

Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und  
Transplantationschirurgie Tübingen

**Einfluss von Human Growth hormon auf die durch  
Everolimus induzierte Wundheilungsstörung von  
Kolonanastomosen bei Ratten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Trütschel, Sebastian Johannes**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Küper  
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Thiel

Tag der Disputation: 30.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Die Rolle von mTOR im Zellzyklus und in Tumorzellen	8
1.2 Die Wirkweise von Everolimus	9
1.3 Der Einfluss auf die Wundheilung	11
1.4 Die Wirkweise des Wachstumshormons	12
1.5 Wirkweise auf mTOR	14
1.6 Einsatzgebiete in der Medizin	14
1.7 Einfluss auf die Wundheilung	16
1.8 Fragestellung der Dissertation	17
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1 Auswahl der Tiere und Bildung von Versuchsgruppen	18
2.2 Medikamentöse Behandlung	19
2.3 Operation	20
2.3.1 Narkose und OP-Vorbereitung	20
2.3.2 OP-Technik	20
2.4 Nachbehandlung und postoperativer Verlauf	23
2.5 Relaparatomie und Organentnahme	24
2.6 Messung des „bursting pressure“	24
2.7 Histologische Aufarbeitung	25
2.7.1 HE-Färbung	27
2.7.2 Azan-Färbung	28
2.8 Immunhistochemie	30
2.8.1 PCNA-Bestimmung	30
2.8.2 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität	31

2.9 Hydroxyprolinkonzentration	33
2.10 Zymographie	34
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1 prä- und postoperativer Verlauf	36
3.1.1 allgemeiner Gesundheitszustand	36
3.1.2 Gewichtsverläufe	36
3.1.3 Ileus und Peritonitis	37
3.1.4 Insuffizienzen und Verwachsungen	38
3.2 Bursting pressure	38
3.3 Histologische Färbungen	39
3.3.1 HE-Färbung	39
3.3.2 Azan-Färbung	43
3.4 Immunhistochemie: PCNA	44
3.5 Hydroxyprolinbestimmung	45
3.6 Zymographie	46
<b>4 Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	
<b>7 Erklärung zum Eigenanteil</b>	

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4E-BP1	4E binding protein-1
Abb.	Abbildung
allg.	allgemein
aqua dest.	destilliertes Wasser
CDK	cyclin dependent kinase
cm	Zentimeter
E	Everolimus-Gruppe
EGFR	epidermal growth factor rezeptor
EH	Everolimus- und hGH-Gruppe
et al	und andere
FKBP-12	FK506-binding protein 12
g	Gramm
G1-Phase	erste Phase des Zellzyklus
GDP	Guanosindiphosphat
GH	growth hormon
GHBP	growth hormon binding protein
GRF	growth hormon releasing factor
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
hGH	humanes Wachstumshormon
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian target of rapamycin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase-C
p.o.	per os
pRb	Retinoblastom-Protein
PTEN	phosphatase and tensing homolog
rel.	relativ
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RT	Raumtemperatur
S6K1	protein S6 kinase 1
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
s.c.	subkutan
sec	Sekunde
SRIF	somatotropin release-inhibiting factor
TSC	tuberous sclerosis complex
U/min	Umdrehung pro Minute

V	Vehikel (Placebogruppe)
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
ZMF	Zentrum für Medizinische Forschung

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Rolle von mTOR im Zellzyklus und in Tumorzellen

mTOR (mammalian target of rapamycin) ist ein Protein der menschlichen Zelle, welches für die intrazelluläre Signaltransduktion eine wesentliche Rolle spielt. Der aktivierte mTOR-Komplex1 führt zur Phosphorylierung der Schlüsselenzyme 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1) und S6K1 (protein S6 kinase 1), die eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und dem Stoffwechsel der Zelle spielen [Fingar et al 2004]. Der mTOR-Komplex ist des Weiteren essenziell für die Migration von intestinalen Zellen unter Miteinbeziehung sowohl cytoplasmatischer als auch nukleärer Bestandteile [Rhoads et al 2006].

In Krebszellen werden durch Mutationen und Genamplifikationen Signale verursacht, die im mTOR-Komplex aktivierend wirken und so das Wachstum und die Zellteilung stimulieren und den Zellmetabolismus und das Überleben von Krebszellen vermitteln [Wullschleger et al. 2006]. Darüber hinaus besteht eine Verbindung von mTOR mit Rezeptoren an der Zelloberfläche wie dem "epidermal growth factor Rezeptor" (EGFR), insbesondere dem "human epidermal growth factor receptor 2" (HER2) und dem "insulin-like growth factor 1 receptor" (IGF-1R). Eine Überexpression dieser Rezeptoren ist wesentlich beim Wachstum der verschiedensten Krebsformen wie Brust-, Lungen- und Kolonkarzinom.

Auch intrazelluläre Rezeptoren sind bei der Aktivierung von mTOR beteiligt, besonders über eine Mutation im G-Protein K-Ras oder im Tumorsuppressorgen PTEN (phosphatase and tensing homolog). Die bei Tumorzellen betroffenen Signalwege sind der Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B- (PI3K/Akt-) Signalweg, der Proteinkinase-C (PKC)- und der Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)/Ras-Signalweg. K-Ras ist jedoch nicht nur bei den MAPK beteiligt, sondern wirkt bei vielen Malignomen auch über den überaktivierten PI3K/Akt-Signalweg mit. Die übersteigerte Aktivität

dieser „pathways“ bedingt eine Aktivierung des mTOR-Komplexes und führt so zur Vermehrung und zum Überleben der Zelle.

Dies geschieht im Wesentlichen durch drei Proteine: Zum einen fördert mTOR die Translation der mRNA für Cyclin D, was den Umsatz der cyclin dependent kinases (CDKs) beeinflusst, die ihrerseits den Zellzyklus regulieren. Des Weiteren werden die Transportproteine für Aminosäuren, Glukose und ATP aktiviert und so dem erhöhten Umsatz der Tumorzelle Rechnung getragen. Schließlich fördert mTOR über die Induktion von Hypoxie-induziertem Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) die Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) und daraus resultierend die Angiogenese, die bei der Ernährung und Metastasierung der Zelle von wesentlicher Bedeutung ist [Dancey et al 2006].

## 1.2 Die Wirkweise von Everolimus

Everolimus ist ein Sirolimusderivat aus der Gruppe der mTOR-Inhibitoren. Es bindet direkt am Rezeptor FK506-binding protein 12 (FKBP-12) des mTOR-Komplexes 1 [Fingar et al 2004]. Durch die Inhibition dieses Komplexes verhindert Everolimus die Phosphorylierung der oben genannten Enzyme 4E-BP1 und S6K1, was eine Transformation von der G1- zur S-Phase der Zelle bewirkt [Flanagan et al 1993; Kuo et al 1992].

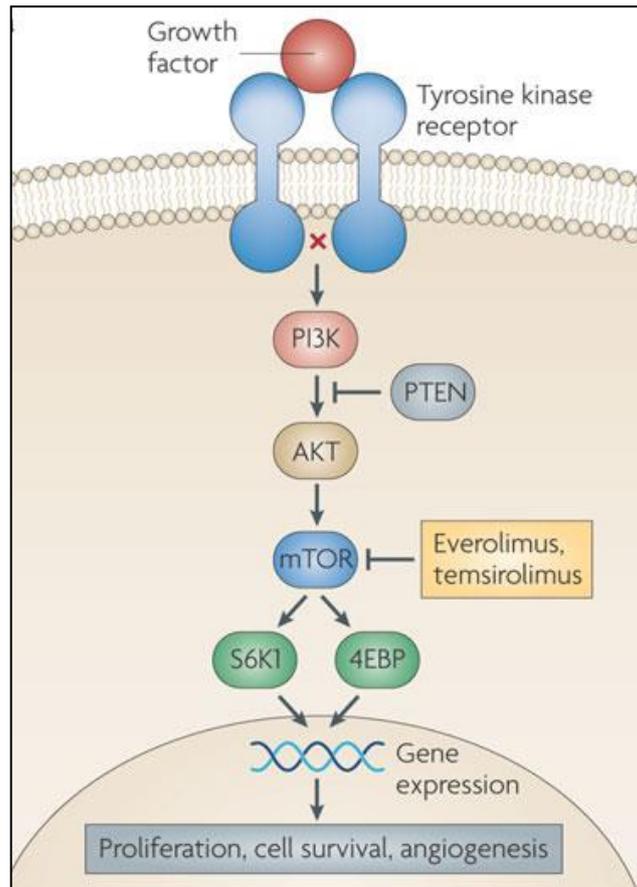


Abb.1: Vereinfachte Darstellung des PI3K/Akt-Signalpfades mit Ansatzpunkt der mTOR-Inhibitoren [Atkins et al 2009]

