

Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer

Einfluss von Everolimus auf die Anastomosenheilung des Kolons bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Nadja Schölzl

aus
Ostfildern

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Coerper

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Köveker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Wirkmechanismus von Everolimus	7
1.2	Phasen der Wundheilung	8
1.3	Störungen der Wundheilung	9
1.4	Anastomoseninsuffizienz	10
1.5	Fragestellung der Dissertation	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Versuchstiere	13
2.2	Versuchsgruppen und Behandlungszeitraum	13
2.2.1	Dosierung der Medikation	14
2.3	Anatomie des Rattendarms	14
2.4	Operationen	15
2.4.1	Anästhesie	15
2.4.2	Operationstechnik	15
2.5	Relaparotomie und Messung des „bursting pressure“	18
2.5.1	Relaparotomie und Gewebeentnahme	18
2.5.2	„bursting pressure“	19
2.5.3	Probenasservierung	22
2.6	Histologie	22
2.6.1	Gewebeaufarbeitung	22
2.6.2	HE-Färbung	23
2.6.3	Azan-Färbung	24
2.7	Immunhistochemie	25
2.7.1	Immunhistochemischer Nachweis	25
2.8	Hydroxyprolinanalyse	26
2.8.1	Aufarbeitung der Proben	27
2.8.2	Ansetzen der Standardreihe	27
2.8.3	Berechnung der Hydroxyprolinkonzentration	29

2.9	Auswertungen der Histologie und der Immunhistochemie	29
2.10	Statistiken und Diagramme	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Allgemeine Beobachtungen	30
3.2	Gewichtsveränderungen	30
3.3	Ileus, Anastomoseninsuffizienz und Peritonitis	31
3.4	Verwachsungen	31
3.5	„bursting pressure“ und Perforationsstellen	34
3.5.1	„bursting pressure“	34
3.5.2	Perforationsstellen	35
3.6	Histologie	36
3.6.1	HE-Färbung	36
3.6.2	Azan-Färbung	40
3.7	Immunhistochemie	43
3.7.1	PCNA	43
3.8	Hydroxyprolinegehalt	46
4	Diskussion	47
5	Zusammenfassung	58
6	Literatur	60
7	Anhang	68
8	Danksagung	79
9	Lebenslauf	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AG-AK-Reaktion	Antigen-Antikörper-Reaktion
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
C_{\min}	kleinste Konzentration
C_{\max}	größte Konzentration
d	Tag
DAB	Diaminobenzin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtOH	Ethylalkohol
FRAP	FKBP-Rapamycin-assoziiertes Protein
G1-Phase	erste Phase des Zellzyklus
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HClO ₄	Perchlorsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
hGH	human growth hormone
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
IGF	insulin-like growth factor
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mTOR	mammalian target of rapamycin
MW	Mittelwert

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronhydroxid
n_{\min}	kleinste Anzahl
n_{\max}	größte Anzahl
OD-Wert	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet-derived growth factor
pDMBA	p-Aminodimethylbenzaldehyd
p_{\min}	kleinster Druck
p_{\max}	größter Druck
pos.	positiv
RAD	Everolimus
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
TGF-beta	transforming growth factor-beta
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation (Standardabweichung)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffer solution
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Wirkmechanismus Everolimus
- Abb. 2 Darstellung der Wundheilung als Balance zwischen Kollagensynthese und Kollagenolyse anhand der mechanischen Belastbarkeit
- Abb. 3 Intraoperative Darstellung des Colon descendens
- Abb. 4 Durchtrennung des Colon descendens

- Abb. 5 Durchtrennter, gesäuberter Darm
- Abb. 6 Aufspannung des Darms über die beiden Ecknähte
- Abb. 7 Beginn der Vorderwandnaht
- Abb. 8 Fertig gestellte Anastomose
- Abb. 9 „Bursting pressure“ einer Anastomose
- Abb. 10 Versuchsaufbau Messung „bursting pressure“
- Abb. 11 Beispiel Mikrotiterplatten-Assay
- Abb. 12 Durchschnittsgewicht der Gruppen zu
Versuchsbeginn und -ende
- Abb. 13 Verwachsungsgrad 1
- Abb. 14 Verwachsungsgrad 2
- Abb. 15 Verwachsungsgrad 3
- Abb. 16 Verwachsungsgrad 4
- Abb. 17 Verteilung der Verwachsungsgrade der Anastomosen
in den Gruppen
- Abb. 18 Durchschnittswerte, Standardabweichungen und
Signifikanzen des „bursting pressure“
- Abb. 19 Verteilung der Perforationsstellen der Anastomosen
beim „bursting pressure“
- Abb. 20 HE-Übersichtsvergrößerung (25 x) einer Anastomosenregion
der Placebo-Gruppe (Ratte 7)
- Abb. 21 HE-Färbung (100 x) Placebo-Gruppe (Ratte 7)
- Abb. 22 HE-Färbung (100 x) Everolimus 3mg-Gruppe (Ratte 3)
- Abb. 23 Azan-Färbung (50 x) Placebogruppe (Ratte 3)
- Abb. 24 Azan-Färbung (400 x) Placebo-Gruppe (Ratte 2)
- Abb. 25 Azan-Färbung (400 x) Everolimus 1mg-Gruppe (Ratte 5)
- Abb. 26 Azan-Färbung (400 x) Everolimus 3mg-Gruppe (Ratte 8)
- Abb. 27 PCNA (200 x) Everolimus 1mg-Gruppe (Ratte 10)
- Abb. 28 PCNA (400 x) Placebo-Gruppe (Ratte 7)
- Abb. 39 PCNA (400 x) Everolimus 1mg-Gruppe (Ratte 9)
- Abb. 30 PCNA (400 x) Everolimus 3mg-Gruppe (Ratte 10)

- Abb. 31 Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen der PCNA positiven Zellen/mm²
- Abb. 32 Durchschnittswerte, Standardabweichungen und Signifikanzen der Hydroxyprolinkonzentrationen
- Abb. 33 Gewichtsverlauf innerhalb der 3 Gruppen
- Abb. 34 Mittlerer Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe
- Abb. 35 Mittlerer Gewichtsverlauf der Everolimus 1mg-Gruppe
- Abb. 36 Mittlerer Gewichtsverlauf der Everolimus 3mg-Gruppe
- Abb. 37 Einzelne Werte „bursting pressure“

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Aufteilung der Versuchsgruppen
- Tab. 2 Schematische Darstellung der auf- und absteigenden Alkoholreihen
- Tab. 3 Übersicht über die wesentlichen Schritte der PCNA
- Tab. 4 Anastomosenverwachsungsgrade
- Tab. 5 Auswertung der HE-Färbung
- Tab. 6 Bewertung der Anordnung der Kollagenfasern im Anastomosenbereich im Rahmen der Azanfärbung
- Tab. 7 Tägliche Einzelgewichte und Gewichtsunterschiede der Tiere
- Tab. 8 Orte der Perforationsstellen beim „bursting pressure“
- Tab. 9 Auszählung der PCNA
- Tab. 10 Hydroxyprolinkonzentration in den Anastomosen der einzelnen Tiere
- Tab. 11 Hydroxyprolinkonzentration im unversehrten Kolon (Kontrolle) der einzelnen Tiere

1 Einleitung

1.1 Wirkmechanismus von Everolimus

Das FKBP-Rapamycin-assoziierte Protein (FRAP) ist eine Phosphatidylinositol-3-Kinase und wird auch mTOR (mammalian target of rapamycin) genannt [Rhoads et al. 2006; Rowinsky 2004]. FRAP regelt als Schlüsselprotein den Metabolismus, das Wachstum und die Proliferation von Zellen.

Der mTOR-Inhibitor Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®) und sein Derivat Everolimus (Certican®) entfalten ihre immunsuppressive Wirkung durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR. Dadurch werden das zelluläre Proliferationssignal und die Expansion antigen-aktivierter T-Lymphozyten gehemmt [Flanagan und Crabtree 1993; Kuo et al. 1992; Morris 1995; Seghal 1998]. Everolimus hemmt somit einen intrazellulären Signalweg, der eigentlich zur Zellproliferation führt. Die Blockade dieses Signals führt jedoch zu einem Stillstand im G1-Stadium des Zellzyklus und somit zu dessen Unterbrechung [Chung et al. 1992; Schuler et al. 1997]. Der Übergang in die S-Phase wird verhindert (Abb. 1).

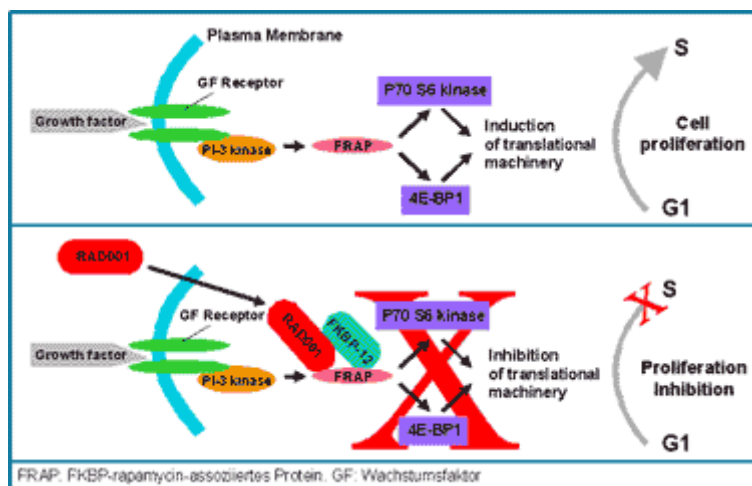


Abb. 1: Wirkmechanismus Everolimus
 Obere Abbildung: physiologischer Mechanismus der zellulären Proliferation
 Untere Abbildung: Blockade des Zellzyklus bei G1 zu S durch Everolimus
 [Nashan 2002 b]

Die obere Abbildung zeigt die physiologische zelluläre Proliferation. Das untere Bild zeigt, wie Everolimus das Proliferationssignal durch Hemmung der p70S6-Kinase und Sperrung des Zellzyklus bei G1 zu S blockiert.

Die Wirkung von Everolimus beschränkt sich nicht nur auf die T- und B-Zellen, sondern hemmt generell eine durch Wachstumsfaktoren stimulierte Proliferation von hämatopoetischen und auch nicht-hämatopoetischen Zellen [Nashan 2002 a], z. B. der vaskulären glatten Muskelzellen [Eisen et al. 2003]. Die Proliferation dieser Gefäßmuskelzellen in der Intima der Transplantatgefäße spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der chronischen Transplantatabstoßung.

Es wäre möglich, dass Everolimus und seine Wirkung auf den Zellzyklus jedoch auch die Wundheilung, besonders in der proliferativen und Differenzierungsphase, beeinträchtigt. Für Sirolimus ist die Störung der Wundheilung klinisch und tierexperimentell nachgewiesen [Flechner et al. 2003; Guilbeau 2003; Kahn et al. 2005; Valente et al. 2003]. Ein Einsatz in der unmittelbaren postoperativen Phase ist deshalb zu vermeiden.

Für Everolimus liegen in der Literatur bis jetzt jedoch kaum Daten zur intestinalen Wundheilung vor.

1.2 Phasen der Wundheilung

Die intestinale Wundheilung folgt grundsätzlich den gleichen Prinzipien wie derjenigen im übrigen Organismus. Hierbei bestehen drei verschiedene Phasen: die exsudative, die proliferative und die Differenzierungsphase [Coerper et al. 2004; Sedlarik 1997; Witte und Barbul 1997]. Deren Übergang ineinander ist fließend.

Nach Verletzung des Gewebes verfolgt die exsudative Phase primär das Ziel der Wundabdichtung. Dabei setzt unmittelbar eine Blutung ein, die Gerinnungskaskade und die Thrombozytenaggregation werden ausgelöst, wodurch es zur Blutstillung und Verklebung der Wunde kommt. Die durch Hypoxie verursachte Gewebsazidose wird durch die Freisetzung von Mediatoren, z. B. Histamin, Serotonin, Prostaglandine, eingeleitet.

Vasodilatation im Wundgebiet mit herabgesetzter Fließgeschwindigkeit, erhöhte Gefäßpermeabilität und die chemotaktische Wirkung der freigesetzten Mediatoren bewirken eine Einwanderung von Phagozyten (Granulozyten, Makrophagen). Diese resorbieren nekrotisches Zellmaterial. Die vor allem aus Fibroblasten und Epithelzellen stammende Kollagenase baut nun freigesprochenes Kollagen ab. Bereits 1968 beschrieben Cronin et al. in Kolonanastomosen eine verstärkte Kollagenolyse.

Die proliferative Phase ist durch Ausbildung von Granulationsgewebe gekennzeichnet. Nach etwa vier Tagen verbessert sich die Durchblutung und der Sauerstoff-Partialdruck im Gewebe steigt wieder an. Es überwiegen die proliferativen Vorgänge und Angioneogenese im Wundgebiet.

Das Kennzeichen der Differenzierungsphase (Reparation) sind Wundkontraktion, Kollagen-Crosslinking und Kollagen-Degradierung. Durch stetige Zunahme der Kollagenfasern wird die Wunde belastungs- und widerstandsfähiger. Die überschießenden Syntheseprozesse normalisieren sich nach etwa zehn bis zwölf Tagen. Enzyme, z. B. Kollagenasen und Elastasen, lockern die interzellulären Strukturen und die Gewebsintegrität wird vollendet.

1.3 Störungen der Wundheilung

Wundheilungsstörung bedeutet vor allem ein Sistieren der Wunde in der ersten Phase, der Exsudation. Verschiedene Faktoren können den Verlauf der Wundheilung bzw. die Narbenbildung negativ beeinflussen. Es spielen sowohl lokale als auch systemische Faktoren eine Rolle [Thompson et al. 2006]:

Als lokale Faktoren sind zum Beispiel Wundinfektionen, Wunddehiszenz nach primärem Wundverschluss, Nekrosen, mangelnde Ruhigstellung und Druckbelastung zu nennen [Coerper et al. 2004].

Zu allgemeinen Faktoren zählen Ischämie [Garcia et al. 1998] und Gewebhypoxie, Immundefizienz, Alter [Ashcroft et al. 2002], genetische Erkrankungen, Malnutrition, Radiatio, als auch verschiedene Medikamente [Thornton und Barbul 1997]. Gewebhypoxie wird durch Erkrankungen, die eine schlechte Durchblutung bedingen verursacht, z. B. Diabetes mellitus [Verhofstad et al. 2001] und periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Konsumierende Erkrankungen (Tumoren, chronische Infektionserkrankungen) beeinträchtigen über eine Schwächung des Immunsystems ebenso die Wundheilung wie Veränderungen des Blutbildes im Sinne einer Granulozytopenie bzw. angeborene Defekte der Chemotaxis oder der Phagozytose. Ein Mangel an Kohlenhydraten, Fetten, Proteinen, Vitaminen, Spurenelementen und Mineralstoffen spielt außerdem eine Rolle [Rojas und Phillips 1999; Thomas 2001]. Schließlich können auch einige Medikamente, wie Zytostatika [Weiber et al. 1994], Antikoagulantien oder auch Immunsuppressiva [Schaeffer et al. 2005; Zeeh et al. 2001] Einfluss auf den reibungslosen Ablauf der Wundheilung nehmen.

1.4 Anastomoseninsuffizienz

In der Viszeralchirurgie stellt die Anastomoseninsuffizienz nach Anlage von Enteroanastomosen eine der am meisten gefürchteten und bedeutendsten Komplikationen dar und führt zu erhöhter Mortalität und verlängerter Hospitalphase. Die Rate der klinisch manifesten Anastomoseninsuffizienzen liegt je nach Literatur zwischen 3,4 [Golub et al. 1997] und 12% [Matthiesen et al. 2004; Rullier et al. 1998]. Neben technischen, z. B. Nahtmaterial und Nahttechnik, sind endogene, z. B. Infektion, Sepsis, Ischämie, und exogene Faktoren, z. B. Steroide, Antibiotikaprohylaxe, Strahlentherapie, zu beachten [Wagner und Egger 2003]. Um die Bedeutung dieser Faktoren herauszufinden, sind tierexperimentelle Studien nötig.

Unterschieden wird zwischen Früh- und Spätinsuffizienzen. Gefährliche Frühinsuffizienzen mit Peritonitis treten innerhalb von vier bis sechs Tagen nach Operation auf, erfordern sofortigen, meist operativen Handlungsbedarf und haben eine hohe Mortalität. Spätinsuffizienzen treten erst nach ein bis zwei Wochen auf und verlaufen ohne wesentliche Komplikationen. Es genügt meist, wenn parenteral ernährt und suffizient drainiert wird.

Durch die starke Kollagenolyse während der späten exsudativen Phase und der erst in der proliferativen und Differenzierungsphase einsetzenden Neusynthese von Kollagen ergibt sich eine Erklärung für die Entstehung von

Frühinsuffizienzen. Am Übergang von der späten entzündlichen zur proliferativen Phase ist die Stabilität der Anastomose am geringsten, da bereits viel Kollagen abgebaut ist, jedoch noch nicht genug neues synthetisiert wurde. Dadurch besteht zu diesem Zeitpunkt die größte Gefahr der Entstehung von Frühinsuffizienzen [Hunt und Hawley 1969; Thornton und Barbul 1997] (Abb. 2).

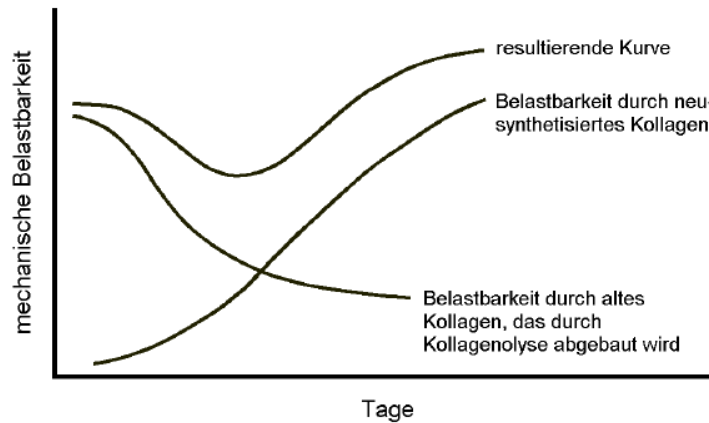


Abb. 2: Darstellung der Wundheilung als Balance zwischen Kollagensynthese und Kollagenolyse anhand der mechanischen Belastbarkeit [Thornton und Barbul 1997]

1.5 Fragestellung der Dissertation

In einer tierexperimentellen Studie an Ratten wurde der Einfluss von Everolimus in zwei verschiedenen Dosierungen (1 bzw. 3mg/kg Körpergewicht) auf die Wundheilung von Kolonanastomosen untersucht.

Es stellten sich folgende Fragen:

1. Beeinflusst die orale Gabe von Everolimus die Wundheilung von Kolonanastomosen?
2. Ist dieser Einfluss dosisabhängig?
3. Ergeben sich Veränderungen im Kollagengehalt, bei der Anordnung der Kollagenfasern und bei der Zellproliferation?
4. Verändert sich die Häufigkeit des Auftretens von Insuffizienzen, Ileitiden oder Peritonitiden innerhalb der unterschiedlichen Dosierungen?
5. Wie wird die mechanische Stabilität der angelegten Kolonanastomosen beeinflusst?
6. Wie verhält es sich mit intraabdominalen Verwachsungen?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen nach §8, Absatz 1 des Tierschutzgesetzes erteilte das Regierungspräsidium Tübingen (Nr. C 11/05).

Die Durchführung der Versuche erfolgte an männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Harlan Winkelmann, Borchem; Gewicht zu Versuchsbeginn 300-380g).

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen ($22\pm 1^\circ\text{C}$, zwölfstündiger Hell-/Dunkelzyklus) gemäß den Tierschutzbedingungen unter tierärztlicher Aufsicht gehalten.

Vor Versuchsbeginn konnten sich die Tiere eine Woche akklimatisieren. Als Nahrung dienten Haltungsalleinfutter für Ratten und Mäuse (Provimi Kliba SA, Kaiseraugst, Schweiz) und Leitungswasser ohne Zusätze. Beides stand den Ratten ad libitum zu Verfügung.

2.2 Versuchsgruppen und Behandlungszeitraum

Für die Versuche wurden drei Gruppen gebildet (Tab. 1). Die Tiere der Gruppe A erhielten Placebo, die Tiere der Gruppe B bekamen Everolimus 1mg/kg Körpergewicht (KG) und die der Gruppe C Everolimus 3mg/kg KG. Der Behandlungszeitraum betrug bei jedem Tier sieben Tage.

Gruppe	Tieranzahl	Charakteristikum	Behandlungsdauer
A	10	Placebo 3mg/kg	7 Tage
B	11	Everolimus 1mg/kg	7 Tage
C	10	Everolimus 3mg/kg	7 Tage

Tab. 1: Aufteilung der Versuchsgruppen

2.2.1 Dosierung der Medikation

Die Firma Novartis AG stellte die Everolimus-Mikroemulsion (20mg RAD/g; Dichte: 0,995g/cm³) und eine Placebolösung (self-microemulsifying drug delivery system) zur Verfügung. Diese wurden bei 4°C gelagert. Die entsprechende Lösung wurde nach folgender Formel hergestellt:

- Everolimus 1mg-Lösung: 50mg Mikroemulsion mit 5%iger Glucose (Glucosteril® 5%; Fresenius, Bad Homburg) aufgefüllt bis 5ml und gemischt
- Everolimus 3mg-Lösung bzw. Placebolösung: 150mg Mikroemulsion bzw. Placebo mit 5%iger Glucose aufgefüllt bis 5ml und gemischt

Jedes Tier erhielt 5ml/kg des jeweiligen Gemisches einmal täglich per gastric gavage. Die Lösungen wurden täglich frisch hergestellt, die Menge an das jeweilige Gewicht des Tieres angepasst und innerhalb von zwei Stunden nach Präparation verabreicht.

