. 4.2.2.a:** Mittlere Zugfestigkeit in Newton (N) der Darmsegmente im postoperativen Zeitverlauf mit Darstellung der Zahl zur Auswertung gekommener Tiere n sowie der Signifikanzen (p im Mann-Whitney-U-Test < 0,05 = signifikant, < 0,01 =hochsignifikant).

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90	Kontrolle
Tierzahl n	20	14	19	17	22	22	5
Mittelwert [N]	1,60	0,95	2,23	3,08	3,30	<b>4,38</b>	3,45
Standardabw.	0,49	0,37	0,36	0,63	0,73	1,17	0,62
Signifikanz p		<b>0,001</b> versus 0	< <b>0,01</b> versus 3	< <b>0,01</b> versus 7	n.s. versus 14	<b>0,002</b> versus 30	
	<b>0,001</b> versus Ko	<b>0,001</b> versus Ko	<b>0,001</b> versus Ko	<b>0,011</b> versus Ko	n.s. versus Ko	n.s. versus Ko	

**Tab. 4.2.2.b:** Medianwerte der Zugfestigkeiten der einzelnen Fäden im postoperativen Zeitverlauf mit Darstellung der zur Auswertung gekommenen Tiere sowie der Signifikanzen (p im Mann-Whitney-U-Test < 0,05 = signifikant, < 0,01 =hochsignifikant).

		Tierzahl n	Medianwerte der Zugfestigkeit in N mit Bereich	Signifikanz p			
				versus MC	versus MA	versus BS	versus MS
Tag 0	MC	5	1,68 (0,8-2,2)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	5	1,12 (0,97-1,35)	n.s.	/	<b>0,009</b>	<b>0,047</b>
	BS	5	1,8 (1,42-2,32)	n.s.	0,009	/	n.s.
	MS	5	<b>2,19</b> (1,09-2,47)	n.s.	0,047	n.s.	/
Tag 3	MC	4	<b>1,32</b> (1,2-1,36)	/	n.s.	<b>0,02</b>	<b>0,034</b>
	MA	3	0,71 (0,48-1,66)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	4	0,55 (0,5-0,86)	0,02	n.s.	/	n.s.
	MS	3	0,94 (0,7-1,19)	0,034	n.s.	n.s.	/
Tag 7	MC	6	2,17 (1,81-2,52)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	3	2,33 (2,05-2,43)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	2,3 (1,76-2,76)	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	2,02 (1,71-3,06)	n.s.	n.s.	n.s.	/
Tag 14	MC	6	3,15 (2,2-4,9)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	3	2,9 (2,5-3,1)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	2,77 (2,28-3,87)	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	3	3,17 (2,88-3,3)	n.s.	n.s.	n.s.	/

Tag 30	MC	6	3,02 (2,43-4,33)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	6	3,13 (2,52-4,74)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	3,24 (2,83-3,65)	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	3,46 (2,39-4,43)	n.s.	n.s.	n.s.	/
Tag 90	MC	6	<b>4,77</b> (2,0-6,88)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	6	4,41 (2,89-5,56)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	4,63 (2,42-5,01)	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	4,2 (2,4-5,74)	n.s.	n.s.	n.s.	/
Kontrolle		5	3,9 (3,28-4,9)				

**Tab. 4.2.2.c:** Absolute Häufigkeiten und Lokalisationen der Gewebszerreißen bei der Zugfestigkeitsmessung zu den Operationszeitpunkten 0, 3, 7, 14, 30 und 90 Tagen in Abhängigkeit vom verwendeten Nahtmaterial.

Tag	Lokalisation	Monocryl®	Maxon®	Biosyn®	Monosyn®	Gesamt
0	Innerhalb der Anastomose	5	5	5	5	<b>20</b>
	Ausserhalb der Anastomose	0	0	0	0	0
3	Innerhalb der Anastomose	4	3	4	3	<b>14</b>
	Ausserhalb der Anastomose	0	0	0	0	0
7	Innerhalb der Anastomose	2	3	0	1	6
	Ausserhalb der Anastomose	4	0	5	4	<b>13</b>
14	Innerhalb der Anastomose	0	2	1	3	6
	Ausserhalb der Anastomose	6	1	4	0	<b>11</b>
30	Innerhalb der Anastomose	0	1	0	1	2
	Ausserhalb der Anastomose	6	5	6	5	<b>22</b>
90	Innerhalb der Anastomose	0	1	0	1	2
	Ausserhalb der Anastomose	6	5	5	4	<b>20</b>

**Tab. 4.2.3.a:** Mittlere Tangentiale Wandspannung in kN / m<sup>2</sup> der Darmsegmente im postoperativen Zeitverlauf mit Darstellung der Zahl zur Auswertung gekommener Tiere n sowie der Signifikanzen (p im Mann-Whitney-U-Test < 0,05 = signifikant, < 0,01 = hochsignifikant).