Es verhindert außerdem die Aktivierung von CDK, die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) und beschleunigt den Abbau von Cyclin D1, was zu einem Defizit an aktivem CDK4/Cyclin D-1-Komplex führt [Mita et al 2003]. Es besteht außerdem eine Wirkung auf den mTOR-Komplex 2 der typischerweise als nicht empfindlich gegenüber Rapamycin gilt [Sarbasov et al 2004; Jacinto et al 2004; Wullschleger et al 2005]. Dieser Komplex aktiviert durch Phosphorylierung die Proteinkinase B, welche Teil eines Schlüsselsignalwegs zum Überleben einer Zelle darstellt. Bei bestimmten Proteinkinase-B-Mutationsformen ist der mTOR-Komplex 2 unempfindlich gegenüber Everolimus, in vielen anderen Zelltypen hingegen führt eine Langzeitbehandlung zu einer Reduktion des mTor-Komplexes 2 unter das Niveau, das benötigt wird um den Proteinkinase-B-Signalweg aufrecht zu erhalten [Sarbasov et al 2006]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden,

dass Everolimus in besonderem Maße die Proliferation von Fibroblasten hemmt und somit auch bei Lungentransplantation zur Prävention einer progressiven Bronchiolitis obliterans eine Rolle spielt [Azzola et al 2004]. Auch bei der Prävention einer Vaskulopathie bei Patienten mit Herztransplantation ist Everolimus anderen Immunsuppressiva wie Azathioprin überlegen [Eisen et al 2003]. Ein weiterer organoprotektiver Effekt ergab sich bei Patienten mit Nierentransplantation, wobei hier insbesondere die platelet-derived growth factor (PDGF)-induzierte Proliferation der Mesangiumzellen inhibiert wurde [Kim et al 2004]. Positive Effekte konnten auch bei der Tumorthherapie mit mTor-Inhibitoren festgestellt werden. So wurde nachgewiesen, dass Rapamycin in hoher Dosierung durch vollständige Dissoziation des mTor-Komplexes 1 und Unterdrückung der Phosphorylierung des Enzymes 4E-BP1 die Apoptose von Tumorzellen induziert [Yellen et al 2011]. Dass eine Langzeittherapie mit Rapamycin im Tierversuch lebensverlängernd wirkt fanden Sharp et al 2009 heraus. Hierbei wurde Zwergmäusen ab dem Alter von 20 Monaten, was einem Menschenalter von umgerechnet 60 Jahren entspricht, täglich eine orale Dosis von 2,24 mg/kg verabreicht. Dies führte zu einer totalen Lebenszeitverlängerung von 9% bei den Männchen und 14% bei den Weibchen gegenüber der Kontrollgruppe.

### 1.3 Der Einfluss auf die Wundheilung

Eine der schwerwiegendsten Nebenwirkungen der mTOR-Inhibitoren ist die verzögerte Wundheilung, welche verstärkt bei Kombinationstherapien mit Steroiden und Ciclosporin A beobachtet wird [Valente et al 2003]. Eine Studie von Flechner et al 2003 ergab zunächst keine signifikante Korrelation, diese zeigte sich jedoch in den Folgestudien im Tierversuch sowohl bei Anastomosen des Gallengangs, des Ureters [Kahn et al 2005], des ileokolischen Überganges sowie der Hautnaht [van der Vliet et al 2006] und spiegelte somit die klinische Erfahrung wieder, die bereits in Fallberichten von Guilbeau 2002 dokumentiert wurden. Auch im Vergleich mit anderen Immunsuppressiva wie Tacrolimus und Mycophenolat-Mofetil führten mTOR-Inhibitoren zu einer signifikant erhöhten

Rate an Komplikationen bezüglich der Wundheilung [Dean et al 2004; Kuppahally et al 2006]. Durch die Messung der „breaking strength“, bei der die Reißfestigkeit der Anastomose mit Hilfe eines Tensiometers in Newton gemessen wird, konnte in weiteren Untersuchungen bezüglich der Anastomoseninsuffizienz bei bronchialen Anastomosen eine signifikante Zunahme festgestellt werden, histologisch fand sich hier jedoch kein Korrelat [Dutly et al 2003]. Bezüglich intestinaler Anastomosen konnte nachgewiesen werden, dass Everolimus die inflammatorische Phase der Wundheilung beeinflusst, was sich sowohl durch die Qualität und Menge des neu synthetisierten Kollagens als auch auf mechanischer Ebene durch Erniedrigung des „bursting pressure“ zeigte [Küper et al 2011]. Diese Methode dient der Überprüfung der mechanischen Belastbarkeit der Anastomose durch Imitation der physiologischen Darmbeanspruchung durch Druckschwankungen aufgrund unterschiedlicher Füllungszustände und peristaltischer Wellen [Kahn et al 2005]. Hierbei wird die in situ belassene oder exzidierte Anastomose mit Flüssigkeit oder Gas befüllt und mittels eines Drucksensors der maximale Druck gemessen, bis es zum Flüssigkeits- oder Gasaustritt und Druckabfall kommt.

#### 1.4 Die Wirkweise des Wachstumshormons

Das humane Wachstumshormon (hGH, Somatotropin) wird von der Hypophyse pulsatil sezerniert und hat über GH-Rezeptoren direkten Einfluss auf die Zelle. Es trägt so zur Differenzierung des Gewebes, der Proliferation und der Proteinsynthese bei. Die Regulation der Freisetzung erfolgt durch 2 Peptide des Hypothalamus. Gesteigert wird sie durch den „growth hormon releasing factor“ (GRF), eine Hemmung wird über das Somatostatin („somatotropin release-inhibiting factor“, SRIF) vermittelt. Dieser Steuerungsmechanismus steht unter dem Einfluss verschiedener neuronaler und humoraler Komponenten. Glukokortikoide, Glucagon, Vasopressin, Hypoglykämie und  $\alpha_2$ -Agonisten führen zu einer gesteigerten GRF-Freisetzung wohingegen Hyperglykämien eine Freisetzung von SRIF induzieren. Die pulsatile Sezernierung von hGH wird in erster Linie über SRIF bewirkt, erhöhte Plasmaspiegel werden durch eine

erhöhte Pulsamplitude, nicht aber durch eine erhöhte Pulsfrequenz erreicht. Die Pulsfrequenz variiert zwischen einem Puls pro Stunde und einem Puls alle vier Stunden. Das sezernierte hGH fördert die Stickstoffretention und die Lipolyse und trägt wesentlich dazu bei, den Blutzuckerspiegel konstant zu halten. Im Blutplasma wird das hGH an zwei verschiedene Bindungsproteine (GHBP) gekoppelt, eines mit hoher Affinität aber geringer Kapazität, das andere mit geringer Affinität aber hoher Kapazität. Zwischen 40 und 50% sind an GHBP mit hoher Affinität, 5 bis 8% an das mit niedriger Affinität gebunden, der Rest liegt als freies GH vor, welches auch die aktive Form darstellt. Aufgrund der kontinuierlichen Assoziation und Dissoziation entsteht ein dynamisches Equilibrium zwischen hGH und den beiden GHBP. Freies hGH wird rasch renal eliminiert, aufgrund der gebundenen hGH verlängert sich die theoretische Halbwertszeit von 7 auf 18 Minuten. GHBP dient somit als intravasales Hormonreservoir und hat einen dämpfenden Effekt auf die hGH-Oszillationen, die durch die pulsatile Freisetzung bewirkt werden [Baumann et al 1993]. Im Gewebe ist hGH an Glycoproteinrezeptoren gebunden. hGH hat sowohl direkte Effekte auf den Organismus als auch indirekt über die Freisetzung von Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) aus Leberzellen. Der Einfluss des hGH auf den Kohlenhydrathaushalt lässt sich folgendermaßen charakterisieren: Exogenes hGH hat einen insulinähnlichen blutzuckersenkenden Effekt, welcher insulinunabhängig läuft [Fineberg et al 1974]. Dies ist jedoch nicht bei der physiologischen hGH-Freisetzung der Fall. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Insulinsensibilität in der Peripherie herabgesetzt und der Glukosetransport in die Zelle verringert ist. Die Oxidation von Glukose wird initial nach hGH-Gabe gesteigert, im Verlauf jedoch wieder reduziert. An den  $\beta$ -Zellen des Pankreas wird über hGH-Rezeptoren die Insulinfreisetzung direkt gesteigert. So kann eine dauerhafte hGH-Therapie zu Hyperglykämie führen, die vor allem auf eine vermehrte Insulinresistenz zurückgeführt wird [Kostyo et al 1976]. Im Fettstoffwechsel bewirkt hGH vornehmlich eine Lipolyse. Nach hGH-Gabe kommt es initial zu einer Erniedrigung freier Fettsäuren im Blut, der im Anschluss eine Steigerung sowohl der freien Fettsäuren als auch der Triglyceride folgt. Seine anabole Wirkung vermittelt hGH besonders über den

Proteinstoffwechsel. Es bewirkt hier in erster Linie eine Steigerung der Proteinbiosynthese und eine vermehrte Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle, wobei es die Proteolyse in der Zelle primär unbeeinflusst lässt. Der proteolytische Effekt von Insulin hingegen wird über hGH antagonisiert [Fryburg et al 1992].