2.3 Anatomie des Rattendarms

Das Kolon der Ratte besteht aus Colon ascendens, transversum, descendens und sigmoideum. Das Colon ascendens ist sehr variabel, bedingt durch das mobile Zäkum. In den meisten Fällen befindet sich das Zäkum ventral im rechten unteren Quadranten. Ausgehend von dieser Stelle zieht das Colon ascendens auf die rechte Seite des Abdomens und verläuft nach kranial zur Duodenalregion. Dort geht es ins Colon transversum über, welches im Bereich der Flexura duodenojejunalis eng anliegend beim Dünndarm liegt. Von hier zieht das Colon transversum nach dorsal und geht in das Colon descendens über, das in der Medianlinie liegend und an der Hinterwand des Bauchraumes fixiert schließlich nach kaudal verläuft.

Aufgrund seines Verlaufes ist das Colon descendens für eine Operation gut zugänglich. Durch seine fixierte Lage und über vorherige Eventrierung des Dünndarms besteht die Möglichkeit eines standardisierten Operationsortes.

2.4 Operationen

2.4.1 Anästhesie

Die Tiere wurden mit Hilfe von Isofluran (Forene®, Abott, Wiesbaden) in eine Kurznarkose versetzt. In dieser bekamen die Tiere eine intraperitoneale Narkose mit einem Gemisch aus Ketaminhydrochlorid (Ketamin 100mg Deltaselect, Konzentration 50mg/ml; Curamed Pharma, Karlsruhe) und Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen).

Das Mischungsverhältnis bestand aus 1,1ml Ketamin und 0,4ml Xylazinhydrochlorid, wobei dem einzelnen Tier initial 0,5ml injiziert wurden. Anschließend wurden die Tiere gewogen und das Abdomen in der Medianlinie rasiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte bei Bedarf das intraperitoneale Nachspritzen von 0,1ml des oben beschriebenen Gemisches.

2.4.2 Operationstechnik

Nach alkoholischer Sprühdesinfektion (Softasept® N, Braun, Melsungen) erfolgte eine mediane Laparotomie über eine Länge von etwa 5cm.

Es wurde das Colon descendens aufgesucht und unter Schonung der versorgenden Mesenterialgefäße durchtrennt (Abb. 3-5).

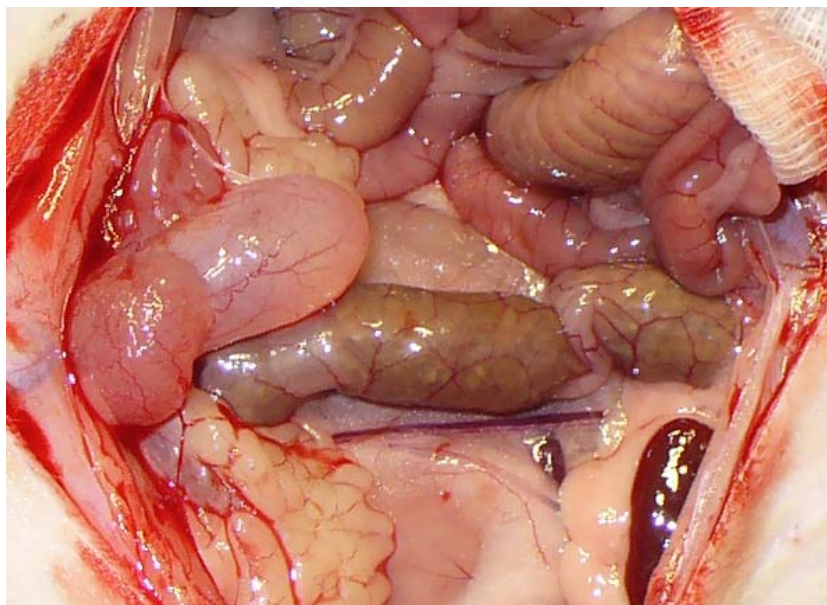


Abb. 3: Intraoperative Darstellung des Colon descendens

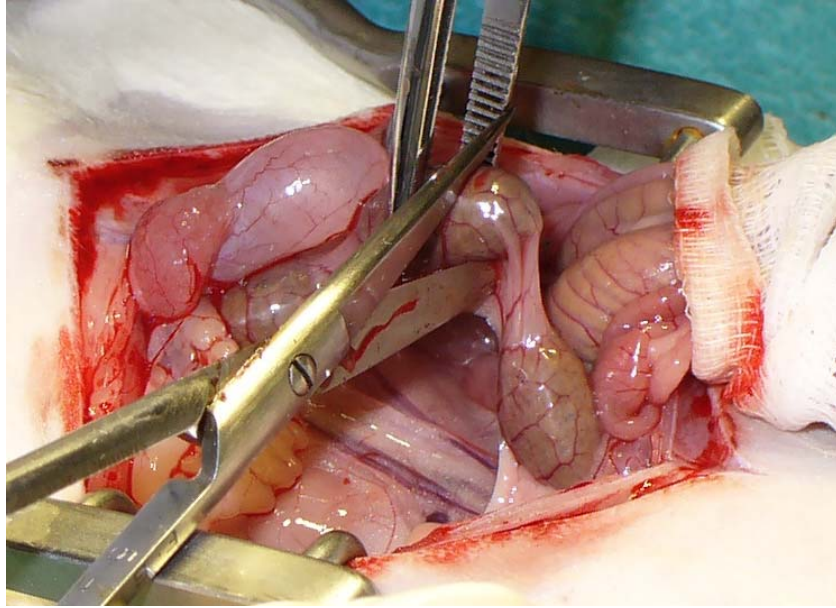


Abb. 4: Durchtrennung des Colon descendens

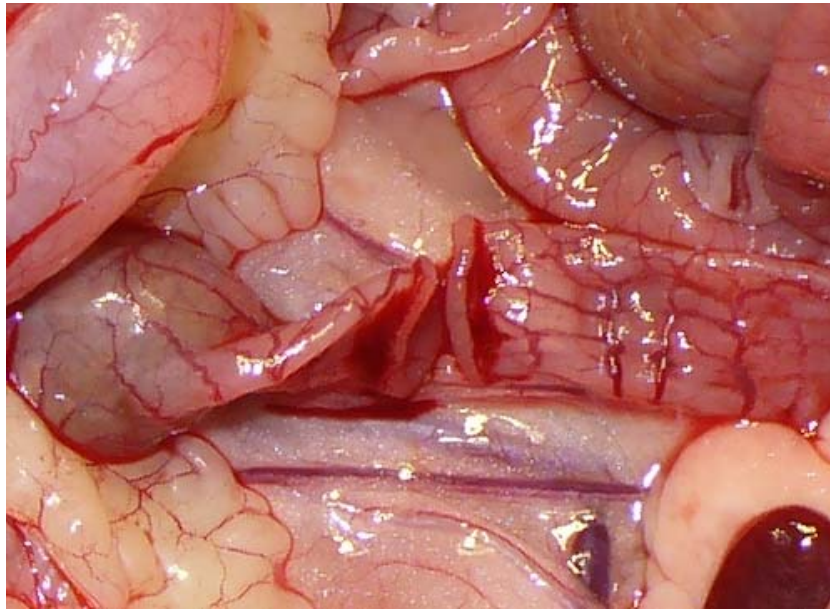


Abb. 5: Durchtrennter, gesäuberter Darm

Die Darmkontinuität wurde mittels End-zu-End-Anastomose wiederhergestellt. Zu Beginn wurden die beiden Ecknähte gestochen, mit deren Hilfe der Darm zur übersichtlichen Fortführung der Arbeit aufgespannt werden konnte (Abb. 6).

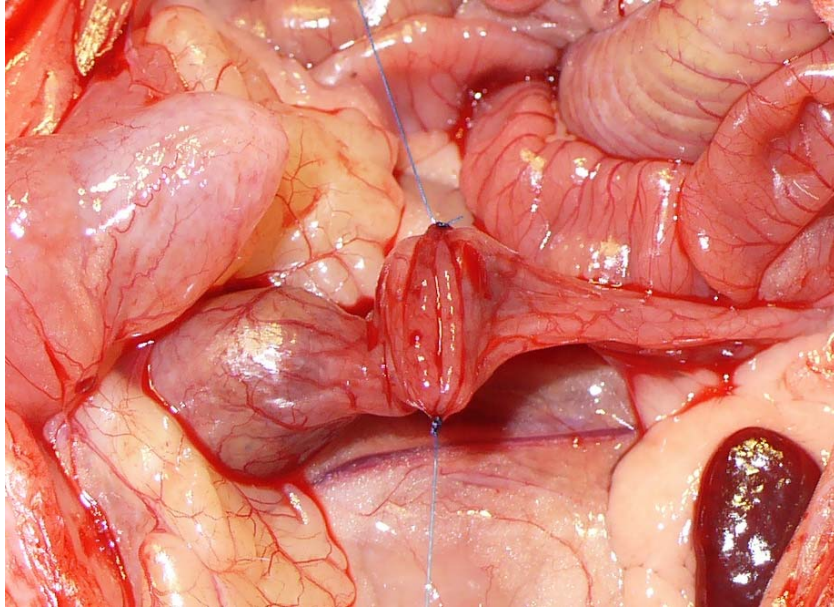


Abb. 6: Aufspannung des Darms über die beiden Ecknähte

Danach folgte zuerst die Naht der Vorderwand, im Anschluss die der Hinterwand. Als Nahttechnik diente eine allschichtige Einzelknopfnah mit Prolene™ 6/0 (Ethicon, Norderstedt) mit jeweils zehn Einzelknöpfen pro Anastomose (Abb. 7 und 8).

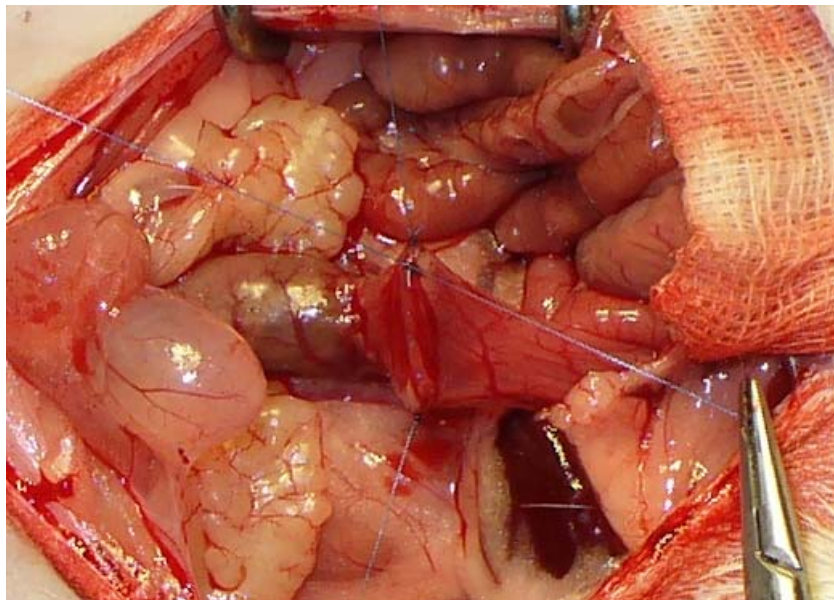


Abb. 7: Beginn der Vorderwandnaht

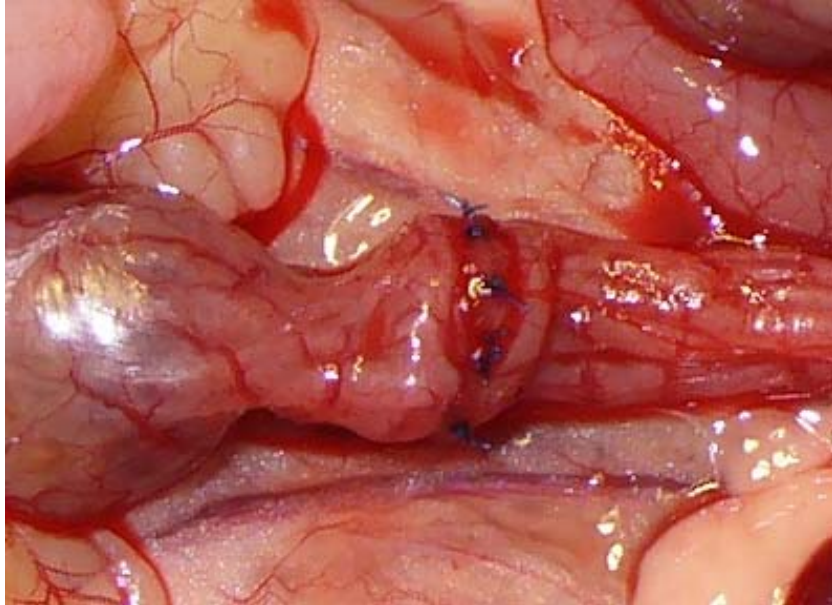


Abb. 8: Fertig gestellte Anastomose

Die Längslaparotomie wurde zweischichtig mittels einer fortlaufenden Naht (Ethilon® II 3/0; Ethicon) verschlossen.

Die gesamte Operationsdauer betrug etwa eine Stunde. Postoperativ hatten die Tiere wieder freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.5 Relaparotomie und Messung des „bursting pressure“

2.5.1 Relaparotomie und Gewebeentnahme

Nach sieben Tagen wurden die Tiere erneut narkotisiert, woraufhin die Hautnaht in toto für Messungen der kutanen Wundheilung exzidiert wurde. Nach Relaparotomie erfolgte das Töten der Tiere durch kardiale Punktion und Ausbluten. Das Blut wurde asserviert.

Danach wurde die Anastomose aufgesucht und vorsichtig freipräpariert. Die Anastomose wurde mit einem je 2cm langen distalen und proximalen Kolonanteil entnommen. Weiterhin erfolgte 5cm proximal der Anastomose die Entnahme eines gesunden Kolonstückes.

2.5.2 „bursting pressure“

Die Methode des „bursting pressure“ prüft die mechanische Belastbarkeit der Anastomose. Dabei wird der intraluminale Druck, bei dem die Anastomose undicht wird, bestimmt und in mmHg angegeben (Abb. 9).

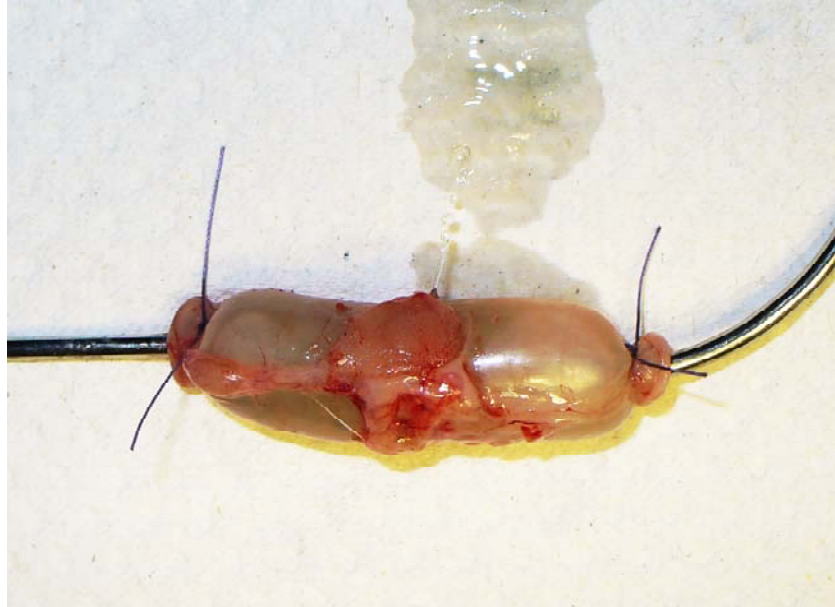


Abb. 9: „bursting pressure“ einer Anastomose

Diese Methode repräsentierte bereits in früheren Studien ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung der Anastomosensicherheit im Tierexperiment. Variationen bestehen darin, ob Gas oder Flüssigkeit infundiert wird, bzw. ob die Messung in situ oder an der exzidierten Anastomose stattfindet [Attard et al. 2005; Cihan et al. 2003; Ikeuchi et al. 1999; Mansson et al. 2002]. Die physiologische Beanspruchung des Darms wird hierbei imitiert, besonders die intraluminale Druckschwankungen durch wechselnde Darmfüllung und peristaltischen Wellen, denen die Anastomose in vivo ausgesetzt ist [Kahn et al. 2005 b]. Bei der Messung des „bursting pressure“ registriert ein Drucksensor den kleinsten Gewebedefekt durch Flüssigkeitsaustritt und den darauf folgenden Druckabfall. Im Vergleich dazu wird bei der als Alternativmethode verwendeten Bestimmung der Reißfestigkeit (Tensiometrie) die Kraft registriert, bei der die Anastomose entzwei reißt. Die Methode des „bursting pressure“ zeichnet sich somit durch eine größere Sensitivität aus. Weiterhin kann durch

die Bestimmung des „bursting pressure“ der Erhalt der Anastomose im Vergleich zur Methode der Zerreißkraftmessung garantiert werden. Dies war für die späteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit notwendig. Des Weiteren wirkt die zu messende Kraft bei der Tensiometrie auf die Längsrichtung des zu messenden Darmsegments, welche physiologisch von untergeordneter Bedeutung ist [Nelsen und Anders 1966].

Eine zuführende Knopfkanüle wurde in den proximalen Darmanteil eingeknotet, die Messkanüle in den distalen Anteil. Zu Messbeginn wurde der Druckabnehmer (Xtrans®, PVB Medizintechnik, Kirchseeon) über die Messkanüle auf 0mmHg geeicht. Mittels einer Infusionspumpe (Infusomat, MTS Schweinfurt) wurde über die zuführende Kanüle NaCl 0,9% mit 60ml/h in die Anastomose infundiert. Der Druckanstieg konnte daraufhin numerisch über den Druckabnehmer registriert werden. Der Druck, bei dem die Anastomose undicht wurde („bursting pressure“), konnte zudem anhand des auf dem Monitor (Fa. Hewlett Packard, Böblingen) dargestellten Druck-Zeit-Diagramms (Y-Achse Druck, X-Achse Zeit) graphisch abgelesen werden (Abb. 10).

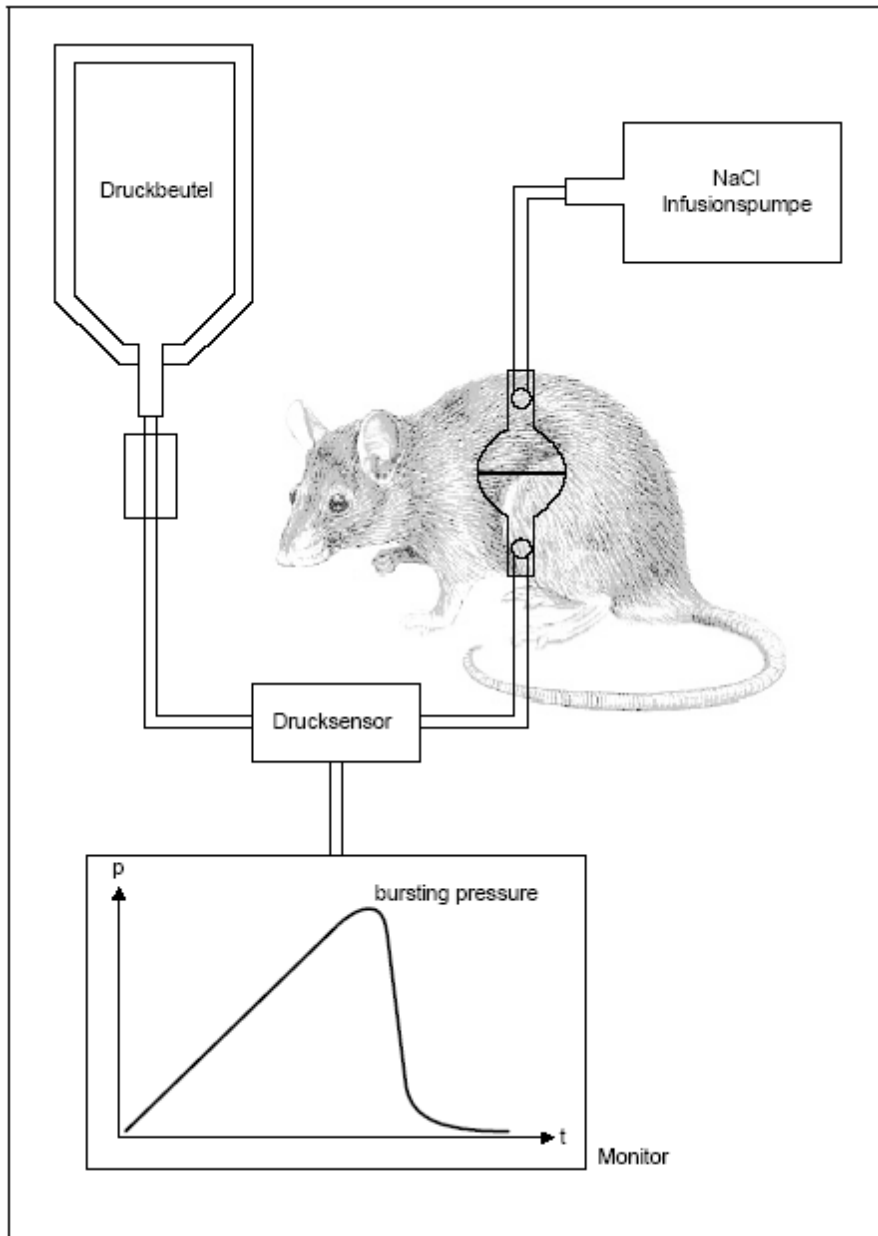


Abb. 10: Versuchsaufbau Messung „bursting pressure“
Nach Infusion von NaCl 0,9% (60ml/h) in die Anastomose Registrierung des Druckanstiegs über den geeichten Drucksensor. Ablesung des „bursting pressure“ anhand des Druck-Zeit-Diagramms

Es wurde notiert, an welcher Stelle eine Leckage auftrat. Dabei wurde in zwei Möglichkeiten unterteilt: Zum einen, ob sich die Perforationsstelle im Anastomosenbereich befand, und zum anderen, ob sich diese proximal oder distal der Anastomose an einer unbehandelten Stelle befand.