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90	Kontrolle
Tierzahl n	20	11	12	12	22	22	4
Mittelwert (kN/m <sup>2</sup> )	14,2	54,5	170,9	210,3	130,8	117,9	111,7
Standardabw.	6,8	26,4	35,9	41,7	35,4	27,3	37,1
Signifikanz p		< <b>0,01</b> versus 0	< <b>0,01</b> versus 3	<b>0,021</b> versus 7	< <b>0,01</b> versus 14	n.s. versus 30	
	<b>0,002</b> versus Ko	<b>0,037</b> versus Ko	<b>0,029</b> versus Ko	<b>0,029</b> versus Ko	n.s. versus Ko	n.s. versus Ko	

**Tab. 4.2.3.b:** Medianwerte der Tangentialen Wandspannung der einzelnen Fäden im postoperativen Zeitverlauf mit Darstellung der zur Auswertung gekommenen Tiere sowie der Signifikanzen (p im Mann-Whitney-U-Test < 0,05 = signifikant, < 0,01 =hochsignifikant).

	Tierzahl n	Medianwerte der Tangentialen Wandspannung in kN/m <sup>2</sup> mit Bereich	Signifikanz p				
			versus MC	versus MA	versus BS	versus MS	
Tag 0	MC	5	17,9 (8,2-31,6)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	5	9,4 (6,7-13,8)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	18,8 (9,9-22,4)	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	9,9 (4,5-18,3)	n.s.	n.s.	n.s.	/
Tag 3	MC	3	48,7 (48,4-66,8)	/	n.s.	n.s.	<b>0,05</b>
	MA	2	37,7 (26,4-49,0)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	3	104,5 (48,9-106,3)	n.s.	n.s.	/	<b>0,05</b>
	MS	3	35,7 (26,4-37,9)	<b>0,05</b>	n.s.	<b>0,05</b>	/
Tag 7	MC	3	206,9 (171,9-227,7)	/	<b>0,05</b>	n.s.	n.s.
	MA	3	116,3 (116,2-125,0)	<b>0,05</b>	/	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>
	BS	3	188,7 (151,5-213,5)	n.s.	<b>0,05</b>	/	n.s.
	MS	3	173,8 (169,2-189,8)	n.s.	<b>0,05</b>	n.s.	/
Tag 14	MC	3	250,2 (189,1-253,1)	/	n.s.	<b>0,05</b>	n.s.
	MA	3	219,7 (214,4-245,9)	n.s.	/	<b>0,05</b>	n.s.
	BS	3	135,0 (133,7-168,7)	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	/	<b>0,05</b>
	MS	3	239,8 (233,1-241,6)	n.s.	n.s.	<b>0,05</b>	/

Tag 30	MC	6	116,0 (84,0-157,9)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	6	142,9 (122,0-191,0)	n.s.	/	<b>0,028</b>	n.s.
	BS	5	90,7 (57,0-143,2)	n.s.	<b>0,028</b>	/	<b>0,009</b>
	MS	5	161,1 (148,1-177,5)	n.s.	n.s.	<b>0,009</b>	/
Tag 90	MC	6	122,6 (89,4-157,9)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	6	110,9 (65,3-138,7)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	121,9 (102,8-134,4)	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	122,1 (45,5-155,5)	n.s.	n.s.	n.s.	/
Kontrolle		4	98,7 (75,8-173,5)				

**Tab. 4.2.3.b:** Medianwerte der Tangentialen Wandspannung der einzelnen Fäden im postoperativen Zeitverlauf mit Darstellung der zur Auswertung gekommenen Tiere sowie der Signifikanzen (p im Mann-Whitney-U-Test < 0,05 = signifikant, < 0,01 =hochsignifikant).