## 1.5 Wirkweise auf mTOR

Über die Freisetzung von IGF-1 bewirkt hGH eine Aktivierung der mTOR-Komplexe 1 und 2 [Wahdan-Alaswad et al 2010]. Während der mTOR-Komplex 1 sowohl sensibel auf Wachstumsfaktoren als auch auf Nährstoffe reagiert ist mTOR-Komplex 2 ausschließlich auf Wachstumsfaktoren sensibel [Guertin et al 2007]. Dies führt zu einer Aktivierung des bereits eingangs erwähnten PI3K/Akt-Signalwegs, somit besitzen Wachstumshormon und Everolimus Wirkungen, die zum Teil über denselben Signalweg erfolgen. Darüber hinaus bewirken die Wachstumsfaktoren über die PI3K und Akt zusammen mit weiteren Kinasen eine Phosphorylierung des Tuberin, der zusammen mit Hamartin den tuberous sclerosis complex (TSC). Der aktivierte TSC wiederum hemmt den mTOR-Komplex 1 über Förderung der Umwandlung von Rheb-GTP (welches den mTOR-Komplex 1 aktiviert) in Rheb-GDP [Inoki et al 2003]. Der Verlust von Tuberin oder Hamartin führt zur Entstehung des autosomal-dominanten Krankheitsbildes tuberöse Sklerose [Kwiatkowski et al 2005; Sengupta et al 2010]. Eine übermäßige Stimulation von IGF-1 kann über den PI3K/Akt-Signalweg jedoch auch zu Tumorentstehung oder zum Tumorwachstum beispielsweise in den Ovarien, der Prostata oder im Pankreas führen [Wahdan-Alaswad et al 2010; Rieder et al 2011; Lau et al 2012].

## 1.6 Einsatzgebiete in der Medizin

Wachstumshormon ist derzeit zugelassen zur Behandlung von Kindern mit Wachstumshormonmangel, bei Turner-Syndrom und chronischer Niereninsuffizienz im Kindesalter. Darüber hinaus kommt es bei Erwachsenen

zur Anwendung bei Wachstumshormondefizit, zum Beispiel nach Hypophysektomie oder nach Trauma.

Kinder mit „klassischem“ Wachstumshormonmangel haben entweder ein isoliertes Defizit an hGH oder es besteht ein Panhypopituitarismus. Hier kann durch die Substitutionstherapie ein deutlicher Nutzen erzielt werden [Ranke et al 1979; Cowell 1990], was sich insbesondere auf die Endgröße auswirkt. Das Wachstum ist besonders im ersten Behandlungsjahr sehr ausgeprägt und verringert sich im Verlauf, das Knochenalter wird jedoch zu keinem Zeitpunkt beeinflusst. Um eine annähernd normale Erwachsenengröße zu erreichen, sollte die Therapie zu einem möglichst frühen Zeitpunkt vor der Pubertät begonnen und bis zum Schluss der Epiphysenfugen fortgesetzt werden [Cowell 1990]. Obwohl beim Turner-Syndrom kein Mangel an Wachstumshormon vorliegt, ist auch hier eine deutliche Verbesserung der Endgröße nachweisbar, jedoch werden hier höhere Dosierungen und die Kombination mit anderen Anabolika wie Oxandrolone empfohlen [Rosenfeld et al 1998]. Bei Kindern mit dialysepflichtiger chronischer Niereninsuffizienz, die ein stark erhöhtes Risiko tragen, ein reduziertes Wachstum aufzuweisen und eine erniedrigte Endgröße zu erreichen, kann ebenfalls durch hGH-Therapie ein annähernd normales Wachstum erreicht werden [Youssef 2012; Gupta et al 2012].

Die Substitution bei Wachstumshormonmangel im Erwachsenenalter wurde aufgrund des Nebenwirkungsprofils früher nur zurückhaltend eingesetzt, über eine konsequente IGF-I-Spiegel-Kontrolle konnten diese jedoch reduziert und ein deutlicher Gewinn an Lebensqualität erreicht werden [Gasco et al 2012; Biller et al 2011], sodass auch unter dieser Indikation eine Zulassung für die Substitution von Wachstumshormon besteht.

Mit dem Ziel, bei lebensbedrohlich erkrankten Erwachsenen unter Intensivtherapie eine positive Stickstoffbilanz zu erreichen und so das „outcome“ zu verbessern, führte die Gabe von Wachstumshormon in klinischen Studien zu einer erhöhten Mortalitätsrate und einer verlängerten Krankheitsdauer. Deshalb gilt die Therapie mit hGH bei intensivpflichtigen Patienten als kontraindiziert [Takala et al 1999]. Bei Verbrennungsopferten hingegen konnte keine erhöhte Mortalitätsrate festgestellt werden, vielmehr war

in Studien die Heilung der Hautwunde signifikant beschleunigt und der Proteinverlust deutlich geringer [Ramirez et al 1998].

## 1.7 Einfluss auf die Wundheilung

Der positive Einfluss von Wachstumshormon auf die Wundheilung wurde nicht nur bei Verbrennungen beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Wundheilung bei gastralen Ulcera durch die Gabe von Wachstumshormon über die gesteigerte Zellproliferation und die Stimulation der Angiogenese beschleunigt werden konnte [Beckert et al 2004]. Die physiologische Heilung von Anastomosen des Colons in Abwesenheit von hGH untersuchten Tei et al 2006, indem sie bei GH-defizienten Ratten die Wirkung von GH auf den Heilungsverlauf erfassten. Auch hier wurde eine deutliche Zunahme der Stärke der Anastomose nachgewiesen, jedoch war die Wundheilung nicht schlechter bei den Ratten ohne GH als bei denjenigen mit normaler Hypophysenfunktion. Darüber hinaus ergaben frühere Studien bereits, dass vornehmlich in der frühen Phase der Heilung die Stärke der Anastomose durch einen gesteigerten Kollageneinbau zunimmt [Christensen et al 1990]. Verglichen mit der physiologischen Wundheilung zeigt sich unter der Gabe von hGH eine Zunahme der Dichte des Kollagens, welches auch eine verbesserte Struktur bezüglich Form und Gerüst besitzt [Christensen et al 1995]. Die Therapie mit Insulin-like growth factor I (IGF-I) führt zwar ebenso zu einer Vermehrung des kollagenhaltigen Bindegewebes in der Anastomose, die Stärke bleibt jedoch unbeeinflusst [Petersen et al 1996]. hGH führt überdies auch zu einer Verbesserung der Heilung bei ischämischen Anastomosen und erzielt bessere Ergebnisse wie "Nandrolone phenylpropionate", ein anaboles Steroid [Yarimkaya et al 2003].

## 1.8 Fragestellung der Dissertation

Der positive Effekt von Wachstumshormon auf die Wundheilung wurde in Studien mehrfach belegt. Auch die mit der Gabe von Everolimus verbundene Störung der Wundheilung konnte sowohl klinisch als auch experimentell nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden ob die negativen Wirkungen von Everolimus auf die intestinale Wundheilung durch die simultane Gabe von humanem Wachstumshormon positiv beeinflusst werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Auswahl der Tiere und Bildung von Versuchsgruppen

Nach Vorlage des Antrages zur Durchführung von Tierversuchen wurde die Genehmigung nach §8, Absatz 1 des Tierschutzgesetzes vom Regierungspräsidium Tübingen erteilt (Genehmigungsnummer C10/07).

Bei den ausgewählten Tieren handelt es sich um männliche Sprague-Dawley-Ratten (Harlan Winkelmann, Borchem; Gewicht zu Versuchsbeginn 250-350g). Diese Tiere wurden bereits im Vorversuch verwendet und erwiesen sich dort als geeignet.

Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Zentrums für Medizinische Forschung (ZMF) gemäß den Tierschutzbedingungen unter tierärztlicher Aufsicht unter konstanten Bedingungen (Raumtemperatur 22 +/-1 °C; Hell/Dunkelzyklus je 12 Stunden) gehalten und von Tierpflegern betreut. Mindestens zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden die Tiere an ihr neues Umfeld gewöhnt. Die Nahrung bestand aus Haltungsallesfutter für Ratten und Mäuse der Provimi Kliba AG (Kaiseraugst, Schweiz) und Leitungswasser. Dies war für die Tiere jederzeit vorhanden und zugänglich.

Die Durchführung der Versuche erfolgte in drei Gruppen. Die Gruppe A erhielt als Placebo die Trägerlösung des Everolimus, Gruppe B erhielt Everolimus (Dosierung von 3mg/kg KG p.o.), die Gruppe C erhielt ebenfalls Everolimus (3mg/kg KG p.o.) und zusätzlich Human growth hormon (hGH) in einer Dosierung von 2,5mg/kg KG s.c.. Der Behandlungszeitraum bei allen Gruppen betrug insgesamt 14 Tage, wobei die Tiere nach 7 Tagen operiert wurden.

Tab. 1: Gruppierung und Behandlung der Versuchstiere

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl der Tiere</b>	<b>Behandlung</b>
<b>A</b>	12	Placebo
<b>B</b>	13	Everolimus 3mg/kg KG p.o.
<b>C</b>	15	Everolimus 3mg/kg KG p.o. plus Human growth hormon 2,5mg/kg KG s.c.