2.5.3 Probenasservierung

Die Anastomose wurde nach Beurteilung der Verwachsung und Messung des „bursting pressure“ längs aufgeschnitten und ebenso wie das separat entnommene Kolonstück zu einem Teil in Stickstoff, zum anderen Teil in 4%igem Formaldehyd asserviert.

2.6 Histologie

Die histologische Beurteilung des Gewebes erfolgte an Aldehyd-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material, welches mit einem Rotationsmikrotom (Leica, Nussloch) in 1µm dünne Scheiben geschnitten, auf Glasobjektträger (Super Frost® Plus, Langenbrinck, Teningen) aufgezogen und gefärbt wurde.

Die im Folgenden verwendeten chemischen Reagenzien und Gebrauchslösungen werden im Anhang erläutert.

2.6.1 Gewebeaufarbeitung

Die in 4%igem Formaldehyd asservierten Proben wurden zur automatisierten Fixierung und Entwässerung für eine Dauer von zwölf Stunden in eine Histokinette (Leica) eingelegt.

Die Entwässerung und Fixierung geschah in folgenden Schritten:

1. Ersatz des Formalins durch zwei Schritte 96%igen Alkohol
2. Vier Schritte absoluter Alkohol (100%)
3. Aufnahme von Xylol in zwei Schritten bei 37°C
4. Erhöhung der Temperatur auf 61°C und dreimal Aufnahme von Paraffin

Nach diesen Arbeitsdurchgängen wurden die Proben in einem Paraffinautomat (Leica) in eine vierte Paraffinstufe überführt. Es folgte die Einbettung in passende Formen (Moulds). Nachdem die fertigen Proben für eine gleichmäßige Struktur möglichst schnell auf eine Kühlplatte (Jung Histoembedder; Leica) gelegt wurden, härteten diese schließlich aus und konnten nach kurzer Zeit am Mikrotom zu mikroskopischen Schnitten weiterverarbeitet werden.

2.6.2 HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Ehrlich ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung in der Histologie. Dabei werden saure Moleküle (z. B. innerhalb der Zellkerne) blau und zytoplasmatische Bestandteile, Binde- und Muskelgewebe nuanciert rot dargestellt.

Die hergestellten histologischen Schnitte wurden in eine absteigende Alkoholreihe überführt, um die darauf folgende fünfminütige wässrige Färbung mit Hämalaun zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Schnitte zehn Minuten gewässert und in aqua dest. gestellt. Schließlich folgte eine einminütige Färbung mit Eosin und die Differenzierung durch aqua dest.. Danach erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, woraufhin die Schnitte mit Roti-Histokitt eingedeckt wurden.

In der folgenden Tabelle sind die ab- und aufsteigenden Alkoholreihen dargestellt:

Absteigende Alkoholreihe	Aufsteigende Alkoholreihe
3 x 10min Xylol	2min 70% EtOH
2 x 10min EtOH 100%	2min 96% EtOH
1 x 10min EtOH 96%	2 x 5min 100% EtOH
1 x 10min EtOH 70%	3 x 2min Xylol

Tab. 2: Schematische Darstellung der auf- und absteigenden Alkoholreihen

Die Auswertung der HE-gefärbten Schnitte erfolgte anhand fünf unterschiedlicher, semiquantitativer Kriterien: Zum einen wurde der Fibrosegrad und die Menge von Granulationsgewebe bestimmt, zum anderen die Dichte und Struktur des Gewebes im Bereich der Anastomose. Des Weiteren wurde die neu gebildete Mukosa im Bereich des ursprünglichen Schnittes in ihrer Höhe und Durchgängigkeit beurteilt. Es folgte der Vergleich von Gefäßeinsprossungen und Vakuolen.

2.6.3 Azan-Färbung

Die Azan-Färbung nach Heidenhain ist eine Mehrfach- oder Trichrom-Färbung. Sie dient insbesondere zur Differenzierung von extrazellulären Bindegewebsfasern, Geweben und Zellbestandteilen. Dabei werden die Zellkerne und das Zytoplasma rot und die Kollagenfasern, Schleim und Mukopolysaccharide blau dargestellt.

1. Entparaffinierung der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe (siehe HE-Färbung)
2. Lagerung der Schnitte in 1%igem Anilinalkohol für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und kurze Spülung in aqua dest. (Beizung des Azokarmin)
3. Fünfzehnminütige Färbung in Azokarmin im 54°C warmen Wasserbad, nach Abkühlung Spülung in aqua dest.
4. Zwei bis vier Minuten 1%iger Anilinalkohol (Differenzierung des Azokarmins für ein optimales Ergebnis, bei dem die Zellkerne gut zu erkennen sein sollen)
5. Unterbrechung der Differenzierung in essigsauerm Alkohol für drei Minuten
6. Lagerung der Präparate in 5%iger Wolframsäure für zwei Stunden bei RT, danach Spülung in aqua dest. (Beizung und gleichzeitige Entfärbung des Bindegewebes)
7. Färbung der Schnitte in Anilinblau-Orange G à fünf Minuten bei RT und wiederholte Spülung in aqua dest.
8. Lagerung der Präparate unter mikroskopischer Kontrolle dreimal für je zwei Minuten in 96%igem Alkohol bis zur gewünschten Färbeintensität
9. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und Eindeckung mit Roti-Histokitt

Es folgte die Beurteilung der gefärbten Schnitte hinsichtlich der im Wundgebiet erhaltenen kollagenen Fasern, wobei insbesondere auf den Grad der Vernetzung, auf parallele Anordnung und Ausrichtung der Fasern geachtet wurde. Außerdem wurde die Zelldichte der Anastomosen verglichen.

2.7 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der Proteine mittels Antikörpern (AK) sichtbar gemacht werden können. Der Nachweis basiert auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (=Epitop, antigene Determinante) als Antigen-Antikörper (AG-AK)-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Ziel ist, ein Signal am Ort des Epitops in ausreichender Manifestation zu erkennen.

2.7.1 Immunhistochemischer Nachweis

Mittels PCNA (proliferating cell nuclear antigen) wurde die Proliferationsrate von Zellen bestimmt, was in folgenden Schritten realisiert wurde:

1. Entparaffinierung der histologischen Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe
2. Blockade der endogenen Peroxidase durch fünfzehnminütige Inkubation der Schnitte im Methanol-H₂O₂-Gemisch, dreimalige Spülung in Tris buffer solution (TBS)-Puffer für jeweils fünf Minuten (Vorbereitung für die spätere Diaminobenzin (DAB)-Entwicklung)
3. Enzymatische Demaskierung der Präparate in Citratpuffer und dreimalige Spülung zu je fünf Minuten in TBS-Puffer (ermöglicht Reaktivität des Primärantikörpers mit dem für ihn spezifischen Epitop)
4. Block mit Serum in einer feuchten Kammer für zwanzig Minuten bei RT (dadurch später spezifische Adsorption des Primärantikörpers bzw. Verhinderung unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers)
5. Aufpipettierung des primären Antikörpers ohne Zwischenschritt, Inkubation für eine Stunde in feuchter Kammer bei RT und Spülung in TBS
6. Auftragung des Sekundärantikörpers auf die Präparate (30 Minuten Inkubation, feuchte Kammer, RT) und übliche Spülung in TBS (Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper)
7. Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex/HRP bei RT für 30 Minuten in feuchter Kammer; dreimalige Spülung à fünf Minuten in TBS (Signalverstärkung durch Bindung des Komplex an das Biotin des Sekundärantikörpers)

8. Entstehung eines braunen unlöslichen Reaktionsprodukts durch das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) unter Beimengung von H₂O₂ mit DAB innerhalb von zehn Minuten (Visualisierung); kurze Gegenfärbung mit Hämalaun und Spülung in Leitungswasser für fünf Minuten (Differenzierung)
9. Dehydrierung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (siehe oben) und Eindeckung mit Roti-Histokitt

Kurzdarstellung der wesentlichen Schritte der PCNA:

Demaskierung	Citratpuffer in Mikrowelle 6*5`
Block	Rabbit serum DAKO X 902 1:5 20` RT
1. Antikörper	Mouse anti-PCNA Oncogene NA-03 1:75 1` RT
2. Antikörper	Rabbit anti-mouse biot DAKO E 413 1:600 30` RT

Tab. 3: Übersicht über die wesentlichen Schritte der PCNA

Die Präparate der PCNA wurden an vier standardisierten Stellen innerhalb der Anastomosenregion ausgewertet, was zu einer besseren Aussagekraft über die durchschnittliche Anzahl und Verteilung der proliferierenden Kerne führte. Zur weiteren Differenzierung erfolgten von jedem Präparat zwei Messungen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Die Einheit der proliferierenden Kerne wird in positiven Zellen pro mm² angegeben.

2.8 Hydroxyprolinanalyse

Die Aminosäure Hydroxyprolin wird während der Kollagensynthese durch enzymatische Hydroxylierung von Prolin gebildet. Da Hydroxyprolin spezifisch in Kollagenen vorkommt, ist es möglich, anhand der in einer organischen Gewebeprobe vorhandenen Hydroxyprolinmenge den Kollagengehalt quantitativ zu messen. Die verwendete Methode basiert auf Woessner (1961), modifiziert nach Stegemann und Stalder (1967).

2.8.1 Aufarbeitung der Proben

Nach dem Trocknen (37°C, 2 Tage) der Gewebeproben (Biopsiestanze; 4mm) wurden diese gewogen, um die gemessene Hydroxyprolinkonzentration in Relation zum entsprechenden Gewebetrockengewicht zu setzen. Daraufhin wurde nach Überführung der Probe in ein thermostabiles 3ml-Röhrchen (Roth, Karlsruhe) jeweils 2ml 6N HCl zupipettiert. Um die vorhandenen Proteine in ihre Aminosäuren zu zerlegen, folgte eine Inkubation der Probe für 3 Stunden bei 110°C im Thermostaten (Rotilabo®-Block-Heater H250; Roth) unter mehrmaligem Mischen. Anschließend wurde die hydrolysierte Probe in ein 15ml-blue-cap-Gefäß (Cellstar®; Greiner Labortechnik, Frickenhausen) umpipettiert und das 3ml-Röhrchen mit 1ml demineralisiertem Wasser nachgewaschen. Danach wurden 2,7-2,9ml NaOH-Citrat/Acetat-Puffer zugegeben, bis der pH-Wert der hydrolysierten Probe bei 5,0-6,0 lag. Jede Probe wurde mit aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10ml aufgefüllt und auf einen pH-Bereich zwischen 5,0 und 6,0 eingestellt, woraufhin diese zentrifugiert (2000rpm, 15min) wurden, um eventuelle unlösliche Bestandteile abzutrennen.

2.8.2 Ansetzen der Standardreihe

100mg Hydroxyprolin wurden in 50ml 6N HCl gelöst, was einer Konzentration von 2000µg/ml entsprach. Es erfolgte ein zweiter Verdünnungsschritt um den Faktor 12,5, wonach jeweils um den Faktor zwei weiter verdünnt wurde. Alle Standards erhielten anschließend eine Verdünnung mit 8ml Wasser. Dies ergab eine Standardverdünnungsreihe mit den Konzentrationen 32, 16, 8, 4, 2, 1 und 0,5µg/ml, sowie einen Blank-Wert (6N HCl). Der Blank-Wert wurde nach Beendigung der Messung durch einen ELISA-Reader (Milenia™ Kinetic Analyzer; Diagnostic Products Corporation Biermann, Bad Nauheim) vom OD- (optische Dichte) Wert, welcher die Absorption angab, automatisch abgezogen. Anschließend wurden je 60µl der jeweiligen Probe/Standard als Duplikate in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (ELISA-Platte; Greiner Labortechnik) pipettiert (Abb. 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 32	Std 32	P 1	P 1	P 9	P 9	P 17	P 17				
B	Std 16	Std 16	P 2	P 2	P 10	P 10	P 18	P 18				
C	Std 8	Std 8	P 3	P 3	P 11	P 11	P 19	P 19				
D	Std 4	Std 4	P 4	P 4	P 12	P 12	P 20	P 20				
E	Std 2	Std 2	P 5	P 5	P 13	P 13	(P 21)	(P 21)				
F	Std 1	Std 1	P 6	P 6	P 14	P 14	(P 22)	(P 22)				
G	Std 0,5	Std 0,5	P 7	P 7	P 15	P 15						
H	blank	blank	P 8	P 8	P 16	P 16						

Abb. 11: Beispiel Mikrotiterplatten-Assay
(Probe/Standard jeweils als Duplikate)

1. Standardwerte (Hydroxyprolinlösung) und Blank-Wert (HCl)
2. Kontrollwerte Kolon (Hydrolysatverdünnung): P1 - P10 (P11)
3. Probenwerte Anastomose (Hydrolysatverdünnung): P11 (P12) - P20 (P22)

Es folgte das Hinzufügen von 30µl Assay Puffer und 40µl frisch angesetzter Chloramin-T-Lösung pro Probe. Die Mikrotiterplatte wurde kurz geschüttelt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Nun wurden zur Beendigung der Oxidationsreaktion pro Vertiefung 80µl frisches Ehrlichs-Reagenz hinzugefügt und auf- und abpipettiert, bis sich keine Schlieren mehr zeigten. Die Proben stellten sich nun gelb und klar dar. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Mikrotiterplatte im 60°C warmen Wasserbad bis zur chemischen Bildung des Chromophors. Der Umschlag der Farbreaktion von gelb zu rot zeigte sich umso intensiver, je höher die Hydroxyprolinkonzentration in der Lösung war. Die Proben wurden mittels eines ELISA-Readers bei einer Messwellenlänge von 570nm (Absorptionsmaximum des Chromophors) und einer Referenzwellenlänge von 650nm vermessen.

2.8.3 Berechnung der Hydroxyprolinkonzentration

Der OD-Wert der jeweiligen Probe, bestimmt durch den ELISA-Reader, wurde über die Software „Softmax“ (Immuno Assay Auswertung; Biermann, Bad Nauheim) in eine Hydroxyprolinkonzentration umgerechnet, welche anhand der linearen Regression des Standards in µg/ml angezeigt wurde.

Die gemessene Hydroxyprolinkonzentration wurde mit dem Faktor zehn multipliziert, da zu Beginn alle Standards und Proben auf ein Gesamtvolumen von 10ml eingestellt worden waren. Anschließend folgte die Normierung aller Proben auf 1mg Gewebe, woraufhin die Hydroxyprolinkonzentration in der Einheit µg Hydroxyprolin pro mg Gewebe angegeben werden konnte.

2.9 Auswertungen der Histologie und der Immunhistochemie

Die gefärbten Präparate wurden mit dem Mikroskop Leitz DM-Reader und der Bildanalysesoftware Quantimet QWin (beides Leica) ausgewertet.

2.10 Statistiken und Diagramme

Mit Hilfe von Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurden die Diagramme erstellt. Die Berechnungen und statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm JMP Version 7.0 (SAS Institute, Carys, USA). Angegeben wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. In den einzelnen Gruppen befanden sich zehn oder elf Tiere. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der Tukey-Kramer-Test verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p < 0,05$) konnte von einem signifikanten Testergebnis ausgegangen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Beobachtungen

Die Operationen wurden von den Tieren gut vertragen, keines verstarb im Laufe der Versuchsreihe. An den postoperativen Tagen zeigten die Tiere ein normales Fressverhalten. Vereinzelt traten Diarrhöen auf. Das erste Tier der Everolimus 1mg-Gruppe litt mehrere Tage an Hämatochezie. Die Hautwunden waren bei allen Tieren primär verheilt.

3.2 Gewichtsveränderungen

Die Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Ausgangsgewicht von 338,4g ($m_{\min}=308\text{g}$, $m_{\max}=376\text{g}$).

In der Placebogruppe betrug das Durchschnittsgewicht am Operationstag 333g (308-352g), bei Versuchsende 322,4g (299-337g). Die mittlere Gewichtsabnahme zwischen Operationstag und Relaparotomie betrug 10,6g bzw. 3,2%.

Die beiden Verumgruppen (Everolimus 1mg/kg KG und Everolimus 3mg/kg KG) wiesen zu Versuchsbeginn Werte von 351,5g (312-376g) und 329,4g (312-355g) auf, am Ende wogen deren Tiere im Mittel 328g (283-350g) und 296,6g (280-317g). Die durchschnittliche Gewichtsabnahme lag in der Everolimus 1mg-Gruppe bei 23,45g (6,7%) und in der Everolimus 3mg-Gruppe bei 32,8g (10,0%) (Abb.12).

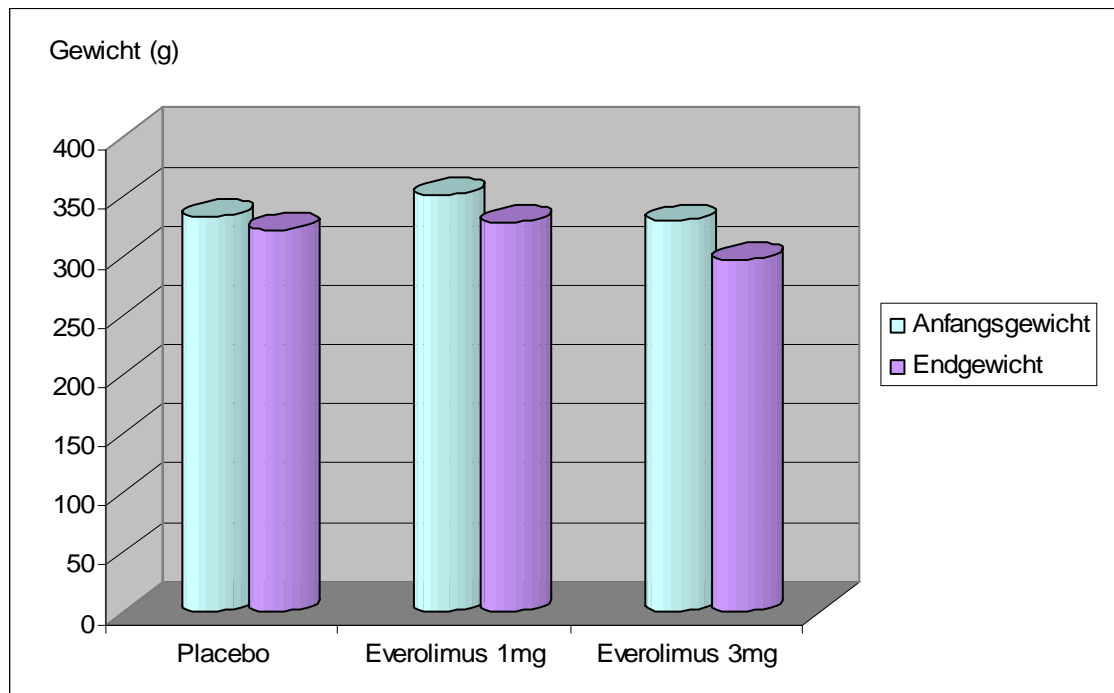


Abb. 12: Durchschnittsgewicht (g) der Gruppen zu Versuchsbeginn und -ende

Die Einzelgewichte und deren Differenzen (Tag 0 bis Tag 7) der Tiere sind im Anhang in Tabelle 6 aufgelistet.

3.3 Ileus, Anastomoseninsuffizienz und Peritonitis

In jeder der drei Gruppen wurde je ein Tier mit gedeckter Anastomoseninsuffizienz beobachtet. Dies waren das Tier Nummer 4 aus der Placebogruppe, das erste Tier der Everolimus 1mg-Gruppe und das letzte Tier der Everolimus 3mg-Gruppe. Eine Peritonitis oder ein Ileus kamen nicht vor.

3.4 Verwachsungen

Die Differenzierung der Verwachsungen an den Anastomosen erfolgte in Grad 0 - 4 (Abb. 13-16):

- 0 = keine Verwachsung
- 1 = geringe Verwachsung
- 2 = mittlere Verwachsung
- 3 = starke Verwachsung
- 4 = sehr starke Verwachsung inkl. Nachbarstrukturen (z. B. Dünndarm)



Abb. 13: Verwachsungsgrad 1
(Ratte 9 Placebogruppe)



Abb. 14: Verwachsungsgrad 2
(Ratte 10 Placebogruppe)



Abb. 15: Verwachsungsgrad 3
(Ratte 8 Everolimus 3mg-Gruppe)



Abb. 16: Verwachsungsgrad 4
(Ratte 7 Everolimus 3mg-Gruppe)

Verwachsungen in der Gruppe A (Placebo):

In der Kontrollgruppe wurden zur Bestimmung der Verwachsungen der Anastomosen jeweils dreimal Grad 1, Grad 2 und Grad 3 vergeben. Grad 4 kam einmal vor.

Verwachsungen in der Gruppe B (Everolimus 1mg):

In dieser Gruppe wurden die Verwachsungen mit Hilfe von einmal Grad 1, je dreimal Grad 2 und 3 und viermal Grad 4 beschrieben.

Verwachsungen in der Gruppe C (Everolimus 3mg):

Hier zeigte sich eine Verteilung von zweimal starker Verwachsung und achtmal sehr starker Verwachsung (Tab. 4).