		Tierzahl n	Medianwerte der Tangentialen Wandspannung in kN/m <sup>2</sup> mit Bereich	Signifikanz p			
				versus MC	versus MA	versus BS	versus MS
Tag 0	MC	5	17,9 (8,2-31,6)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	5	9,4 (6,7-13,8)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	18,8 (9,9-22,4)	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	9,9 (4,5-18,3)	n.s.	n.s.	n.s.	/
Tag 3	MC	3	48,7 (48,4-66,8)	/	n.s.	n.s.	<b>0,05</b>
	MA	2	37,7 (26,4-49,0)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	3	104,5 (48,9-106,3)	n.s.	n.s.	/	<b>0,05</b>
	MS	3	35,7 (26,4-37,9)	<b>0,05</b>	n.s.	<b>0,05</b>	/
Tag 7	MC	3	206,9 (171,9-227,7)	/	<b>0,05</b>	n.s.	n.s.
	MA	3	116,3 (116,2-125,0)	<b>0,05</b>	/	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>
	BS	3	188,7 (151,5-213,5)	n.s.	<b>0,05</b>	/	n.s.
	MS	3	173,8 (169,2-189,8)	n.s.	<b>0,05</b>	n.s.	/
Tag 14	MC	3	250,2 (189,1-253,1)	/	n.s.	<b>0,05</b>	n.s.
	MA	3	219,7 (214,4-245,9)	n.s.	/	<b>0,05</b>	n.s.
	BS	3	135,0 (133,7-168,7)	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	/	<b>0,05</b>
	MS	3	239,8 (233,1-241,6)	n.s.	n.s.	<b>0,05</b>	/

Tag 30	MC	6	116,0 (84,0-157,9)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	6	142,9 (122,0-191,0)	n.s.	/	<b>0,028</b>	n.s.
	BS	5	90,7 (57,0-143,2)	n.s.	<b>0,028</b>	/	<b>0,009</b>
	MS	5	161,1 (148,1-177,5)	n.s.	n.s.	<b>0,009</b>	/
Tag 90	MC	6	122,6 (89,4-157,9)	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	6	110,9 (65,3-138,7)	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	121,9 (102,8-134,4)	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	122,1 (45,5-155,5)	n.s.	n.s.	n.s.	/
Kontrolle		4	98,7 (75,8-173,5)				

**Tab. 4.2.3.c:** Absolute Häufigkeiten und Lokalisationen der Gewebszerreibungen bei der Berstungsdruckmessung nach 0, 3, 7, 14, 30 und 90 Tagen in Abhängigkeit vom verwendeten Nahtmaterial.

Tag	Lokalisation	Monocryl®	Maxon®	Biosyn®	Monosyn®	Gesamt
0	Innerhalb der Anastomose	5	5	5	5	<b>20</b>
	Ausserhalb der Anastomose	0	0	0	0	0
3	Innerhalb der Anastomose	3	3	3	3	<b>12</b>
	Ausserhalb der Anastomose	0	0	0	0	0
7	Innerhalb der Anastomose	0	3	0	1	4
	Ausserhalb der Anastomose	3	0	3	2	<b>8</b>
14	Innerhalb der Anastomose	0	1	2	2	5
	Ausserhalb der Anastomose	3	2	1	1	<b>7</b>
30	Innerhalb der Anastomose	2	2	0	1	5
	Ausserhalb der Anastomose	4	4	5	4	<b>17</b>
90	Innerhalb der Anastomose	0	0	1	2	3
	Ausserhalb der Anastomose	6	6	4	3	<b>19</b>

**Tab. 4.2.4.a:** Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten Entzündungszellzahl (EZZ) im Zeitverlauf mit Darstellung der Zahl zur Auswertung gekommener Tiere n sowie der Signifikanzen (p im Mann-Whitney-U-Test < 0,05 = signifikant, < 0,01 =hochsignifikant).

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90
Tierzahl n	20	11	12	12	22	22
Mittelwert EZZ absolut (gerundet)	60	150	92	87	40	31
Standardabw. (gerundet)	30	32	19	20	14	13
Signifikanz p		< <b>0,01</b> versus 0	< <b>0,01</b> versus 3	n.s. versus 14	< <b>0,01</b> versus 14	<b>0,018</b> versus 30

**Tab. 4.2.4.b:** Medianwerte der Entzündungszellzahlen (EZZ) im postoperativen Zeitverlauf unter Berücksichtigung des verwendeten Fadens und Darstellung der zur Auswertung gekommenen Tiere sowie der Signifikanzen (p im Mann-Whitney-U-Test < 0,05 = signifikant, < 0,01 =hochsignifikant).