## 2.2 Medikamentöse Behandlung

Die Medikamente wurden von der Novartis AG zur Verfügung gestellt. Die Placebobehandlung erfolgte mit der Trägerlösung des Everolimus (self-microemulsifying drug delivery system, Novartis), die beiden anderen Gruppen erhielten Everolimus (Dosis je ml Emulsion, Novartis). Darüber hinaus wurde die dritte Gruppe mit hGH (Fertiglösung zur Injektion, Novo Nordisk) behandelt. Die Medikamente wurden lichtgeschützt und stets bei 4°C gelagert.

Die Zubereitung der Medikamente erfolgte zeitnah zur Gabe. Hierbei wurden 10mg Everolimus, was 500µl der Emulsion entspricht, mit 4,5ml 5%-Glucoselösung verdünnt und mit Hilfe eines Vortexers gemischt. Die Lösung betrug somit eine Konzentration von 2mg/ml. Appliziert wurden je 1,5ml pro Kilogramm Körpergewicht, was einer Dosis von 3mg Everolimus entspricht. Die Trägerlösung für die Behandlung der Placebotiere wurde analog dazu verdünnt. Die Applikation der Medikamente erfolgte einmal täglich über eine Magensonde. Dafür wurden die Tiere jeweils in Kurznarkose mit Isofluran (Forene©; Firma Abott, Wiesbaden) versetzt und die vorbereiteten Medikamente per gastric gavage intragastral appliziert.

Die Gabe des Human Growth Hormons erfolgte subkutan. Hierbei wurde von der Fertiglösung je 1ml/KG Körpergewicht subcutan zwischen die Schulterblätter injiziert, was einer Dosierung von 2,5mg/kg KG entspricht.

Die Ratten wurden hierbei täglich gewogen und die Dosierung an das jeweilige Gewicht angeglichen.

## 2.3 Operation

### 2.3.1 Narkose und OP-Vorbereitung

Nach 7 Tagen Vorbehandlung erfolgte die Operation. Hierbei wurden die Rattten zuerst mit Isofluran (Forene®, Abott, Wiesbaden) in Kurznarkose versetzt, gewogen und großflächig am Bauch rasiert.

Daraufhin erfolgte die Applikation der Intraperitonealnarkose mit einer Lösung aus Ketaminhydrochlorid (Ketamin 100mg Deltaselect, Konzentration 50mg/ml; Curamed Pharma, Karlsruhe) und Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen) wobei 1,1ml Ketamin und 0,4ml Xylazinhydrochlorid gemischt wurden. Jedem Tier wurden vor OP-Beginn 0,5ml des Gemisches injiziert, die dann intraoperativ bei Bedarf noch mit Einzeldosen von je 0,1ml erweitert werden konnten.

Die intraperitoneale Narkose erreichte ihre gesamte Wirkung nach etwa 2-4 Minuten, sodass, nach Überprüfung der Narkosetiefe mittels Schmerzreiz, die Operation beginnen konnte.

### 2.3.2 OP-Technik

Das Tier wird auf den Rücken gelegt und an den Pfoten fixiert. Nach nochmaliger Überprüfung der Narkosetiefe erfolgt eine ca. 4cm lange mediane Laparotomie in der Abdomenmitte.



Abb. 2: mediane Laparotomie

Zum Offenhalten des OP-Gebietes wird ein Lidsperrer Barraquer („Colibri“, 4cm; Firma Eickemeyer) eingesetzt. Coecum und Dünndarm werden aufgesucht und mit feuchten Kompressen umgeben. Nun wird das Colon descendens aufgesucht in welchem die Anastomose angelegt werden soll. Dieses ist für ein standardisiertes Operationsverfahren in besonderem Maße geeignet, da es relativ medial an der hinteren Bauchwand senkrecht nach kaudal läuft und dort gut fixiert ist, wohingegen die anderen Darmabschnitte variabel verlaufen. Unter Schonung der erfolgt eine Durchtrennung des Colons an dieser Stelle. Nun folgt die Anlage der Anastomose mit Prolene 6/0 (Ethicon, Norderstedt) als Nahtmaterial.

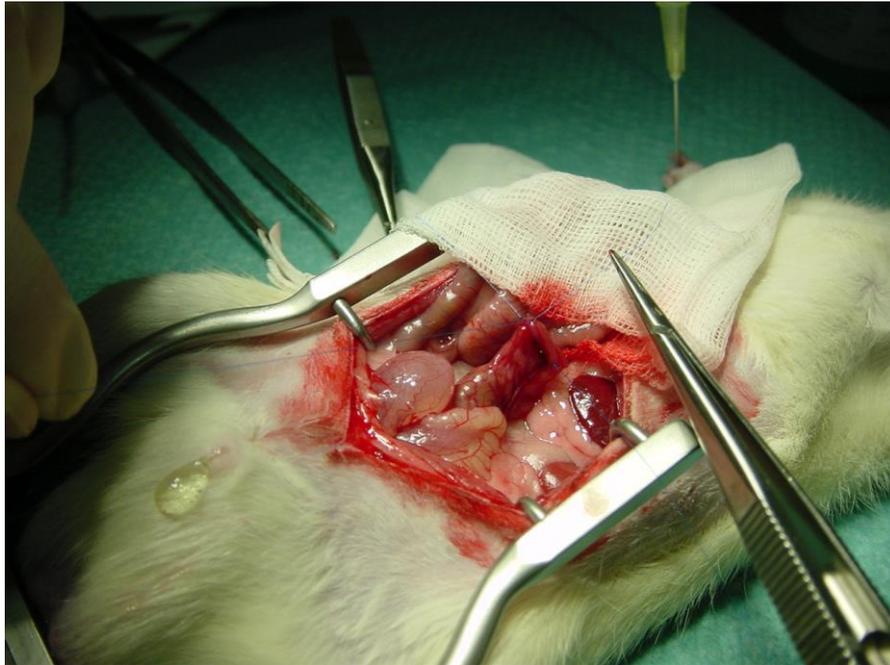


Abb. 3: Einzelknopfnahnt bei der Anlage der Anastomose

Die Kontinuität wird hierbei durch 10 allschichtige Einzelknopfnähte wiederhergestellt. Es resultiert nun eine einreihige allschichtige End-zu-End-Anastomose.

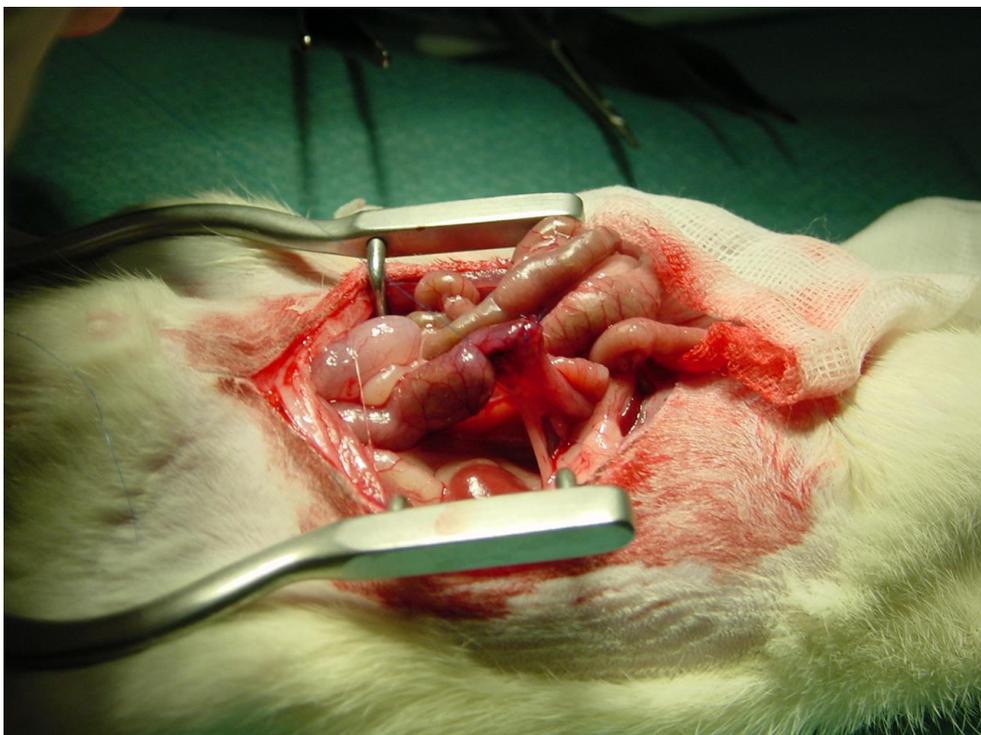


Abb. 4: Fertig gestellte Anastomose

Danach wird der Darm zurückgedreht und nach Überprüfung der korrekten Lage wird die Bauchhöhle mit ca. 0,5 ml NaCl lavagiert.



Abb. 5: postoperativer Situs vor der Bauchnaht

Das Coecum und der Dünndarm werden reponiert, anschließend wird die Bauchdecke mit 3/0 Seidenfaden (Ethilon, Ethicon) in einer fortlaufenden Naht in 2 Schichten verschlossen. Die reine Operationszeit beträgt in etwa 45 Minuten.