Placebogruppe		Everolimus 1mg-Gruppe		Everolimus 3mg-Gruppe	
Tier	Verwachsungsgrad	Tier	Verwachsungsgrad	Tier	Verwachsungsgrad
1	1	1	1	1	4
2	2	2	4	2	4
3	4	3	4	3	3
4	3	4	3	4	4
5	3	5	2	5	4
6	2	6	3	6	4
7	1	7	2	7	4
8	3	8	4	8	3
9	1	9	3	9	4
10	2	10	4	10	4
		11	2		

Tab. 4: Anastomosenverwachsungsgrade (1 = geringe, 4 = sehr starke Verwachsung)

Die Verteilung der verschiedenen Verwachsungsgrade der Anastomosen innerhalb der einzelnen Gruppen ist in Abbildung 17 dargestellt.

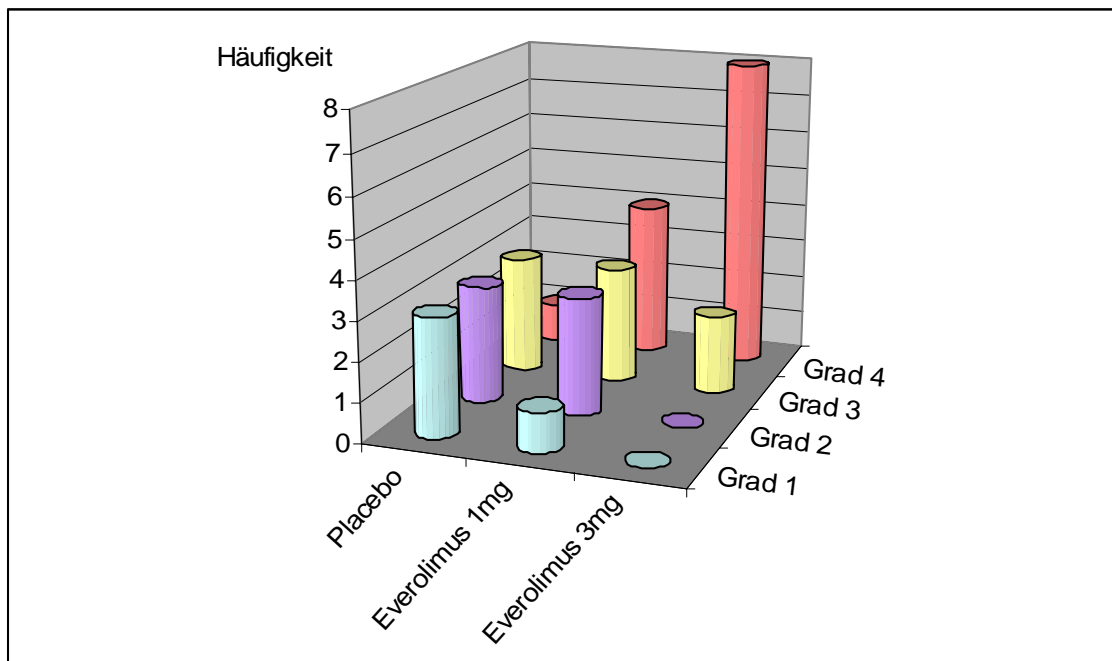


Abb. 17: Verteilung der Verwachsungsgrade der Anastomosen in den Gruppen

Die Anastomosen der Everolimus 3mg-Gruppe wiesen die stärksten Verwachsungen auf, gefolgt von der Everolimus 1mg-Gruppe, und jene der Placebogruppe die geringsten. Der Verwachsungsgrad 0, also keine Verwachsung, kam nicht vor.

3.5 „bursting pressure“ und Perforationsstellen

3.5.1 „bursting pressure“

Der Mittelwert des „bursting pressure“ lag in der Placebogruppe bei $142,44 \pm 17,04$ mmHg ($p_{\min}=122$ mmHg, $p_{\max}=174$ mmHg). In der Everolimus 1mg-Gruppe fand sich der Durchschnitt des „bursting pressure“ bei $116,90 \pm 25,41$ mmHg (68-151 mmHg) und in der Everolimus 3mg-Gruppe bei $107,56 \pm 29,95$ mmHg (45-146 mmHg). Der verwendete Druck reduzierte sich von der Placebogruppe zur Everolimus 1mg-Gruppe um 17,93%. Von Everolimus 1mg fiel der „bursting pressure“ zu Everolimus 3mg um weitere 7,99% ab. Der Unterschied zwischen der Placebogruppe und der Everolimus-1mg-Gruppe war statistisch signifikant, ebenso derjenige zwischen Placebo und Everolimus 3mg. Keine Signifikanz bestand zwischen den Werten von Everolimus 1mg und denen von Everolimus 3mg (Abb.18).

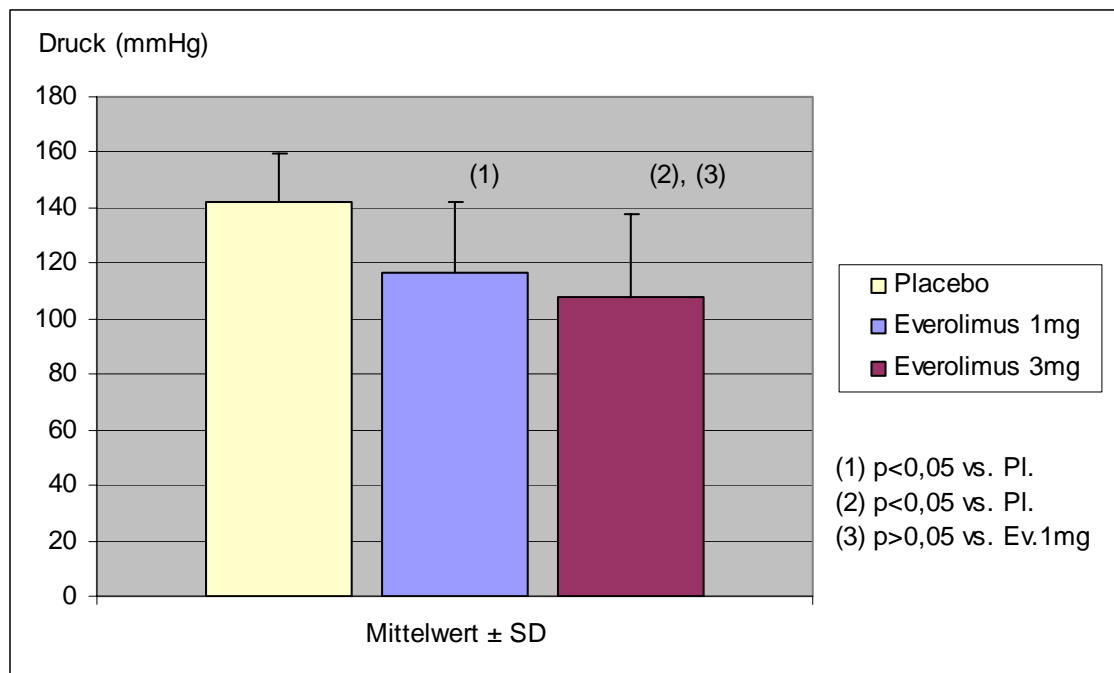


Abb. 18: Durchschnittswerte, Standardabweichungen und Signifikanzen des „bursting pressure“ in mmHg

Im Anhang (Abbildung 40 und Tabelle 7) sind die einzelnen Werte des „bursting pressure“ für die jeweiligen Gruppen aufgelistet.

3.5.2 Perforationsstellen

In der Kontrollgruppe konnte beobachtet werden, dass alle Perforationen außerhalb der Anastomose lagen, wohingegen sich in der Everolimus 1mg-Gruppe neun von zehn Perforationen innerhalb der Anastomose befanden. Bei der Everolimus 3mg-Gruppe waren die Anteile ausgeglichen, vier der Perforationsstellen lagen innerhalb und fünf außerhalb der Anastomose.

Die Anastomosen mit Insuffizienzen blieben unbeachtet (Abb. 19).

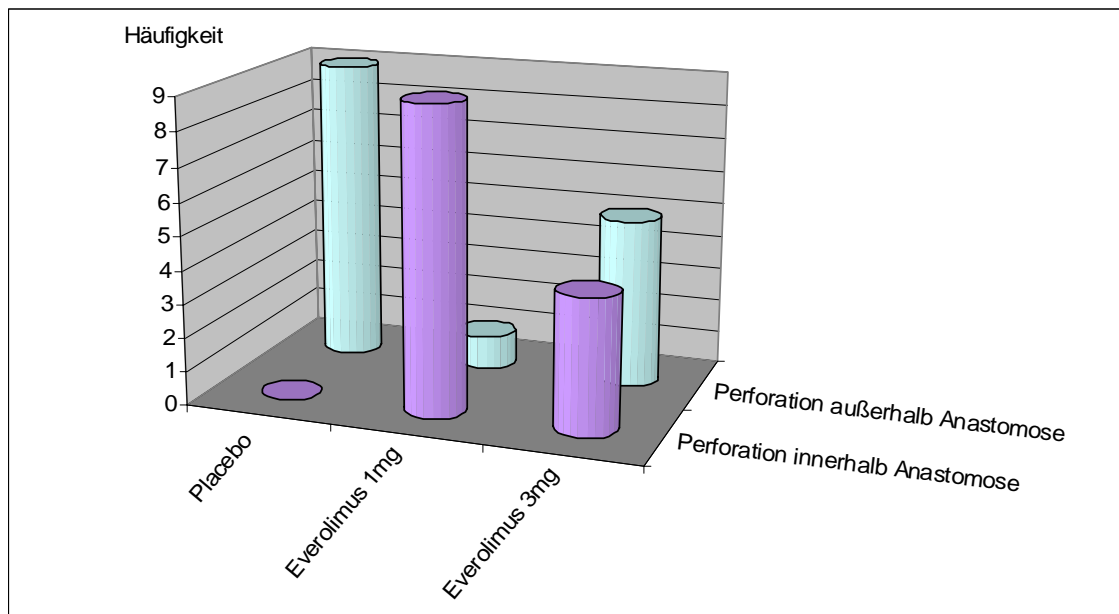


Abb. 19: Verteilung der Perforationsstellen der Anastomosen beim „bursting pressure“

Die Tabelle 7 im Anhang ordnet die Perforationsstellen den einzelnen Tieren genau zu.

3.6 Histologie

3.6.1 HE-Färbung

Übersicht einer Anastomosenregion eines Tieres der Kontrollgruppe:



Abb. 20: HE-Übersichtsvergrößerung (25 x) einer Anastomosenregion der Placebo-Gruppe; rechts und links der Anastomose befindet sich intakte Kolonschleimhaut, Muskularis und Serosa; im Bereich der Schnittstelle sind diese Strukturen durchbrochen und von Granulationsgewebe überbrückt (Ratte 7)

Die Beurteilung der HE-gefärbten Schnitte erfolgte anhand des Fibrosegrades, der Menge, Dichte und Struktur des Granulationsgewebes im Anastomosenbereich und der Mukosa. Des Weiteren wurden die Angiogenese und Vakuolen verglichen. Für diese Parameter wurden jeweils Zahlen von 0 - 3 vergeben (0 = nichts, 1 = wenig, 2 = mittel, 3 = viel) (Tab.5).

Gruppe	Tier	Fibrosegrad, Granulations- gewebe	Dichte, Struktur	Schleimhaut	Gefäße	Vakuolen
Placebo	1	2	1	2	1	0
	2	3	2	1	2-3	2
	3	2	1	1-2	2	1
	4	2	1	2	1	0
	5	3	2	3	3	0
	6	2	1	2-3	1-2	0
	7	3	1	3	2	0-1
	8	3	2	3	1-2	1
	9	2	1	2-3	1	1
	10	2	2	0	1-2	1
Ev. 1mg	1	3	2	2	1	1-2
	2	1	2	1	0	2
	3	2	2-3	0	1-2	1-2
	4	2	2	1	0	1
	5	2	2	1	1	0
	6	3	3	1	0	1-2
	7	1	1-2	1	2	0
	8	2	3	-	0	0
	9	2	3	0	1	2
	10	3	3	1	0	1
	11	1	2	0-1	0	0-1
Ev. 3mg	1	2	3	0	0	0-1
	2	1-2	2	0	1-2	0
	3	1	1	1-2	0	0
	4	1-2	2	0	0	0
	5	3	2	0	0	1-2
	6	1	2	0	0	2
	7	2	3	0	0-1	1
	8	2	3	0	0	2
	9	2	3	0-1	1-2	2
	10	2	2	0	0	1

Tab. 5: Auswertung der HE-Färbung
Beurteilt wurden Fibrosegrad, Dichte und Struktur des Granulationsgewebes, Mukosa, Gefäße und Vakuolen in jeweils 4 Graden (0 - 3)

Es zeigten sich in der Kontrollgruppe viel Granulationsgewebe und ein hoher Fibrosegrad. Die Dichte und Struktur des Gewebes war niedrig. Es hatte sich bereits einiges an neuer Mukosa gebildet, die bis in die Anastomose hoch hineinragte und das Narbengewebe epithelialisierte. In den Schnitten war eine deutliche Angiogenese zu erkennen, wobei wenige Vakuolen vorkamen.

Innerhalb der Verumgruppen (Everolimus 1mg/kg KG und Everolimus 3mg/kg KG) konnte dosisabhängig ein abnehmender Fibrosegrad und weniger Granulationsgewebe festgestellt werden, wobei die Dichte und Struktur des Gewebes verstärkt waren. Es erfolgte kaum eine Neubildung von Schleimhaut, besonders in der Everolimus 3mg-Gruppe reichte die Mukosa nur bis an die Anastomose heran. Ebenso nahm die Gefäßneubildung dosisabhängig deutlich ab, wobei die Anzahl von Vakuolen in den Verumgruppen im Vergleich zu Placebo etwas zunahm.

HE-Färbungen von Anastomosen, zum einen mit Placebo behandelt, zum anderen eine beispielhafte Färbung der Everolimus-Gruppe:

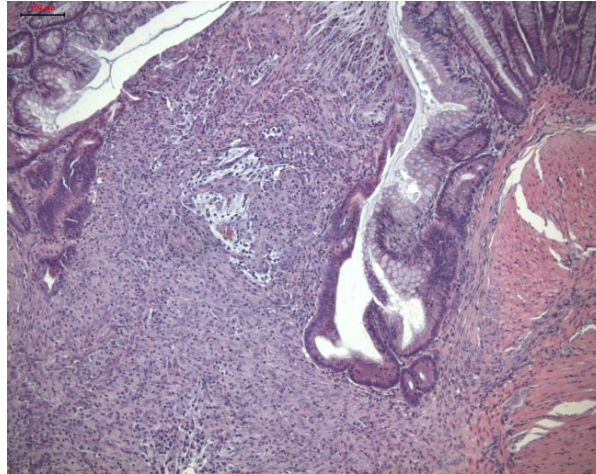


Abb. 21: HE-Färbung (100 x) Placebo-Gruppe; in der Mitte des Bildes befindet sich im Bereich der ehemaligen Schnittstelle breites Granulationsgewebe, es zeigt sich ein hoher Fibrosegrad; rechts davon sind Muskularis, Bindegewebe und Gefäße abgebildet; seitlich oben befindet sich ursprüngliche Schleimhaut; in der Tiefe (untere Mitte des Bildes) ist neue, bereits relativ hohe Schleimhaut zu erkennen, welche in die Anastomose hineinragt und das Narbengewebe epithelialisiert; die Bindegewebsfasern zeigen eine gerade Ausrichtung (Ratte 7)

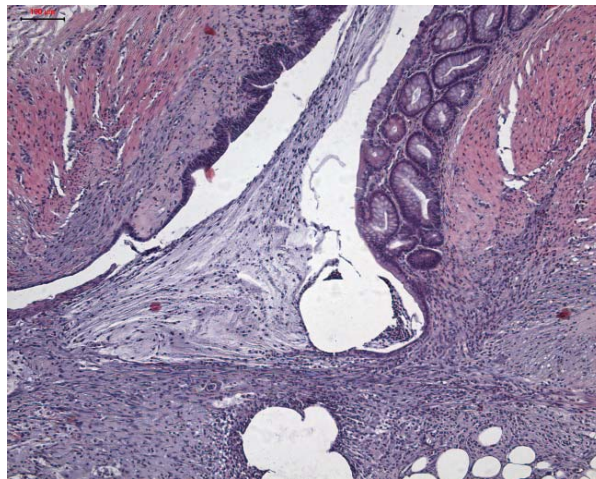


Abb. 22: HE-Färbung (100 x) Everolimus 3mg-Gruppe; in der Mitte des Bildes befindet sich im Bereich der ehemaligen Schnittstelle zellarmes, schmales Granulationsgewebe, der Fibrosegrad ist gering; rechts und links davon sind Muskularis, Bindegewebe und Gefäße abgebildet; die Schleimhaut reicht an die Anastomose heran; innerhalb des Narbengewebes befinden sich aufgelockerte Stellen, die Bindegewebsfasern sind wenig ausgerichtet; mittig des unteren Bildrandes ist die frühere Nahtstelle lokalisiert (Ratte 3)

3.6.2 Azan-Färbung

Ansicht einer Azan-Färbung:

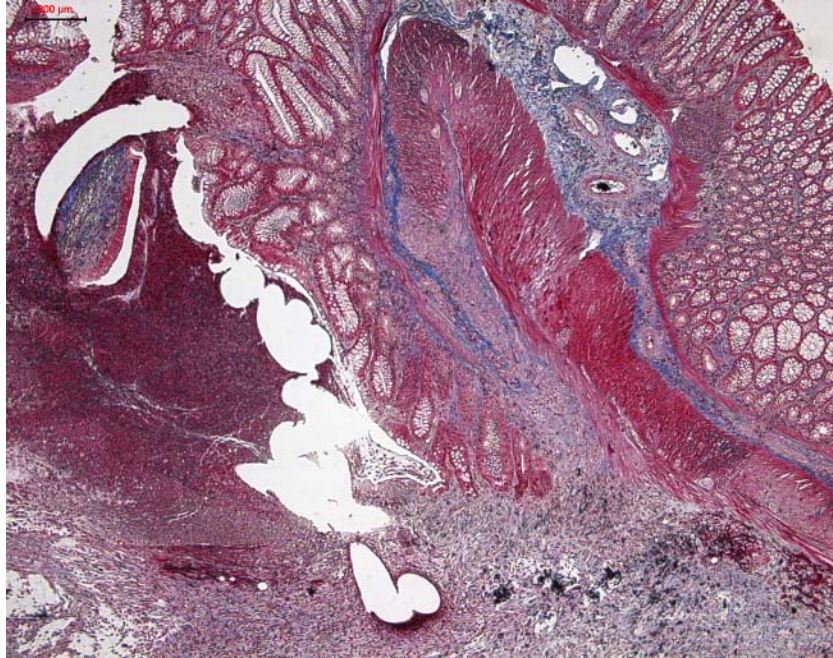


Abb. 23: Azan-Färbung (50 x) Placebogruppe; Verlauf der ehemaligen Schnittstelle im Bild von links oben bis Mitte unten; Reste der Nahtstelle in der Mitte unten; im rechten Bildanteil Kolonschleimhaut und Muskularis (Ratte 3)

Die Einteilung über die Anordnung der Kollagenfasern erfolgte in den Zahlen 1 (ungeordnet), 2 (mäßig geordnet) und 3 (geordnet) (Abb. 24-26).

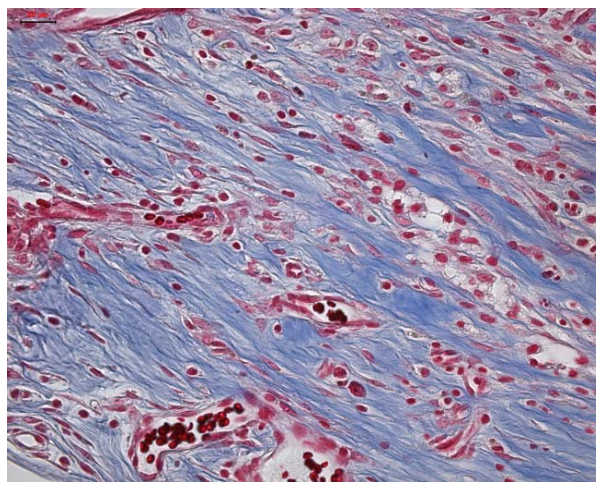


Abb. 24: 3 Azan-Färbung (400 x) Placebo-Gruppe; dichte kollagene, parallel angeordnete Fasern (blau) bilden eine starke Vernetzung; mäßige Zelldichte; mehrere angeschnittene Blutgefäße, v. a. im unteren Bildanteil (Ratte 2)

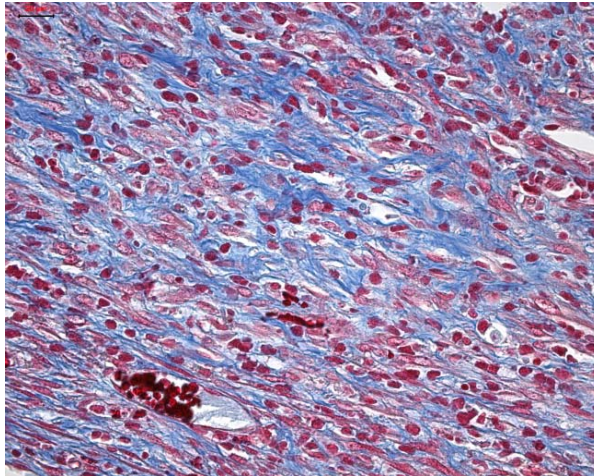


Abb. 25: 2 Azan-Färbung (400 x) Everolimus 1mg-Gruppe; teils vernetzte Fasern lassen eine Ausrichtung erkennen; zunehmende Zelldichte; im unteren Bild angeschnittene Gefäße (Ratte 5)

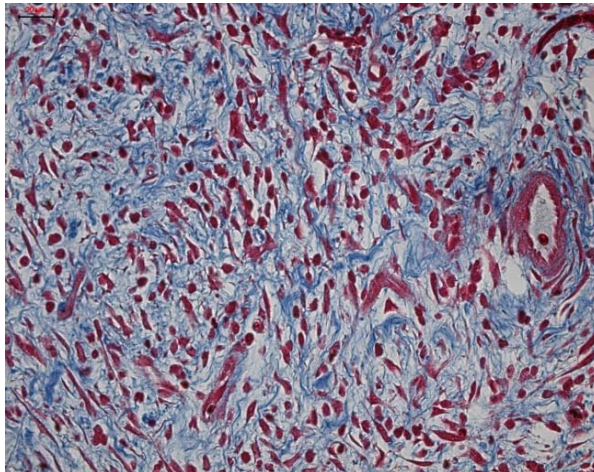


Abb. 26: 1 Azan-Färbung (400 x) Everolimus 3mg-Gruppe; dünne Kollagenfasern ohne Ausrichtung und wenig Zusammenhalt; viele Zellkerne; rechts im Bild ein angeschnittenes Blutgefäß (Ratte 8)

Gruppe A (Kontrollgruppe):

In der Placebogruppe wurde zur Beurteilung der Faseranordnung im Anastomosenbereich viermal eine 3 vergeben. Weiterhin zeigten sich die Kollagenfasern in zwei Präparaten als 2-3 und dreimal als 2.