		Tierzahl n	Medianwerte der EZZ mit Bereich	Signifikanz p			
				versus MC	versus MA	versus BS	versus MS
Tag 0	MC	5	50 ± 14	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	5	88 ± 26	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	84 ± 34	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	41 ± 14	n.s.	n.s.	n.s.	/
Tag 3	MC	3	191 ± 14	/	n.s.	<b>0,05</b>	n.s.
	MA	3	127 ± 30	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	3	127 ± 24	0,05	n.s.	/	n.s.
	MS	3	138 ± 14	n.s.	n.s.	n.s.	/
Tag 7	MC	3	96 ± 10	/	0,05	n.s.	n.s.
	MA	3	73 ± 5	0,05	/	n.s.	n.s.
	BS	3	98 ± 26	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	3	94 ± 13	n.s.	n.s.	n.s.	/
Tag 14	MC	3	85 ± 19	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	3	75 ± 21	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	3	104 ± 4	n.s.	n.s.	/	0,05
	MS	3	72 ± 7	n.s.	n.s.	0,05	/

Tag 30	MC	6	38 ± 8	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	6	43 ± 12	n.s.	/	n.s.	<b>0,045</b>
	BS	4	41 ± 11	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	9	35 ± 16	n.s.	<b>0,045</b>	n.s.	/
Tag 90	MC	6	33 ± 14	/	n.s.	n.s.	n.s.
	MA	6	24 ± 9	n.s.	/	n.s.	n.s.
	BS	5	26 ± 13	n.s.	n.s.	/	n.s.
	MS	5	25 ± 8	n.s.	n.s.	n.s.	/

**Tab. 4.3.2:** Mittlere TGF  $\beta$ 1-Gehalt im postoperativen Zeitverlauf mit Darstellung der Zahl zur Auswertung gekommener Tiere sowie Standardabweichungen und Signifikanzen ( $p$  im Mann-Whitney-U-Test  $< 0,05$  = signifikant,  $< 0,01$  =hochsignifikant).

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90	Kontrolle
Tierzahl n	11	12	10	11	12	10	5
Mittelwert [pg]	5,53	0,24	1,68	2,06	4,05	11,33	9,16
Standardabw.	2,96	0,22	2,85	2,03	3,25	7,4	2,49
Signifikanz p		<b>&lt;0,01</b> versus 0	n.s. versus 3	n.s. versus 7	<b>0,016</b> versus 14	<b>0,015</b> versus 30	
	n.s. versus Ko	<b>0,002</b> versus Ko	<b>0,007</b> versus Ko	<b>0,003</b> versus Ko	<b>0,02</b> versus Ko	n.s. versus Ko	

**Tab. 4.3.3:** Mittlere Rantes-Gehalt im postoperativen Zeitverlauf mit Darstellung der Zahl zur Auswertung gekommener Tiere sowie Standardabweichungen und Signifikanzen ( $p$  im Mann-Whitney-U-Test  $< 0,05$  = signifikant,  $< 0,01$  =hochsignifikant).

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90	Kontrolle
Tierzahl n	10	11	9	12	10	11	5
Mittelwert [pg]	150,19	54,73	14,32	51,53	36,42	37,21	40,05
Standardabw.	89,18	30,71	10,85	39,27	43,99	20,63	13,08
Signifikanz p		<b>0,017</b> versus 0	<b>0,004</b> versus 3	<b>0,007</b> versus 7	n.s. versus 14	n.s. versus 30	
	<b>0,01</b> versus Ko	n.s. versus Ko	<b>0,006</b> versus Ko	n.s. versus Ko	n.s. versus Ko	n.s. versus Ko	

**Tab. 4.3.4:** Mittlere IL-10-Gehalt im postoperativen Zeitverlauf mit Darstellung der Zahl zur Auswertung gekommener Tiere sowie Standardabweichungen und Signifikanzen ( $p$  im Mann-Whitney-U-Test  $< 0,05$  = signifikant,  $< 0,01$  =hochsignifikant).

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 90	Kontrolle
Tierzahl n	9	11	11	11	11	11	5
Mittelwert [pg]	22,65	8,35	1,9	8,59	5,8	3,88	3,90
Standardabw.	13,87	4,83	2,73	9,37	11,04	5,93	1,70
Signifikanz p		n.s. versus 0	<b>0,001</b> versus 3	<b>0,005</b> versus 7	n.s. versus 14	n.s. versus 30	
	<b>0,028</b> versus Ko	n.s. versus Ko	<b>0,047</b> versus Ko	n.s. versus Ko	n.s. versus Ko	n.s. versus Ko	

## Medikamente

### Neo-Kodan®

#### Zusammensetzung

100 g Lösung enthalten:

0,1 g Octenenidin-HCl

30 g 1-Propanolol

45 g 2-Propanolol

### Tramal-Tropfen® Grünethal

#### Zusammensetzung

0,5 ml enthält:

50 mg Tramadol-HCl

## Futtermittel

### Altromin® 1324 Haltungsdiet für Ratten und Mäuse

#### Inhaltsstoffe

Rohprotein (19%)

Methionin (0,3%)

Lysin (0,9%)

Rohfett (4%)

Rohfaser (6%)

Calcium (0,2%)

Rohasche (7%)

#### Zusatzstoffe (je kg)

Vit. A (15 000 IE)

Vit. D3 (60 IE)

Vit. E (75 mg)

Kupfer (5 mg)

## Verzeichnis der Abkürzungen

A	Anastomose
Abb.	Abbildung
BS	Biosyn®
CXC	Cystein-Rest-Cystein
ELISA	Encyme linked immuno sorbent assay
EZZ	Entzündungszellzahl
g	Gramm
fl	Femtoliter
h	Darmwanddicke in Zentimeter
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL-10	Interleukin-10
kDa	kilo Dalton
kN/m <sup>2</sup>	Kilonewton pro Quadratmeter
m	Gehalt im Sinne von Masse
MA	Maxon®
MC	Monocryl®
MS	Monosyn®
N	Newton
OD	Optical Density
P	Druck in Pascal
pg	Picogramm
RANTES	Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted
rpm	rotation per minute
t	Zeitpunkt
T	Tangentiale Wandspannung in N/m <sup>2</sup>
Tab.	Tabelle
Tmax	Maximalwert der Tangentialen Wandspannung
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1
$\mu$ l	Mykroliter

## Danksagung

Herrn Professor Dr. med. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, und Frau Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Arbeitsgruppe für Experimentelle Transplantationsimmunologie, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im mikrochirurgischen Labor der Experimentellen Chirurgie Würzburg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozenten Dr. med. E. S. Debus, Oberarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie der Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit durch die jederzeit angebotene Diskussionsbereitschaft und Betreuung.

Herrn Professor Dr. med. A. Thiede danke ich sehr für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit und die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. Karsten Schmidt, Assistenzarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, für seine Bereitschaft, jederzeit als direkter Ansprechpartner und Helfer zur Stelle gewesen zu sein.

Frau A. Dragan und ihre Vorgängerin, Frau A. Karenberg, medizinisch technische Assistentinnen der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, für ihre Anleitung beim Erlernen immunochemischer Arbeitstechniken und die Überlassung des Arbeitsplatzes im Sepsislabor der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg.

Allen Tierpflegern und –pflegerinnen der Experimentellen Chirurgie Würzburg, für die sorgsame Betreuung und Pflege der Versuchstiere.

Das Laborteam um Herrn Dr. F. Hensel, Biologe, Arbeitsgruppe von Professor Dr. H. P. Vollmers, sowie allen Mitarbeitern des Pathologischen Institut Würzburg, für die Bereitstellung eines Teils des Instrumentariums sowie das Anfertigen der histologischen Präparate.

Meiner Mutter, Frau Ulrike Ziegler, ohne deren moralische und finanzielle Unterstützung das Bewältigen weder des Medizinstudiums noch dieser Doktorarbeit möglich gewesen wären sowie meinem Bruder Christian Ziegler.

## Lebenslauf

Persönliche Daten	Name:	Dirk Ziegler
	Geburtsdatum/-ort:	24.06.1975 in Hassfurt a. Main
Ausbildung	1981-1985:	Grundschule, Hassfurt
	1985-1994:	Regiomontanus-Gymnasium Hassfurt
	1994-1995:	Zivildienst, Krankenhaus Hassfurt
	1995-2002:	Studium der Humanmedizin, Julius- Maximilians-Universität Würzburg
	9/1997:	Physikum
	8/1998:	1. Staatsexamen
	3/2001:	2. Staatsexamen
	5/2002:	3. Staatsexamen
Famulaturen	3/1998:	Chirurgie, Kreiskrankenhaus, Hassfurt
	10/1998:	Innere Medizin, Herz-Jesu-Krankenhaus, Wien
	8/1999:	Gynäkologie, Dr. B.L. Kapoor Memorial Hospital, Ludhiana, Indien
	10/1999:	Chirurgische Praxis, Dr. M. Groeger, Würzburg
Praktisches Jahr	4/2001-8/2001:	Orthopädie, Orthopädische Universitäts- klinik Balgrist, Zürich
	8/2001-12/2001:	Chirurgie, Chirurgische Universitäts- klinik, Würzburg
	12/2001-2/2002:	Innere Medizin, School of Medicine, Rochester, New York, USA

Dirk Ziegler