#### 2.4 Nachbehandlung und postoperativer Verlauf

Es erfolgte eine 7-tägige Nachbehandlung mit den der Gruppe entsprechenden Medikamenten. In den ersten 3 Tagen nach der Operation erfolgte eine Analgesie mit Carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg; Pfizer Animal Health, New York, NY) subcutan zweimal täglich. Einige Tiere entwickelten im postoperativen Verlauf Durchfälle. Alle Tiere wurden weiterhin gewogen und der Gesundheitszustand beurteilt.

## 2.5 Relaparatomie und Organentnahme

Am Ende der Nachbehandlung wurden die Tiere erneut laparotomiert. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen: In Narkose wurde diesmal zuerst die entstandene Hautnarbe ausgeschnitten, danach erfolgte eine Laparotomie bis zum Xiphoid und die Entnahme eines Stückes gesunder Haut, die ebenfalls zuvor rasiert wurde. Daraufhin erfolgte eine kardiale Punktion mit Blutentnahme, welches asserviert wurde. Es kam in der Folge zum Tod durch Kreislaufstillstand bei den Tieren. Nun erfolgte die Entnahme der gesamten Milz und eines Lappens der Leber, bei Dünndarm und Dickdarm, jeweils ein Stück mit einer Länge von in etwa 5cm. Diese wurden entlang des Mesenteriums aufgeschnitten und gereinigt. Als letztes wurde die Darm-Anastomose entnommen, wobei hier zu beachten war, eventuelle Verwachsungen möglichst mit zu exzidieren. Der resezierte Darmabschnitt betrug 4cm mit der Anastomose in der Mitte.

## 2.6 Messung des „bursting pressure“

Die Messung des „bursting pressure“ ist eine etablierte Methode zur Überprüfung der Suffizienz einer Anastomose. So findet sie auch in anderen Arbeiten Anwendung, die sich mit der Insuffizienz von Anastomosen beschäftigen, wie zum Beispiel Attard JA et al. 2005, der den Effekt von systemischer Hypoxie auf die Heilung von Anastomosen des Kolons mithilfe dieser Methode untersuchte.

Es gibt die Möglichkeit, die Messung in vivo oder in vitro durchzuführen. In vivo bedeutet, dass die Suffizienz der Anastomose noch vor der Entnahme geprüft wird, in vitro, dass dies erst extracorporal geschieht. In seiner Untersuchung vergleicht Cihan et al 2003 die beiden Möglichkeiten und kommen zu dem Schluss, dass die in vivo-Methode bessere Ergebnisse erzielt, was sie jedoch darauf zurückführen, dass durch die mechanischen Veränderungen die Adhäsionen geschwächt werden.

Bei der Überprüfung der Anastomoseninsuffizienz wurde in unserem Fall die in vitro Messung gewählt, wobei die Adhäsionen bei der Entnahme besonders geschont und erst nach Beendigung der Messung gelöst wurden.

Die Messung läuft folgendermaßen ab:

Die beiden offenen Darmenden werden jeweils mit einer Kanüle eingeknotet. Die eine Kanüle ist mit einem Perfusor verbunden, der kontinuierlich 0,9% NaCl mit einer Geschwindigkeit 1,0ml/min in die Anastomose pumpt. Die andere Kanüle ist mit einem Drucksensor verbunden, der den Druckanstieg digital misst. Der bursting pressure ist, der Druck, bei dem die Anastomose oder die Darmwand insuffizient wird und das NaCl austritt. Hierbei entsteht ein plötzlicher Druckabfall im Druck-Zeit-Diagramm. Der maximal erreichte Druck wird nun als „bursting pressure“ notiert.

Der Vorteil dieser Untersuchung zur Anastomoseninsuffizienz besteht vor allem darin, dass die Anastomose hierbei nicht völlig zerstört wird und noch für weitere Untersuchungen verwendet werden kann, was in unserem Falle von entscheidender Bedeutung ist.

Nach der Messung wird die Anastomose vorsichtig von den etwaigen Verwachsungen getrennt und, wie auch der andere Darm, entlang des Mesenteriums aufgeschnitten.

## 2.7 Histologische Aufarbeitung

Zuerst erfolgte die Einbettung der Organe, um diese als Paraffinschnitt auswerten zu können. Es wurde der Gewebeeinfiltrationsautomat der Fa. Leica / Jung Typ 1050 verwendet. Vor dem Einbetten sind die Organe in 4% Formalin fixiert, welches ausgewaschen werden muss. Dazu werden die in Kassetten befindlichen Präparate für 1 Stunde in ein Becherglas mit 70% Ethanol gelegt.

Nach dem Auswaschen der Fixierflüssigkeit erfolgt das Entwässern der Präparate, um diese in das Einbettmedium Paraffin übertragen zu können. Dies geschieht stufenweise, um Zerreißen und Schrumpfungen möglichst zu vermeiden. Nach der Alkoholreihe kommt vor der mit Wasser nicht mehr mischbaren Phase (Paraffin) das Intermedium Xylol. Dieses besitzt die Eigenschaft, sich sowohl mit Alkohol zu mischen als auch geringe Mengen Wasser aufzunehmen. Das Einbettschema ist in folgender Tabelle dargelegt:

Tab. 2: Einbettschema für Paraffinschnitte

<b>Fixiermedium</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
96% Ethanol	15 min	37 °C
96% Ethanol	15 min	37 °C
100% Ethanol	60 min	37 °C
100% Ethanol	60 min	37 °C
100% Ethanol	60 min	37 °C
100% Ethanol	60 min	37 °C
Xylol	80 min	37 °C
Xylol	45 min	37 °C
Paraffin	45 min	61 °C
Paraffin	45 min	61 °C
Paraffin	90 min	61 °C

Die so behandelten Kassetten werden anschließend für etwa 10 Stunden mit dem Gewebeeinfiltrationsautomat (Programm 6) eingebettet. Danach wird das Paraffin aus der Retorte abgelassen und die Präparate an einem Histoembedder (Leica-Jung - 09200359) in eine 4. Paraffinstufe wie folgt überführt:

1. Der Paraffintank, Kassettenbad und Formwanne werden auf 58°C, die Kühlplatte auf -5°C eingestellt.
2. Der Paraffintank und das Kassettenbad werden mit den Paraffinpellets (Paraplast plus, Tissue embedding medium Mc.Cormick Scientific) aufgefüllt, welche man für 24 Stunden stehen lässt, bis diese geschmolzen sind.
3. Die Gewebekassetten können nun ins Kassettenbad des Embedders überführt werden.

4. Das Präparat aus der Gewebeskassette und das passende Formwännchen (Moulds) werden anschließend mit wenig Paraffin befüllt, gleichzeitig wird das Präparat mittels Pinzette arretiert (beachte Orientierung: Längs - oder Querschnitt) und mit Paraffin aufgefüllt.
5. Jetzt lässt man es kurz abkühlen und drückt den beschrifteten Teil der Kassette auf das Formwännchen.
6. Nun kann man die Kassetten auf die Kühlplatte (-5°C) stellen und aushärten lassen (ca. 30min).

Die so behandelten Blöcke werden nun mit dem Mikrotom zu ein µm dicken Paraffinschnitten verarbeitet.

### 2.7.1 HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine der gebräuchlichsten Färbemethoden der Histologie. Sie dient in erster Linie der Unterscheidung verschiedener Gewebsstrukturen. Hierbei färbt die Hämatoxylin-Komponente alle basophilen Zellbestandteile blau, insbesondere das raue endoplasmatische Retikulum und die Zellkerne mit der sauren Desoxyribonukleinsäure. Die Eosin-Komponente färbt hingegen alle acidophilen Zellbestandteile rot, was vor primär das Zellplasma betrifft.

Um die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zu ermöglichen muss der Paraffinschnitt zuerst für diese wasserlösliche Färbung aufnahmefähig gemacht werden. Zur abschließenden Eindeckung mit Eukit muss sie jedoch wieder hydrophob sein. Deshalb wird der Schnitt zuerst mit einer absteigenden, nach Färbung wieder mit einer ansteigenden Alkoholreihe behandelt. Dies geschieht nach folgendem Protokoll:

1. Der Paraffinschnitt wird für 3 mal 10 min in Xylol, für 2 mal 5 min in 100% Ethanol, für 5 min in 96% Ethanol, für weitere 5 min in 70% Ethanol und schließlich für 5 min in aqua dest. überführt.
2. Anschließend erfolgt die Färbung mit Hämalaun nach Mayer (Firma Merck 9249) für 5 min in der Verdünnung 1:5 (35ml Hämatoxylin und 140ml aqua dest.).

3. Danach wird der Schnitt kurz in aqua dest. geschwenkt und für 10 min in fließendem Leitungswasser gewässert.
4. Hierauf erfolgt die Kontrolle unter dem Mikroskop, wobei besonders auf die Blaufärbung der Zellkerne geachtet werden muss.
5. Die zweite Färbung erfolgt für ca. 1 min mit 1% Eosin (1,75g Eosin und 175 ml aqua dest. und 2-3 Tropfen Eisessig).
6. Daraufhin wird das Präparat wieder für ca. 10 sec in aqua dest. geschwenkt und dann für ca. 5 sec mit 70% Ethanol differenziert.
7. Schließlich wird das gefärbte Präparat einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt, wobei es hierbei für 10 sec in 96% Ethanol, für 2 mal 2-5 min in 100% Ethanol, für 3 mal 2-5 min in Xylol überführt und schließlich mit Eukit eingedeckt wird.