Gruppe B (Everolimus 1mg-Gruppe):

Bei der niedrigen Dosierung von Everolimus erschienen die Fasern sechsmal als 2 und wurden dreimal mit einer 2-3 und zweimal mit einer 1 beschrieben.

Gruppe C (Everolimus 3mg-Gruppe):

In dieser Gruppe wurde zur Faseranordnung dreimal eine 2 vergeben. Außerdem konnten die Kollagenfasern in einem Präparat mit 1-2 bewertet werden. Sechsmal erschienen die Fasern als 1 (Tab. 6).

Placebogruppe		Everolimus 1mg-Gruppe		Everolimus 3mg-Gruppe	
Tier	Faseranordnung	Tier	Faseranordnung	Tier	Faseranordnung
1	2-3	1	1-2	1	2
2	3	2	2	2	1
3	3	3	2	3	1
4	3	4	2	4	2
5	2	5	2	5	2
6	2	6	2	6	1-2
7	2	7	1	7	1
8	2-3	8	1	8	1
9	3	9	1-2	9	1
10	2	10	2	10	1
		11	1-2		

Tab. 6: Bewertung der Anordnung der Kollagenfasern (1 = ungeordnet, 3 = geordnet) im jeweiligen Anastomosenbereich im Rahmen der Azanfärbung

Zusammenfassend waren die Fasern innerhalb der Anastomosenbereiche der Placebogruppe zu Versuchsende nach 7 Tagen sehr geordnet und vernetzt, ebenso zeigte sich das Gewebe reifer und zellärmer. Dahingegen waren die Fasern in den Anastomosen der Tiere, die Everolimus erhielten, um einiges ungeordneter und die Zelldichte war erhöht (3mg > 1mg).

3.7 Immunhistochemie

3.7.1 PCNA

Ein Ausschnitt einer Anastomosenregion:

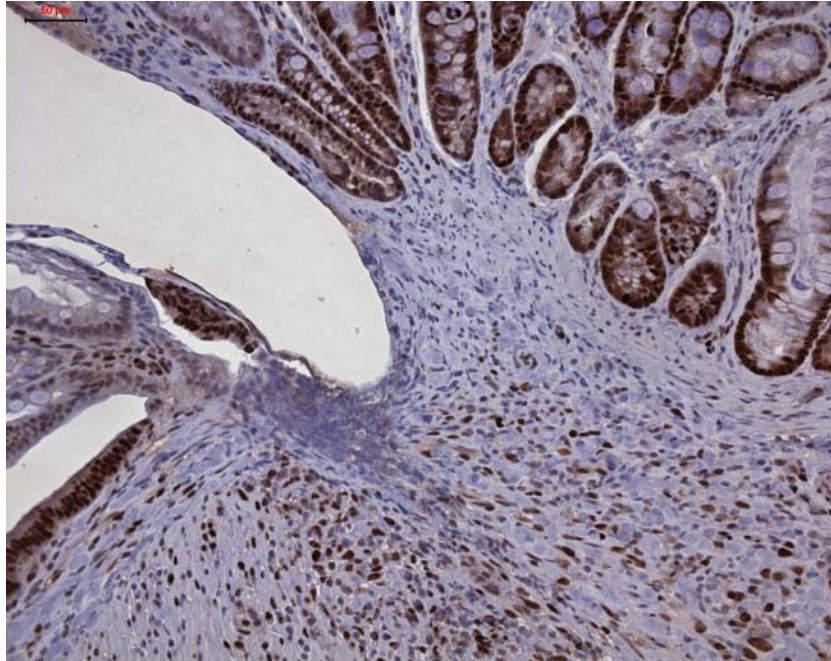


Abb. 27: PCNA (200 x) Everolimus 1mg-Gruppe; apikal angeschnittene Krypten; von links oben schräg nach rechts unten verläuft die ehemalige Schnittstelle; v. a. im unteren Bildanteil proliferierende Kerne (braun) der Anastomosenregion (Ratte 10)

Die Werte der einzelnen Messungen und deren Mittelwerte sind im Anhang in Tabelle 8 verzeichnet.

Gruppe A (Kontrollgruppe):

Für diese Gruppe wurden im Mittel $11091,05 \pm 1976,65/\text{mm}^2$ ($n_{\min}=6831/\text{mm}^2$, $n_{\max}= 14367/\text{mm}^2$) positive Zellen gemessen.

Gruppe B (Everolimus 1mg-Gruppe):

Die durchschnittliche Auszählung erbrachte hier einen Wert von $8067,32 \pm 1127,40/\text{mm}^2$ positiven Zellen ($5985-10832/\text{mm}^2$).

Gruppe C (Everolimus 3mg-Gruppe):

Bei dieser Dosierung lag der Durchschnitt an positiven Zellen bei $6352,45 \pm 1271,77 / \text{mm}^2$ (3301- 8265 / mm^2).

Die Anzahl der positiven Zellen erfuhr von Placebo zu Everolimus 1mg eine 27,26%ige Abnahme. Von der Everolimus 1mg- zur Everolimus 3mg-Gruppe verringerten sich die Kerne um weitere 21,56%.

Im Folgenden werden typische Vertreter aus den einzelnen Gruppen bezüglich der Anzahl und Verteilung positiver Kerne in der PCNA gezeigt:

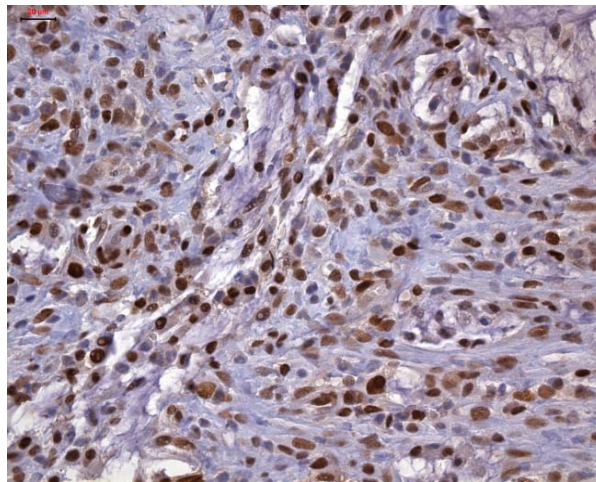


Abb. 28: PCNA (400 x) Placebo-Gruppe; große Anzahl proliferierender Kerne (braun) in der Anastomosenregion (Ratte 7)

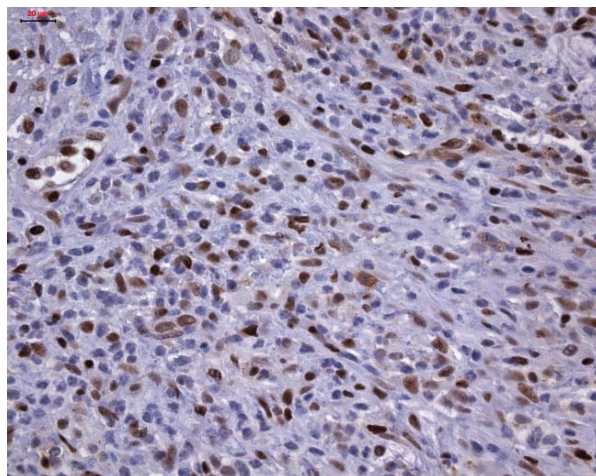


Abb. 29: PCNA (400 x) Everolimus 1mg-Gruppe; abnehmende Zahl an positiven Kernen (Ratte 9)

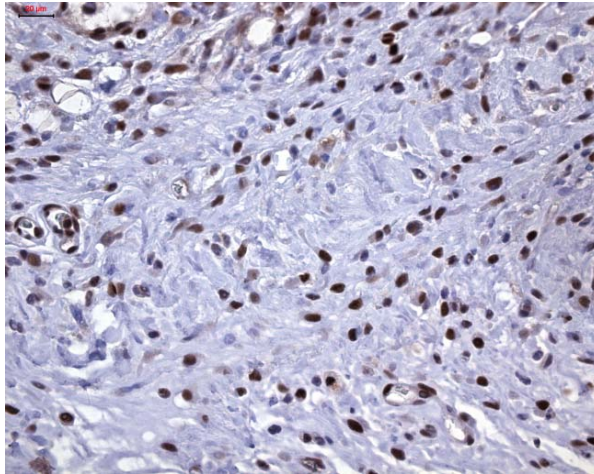


Abb. 30: PCNA (400 x) Everolimus 3mg-Gruppe; vereinzelte PCNA-positive Kerne innerhalb der Anastomose (Ratte 10)

Der Durchschnitt von gemessenen Mittelwerten an positiven Zellen/mm² in der PCNA für die einzelnen Gruppen (Placebo > Everolimus 1mg > Everolimus 3mg), wobei die Unterschiede statistisch signifikant waren:

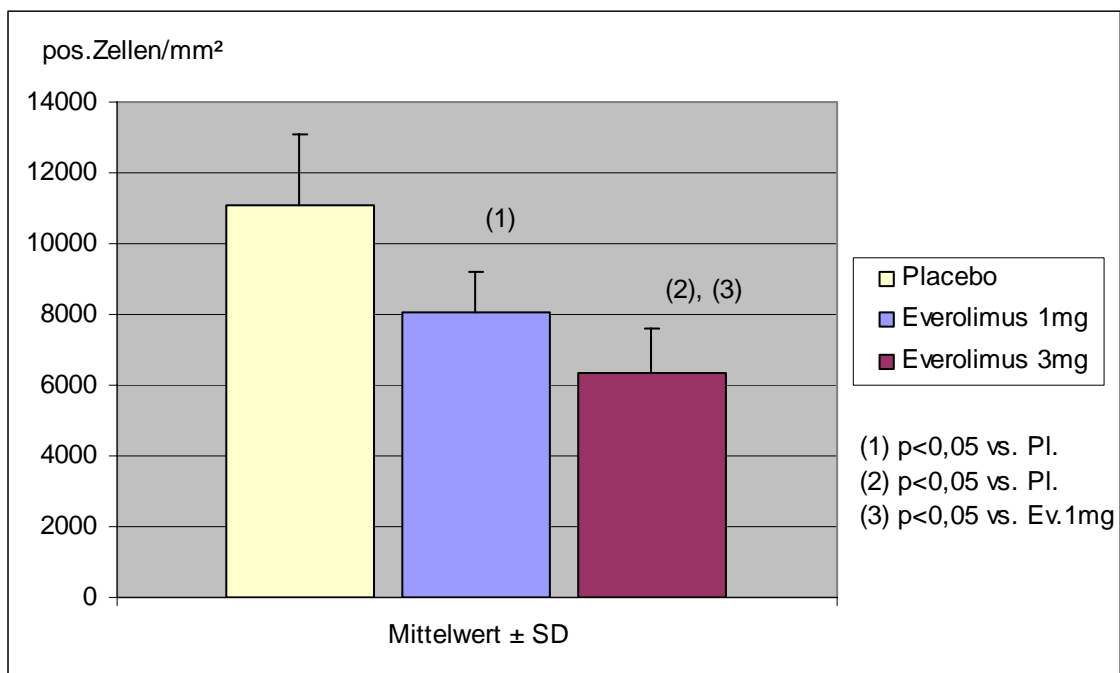


Abb. 31: Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen der PCNA positiven Zellen/mm²

3.8 Hydroxyprolingehalt

Der durchschnittliche Wert des Hydroxyprolingehalts in den Anastomosen der Placebogruppe lag bei $9,77 \pm 2,54 \mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe ($c_{\text{min}} = 5,47 \mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe, $c_{\text{max}} = 13,72 \mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe). In der Everolimus 1mg-Gruppe betrug der Mittelwert der gemessenen Hydroxyprolinkonzentration $10,31 \pm 3,14 \mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe (6,47-16,98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe), in der Everolimus 3mg-Gruppe ergab sich ein Wert von $6,20 \pm 2,68 \mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe (3,13-10,82 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe). Der Unterschied von Placebo zu Everolimus 3mg war statistisch signifikant, ebenso derjenige von Everolimus 1mg zu Everolimus 3mg. Keine Signifikanz bestand zwischen Placebo und Everolimus 1mg (Abb. 32).

Die Einzelwerte sind im Anhang in Tabelle 9 und 10 aufgelistet.

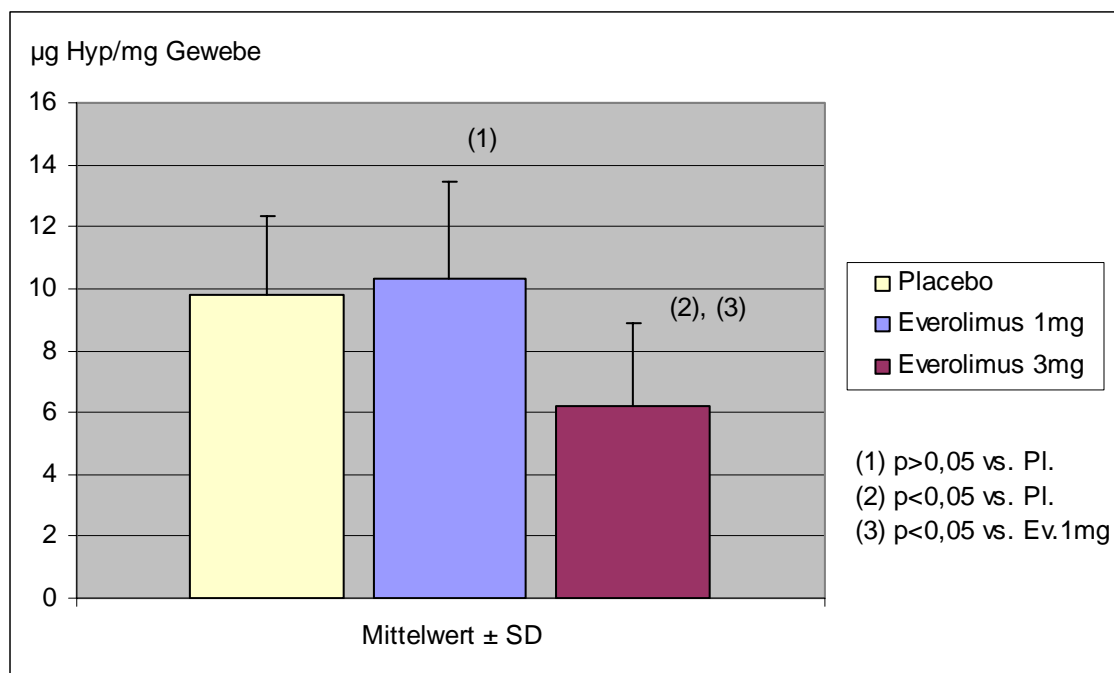


Abb. 32: Durchschnittswerte, Standardabweichungen und Signifikanzen der Hydroxyprolinkonzentrationen in μg Hydroxyprolin/mg Gewebe

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Everolimus (Certican®) auf die Wundheilung von experimentell angelegten Kolonanastomosen bei Ratten untersucht.

Everolimus ist ein Derivat des Immunsuppressivums Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®), welches angewandt wird, um Abstoßungsreaktionen bei klinischen Transplantationen zu verhindern. Seine Wirksamkeit wurde bereits in Kombination mit Calcineurininhibitoren und Kortikosteroiden zur Prävention von Abstoßung bei Nierentransplantatempfängern in zwei großen Multicenter-Studien ermittelt [Lorber et al. 2005; Vitko et al. 2005]. Ebenso wurde die Sicherheit einer suffizienten Immunsuppression mit Everolimus ohne die zusätzliche Gabe von Calcineurininhibitoren nach Herztransplantationen untersucht [Rothenburger et al. 2007].

Everolimus inhibiert eine Reihe von Zytokin-vermittelten Signaltransduktionswegen. Durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR wird schließlich das Voranschreiten der T-Zellen von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. Seine Wirkung beschränkt sich jedoch nicht nur auf T- und B-Zellen, sondern hemmt generell eine durch Wachstumsfaktoren stimulierte Proliferation von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen [Nashan 2002 a; Schuler et al. 1997]. Die antiproliferativen Effekte von mTOR-Inhibitoren beziehen sich somit auf eine Vielzahl von Zellen inklusive Fibroblasten, Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen [Azzola et al. 2004; Park et al. 2004; Viñals et al. 1999]. In Mesangiumzellen wurde die Inhibition der PDGF-induzierten Kollagensynthese aufgezeigt [Kim et al. 2004]. Besonders Kollagen und die aufgeführten Zellen sind an den ersten beiden Phasen im Verlauf der Wundheilung beteiligt.

Für Sirolimus ist eine Störung der Wundheilung in vielen Fällen klinisch und tierexperimentell nachgewiesen, für Everolimus liegen in der Literatur jedoch bislang nur wenig Daten vor.

Troppmann et al. (2003) berichteten unter Gabe von Sirolimus über eine signifikante Zunahme chirurgischer Wundkomplikationen nach klinischen Nierentransplantationen, wobei das Transplantat nicht betroffen war. Die Mortalität war nicht erhöht. Von anderen Arbeitsgruppen wurde bei Nierentransplantatempfängern eine erhöhte Inzidenz an Wundheilungskomplikationen, z. B. Lymphozelen um das Transplantat, oberflächliche Wundinfektionen und Narbenhernien, festgestellt [Dean et al. 2004; Flechner et al. 2003; Valente et al. 2003].

Nach Verabreichung von Sirolimus ließ sich nach Leber-, Darm-, und Herztransplantationen eine Zunahme an Wundheilungskomplikationen, besonders Hernien, Abszessen und Dehiszenzen beobachten [Guilbeau 2003; Kobashigawa et al. 2006; Kuppahally et al. 2006].

Speziell bei angelegten Anastomosen ergaben tierexperimentelle Untersuchungen Ähnliches: Für die Behandlung mit Sirolimus wurde bei Schweinen eine reduzierte Belastbarkeit von Ureter- und Gallenganganastomosen verzeichnet [Kahn et al. 2005 a und b].

Dutly et al. (2003) stellten unter Gabe von Everolimus bei Schweinen nach vierzehn Tagen eine geringere mechanische Reißfestigkeit von Bronchialanastomosen fest. Van der Vliet et al. (2006) führten jüngst erste Versuche zur Wirkung von Everolimus auf die Heilung von Kolonanastomosen bei Ratten durch. In diesen verringerte Everolimus die mechanische Stabilität der Anastomosen signifikant, ebenso kam es zu einem verminderten Kollagengehalt. Ob und auf welche Weise Everolimus die Wundheilung auf intestinaler Ebene beeinflusst und ob es möglicherweise sogar zu vermehrten Anastomoseninsuffizienzen führt, wurde bisher allerdings noch unzureichend untersucht.

In der vorliegenden Studie wurde die Wundheilung von Kolonanastomosen untersucht. Als Parameter hierfür fanden die histologischen Basisfärbungen HE und Azan Verwendung. Zusätzlich erfolgte die Beurteilung des Kollagengehalts innerhalb der Anastomosenregion anhand der quantitativen Messung von Hydroxyprolin. Weiterhin wurde innerhalb der Immunhistochemie die PCNA-Expression als Marker für die Zellproliferation bestimmt. Die Korrelation der mechanischen Wundheilung erfolgte mittels Messung des „bursting pressure“.

Der anatomische Aufbau des Rattendarms ähnelt dem des Menschen, ebenso verhält es sich mit der fetalen Mikroflora des Rattenkolons und dem humanen Kolon [Hermann et al. 1964]. Die Wundheilung verläuft in beiden Fällen nach den gleichen Prinzipien in drei aufeinander folgenden Phasen: exsudative, proliferative und reparative Phase [Coerper et al. 2004; Sedlarik 1997; Witte und Barbul 1997]. Es sind somit Rückschlüsse auf die Anastomosenheilung am Menschen möglich.

Die Zeitdauer der Versuche wurde auf sieben Tage festgelegt, da durch die stattfindende Kollagenolyse und der erst beginnenden Kollagensynthese früher noch keine ausreichende Eigenstabilität der Wunde besteht. Der Zusammenhalt dieser wird in den frühen Phasen der Wundheilung vor allem durch das Nahtmaterial gewährleistet [Luenstedt und Debus 1990]. Ein späterer Zeitpunkt wurde durch die Anwendung der Methode des „bursting pressure“ limitiert. Der „bursting pressure“ repräsentiert die Zunahme der Anastomosenstärke nur etwa eine Woche nach Operation, solange die Zerreißung innerhalb des Anastomosenbereichs eintritt [Hendriks und Mastboom 1990].