Die so gefärbten Schnitte können nun unter dem Mikroskop beurteilt werden. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ und erfolgt in den Graden 0-3 für jeden Parameter. Ausgewertet wurden hierbei die Zelldichte, die Menge an Granulationsgewebe in der Anastomosenregion und das Ausmaß der Gefäßeinsprossung.

### 2.7.2 Azan-Färbung

Die Azan-Färbung nach Heidenhain ist eine Kombination der Färbungen aus Azokarmin und Anilinblau. Hierbei werden kollagenes und retikuläres Bindegewebe scharf blau, Schleim und Mucopolysaccharide blau, Muskelgewebe orange bis rötlich und Erythrozyten, Gliafasern und Chromatin rot gefärbt. Dadurch ist besonders eine Abgrenzung zwischen intra- und extrazellulären Substanzen, aber auch eine Unterscheidung zwischen Muskulatur und Bindegewebe möglich.

Die Aufarbeitung erfolgt ähnlich zur HE-Färbung mit einer absteigenden und einer aufsteigenden Alkoholreihe nach folgendem Protokoll:

1. Zu Beginn wird der Paraffinschnitt für 3 mal 10 min in Xylol, für 2 mal 10 min in 100% Ethanol, für 10 min in 96% Ethanol, für 10 min in 70% Ethanol und für 5 min in aqua dest. überführt.

2. Danach wird der Schnitt für 15 min bei RT in 1% Anilinalkohol vorbehandelt. Dieser wird aus 1000ml 96% Ethanol und 1 ml Aminobenzol (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Art. Nr. 10137) hergestellt. Es folgt die Spülung für etwa 1 min mit aqua dest.
3. Die Färbung erfolgt mit 56 °C warmer, gebrauchsfertiger Azokarminlösung (0,1 g Azokarmin G in 100ml aqua dest. aufschwemmen, kurz aufkochen und durch einen nicht gehärteten Filter abfiltrieren, je 100ml Filtrat 1 ml Eisessig zugeben; Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Art. Nr. 10147).
4. Anschließend wird das Präparat für 15 min im Trockenschrank bei 56 °C inkubiert. Nach dem Herausnehmen wird es zunächst stehen gelassen, bis es auf RT abgekühlt ist.
5. Daraufhin erfolgt die Spülung mit aqua dest. für 1-2 min.
6. Nun werden die Strukturen differenziert. Dies erfolgt mit 1% Anilinalkohol für 1-4 min, bis nur noch die Zellkerne gefärbt sind.
7. Anschließend wird der Schnitt kurz mit essigsauerm Alkohol (1% Eisessig in 96 % Ethanol) ausgewaschen und für 1-2 min mit aqua dest. gespült.
8. Nun kann man das Bindegewebe entfärben und beizen. Dies geschieht mit 5% Phosphorwolframsäure (Mephisto GmbH, Frankfurt am Main, Art. Nr. 10323) für 80 min.
9. Anschließend wird erneut für 1-2 min mit aqua dest. gespült.
10. Nach dieser Vorbehandlung erfolgt die Färbung des Bindegewebes und des Zytoplasmas mit Anilinblau-Orange-Gemisch (0,5 g Anilinblau, 2 g Orange Gin in 100 ml aqua dest. und 8 ml Eisessig lösen; Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Art. Nr. 10144.01000) für 75 min.
11. Die Färbung noch einmal kurz mit aqua dest. abgespült und bis zur gewünschten Farbintensität unter mikroskopischer Kontrolle mit 96% Ethanol differenziert.
12. Daraufhin wird der Schnitt für 2 min mit Isopropanol und für 2 mal 10 min mit Xylol dehydriert bevor er mit dem Roti-Histokitt (Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. Nr. 6638.1) eingedeckt werden kann.

Auch diese Schnitte können nun unter dem Mikroskop beurteilt werden. Hierbei erfolgt eine Bewertung des kollagenen Bindegewebes hinsichtlich Struktur und Anordnung, außerdem wird die vorhandene Zelldichte beurteilt.

## 2.8 Immunhistochemie

### 2.8.1 PCNA-Bestimmung

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) ist ein Protein, welches bei der Zellteilung, insbesondere der DNA-Replikation, eine wichtige Rolle einnimmt und als zuverlässiger Marker für die Bestimmung der Proliferationsaktivität anerkannt ist.

Der Nachweis erfolgt indirekt über monoklonale Antikörper gegen PCNA an Paraffinschnitten. Diese werden nach folgendem Protokoll behandelt:

1. Als erstes wird das Präparat mit Xylol für 3 mal 10 min und mit 100% Ethanol für 2 mal 10 min entparaffiniert.
2. Daraufhin wird die endogene Peroxidase mit 150ml Methanol plus 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15 min bei RT blockiert.
3. Nun erfolgt die Inkubation mit TBS für 3 mal 5 min und die Demaskierung mit Citratpuffer (pH 6,0) für 6 mal 5 min in der Mikrowelle bei 750 Watt.
4. Daraufhin wird der Schnitt erneut mit TBS für 3 mal 5 min inkubiert.
5. Jetzt erfolgt der Block mit 1:5 verdünntem Ratten-Serum (rabbit-serum DAKO X 902) um eine spezifische Bindung des Primär-Antikörpers sicher zu stellen.
6. Nun kann der 1:75 verdünnte Primär-Antikörper (mouse anti-PCNA Oncogene NA-03) aufgetragen und das Präparat für eine Stunde bei RT inkubiert werden.
7. Anschließend wird es erneut mit TBS für 3 mal 5 min inkubiert.
8. Es folgt die Preinkubation des Sekundär-Antikörpers mit 1:2 verdünntem Ratten-Serum (rat-serum DAKO X 940) für 30 min auf Eis, anschließend wird das Gemisch für 5 min zentrifugiert und der Überstand wird eingesetzt.

9. Dieser auf 1:600 hochverdünnten Sekundär-Antikörper (rabbit anti-mouse biotinylated DAKO E413) wird nun aufpipettiert und für 30 min bei RT und wieder mit TBS für 3 mal 5 min inkubiert.
10. Nun wird noch der Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex/HRP (PK 6100 vecastain ABC Kit Elite; Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen) aufpipettiert und für 30 min bei RT inkubiert, was eine Signalverstärkung zur Folge hat, da der Komplex an den Sekundärantikörper bindet.
11. Es erfolgt die erneute Inkubation mit TBS für 3 mal 5 min. und mit einem Gemisch aus 100ml TBS, 50mg DAB (FLUKA 32750) und 33,3µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10min bei RT. Hierbei entsteht ein braunes, unlösliches Reaktionsprodukt.
12. Nun wird das Präparat in H<sub>2</sub>O gespült und eventuell mit Hämalaun gegengefärbt.
13. Es erfolgt eine Dehydratation mittels aufsteigender Alkoholreihe: Hierbei wird der Schnitt zuerst für ca. 5 sec mit 70% Ethanol differenziert, anschließend für 10 sec in 96% Ethanol, für 2 mal 2-5 min in 100% Ethanol und für 3 mal 2-5 min in Xylol überführt.
14. Zuletzt wird das Präparat mit dem Roti-Histokitt (Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. Nr. 6638.1) eingedeckt.

Die Auswertung der PCNA-Präparate erfolgt durch Auszählung der proliferierenden Zellkerne an standardisierten Punkten innerhalb der Anastomose aus welchen anschließend ein Mittelwert gebildet wird.

### 2.8.2 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielt. Es wird sowohl von neutrophilen Granulozyten, Monozyten als auch Makrophagen im Rahmen der Phagozytenaktivierung sezerniert und bindet über Phosphatidylserin an apoptotische Zellen.

Um den Verlauf der Entzündungsprozesse in den einzelnen Gruppen besser beurteilen zu können, wurde die MPO-Aktivität in jeder Anastomose gemessen.

Nach folgendem Protokoll werden jeweils eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle erstellt:

1. Zu Beginn wird der Schnitt durch Überführung in Xylol für 3 mal 10min und in 100% Ethanol für 2 mal 10min entparaffiniert.
2. Als nächstes erfolgt die Blockade endogener Peroxidasen durch Inkubation in einem Gemisch aus 100ml Methanol mit 2,7ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus 150ml Methanol mit 4,05ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15min bei RT. Nun wird das Präparat mit PBS für 3 mal 5min gewaschen.
3. Daraufhin werden die unspezifischen Bindungsstellen mit Schweine Serum (swine-serum DAKO X0901) in der Verdünnung 1:5 mit PBS für 20min bei RT blockiert.
4. Im Anschluss erfolgt das Aufpipettieren des 1:50 mit PBS verdünnten Primär-Antikörpers (rabbit polyclonal antibody; DIANOVA DLN-12930 [0,1ml] und DLN-12931 [0,5ml]), jedoch ausschließlich auf die Positiv-Kontrolle, und Inkubation über Nacht bei RT.
5. Der so behandelte Schnitt wird nun erneut mit PBS für 3 mal 5min gewaschen.
6. Als nächstes wird der 1:600 mit PBS verdünnte Sekundär-Antikörper (swine anti-rabbit/biot) aufpipettiert und für 60min bei RT inkubiert. Erneut wird mit PBS für 3 mal 5min gewaschen, bevor der Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex/HRP (PK 6100 vecastain ABC Kit Elite; Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen) aufpipettiert und für 60 min bei RT inkubiert werden kann.
7. Hierauf wird wiederum mit PBS für 3 mal 5min gewaschen.
8. Anschließend wird der Schnitt mit einem Gemisch aus 70ml TBS, 35mg DAB (FLUKA 32750) und 23,31µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5-10min bei RT inkubiert und sowohl mit PBS für 3 mal 5min als auch mit aqua dest. für 1 mal 5min gewaschen.
9. Schließlich erfolgt die Dehydratation über die aufsteigende Alkoholreihe, wobei das Präparat zuerst für ca. 5 sec mit 70% Ethanol differenziert und anschließend für 10 sec in 96% Ethanol, für 2 mal 2-5 min in 100% Ethanol und für 3 mal 2-5 min in Xylol überführt wird.

10. Abschließend wird der Schnitt mit Roti-Histokitt (Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. Nr. 66381) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte am Mikroskop, wobei je 30 standardisierte high power fields pro Schnitt ausgewertet wurden.

## 2.9 Hydroxyprolinkonzentration

Die Messung der Hydroxyprolinkonzentration gibt eine quantitative Auskunft über die Menge an vorhandenen Kollagenfasern und kann somit als Indikator für die Wundheilung verwendet werden.

Diese Messungen führten wir sowohl in Hautwunde und der gesunden Haut als auch in der Anastomose und dem gesunden Dickdarm durch.

Die Durchführung der Messung erfolgt nach dem Verfahren von Wössner. Hierbei werden die Proben zu Beginn bei 37 °C für 2 Tage getrocknet und anschließend gewogen, um die später gemessenen Konzentrationen in das Verhältnis zum Gewicht setzen zu können. In säure und hitzebeständigen Cryo-Röhrchen (Firma Roth, Karlsruhe) wurden die Proben mit 2 ml 6 N HCL versetzt und für 3 Stunden bei 110 °C hydrolysiert (Rotilabo®-Block-Heater H250; Roth). Das Hydrolysat wurde bei 1700 U/min für 15 Minuten abzentrifugiert und in einem 15ml-blue-cap-Gefäß (Cellstar®; Greiner Labortechnik, Frickenhausen) mit 2,7 -2,9 ml NaOH-Citrat/Acetat-Puffer aufgefüllt, um einen pH-Wert zwischen 5,4 und 6 zu erreichen. Daraufhin wurde die Probe mit aqua dest. auf 10ml aufgefüllt.

Im Anschluss konnte die Standardreihe angesetzt werden. Hierfür wurden für die Stammlösung 100mg Hydroxyprolin abgewogen und in 50 ml 6 N HCl gelöst, was eine Hydroxyprolinkonzentration von 2 mg/ml entspricht. Es wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, wobei zuerst um den Faktor 12,5 verdünnt wurde (1 ml der Stammlösung mit 11,5 ml HCl). Alle weiteren Verdünnungen wurden um den Faktor 2 verdünnt. Am Ende wurden alle so hergestellten Standards noch um den Faktor 5 verdünnt, indem je 2 ml mit 8 ml aqua dest. aufgefüllt wurden. So entstanden eine Verdünnungsreihe mit den absteigenden

Konzentrationen 32, 16, 8, 4, 2, 1 und 0,5 µg Hydroxyprolin pro Milliliter und ein Leerwert bestehend aus 6 N HCl.

Von jeder Probe (Standard und Hydrolysate) wurden je 60 µl als Duplicate in 96-well Microtiterplatte (flat) vorgelegt und sowohl 20 µl Assay Puffer als auch 40 µl frische Chloramin T Lösung hinzugefügt. Mit einer Pipette wurden die Proben vorsichtig gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Schließlich wurden noch 80 µl frisches Ehrlich's Reagenz zuzufügen hinzugefügt und nach erneutem Mischen mittels Pipette für 30 min bei 60° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Platte abgewischt und nach Abkühlung konnten die Platte im ELISA-Reader (Allg. Chirurgie) bei Messwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm vermessen werden. Der Farbumschlag von gelb zu rot war bereits makroskopisch sichtbar und umso deutlicher, je höher die Hydroxyprolinkonzentration war.

## 2.10 Zymographie

Die Zymographie ermöglicht, bestimmte Enzyme in einer Probe mittels Gelelektrophorese sichtbar zu machen. Hierbei werden die Proteine zuerst denaturiert und durch die Elektrophorese getrennt, nach anschließender Renaturierung, Inkubation und Färbung erscheinen die Banden mit Enzymaktivität farblos, während die Banden mit dem unverdauten Substrat blau erscheinen.

Die gemessenen Enzyme waren in unserem Fall die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) und die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), zwei Kollagenasen, die unter anderem Kollagen IV und V spalten und insbesondere beim Umbau von Bindegewebsstrukturen eine Rolle spielen.

Die Aufarbeitung der Anastomosengewebe für diese Aktivitätssays erfolgte nach folgendem Protokoll: Zuerst werden ca. 200 – 300 mg Anastomosengewebe plus 400 µl eiskühlten Extraktionspuffer für 30 Sekunden mit dem Schredder homogenisiert. Dieses Gemisch wird anschließend für 30 Sekunden mit dem Vortexer gemischt und für 10 Minuten bei 10.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen,

aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Von dem übrigen Zentrifugat wird nun die Proteinkonzentration bestimmt und jeweils 100µg Gesamtprotein auf das Zymographiegel (Fertiggel Firma BIORAD 0,1 % endconc. Gelatine) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte in Alpha Digidoc RT mit Freihand Tool.

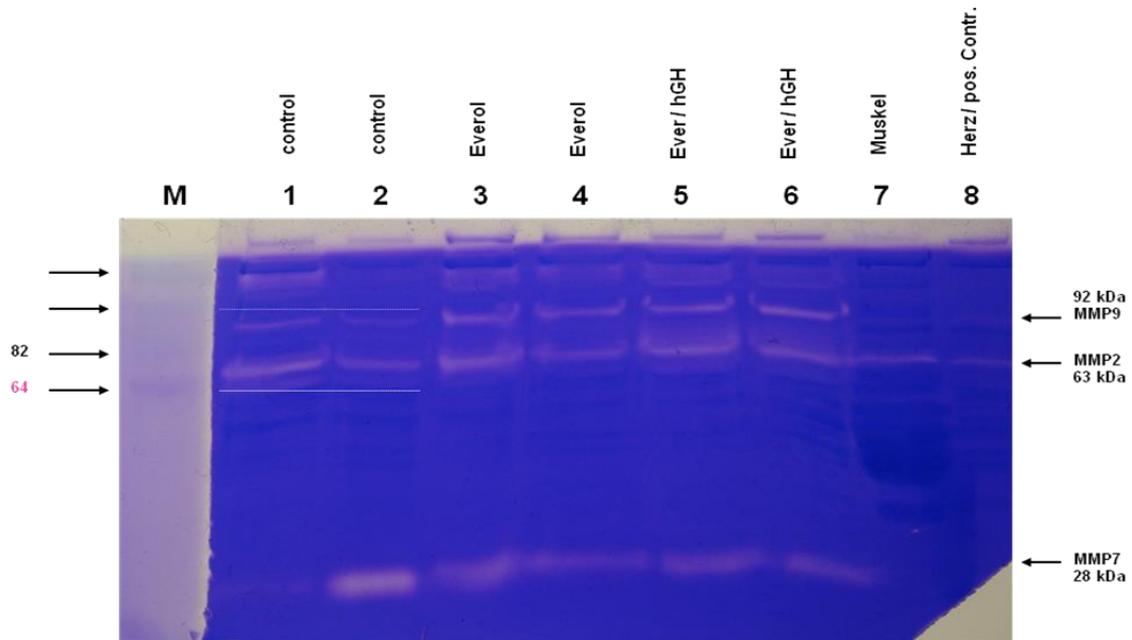


Abb. 6: Beispiel eines Zymographiegels zur Konzentrationsbestimmung der MMP2 und MMP9 von den extrahierten Gewebeproben

## 3 Ergebnisse

### 3.1 prä- und postoperativer Verlauf

#### 3.1.1 allgemeiner Gesundheitszustand

Im Allgemeinen tolerierten die Versuchstiere die Behandlung sehr gut. Insgesamt verstarben jedoch 8 Tiere (1 Tier präoperativ, 7 Tiere intraoperativ). Hier ist jedoch am ehesten von einer Narkoseunverträglichkeit gegenüber dem Isofluran auszugehen, da es sich um Tiere handelte, die fast alle aus einem Wurf kamen. Diese wurden auch in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

Bei allen anderen Tieren war auffällig, dass es besonders bei den Tieren mit ausschließlicher Everolimus-Behandlung im postoperativen Verlauf zu Durchfällen kam. Bis auf die oben erwähnte Narkoseunverträglichkeit wurden sowohl die intragastrale Applikation der Placebo- und der Everolimus-Emulsion in Kurznarkose als auch die subkutane Injektion des hGH gut toleriert. Es traten weder Erbrechen noch Spritzenabszesse oder andere Komplikationen auf.