Insbesondere wurde auf die dosisabhängigen Wirkunterschiede von Everolimus Wert gelegt. In Anlehnung an Hausen et al. (1999) und Johnson et al. (2003) führen die hier verwendeten Dosierungen von 1 und 3mg/kg KG zu einem immunsuppressiven Effekt bei der Ratte. Die 3mg-Dosis führt bei dieser zu einer drei- bis vierfach stärkeren Immunsuppression im Vergleich zum Zielbereich beim Menschen. Die klinische Anwendung von Everolimus erfolgt in

Kombination mit einem Calcineurininhibitor und Kortikosteroiden. Beim Patienten liegt der Zielbereich des Everolimus-Blutspiegels zwischen 3 und 8ng/ml, der mit 0,75-1,5mg Everolimus/Patient erzielt wird [Kovarik et al. 2004].

Im Laufe einer Woche nach Anastomosenanlage zeigten sich bereits Differenzen im Gewichtsverlauf zwischen den drei Gruppen, was eine sensible Methode für die postoperative Genesung der Tiere darstellt. Die Versuchstiere der Placebogruppe zeigten nach Operation nur eine geringe Gewichtsabnahme, welche innerhalb des Versuchszeitraumes zu einem großen Teil wieder ausgeglichen wurde. Dahingegen nahmen die Tiere der Everolimusgruppen dosisabhängig initial mehr an Gewicht ab und legten im Verlauf nur noch wenig zu. Diese Resultate decken sich mit denen von van der Vliet et al. [2006]. Ein toxischer Effekt von Everolimus scheint jedoch unwahrscheinlich, da auch bei der hohen Dosierung ein geringer Gewichtsanstieg verzeichnet wurde.

Innerhalb jeder der drei untersuchten Gruppen trat jeweils eine Insuffizienz auf. Deren gesamter Anteil lag mit 9,3% in jenem Bereich, welcher in publizierter Literatur für intestinale Anastomoseninsuffizienzen (3,4-12%) beschrieben wurde [Golub et al. 1997; Matthiesen et al. 2004; Rullier et al. 1998].

Bereits 1991 erfolgte von van der Ham et al. die Beurteilung intestinaler Verwachsungen von mit Fibrinkleber behandelten Kolonanastomosen mittels einer Einteilung in vier Grade. Diese fand bei Zacharakis et al. (2007) erneut Verwendung, welche den Einfluss von IGF-I auf die Heilung von Kolonanastomosen untersuchten. Für die vorliegende Arbeit wurde deren Skala leicht modifiziert und auf fünf Verwachsungsgrade erweitert.

Innerhalb der Placebogruppe kamen nur geringgradige Verwachsungen an den Anastomosen vor. Der Verwachsungsgrad an der Anastomosenregion nahm umso mehr zu, je höher das Medikament dosiert wurde.

Anhand des HE-gefärbten Schnittes wurde die Wundheilung innerhalb der Anastomosenregion mittels verschiedener Parameter beurteilt. Die HE-Färbung

fand schon bei anderen Autoren Verwendung, um beispielsweise die Anzahl von Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten oder auch Ödeme, Granulations- und Narbengewebe zu beurteilen [Sikas et al. 2006; Verhofstad et al. 2001]. In den vorliegenden Versuchen wurde besonders auf folgende Kriterien geachtet: die Menge, Dichte und Struktur des Granulationsgewebes, den Fibrosegrad, die Beschaffenheit der Schleimhaut und die Darstellung von Gefäßen und Vakuolen. In der Placebogruppe konnte im Vergleich zu den beiden Verumgruppen eine größere Menge Granulationsgewebe und ein erhöhter Fibrosegrad festgestellt werden, was in den Verumgruppen dosisabhängig abnahm. Die Dichte und Struktur des Gewebes war dosisabhängig erhöht. Innerhalb der Kontrollpräparate hatte sich bereits deutlich neue Mukosa gebildet, die bis in die Anastomose weit hineinragte und das Narbengewebe epithelialisierte. In den beiden Gruppen, die Everolimus erhielten, erfolgte kaum eine Neubildung von Schleimhaut, wobei diese besonders in der Everolimus 3mg-Gruppe nur bis an die Anastomose heranreichte. Im Vergleich zur Kontrolle konnten innerhalb der Verumgruppen dosisabhängig deutlich weniger Gefäße verzeichnet werden. Die Anzahl von Vakuolen war in Präparaten unter Everolimus-Medikation etwas höher als in denen der Placebogruppe.

Die dosisabhängige verminderte Menge an Granulationsgewebe korreliert mit der ebenso dosisabhängigen Abnahme von Gefäßen und Mukosa innerhalb der Verumgruppen im Vergleich zu Placebo. Insgesamt lag eine gestörte Granulation bei reduzierter Angiogenese vor. Diese Erkenntnis bestätigt den Wirkmechanismus von Everolimus, welches unter anderem die vaskulären, glatten Muskelzellen in Gefäßen hemmt [Eisen et al. 2003]. Die Anzahl der Vakuolen scheint nicht aussagekräftig, da es sich aufgrund von intraoperativ eingenähtem Fett um Artefakte handeln könnte. Diese Ergebnisse, bei denen im Rahmen der HE-Färbung deutliche Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen festgestellt werden konnten, widersprechen denen von van der Vliet et al (2006). Sie stellten in Bezug auf histologische Parameter in HE-gefärbten Schnitten keinerlei architektonische Veränderungen zwischen den verschiedenen behandelten Anastomosen fest.

Die Quantifizierung von Kollagen erfolgte über die Messung des Hydroxyprolinegehalts. Laut Hendriks et al. (1990) sei dies in enteralen Anastomosen gleichzusetzen. Die verwendete Methode basiert auf der schon lange etablierten von Wössner [1961], modifiziert durch Stegemann und Stalder [1967].

Bei der Bestimmung von Hydroxyprolin ließ sich der größte Gehalt innerhalb der Anastomosen der Placebogruppe sowie der Everolimus 1mg-Gruppe verzeichnen. Der Unterschied war gering und nicht signifikant. Dies deckt sich ebenso nicht mit den Ergebnissen von van der Vliet et al. (2006). Sie stellten zwischen allen drei Versuchsgruppen abnehmende Werte mit statistischer Signifikanz fest. In der vorliegenden Arbeit bestand jedoch erst zur Everolimus 3mg-Gruppe eine signifikante Abnahme der Hydroxyprolinkonzentration.

In der Azanfärbung der Placebogruppe stellten sich die Kollagenfasern der Anastomosenbereiche parallel angeordnet und vernetzt dar. Das Gewebe zeigte sich sehr reif und enthielt wenig Zellen. In der Everolimus 1mg-Gruppe waren die Fasern gegenüber der Placebogruppe bereits um einiges ungeordneter und erschienen weniger vernetzt. Der Zellgehalt nahm zu. Die Kollagenfasern innerhalb der Everolimus 3mg-Gruppe zeigten sich sehr ungeordnet und die Zelldichte war stark erhöht. Eine Vernetzung war kaum noch erkennbar. Insgesamt nahm die Ordnung der Kollagenfasern mit zunehmender Dosierung von Everolimus ab. Dieser Aspekt korreliert mit der dosisabhängigen Reduktion des Fibrosegrades und der abnehmenden Menge an Granulationsgewebe innerhalb der HE-Färbung. Ebenso konnte in den HE-gefärbten Schnitten der Verumgruppen eine größere Dichte und Struktur des Gewebes festgestellt werden, was sich mit der erhöhten Zelldichte aus der Azan-Färbung deckt.

Des Weiteren zeigte sich im Rahmen des Auszählungsverfahrens der PCNA-Präparate, dass die meisten proliferierenden Zellen in der Placebogruppe existierten. In den Everolimusgruppen wurden jeweils dosisabhängig signifikant weniger proliferierende Zellen gemessen, die Kerne ließen sich nur noch

vereinzelt darstellen. Korrespondierend zu den Ergebnissen der HE- und Azan-Färbung nahm die Anzahl der PCNA-positiven Zellen mit zunehmender Dosierung von Everolimus ab.

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit die Erkenntnisse der histologischen, immunhistochemischen und biochemischen Untersuchungen erörtert wurden, sollen nun weitere Ergebnisse diskutiert werden. Insgesamt bestätigten die Resultate der physikalischen Messungen die bereits aufgeführten Befunde.

Zur Beurteilung der mechanischen Stabilität wurde die Methode des „bursting pressure“ verwendet. Diese repräsentiert bereits in früheren Studien ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung der Anastomosensicherheit im Tierexperiment [Attard et al. 2005; Cihan et al. 2003; Ikeuchi et al. 1999; Mansson et al. 2002].

In anderen Arbeiten wurde das Nahtmaterial vor der mechanischen Prüfung entfernt, was in diesen Versuchen unterblieb, da die Manipulation des Gewebes die Messungen des „bursting pressure“ möglicherweise verändert hätte [Slavin et al. 1992]. Aus dem gleichen Grund wurden die Verwachsungen der Anastomosen vor der mechanischen Testung nicht vollständig entfernt, sondern vorsichtig stumpf gelöst.

Die Messungen des „bursting pressure“ ergaben umso niedrigere Werte, je höher die Dosierung von Everolimus war. Die mechanische Belastbarkeit der Anastomose war in der Placebogruppe gegenüber den Everolimusgruppen signifikant höher, wobei sich zwischen den Werten der beiden Medikamentengruppen keine Signifikanz nachweisen ließ. Zusammenfassend nahm die Belastbarkeit der Anastomosenregion dosisabhängig ab.

Seit den Untersuchungen von Jiborn et al. (1978) ist bekannt, dass die Darmwand bei Messungen des „bursting pressure“ nicht unbedingt in der Anastomose selbst einreißen muss, sondern dass es ebenso proximal oder distal davon zur Perforation kommen kann. Die Festigkeit der Anastomose kann

somit diejenige der Umgebung durch überschießende Kollagenbildung oder durch noch vorhandenes Nahtmaterial überschreiten.

Alle Perforationsstellen des „bursting pressure“ fanden sich in der Placebogruppe außerhalb der Anastomose. Das bedeutet, dass die Anastomose problemlos verheilt war. Nahezu alle Perforationen in der Everolimus 1mg-Gruppe befanden sich stattdessen innerhalb der Anastomose. Diese Beobachtung ist ein Indiz dafür, dass die Gewebefestigkeit der Anastomosenregion unter Gabe von Everolimus 1mg abnahm. In der Everolimus 3mg-Gruppe zeigte sich eine unerwartet ausgewogene Verteilung. Die eine Hälfte der Perforationen befand sich außerhalb, die andere innerhalb der Anastomose.

Es kann angenommen werden, dass die starken Verwachsungen die Anastomosen der Everolimus 3mg-Gruppe stabilisiert haben, weshalb einige Perforationsstellen außerhalb des Anastomosenbereichs lagen. Durch Zunahme dieser Verwachsungen und dem bedingten Gewinn an Stabilität wiesen die Werte des „bursting pressure“ der Everolimus 3mg-Gruppe keine signifikante Abnahme gegenüber Everolimus 1mg auf.

Die Ergebnisse der Messung des Hydroxyprolinegehaltes zwischen der Placebogruppe und der Everolimus 1mg-Gruppe stimmen nicht mit den anderen Versuchsergebnissen, wie der HE- und Azan-Färbung, der PCNA-Expression und dem „bursting pressure“ überein. Nach Jiborn et al. [1978] besteht auch kein direkter Zusammenhang zwischen gemessenem „bursting pressure“ und einer bestimmten Kollagenkonzentration.

Insgesamt bestätigen die Erkenntnisse der mechanischen Anastomosenstabilität die Ergebnisse der HE- und Azan-Färbung. Sowohl der „bursting pressure“, als auch die Menge des Granulationsgewebes und der Fibrosegrad reduzierten sich dosisabhängig. Genauso verhielt es sich mit neu gebildeter Mukosa und Gefäßen im Anastomosenbereich, die ebenso wie die Faserordnung dosisabhängig abnahmen. Die Resultate der PCNA-Expression bestätigen die abnehmende Wundheilung durch eine dosisabhängige Verminderung der Zellproliferation.

Trotz bedeutender Unterschiede in Parametern der Wundheilung traten bei den beiden Medikamentengruppen im Vergleich zur Placebogruppe jedoch keine weiteren Anastomoseninsuffizienzen auf. Grund dafür könnte zum einen sein, dass die Dichte und Struktur des Gewebes unter Everolimus-Medikation zunahm, zum anderen, dass der Hydroxyprolinegehalt von der Placebo- zur Everolimus 1mg-Gruppe nicht abnahm, wodurch die Anastomose mechanisch relativ stabil blieb. In der Everolimus 3mg-Gruppe reduzierte sich der Hydroxyprolinegehalt deutlich, die Anastomose wurde aber durch die starke Verwachsung stabilisiert.

Everolimus hat einen negativen Einfluss auf die Wundheilung von Kolonanastomosen. Aufgrund seines Wirkmechanismus entspricht dies den Erwartungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie decken sich demnach mit Erkenntnissen in relevanter Literatur und haben gezeigt, dass Everolimus die intestinale Wundheilung nach einem bestimmten Zeitraum auf verschiedene Weise beeinträchtigt. Einerseits konnte die verminderte Wundheilung sowohl histologisch als auch immunhistochemisch gesichert werden, andererseits reduzierte sich die mechanische Stabilität. Dennoch kam es selbst bei der verwendeten höheren Dosierung nicht zu einem vermehrten Auftreten von Insuffizienzen.

Für den klinischen Einsatz und eine optimale Sicherheit für Patienten sollte abgewogen werden, ob Everolimus erst nach den überstandenen ersten Phasen der Wundheilung eingesetzt wird oder bereits unmittelbar postoperativ, begleitet von anfänglicher parenteraler Ernährung und langsam sukzessiven Kostaufbau. Zum derzeitigen Zeitpunkt wird Everolimus klinisch erst zwei bis drei Wochen postoperativ verabreicht.

Da Everolimus klinisch gemeinsam mit Calcineurininhibitoren und Kortikosteroiden angewendet wird, sollte darüber hinaus die gemeinsame Wirkung dieser Kombinationen auf die Wundheilung untersucht werden.

Die erfolgreiche Anastomosenheilung im Kolon ist am Übergang der späten entzündlichen zur proliferativen Phase aufgrund der verstärkten Kollagenolyse eingeschränkt. Zu diesem Zeitpunkt ist noch nicht genügend neues Kollagen synthetisiert und bedingt so eine geringe Stabilität der Anastomose [Cronin et al. 1968; Thornton und Barbul 1997].

An diesem Punkt besteht ein Ansatz, die Wundheilung zu verbessern. Je früher die Synthese von neuem Kollagen einsetzt, desto kürzer ist die vulnerable Phase der Heilung. So könnte die Anastomose schneller an mechanischer Belastbarkeit gewinnen, wodurch das Risiko für Frühinsuffizienzen reduziert werden könnte.

Zur Diskussion stehen Zytokine, eine Gruppe verschiedenster Faktoren wie Interleukine, Interferone, ebenso das Wachstumshormon (human growth hormone; hGH) und die klassischen Wachstumsfaktoren. Diese Polypeptide fördern die Zellteilung, Migration und Differenzierung. Weiterhin beeinflussen sie die DNA-Synthese über Proteinexpression und Enzymproduktion. Die Wundheilung wird somit durch Stimulation von Angiogenese und Zellproliferation beschleunigt.

Bisherige Studien zeigten bereits die erfolgreiche Anwendung von Wachstumsfaktoren zur Verbesserung der Wundheilung [Beckert et al. 2005 und 2007; Coerper et al. 2001; Debus et al. 2000]. Intraperitoneal appliziertes IGF-I erhöhte den Hydroxyprolinspiegel und „bursting pressure“ von Kolonanastomosen. Die Einwanderung von Entzündungszellen reduzierte sich nach einer Woche, die Fibroblastenaktivität nahm zu [Zacharakis et al. 2007]. Dagegen ergaben Untersuchungen von Petersen et al. (1996) einen nur erhöhten Hydroxyprolinegehalt, jedoch keinen erhöhten „bursting pressure“ in Kolonanastomosen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. TGF-beta1 zeigte in Kolonanastomosen kollageninduzierende Aktivität [Buckmire et al. 1998]. Differenzen bestehen in der Applikationsform, die sowohl singulär, als auch in Kombination erfolgen kann [Egger et al. 2001]. Von Tei et al. (2000) wurde nach Applikation von hGH bei hGH-defizienten Ratten ein vermehrtes viszerales Wachstum induziert.

In der Literatur ist die Wirksamkeit der Wachstumsfaktoren auf molekularer Ebene besonders in den ersten beiden Phasen der Wundheilung nachgewiesen. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit besteht genau zu diesem Zeitpunkt die Notwendigkeit, die Kolonanastomose zu festigen. Gelänge es, die verminderte Anastomosenstabilität zu kompensieren, könnte Everolimus möglicherweise direkt postoperativ verabreicht werden. Derartige Untersuchungen könnten Gegenstand weiterer Studien sein.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass Everolimus die intestinale Wundheilung dosisabhängig hemmt. Zum einen liegt eine gestörte Granulation mit reduzierter Angiogenese und verminderter Neubildung von Mukosa vor, zum anderen wird die Zellproliferation mit steigender Dosierung beeinträchtigt. Die Ordnung der Kollagenfasern nimmt mit steigender Immunsuppression ab, wobei der Hydroxyprolinegehalt der Anastomose lediglich in hoher Dosierung vermindert wird. Korrespondierend zu diesen Werten nimmt der „bursting pressure“ der Anastomosen unter Everolimus-Medikation signifikant ab. Unter Gabe von Everolimus kam es zu keinem vermehrten Auftreten von Insuffizienzen, da die Anastomosen möglicherweise durch die dosisabhängige Zunahme der Verwachsungen stabilisiert wurden.

Everolimus wird klinisch derzeit postoperativ erst nach Abschluss der ersten Phasen der Wundheilung verabreicht. Um seine potente Immunsuppression in Zukunft zu einem früheren Zeitpunkt einsetzen zu können, sind weitere Studien nötig, welche zur Erforschung der Kompensation des negativen Effekts von Everolimus auf die intestinale Wundheilung beitragen.

5 Zusammenfassung

Everolimus (Certican®) wurde im Jahr 2005 als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin zugelassen. Ausgehend von einer geringen Anzahl an experimentellen Studien zu dessen Wirkung auf die intestinale Wundheilung, war Ziel der vorliegenden Studie zu klären, in welcher Weise Everolimus die Wundheilung von Kolonanastomosen bei Ratten beeinflusst.

Die Durchführung der Versuche erfolgte an männlichen Sprague-Dawley-Ratten. Nach einem Zeitraum von sieben Tagen wurde die Wirkung zweier differenzierter Dosierungen (1 und 3mg/kg KG) von Everolimus im Vergleich zu Placebo auf angelegte Kolonanastomosen untersucht. Everolimus bzw. Placebo wurden täglich per gastric gavage verabreicht, der Gewichtsverlauf der Tiere notiert. Die intestinale Wundheilung wurde über die mechanische Belastbarkeit der Anastomose mittels Messung des „bursting pressure“ bestimmt. Zusätzlich wurde die Perforationsstelle und der Verwachsungsgrad der Anastomose beschrieben. Es erfolgte die histologische und immunhistochemische Beurteilung des Gewebes, sowie die Bestimmung des quantitativen Kollagengehaltes mittels Messung von Hydroxyprolin.

Innerhalb der HE-Färbung zeigte sich im Anastomosenbereich eine dosisabhängige Verminderung des Granulationsgewebes, dessen Dichte zunahm. Die gestörte Granulation korrelierte mit einer reduzierten Angiogenese und verminderter Neubildung von Mukosa unter Everolimus-Medikation. Bei der Bestimmung von Hydroxyprolin ergab sich kaum eine Differenz zwischen den Werten der Placebo- und Everolimus 1mg-Gruppe. Erst zur höheren Dosierung konnte eine signifikante Abnahme der Hydroxyprolinkonzentration gemessen werden. Im Rahmen der Azanfärbung und der PCNA-Expression bestätigten sich die Erkenntnisse gegenseitig, was ebenso mit denen der HE-Färbung übereinstimmte. In der Azanfärbung nahm die Unordnung der Kollagenfasern dosisabhängig zu, innerhalb der PCNA-Expression zeigte sich dosisabhängig

eine abnehmende Rate proliferierender Zellen. Korrespondierend dazu ergaben die Messungen des „bursting pressure“ umso niedrigere Werte, je höher Everolimus dosiert wurde. In jeder Gruppe kam jeweils eine Insuffizienz vor. Die Perforationsstellen des „bursting pressure“ fanden sich in der Placebogruppe vollständig außerhalb der Anastomose, wobei sich die der Everolimus 1mg-Gruppe nahezu alle in der Anastomose befanden. In der Everolimus 3mg-Gruppe zeigte sich eine ausgewogene Verteilung. Die Erklärung hierfür könnte in den Verwachsungen der Anastomosen liegen, die dosisabhängig zunahmen. Der hohe Verwachsungsgrad in der Everolimus 3mg-Gruppe könnte die Anastomose stabilisiert haben. Diese Beobachtung wurde in dieser Gruppe durch die hohe Gewebsdichte, festgestellt in der HE-Färbung, und die erhöhte Zellzahl innerhalb der Azan-Färbung gestützt. Das fehlende Auftreten weiterer Insuffizienzen innerhalb der beiden Medikamentengruppen könnte dadurch begründet werden, dass der Hydroxyprolinegehalt von der Placebo- zur Everolimus 1mg-Gruppe nicht abnahm, wodurch die Anastomose mechanisch relativ stabil blieb. In der Everolimus 3mg-Gruppe reduzierte sich der Hydroxyprolinegehalt deutlich, jedoch wurde die Anastomose durch die starke Verwachsung von außen stabilisiert.

Aufgrund dieser Untersuchungen beeinträchtigt Everolimus die intestinale Wundheilung in ihren frühen Phasen, führt jedoch nicht zu einem vermehrten Auftreten von Insuffizienzen. Für den klinischen Einsatz sollte abgewogen werden, ob Everolimus erst nach den überstandenen ersten Phasen der Wundheilung oder unmittelbar postoperativ eingesetzt wird.

In weiteren Studien könnte versucht werden, den negativen Effekt von Everolimus auf die Wundheilung über eine Applikation von Wachstumsfaktoren oder -hormon zu kompensieren.

6 Literaturangaben

- Ashcroft G.S., Mills S.J., Ashworth J.J.
Ageing and wound healing. *Biogerontology* 2002; 3(6): 337-45
- Attard J.A., Raval M.J., Martin G.R., Kolb J., Afrouzian M., Buie W.D., Sigalet D.L.
The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model. *Dis Colon Rectum* 2005; 48(7): 1460-70
- Azzola A., Havryk A., Chhajed P., Hostettler K., Black J., Johnson P., Roth M., Glanville A., Tamm M.
Everolimus and mycophenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation. *Transplantation* 2004; 77(2): 275-80
- Beckert S., Hierlemann H., Muschenborn N., Witte M.B., Ranke M., Coerper S.
Experimental ischemic wounds: correlation of cell proliferation and insulin-like growth factor I expression and its modification by different local IGF-I release systems. *Wound Repair Regen.* 2005; 13(3): 278-83
- Beckert S., Haack S., Hierlemann H., Farrahi F., Mayer P., Koenigsrainer A., Coerper S.
Stimulation of steroid-suppressed cutaneous healing by repeated topical application of IGF-I: different mechanisms of action based upon the mode of IGF-I delivery. *J Surg Res.* 2007; 139(2): 217-21
- 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; 80(1): 52-7
- Chung J., Kuo C.J., Crabtree G.R., Blenis J.
Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signalling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 1992; 69(7): 1227-36
- Cihan A., Armutcu F., Uçan B.H., Acun Z., Numanoglu V.K., Guerel A., Ulukent S.C.
Comparison of the measurement methods of bursting pressure of intestinal anastomoses. *Hepatogastroenterology* 2003; 50 Suppl 2
- Coerper S., Wolf S., von Kiparski S., Thomas S., Zittel T.T., Ranke M.B., Hunt T.K., Becker H.D.
Insulin-like growth factor I accelerates gastric ulcer healing by stimulating cell proliferation and by inhibiting gastric acid secretion. *Scand J Gastroenterol.* 2001; 36(9): 921-7

- Coerper S., Beckert S., Becker H.D.
Possible interventions in impaired wound healing.
Chirurg 2004; 75(5): 471-6
- Cronin K., Jackson D.S., Dunphy J.E.
Changing bursting strength and collagen content of the healing colon.
Surg Gynecol Obstet. 1968; 126(4): 747-53
- Dean P.G., Lund W.J., Larson T.S., Prieto M., Nyberg S.L., Ishitani M.B.,
Kremers W.K., Stegall M.D.
Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective,
randomized comparison of sirolimus and tacrolimus.
Transplantation 2004 27; 77(10): 1555-61
- Debus E.S., Schmidt K., Ziegler U.E., Thiede A.
The role of growth factors in wound healing.
Zentralbl Chir. 2000; 125 Suppl 1: 49-55
- Dutly A.E., Gaspert A., Inci I., Schneiter D., Korom S., Weder W.
The influence of the rapamycin-derivate SDZ RAD on the healing of
airway anastomoses. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003; 24(1): 154-8
- Egger B., Inglin R., Zeeh J., Dirsch O., Huang Y., Buechler M.W.
Insulin-like growth factor I and truncated keratinocyte growth factor
accelerate healing of left-sided colonic anastomoses.
Br J Surg. 2001; 88(1): 90-8
- Eisen H.J., Tuzcu E.M., Dorent R., Kobashigawa J, Mancini D., Valantine-von
Kaepler H.A., Starling R.C., Sorensen K., Hummel M., Lind J.M.,
Abeywickrama K.H., Bernhardt P.
Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in
cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2003; 349(9): 847-58
- Flanagan W.M., Crabtree G.R.
Rapamycin inhibits p34cdc2 expression and arrests T lymphocyte
proliferation at the G1/S transition. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 696: 31-7
- Flechner S.M., Zhou L., Derweesh I., Mastroianni B., Savas K., Goldfarb D.,
Modlin C.S., Krishnamurthi V., Novick A.
The impact of sirolimus, mycophenolate mofetil, cyclosporine,
azathioprine, and steroids on wound healing in 513 kidney-transplant
recipients. *Transplantation* 2003; 76(12): 1729-34
- Garcia J.G., Criado F.J., Persona M.A., Alonso A.G.
Healing of colonic ischemic anastomoses in the rat: role of superoxide
radicals. *Dis Colon Rectum* 1998; 41(7): 892-5

- Golub R., Golub R.W., Cantu R. Jr, Stein H.D.
A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomosis. *J Am Coll Surg.* 1997; 184: 364-72
- Guilbeau J.M.
Delayed wound healing with sirolimus after liver transplant.
Ann Pharmacother 2002; 36(9), 1391-5
- Hausen B., Boeke K., Berry G.J., Segarra I., Benet L.Z., Christians U., Morris R.E.
Coadministration of neoral and the novel rapamycin analog, SDZ RAD, to rat lung allograft recipients: potentiation of immunosuppressive efficacy and improvement of tolerability of staggered versus simultaneous treatment. *Transplantation* 1999; 67(7): 956-62
- Hendriks T., Mastboom W.J.
Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair.
Dis Colon Rectum 1990; 33(10): 891-901
- Hermann J. et al.
Healing of colonic anastomoses in the rat.
Surg Gynecol Obstet. 1964; 119: 269-275
- Hunt T.K., Hawley P.R.
Surgical judgement and colonic anastomoses.
Dis Colon Rectum 1969; 12; 167-171
- Ikeuchi D., Onodera H., Aung T., Kan S., Kawamoto K., Imamura M., Maetani S.
Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. *Dig Surg.* 1999; 16(6): 478-85
- Jiborn H., Ahonen J., Zederfeldt B.
Healing of experimental anastomoses I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg.* 1978; 136: 587-94
- Johnson S., Qi S., Xu D., Jolicoeur M., Liu D., Barama A., Busque S., Smeesters C., Daloz P., Chen H.
Synergistic effects of RAD and Neoral in inhibition of host-vs.-graft and graft-vs.-host immune responses in rat small-bowel transplantation.
Microsurgery. 2003; 23(5): 476-82
- Kahn D., Spearman C.W., Mall A., Shepherd E., Engelbrecht G., Lotz Z., Tyler M.
Effect of rapamycin on the healing of the bile duct.
Transplant Proc. 2005 a; 37(2): 832-3

- Kahn D., Spearman C.W., Mall A., Shepherd E., Engelbrecht E., Lotz Z., Tyler M.
The effect of rapamycin on the healing of the ureteric anastomosis and wound healing. *Transplant Proc.* 2005 b; 37(2): 830-1
- Kim M.S., Park J., Ha H., Kim Y.S., Kang S.W., Jeong H.J., Kang D.H., Yang C.W.
Rapamycin inhibits platelet-derived growth factor-induced collagen, but not fibronectin, synthesis in rat mesangial cells.
Yonsei Med J. 2004; 45(6): 1121-6
- Kobashigawa J.A., Miller L.W., Russell S.D., Ewald G.A., Zucker M.J., Goldberg L.R., Eisen H.J., Salm K., Tolzman D., Gao J., Fitzsimmons W.
Tacrolimus with mycophenolate mofetil (MMF) or sirolimus vs. cyclosporine with MMF in cardiac transplant patients: 1-year report.
Am J Transplant. 2006; 6(6): 1377-86
- Kovarik J.M., Tedesco H., Pascual J., Civati G., Bizot M.N., Geissler J., Schmidli H.
Everolimus therapeutic concentration range defined from a prospective trial with reduced-exposure cyclosporine in de novo kidney transplantation. *Ther Drug Monit.* 2004; 26(5): 499-505
- Kuo C.J., Chung J., Fiorentino D.F., Flanagan W.M., Blenis J., Crabtree G.R.
Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase.
Nature 1992; 358(6381): 70-3
- Kuppahally S., Al-Khaldi A., Weisshaar D., Valantine H.A., Oyer P., Robbins R.C., Hunt S.A.
Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients.
Am J Transplant. 2006; 6(5 Pt 1): 986-92
- Lorber M.I., Mulgaonkar S., Butt K.M., Elkhammas E., Mendez R., Rajagopalan P.R., Kahan B., Sollinger H., Li Y., Cretin N., Tedesco H.
Everolimus versus mycophenolate mofetil in the prevention of rejection in de novo renal transplant recipients: a 3-year randomized, multicenter, phase III study. *Transplantation* 2005; 80(2): 244-52
- Luenstedt B., Debus E.S.
Duration of wound healing and tissue resistance as important criteria for selecting suture materials in colon surgery. *Chirurg* 1990; 61(10): 717-9
- Mansson P., Zhang X.W., Jeppsson B., Thorlacius H.
Anastomotic healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure.
Int J Colorectal Dis. 2002; 17(6): 420-5

- Matthiessen P., Hallböök O., Andersson M., Rutegård J., Sjødahl R.
Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection of the
Rectum. *Colorectal Dis.* 2004 ; 6(6): 462-9
- Morris R.E.
Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs.
Ther Drug Monit. 1995; 17(6): 564-9
- Nashan B.
Early clinical experience with a novel rapamycin derivative.
Ther Drug Monit. 2002 a; 24(1): 53-8
- Nashan B.
Review of the proliferation inhibitor everolimus.
Expert Opin Investig Drugs. 2002 b; 11(12): 1845-5
- Nelsen T.S, Anders C.J.
Dynamic aspects of small intestinal rupture with special consideration of
anastomotic strength. *Arch Surg.* 1966; 93(2): 309-14
- Park J., Ha H., Ahn H.J., Kang S.W., Kim Y.S., Seo J.Y., Kim M.S.
Sirolimus inhibits platelet-derived growth factor-induced collagen
synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *Transplant Proc.* 2005;
37(8): 3459-62
- 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
- Rhoads J.M., Niu X., Odle J., Graves L.M.
Role of mTOR signaling in intestinal cell migration.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006; 291(3): G510-7
- Rojas A.I., Phillips T.J.
Patients with chronic leg ulcers show diminished levels of vitamins A and
E, carotenes and zinc. *Dermatol Surg.* 1999; 25(8): 601-4
- Rothenburger M., Teerling E., Bruch C., Lehmkuhl H., Suwelack B., Bara C.,
Wichter T., Hinder F., Schmid C., Stypmann J.
Calcineurin inhibitor-free immunosuppression using everolimus
(Certican) in maintenance heart transplant recipients: 6 months' follow-
up. *J Heart Lung Transplant.* 2007; 26(3): 250-7
- Rowinsky E.K.
Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR).
Curr Opin Oncol. 2004; 16(6): 564-75

- Rullier E., Laurent C., Garrelon J.L., Michel P., Saric J., Parneix M.
Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer.
Br J Surg. 1998; 85(3): 355-8
- Schaeffer M. R., Fuchs N., Volker J., Schulz T., Kapischke M., Viebahn R.
Differential effect of tacrolimus on dermal and intestinal wound healing.
J Invest Surg. 2005; 18(2): 71-9
- Schuler W., Sedrani R., Cottens S., Haberlin B., Schulz M., Schuurmann H.J.,
Zenke G., Zerwes H.G., Schreier M.H.
SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in
vitro and in vivo. *Transplantation* 1997; 64(1): 36-42
- Sedlarik K.M.
Wounds and wound healing. *Med Monatsschr Pharm.* 1997; 20(2): 44-6
- Sehgal, S.N.
Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action
immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction
and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem.* 1998; 31: 335-40
- Sikas N., Imvrios G., Takoudas D., Gakis D., Papanikolaou V.
Mycophenolate mofetil impairs the integrity of colonic anastomosis.
J Surg Res. 2006; 134(2): 168-72
- Stegemann H., Stalder K.
Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta.* 1967; 18(2): 267-73
- Tei T.M., Kissmeyer-Nielsen P., Christensen H., Flyvbjerg A.
Growth hormone treatment increases transmural colonic growth in GH-
deficient dwarf rats. *Growth Horm IGF Res.* 2000; 10(2): 85-92
- Thomas D.R.
Improving outcome of pressure ulcers with nutritional interventions: a
review of the evidence. *Nutrition* 2001; 17(2): 121-5
- Thompson S.K., Chang E.Y., Jobe B.A.
Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I.
Microsurgery 2006; 26(3): 131-6
- Thornton F.J., Barbul A.
Healing in the gastrointestinal tract.
Surg Clin North Am. 1997; 77: 549-73
- Troppmann C., Pierce J.L., Gandhi M.M., Gallay B.J., McVicar J.P., Perez R.V.
Higher surgical wound complication rates with sirolimus
immunosuppression after kidney transplantation: a matched-pair pilot
study. *Transplantation* 2003; 76(2): 426-9

- Valente J.F., Hricik D., Weigel K., Seaman D., Knauss T., Siegel C.T., Bodziak K., Schulak J.A.
Comparison of sirolimus vs. mycophenolate mofetil on surgical complications and wound healing in adult kidney transplantation.
Am J Transplant. 2003; 3(9): 1128-34
- van der Vliet J.A., Willems M.C., de Man B.M., Lomme R.M., Hendriks T.
Everolimus interferes with healing of experimental intestinal anastomoses. *Transplantation* 2006; 82(11): 1477-1483
- van der Ham A.C., Kort W.J., Weijma I.M., van den Ingh H.F., Jeekel J.
Effect of fibrin sealant on the healing colonic anastomosis in the rat.
Br J Surg. 1991; 78(1): 49-53
- Verhofstad M.H., Lange W.P., van der Laak J.A., Verhofstad A.A., Hendriks T.
Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. *Dis Colon Rectum* 2001; 44(3): 423-31
- Viñals F., Chambard J.C., Pouysségur J.
p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1999; 274(38): 26776-82
- Vitko S., Margreiter R, Weimar W., Dantal J., Kuypers D., Winkler M., Oyen O., Viljoen H.G., Filiptsev P., Sadek S., Li Y., Cretin N., Budde K.
Three-year efficacy and safety results from a study of everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patient.
Am J Transplant. 2005; 5(10): 2521-30
- Wagner O.J., Egger B.
Beeinflussende Faktoren bei der Anastomosenheilung.
Swiss Surg. 2003; 9: 105-113
- Weiber S., Graf W., Glimelius B., Jiborn H., Pahlman L., Zederfeldt B.
The effect of 5-fluorouracil on wound healing and collagen synthesis in left colon anastomoses. An experimental study in the rat.
Eur Surg Res. 1994; 26(3): 173-8
- Witte M.B., Barbul A.
General principles of wound healing.
Surg Clin North Am. 1997; 77: 509-28
- Woessner J.F. jr.
The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid.
Arch Biochem Biophys. 1961; 93: 440-7

Zacharakis E., Demetriades H., Kanellos D., Sapidis N., Zacharakis E.,
Mantzoros I., Kanellos I., Koliakos G., Zaraboukas T., Topouridou K.,
Betsis D.
Contribution of insulin-like growth factor I to the healing of colonic
anastomoses in rats. *J Invest Surg.* 2007; 20(1): 9-14

Zeeh J., Inglin R., Baumann G., Dirsch O., Riley N.E., Gerken G.,
Buchler M.W., Egger B.
Mycophenolate mofetil impairs healing of left-sided colon anastomoses.
Transplantation 2001; 71(10): 1429-35

7 Anhang

Chemische Reagenzien

Die Reagenzien der Histologie, Immunhistochemie und Hydroxyprolinanalyse und deren Hersteller sind in alphabetischer Anordnung aufgelistet.

Alkohole	Merck, Darmstadt
Anilinalkohol (1%)	Art. 10138; Morphisto, Frankfurt/Main
Anilinblau	Wasserblau; Fluka, Buchs, Schweiz
Azokarmin	Azokarmin G; Fluka, Buchs, Schweiz
Chloramin T	Chloramin T hydrate; Sigma, Steinheim
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
DAB	3`3`-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride; Sigma, Steinheim
Eisessig (100%)	Merck, Darmstadt
Eosin	Eosin Scharlach; Fluka, Buchs, Schweiz
Essigsaurer Alkohol (0,1% in 96% Ethanol)	Universitätsapotheke Tübingen
Formaldehyd (4%)	pH 7 gepuffert; Universitätsapotheke Tübingen
Hämalaun	Mayer`s Hämalaunlösung; Merck, Darmstadt
HCl (12,5mol/l)	Salzsäure rauchend 37%; Merck, Darmstadt
HClO ₄	Perchlorsäure 70-72%; Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂ (30%)	Merck, Darmstadt
Hydroxyprolin	L-Hydroxyprolin; Merck, Darmstadt
Methylcellosolve	2-Ethoxyethanol; Sigma, Steinheim

Mouse anti-PCNA	NA-03; Oncogene, Cambridge, USA
NaCl (0,9%)	Fresenius, Bad Homburg
NaOH	Natriumhydroxid; Merck, Darmstadt
Natriumacetat	wasserfrei; Merck, Darmstadt
Orange G	Roth, Karlsruhe
pDMBA	4-Dymethylaminobenzaldehyd 99%; Sigma, Steinheim
Rabbit anti-mouse biot	E 413; DAKO, Glostrup, Dänemark
Rabbit serum	X 902; DAKO, Glostrup, Dänemark
Rat serum	X 912; DAKO, Glostrup, Dänemark
Roti-Histokitt	Roth, Karlsruhe
Stickstoff	Westfalen, Münster
Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex/HRP	PK 6100 Vectastain ABC Kit Elite; Linaris, Wertheim
Tris-hydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
Wolframsäure (5%)	Art. 10323; Morphisto, Frankfurt/Main
Xylol	VWR, Darmstadt

Herstellung der Gebrauchslösungen

Die Lösungen sind im Folgenden in verwendeter Reihenfolge beschrieben.

Histologie:

1. Hämalaun: Mayer`s Hämalaunlösung 1:5 mit aqua dest
2. Eosin: Eosin Scharlach 1% in aqua dest; 1ml Eisessig
3. Azokarmin: 0,1g Azokarmin G auf 100ml aqua dest, kurz aufgeköcht, abgekühlt, filtriert; 1ml Eisessig dazu

4. Anilinblau-Orange G: 0,5g Anilinblau + 2g Orange G + 8ml Eisessig + 100ml aqua dest, aufgeköcht, erkaltet, filtriert; Stammlösung 1:1 mit aqua dest verdünnt

Immunhistochemie:

1. Methanol-H₂O₂-Gemisch (0,5%): 2ml 30% H₂O₂ in 120ml Methanol
2. TBS: 60,6g Tris-hydroxymethyl-aminomethan + 85,2g NaCl in 0,5l aqua dest gelöst und mit HCl auf pH 7,6 eingestellt, danach auf 1l mit aqua dest aufgefüllt; Stammlösung 1:10 mit aqua dest verdünnt
3. Citratpuffer: 2,1g Citronensäure-Monohydrat auf 1l aqua dest; pH 6,0
4. Block: Rabbit serum 1:5 mit TBS (unter Punkt 2 beschrieben) verdünnt
5. Primärantikörper: Mouse anti-PCNA 1:75 mit TBS
6. Sekundärantikörper: Rabbit anti-mouse biot 1:2 mit rat serum und 30 Minuten auf Eis, danach 5 Minuten zentrifugieren; Überstand 1:300 mit TBS verdünnt
7. DAB-Entwicklung: 100ml TBS + 50mg DAB + 35µl 30% H₂O₂

Hydroxyprolinanalyse:

1. HCl (6 mol/l): 100ml 12,5 N HCl + 100ml aqua dest
2. Citrat / Acetat Puffer; pH 6,0 (1l): 50g Citronensäure-Monohydrat + 120g Natriumacetat + 34g NaOH ; aufgefüllt mit H₂O bis 1l; pH- Einstellung mittels Eisessig auf pH=6,0
3. NaOH - Citrat / Acetat Puffer; pH 14 (300ml): 19,8g NaOH + 300ml des unter 2. beschriebenen Citrat / Acetat Puffers
4. Assay Puffer (15ml): 3ml 2-Propanol + 2ml aqua dest. + 10ml Citrat / Acetat Puffer
5. Ehrlichs Reagenz (16ml): 8g pDMBA + 11ml HClO₄ + 5ml Methylcellosolve
6. Chloramin T Lösung (10ml): 0,282g Chloramin T + 1ml 2-Propanol + 1ml aqua dest. + 8ml Citrat / Acetat Puffer

Übersicht über Einzelgewichte und Gewichts-differenzen der Tiere:

Gewicht (g)		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Gewichts-differenz
		(OP)							(Ende)	(Tag 0-7)
Placebo										
3,0mg/kg/d										
Ratte	1	346	330	321	322	327	329	334	337	9
	2	316	310	299	302	304	306	310	313	3
	3	352	345	330	329	332	333	333	337	15
	4	341	339	330	328	331	334	337	337	4
	5	338	330	324	327	326	330	330	329	9
	6	331	325	322	325	323	329	327	323	8
	7	327	308	297	302	303	297	301	308	19
	8	345	331	314	309	300	315	322	328	17
	9	308	302	298	290	297	293	293	299	9
	10	326	317	315	314	318	311	314	313	13
Everolimus										
1,0mg/kg/d										
Ratte	1	363	341	337	335	338	342	346	345	18
	2	362	343	327	331	332	334	337	332	30
	3	376	365	346	343	349	345	346	350	26
	4	372	361	341	347	351	344	345	347	25
	5	370	350	342	338	338	343	345	344	26
	6	361	349	336	328	331	331	336	337	24
	7	357	346	339	335	340	337	334	330	27
	8	322	313	305	303	311	312	314	310	12
	9	312	296	282	280	282	283	279	283	29
	10	323	308	304	302	303	306	305	307	16
	11	348	325	313	299	291	313	315	323	25
Everolimus										
3,0mg/kg/d										
Ratte	1	355	338	328	324	323	321	321	317	38
	2	345	334	322	317	310	310	312	315	30
	3	341	322	297	291	289	289	290	290	51
	4	330	319	305	301	303	300	299	299	31
	5	312	293	284	290	288	289	287	288	24
	6	312	298	276	272	276	270	279	280	32
	7	329	309	298	295	294	294	295	292	37
	8	327	300	298	299	297	299	297	302	25
	9	315	299	290	281	288	291	289	291	24
	10	328	308	295	292	289	291	288	292	36

Tab. 7: Tägliche Einzelgewichte und Gewichts-differenzen der Tiere

Mittlerer Gewichtsverlauf während des Versuches für die jeweilige Gruppe:

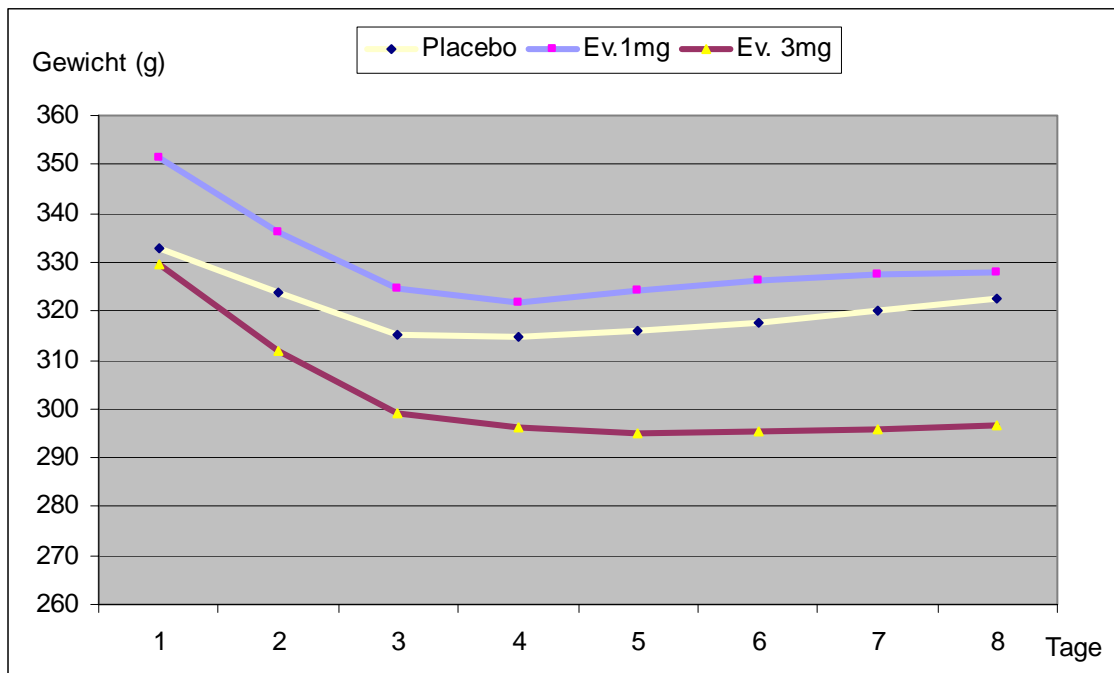


Abb. 33: Gewichtsverlauf innerhalb der 3 Gruppen

Durchschnittlicher Gewichtsverlauf der Placebogruppe:

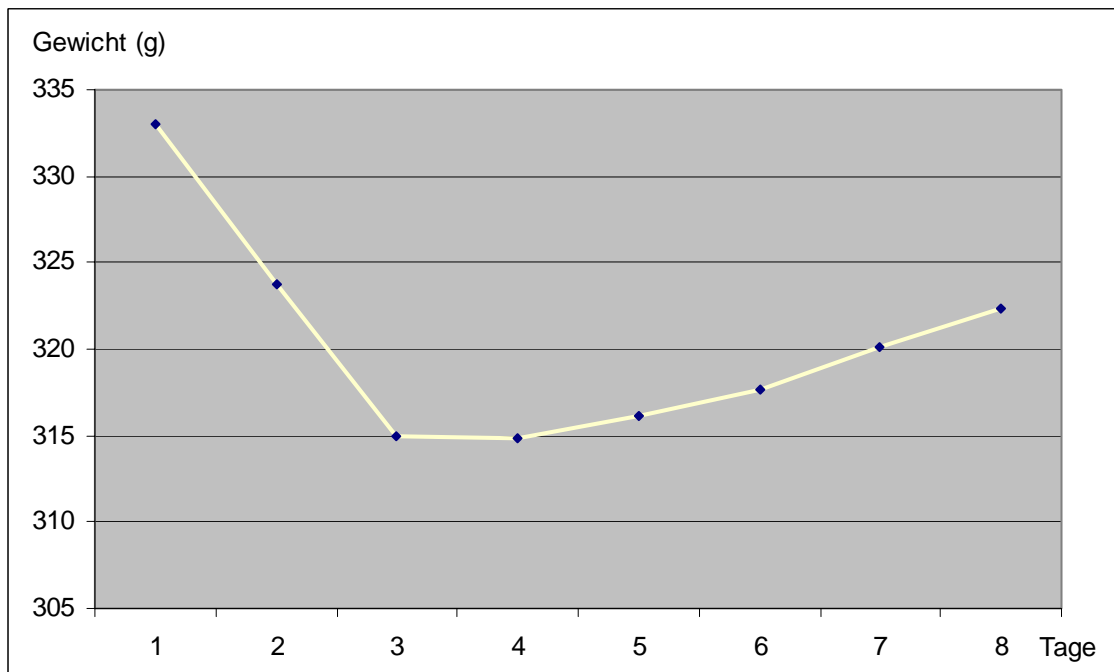


Abb. 34: Mittlerer Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe

Durchschnittlicher Gewichtsverlauf der Everolimus 1mg-Gruppe:

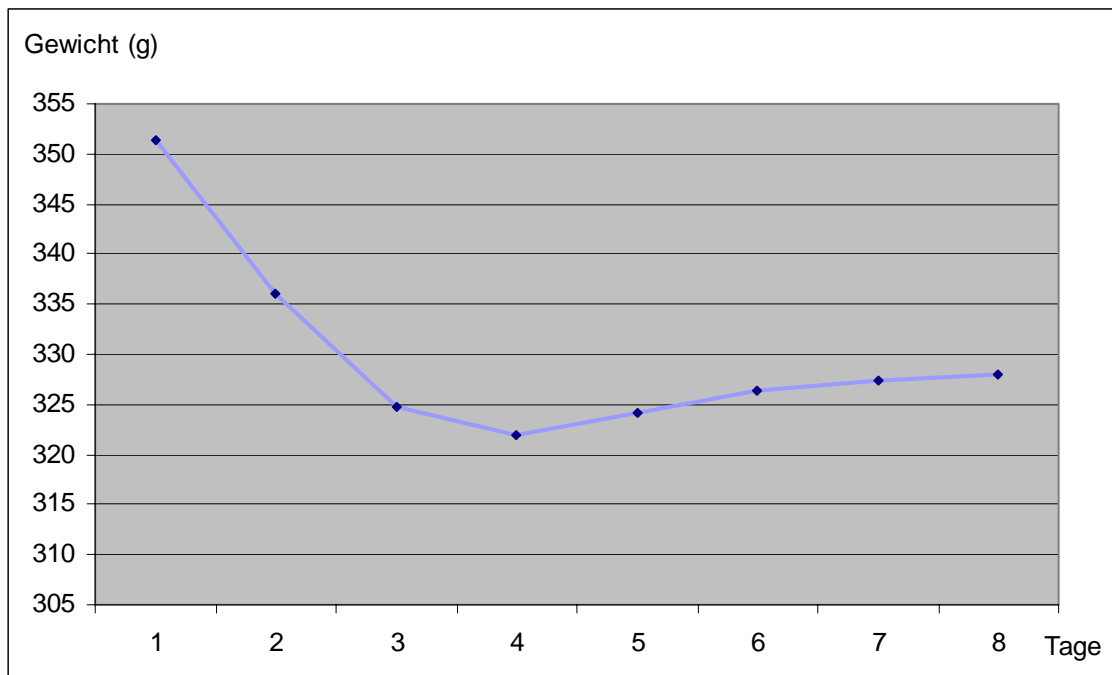


Abb. 35: Mittlerer Gewichtsverlauf der Everolimus 1mg-Gruppe

Durchschnittlicher Gewichtsverlauf der Everolimus 3mg-Gruppe:

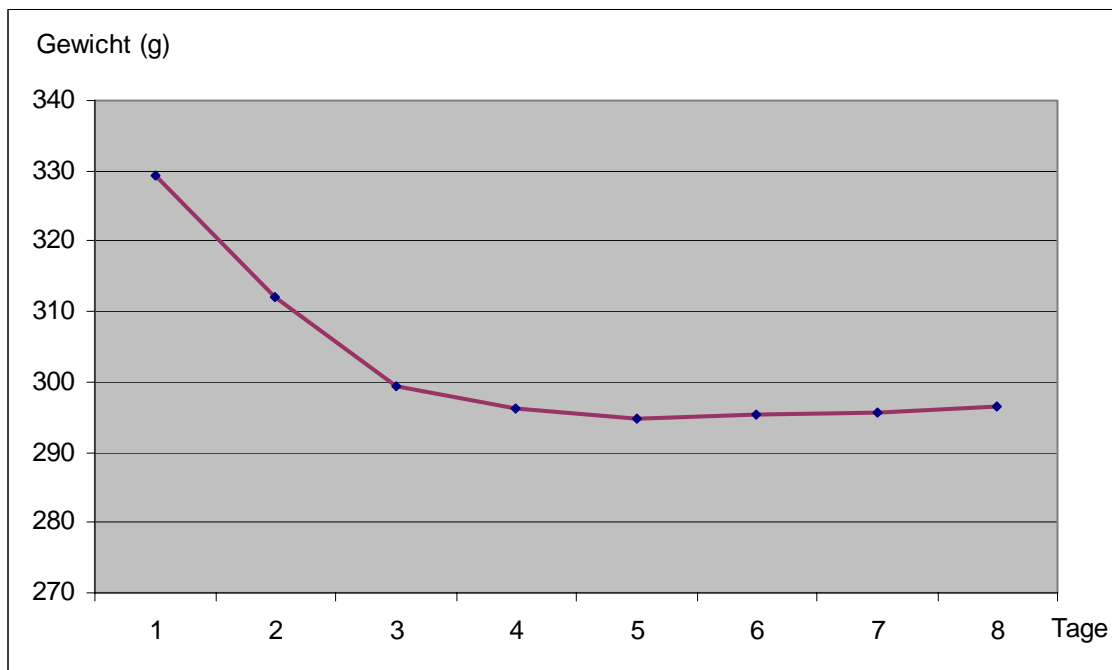


Abb. 36: Mittlerer Gewichtsverlauf der Everolimus 3mg-Gruppe

Werte des „bursting pressure“ und Perforationsstellen:

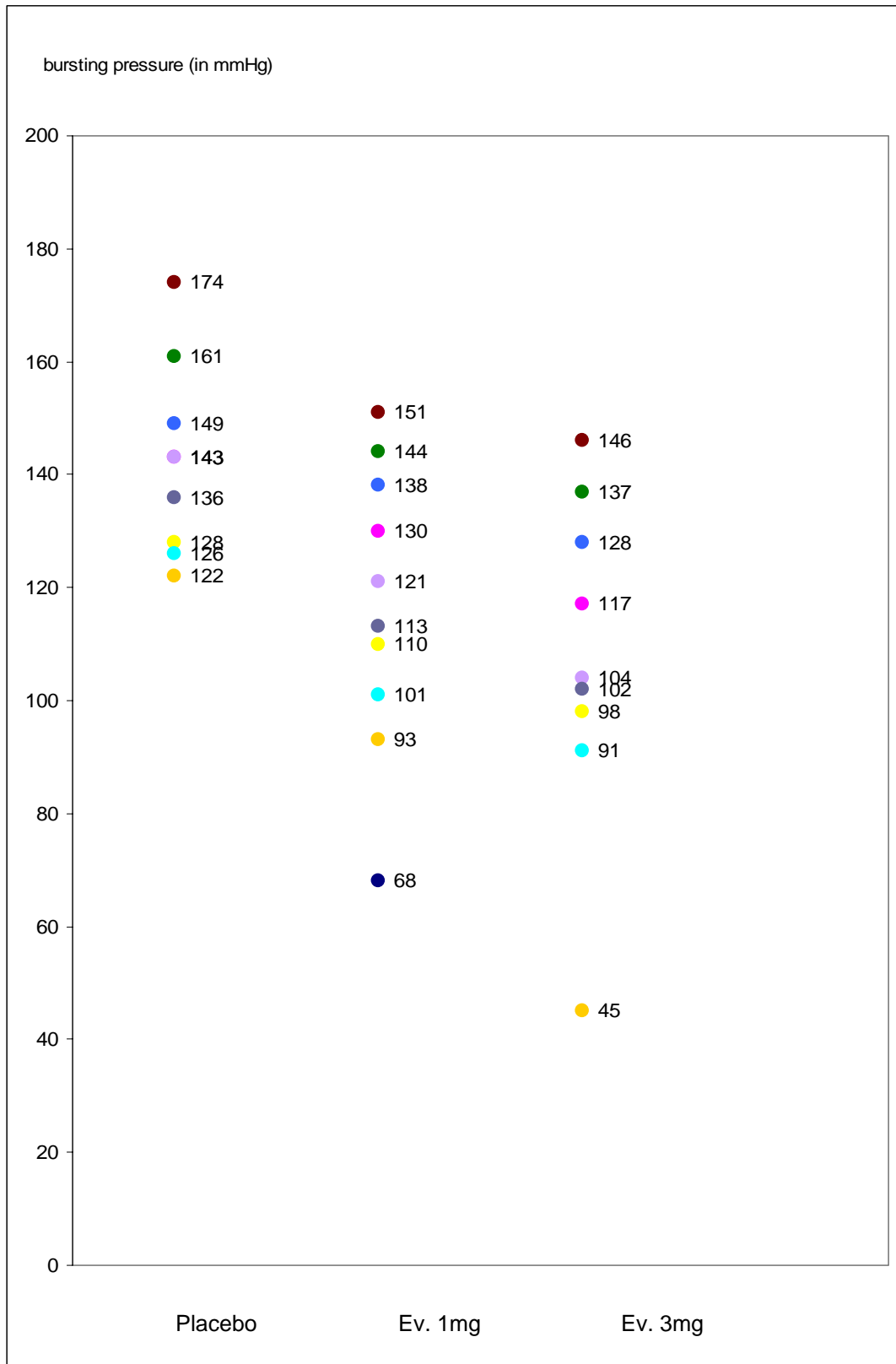


Abb. 37: Einzelne Werte „bursting pressure“

Perforationsstellen der Anastomosen			
		„bursting pressure“ (mmHg)	Lage der Perforation
Placebo 3,0mg/kg/d			
Ratte	1	136	außerhalb der Anastomose
	2	122	außerhalb der Anastomose
	3	126	außerhalb der Anastomose
	4	Insuffizienz	
	5	149	außerhalb der Anastomose
	6	143	außerhalb der Anastomose
	7	143	außerhalb der Anastomose
	8	161	außerhalb der Anastomose
	9	174	außerhalb der Anastomose
	10	128	außerhalb der Anastomose
Everolimus 1,0mg/kg/d			
Ratte	1	Insuffizienz	
	2	144	innerhalb der Anastomose
	3	110	innerhalb der Anastomose
	4	101	innerhalb der Anastomose
	5	138	innerhalb der Anastomose
	6	68	innerhalb der Anastomose
	7	93	innerhalb der Anastomose
	8	151	außerhalb der Anastomose
	9	113	innerhalb der Anastomose
	10	121	innerhalb der Anastomose
	11	130	innerhalb der Anastomose
Everolimus 3,0mg/kg/d			
Ratte	1	91	außerhalb der Anastomose
	2	45	innerhalb der Anastomose
	3	146	außerhalb der Anastomose
	4	117	außerhalb der Anastomose
	5	104	außerhalb der Anastomose
	6	128	innerhalb der Anastomose
	7	102	innerhalb der Anastomose
	8	137	außerhalb der Anastomose
	9	98	innerhalb der Anastomose
	10	Insuffizienz	

Tab. 8: Orte der Anastomosenperforationen beim „bursting pressure“

Auswertung der PCNA:

PCNA		Anzahl pos. Zellen/mm ²		
		1. Messung	2. Messung	Mittelwert
Placebo 3,0mg/kg/d				
Ratte	1	10206	11518	10862
	2	11411	11923	11667
	3	9203	8049	8626
	4	7454	6831	7142,5
	5	13764	14367	14065,5
	6	12568	13552	13060
	7	10542	12343	11442,5
	8	10987	11326	11156,5
	9	11805	10934	11369,5
	10	10741	12297	11519
Everolimus 1,0mg/kg/d				
Ratte	1	8963	7642	8302,5
	2	7261	6587	6924
	3	8511	9781	9146
	4	7588	5985	6786,5
	5	7843	8048	7945,5
	6	8016	6855	7435,5
	7	8798	8514	8656
	8	9140	8640	8890
	9	6650	7352	7001
	10	6596	7954	7275
	11	9925	10832	10378,5
Everolimus 3,0mg/kg/d				
Ratte	1	4655	3301	3978
	2	4808	6169	5488,5
	3	6118	6589	6353,5
	4	5342	5914	5628
	5	5258	5130	5194
	6	7604	8265	7934,5
	7	6773	6598	6685,5
	8	7352	8130	7741
	9	6812	8186	7499
	10	6327	7718	7022,5

Tab. 9: Auszählung der PCNA

Hydroxyprolinkonzentrationen:

Anastomose					
		Biopsie- gewicht trocken (mg)	Hydroxyprolin- konzentration (µg/ml)	Hydroxyprolin- konzentration x 10	Hydroxyprolin- konzentration (µg/mg Gewebe)
Placebo 3,0mg/kg/d					
Ratte	1	3,62	3,409	34,09	9,42
	2	4,18	2,285	22,85	5,47
	3	5,12	3,106	31,06	6,07
	4	3,79	3,284	32,84	8,66
	5	3,74	4,265	42,65	11,40
	6	3,90	3,730	37,30	9,56
	7	3,03	4,158	41,58	13,72
	8	3,76	4,319	43,19	11,49
	9	3,81	4,372	43,72	11,48
	10	2,34	2,446	24,46	10,45
Everolimus 1,0mg/kg/d					
Ratte	1	3,29	5,585	55,85	16,98
	2	5,17	6,085	60,85	11,77
	3	3,57	4,961	49,61	13,90
	4	4,11	2,660	26,60	6,47
	5	5,49	4,051	40,51	7,38
	6	4,87	4,354	43,54	8,94
	7	4,41	4,622	46,22	10,48
	8	4,20	3,052	30,52	7,27
	9	3,47	3,124	31,24	9,00
	10	3,79	3,572	35,72	9,42
	11	2,26	2,668	26,68	11,81
Everolimus 3,0mg/kg/d					
Ratte	1	5,28	1,650	16,50	3,13
	2	3,94	4,264	42,64	10,82
	3	3,67	1,453	14,53	3,96
	4	3,94	4,024	40,24	10,21
	5	9,29	6,086	60,86	6,55
	6	8,18	4,547	45,47	5,56
	7	3,01	2,399	23,99	7,97
	8	5,40	1,947	19,47	3,61
	9	5,32	2,682	26,82	5,04
	10	3,87	1,989	19,89	5,14

Tab. 10: Hydroxyprolinkonzentration in den Anastomosen der einzelnen Tiere

Anhang

Kolon					
		Biopsie- gewicht trocken (mg)	Hydroxyprolin- konzentration (µg/ml)	Hydroxyprolin- konzentration x 10	Hydroxyprolin- konzentration (µg/mg Gewebe)
Placebo 3,0mg/kg/d					
Ratte	1	3,04	2,517	25,17	8,28
	2	2,85	2,232	22,32	7,83
	3	2,65	2,125	21,25	8,02
	4	2,58	1,911	19,11	7,41
	5	2,66	1,786	17,86	6,71
	6	2,74	1,607	16,07	5,86
	7	2,33	1,572	15,72	6,75
	8	2,68	1,607	16,07	6,00
	9	3,55	2,660	26,60	7,49
	10	2,44	1,804	18,04	7,39
Everolimus 1,0mg/kg/d					
Ratte	1	3,32	2,428	24,28	7,31
	2	4,51	2,731	27,31	6,06
	3	3,41	1,946	19,46	5,71
	4	3,57	1,465	14,65	4,10
	5	3,10	2,767	27,67	8,93
	6	2,79	1,911	19,11	6,85
	7	4,50	3,034	30,34	6,74
	8	1,43	1,072	10,72	7,50
	9	2,34	2,232	22,32	9,54
	10	2,56	2,499	24,99	9,76
	11	2,29	1,554	15,54	6,79
Everolimus 3,0mg/kg/d					
Ratte	1	3,43	3,233	32,33	9,43
	2	2,83	2,300	23,00	8,13
	3	2,94	2,724	27,24	9,27
	4	4,89	4,928	49,28	10,08
	5	3,89	4,165	41,65	10,71
	6	6,29	5,479	54,79	8,71
	7	2,41	2,131	21,31	8,84
	8	2,87	2,992	29,92	10,43
	9	3,26	2,173	21,73	6,67
	10	4,04	3,317	33,17	8,21

Tab. 11: Hydroxyprolinkonzentration im unversehrten Kolon (Kontrolle) der einzelnen Tiere