#### 3.1.2 Gewichtsverläufe

Vor Beginn der Behandlung betrug das Durchschnittsgewicht bei allen Tieren  $343,6 \pm 29$ g, wobei die Verteilung auf die Gruppen nahezu identisch war (Durchschnittsgewicht Gruppe 1= $343,8 \pm 31$ g; Gruppe 2= $343,3 \pm 27$ g; Gruppe 3= $343,8 \pm 31$ g).

Während der 7-tägigen Vorbehandlung war bereits ein leichter Gewichtsverlust, sowohl der Gruppe 2 als auch der Gruppe 3 festzustellen, wobei die Gewichtsabnahme bei Gruppe 2 stärker war (durchschnittlicher Gewichtsverlust bis zum OP-Tag Gruppe 2= $11,5$ g; Gruppe 3= $5,4$ g). Die Tiere der ersten Gruppe hingegen legten noch an Gewicht zu (durchschnittliche Gewichtszunahme  $5,1$ g). In der postoperativen Phase jedoch kam es zu Gewichtsabnahmen in

allen Gruppen. Während es in Gruppe 1 zu einem durchschnittlichen Gewichtsverlust von 8,6g im postoperativen Verlauf kam, verloren die Tiere in Gruppe 2 31,4g in dieser Zeit. Bei Gruppe 3 betrug der durchschnittliche Gewichtsverlust 17,4g. Die drastischen Gewichtsabnahmen, besonders in der zweiten Gruppe sind im postoperativen Verlauf vor allem Ausdruck der schlechten Wundheilung unter Everolimus.

Der Gewichtsverlauf der einzelnen Gruppen ist in folgendem Diagramm aufgetragen:

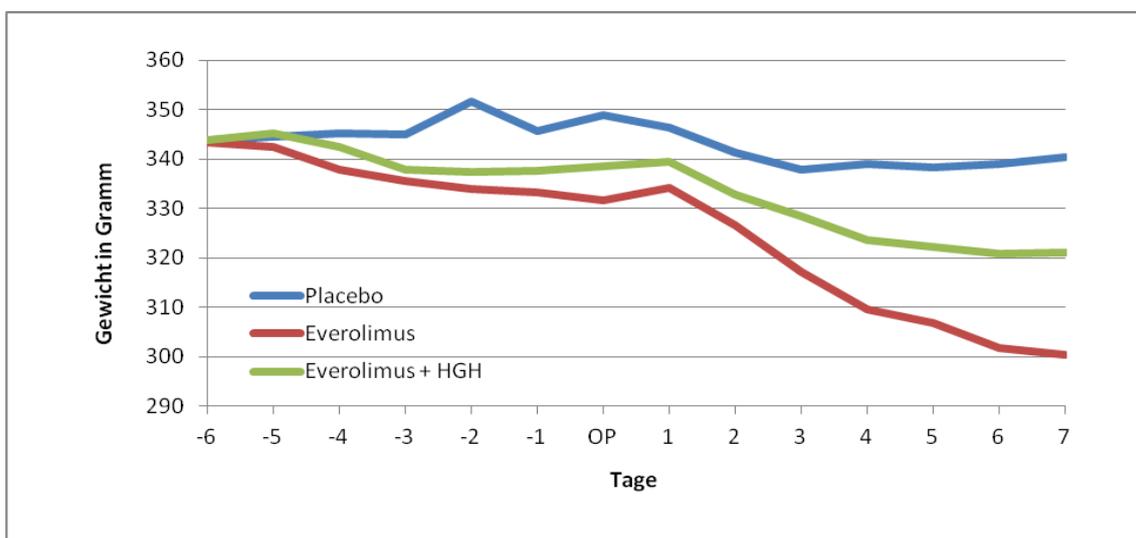


Abb. 7: Gewichtsverläufe der Behandlungsgruppen

### 3.1.3 Ileus und Peritonitis

Bei insgesamt 4 Tieren war bei der Relaparotomie ein Ileus festzustellen. Es handelte sich ein Tier aus der Gruppe 1 (Nr. 22) ein Tier aus der Gruppe 2 (Nr. 26) und zwei Tiere aus der Gruppe 3 (Nr. 9 und Nr. 24). Bei 2 Tieren war überdies hinaus eine Peritonitis vorhanden (Nr. 9 und Nr.26).

### 3.1.4 Insuffizienzen und Verwachsungen

Es traten insgesamt 9 Anastomoseninsuffizienzen auf, wobei hier eine Ratte der Gruppe 1 (Nr. 19), vier Ratten der Gruppe 2 (Nr. 14, Nr. 26, Nr. 35, Nr. 44) und vier Ratten der Gruppe 3 (Nr. 9, Nr. 12, Nr. 18, Nr. 21) betroffen waren.

Die Verwachsungen waren insbesondere bei den Gruppen 2 und 3 sehr ausgeprägt. Hierbei waren sowohl Fettgewebe als auch die umliegenden Organe, insbesondere Dünndarm und Coecum betroffen. Dies führte soweit, dass Anastomosen teilweise so stark mit den Nachbarorganen verwachsen waren, dass eine Messung des bursting pressures nicht mehr möglich war. Dies war bei insgesamt bei 5 Tieren der Fall, ein Tier der Gruppe 1 (Nr. 2) 3 Tiere der Gruppe 2 (Nr. 4, Nr. 8, Nr. 17) und 1 Tier der Gruppe 3 (Nr. 6).

### 3.2 Bursting pressure

Die Messung des bursting pressures gestaltete sich in der Gruppe 1 weitestgehend komplikationslos. Es wurden 10 Tiere gemessen, der mittlere Druck bis zur Insuffizienz der Anastomose lag bei  $133,5 \pm 19$  mmHg. Die Gruppen 2 und 3 waren aufgrund der oben beschriebenen Verwachsungen nur bedingt messbar. Hierbei wurden bei der Gruppe 2 bei 5 Tieren verwertbare Ergebnisse erzielt, der mittlere Druck lag bei  $84,6 \pm 25$  mmHg. In der dritten Gruppe waren 6 Messungen auswertbar, hier lag der mittlere Druck bei  $113,5 \pm 25$  mmHg.

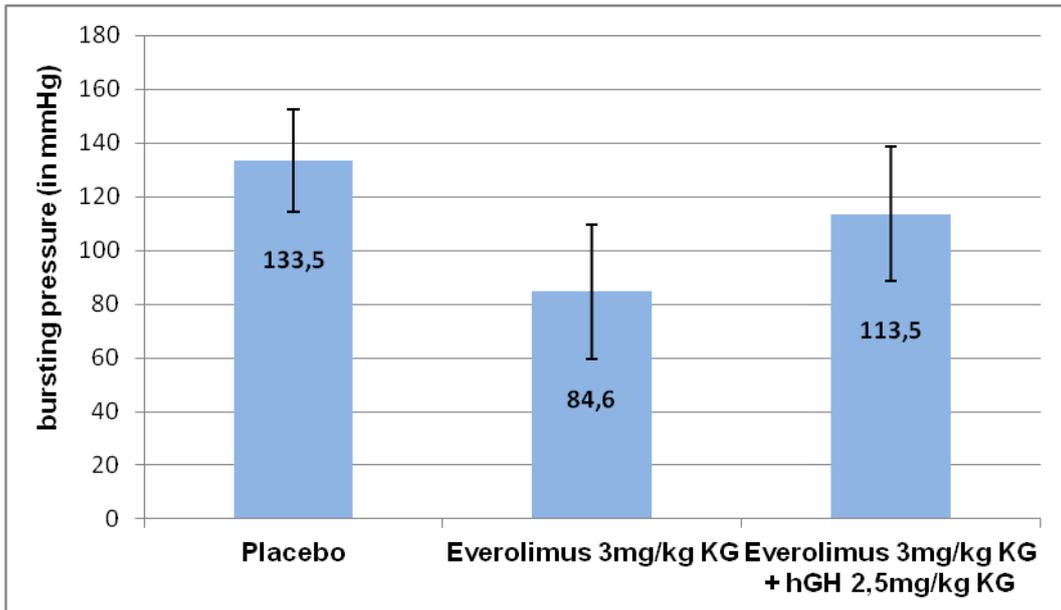


Abb. 8: Mittlerer Druck der Messungen des bursting pressure

### 3.3 Histologische Färbungen

#### 3.3.1 HE-Färbung

In den HE-Schnitten wurden die Anzahl der Fibroblasten, Entzündungszeichen, Menge an Fibrin, Fett, Gefäßen, Nekrosen und die Anastomose selbst beurteilt. Für diese Parameter wurden jeweils Zahlen von 0 bis 3 vergeben (0 = nichts, 1 = wenig, 2 = mittel, 3 = viel). Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse der Auswertung wieder:

Tab. 3: Auswertung der HE-Färbungen

Gruppe	Tier	Fibroblasten	Entzündung	Fibrin	Fett	Gefäße	Nekrose	Anastomose
Placebo	7	3	1	1	0	1	1	1
	19	3	1	1	1	1	1	1
	22	2	2	3	1	3	2	1
	25	3	0	0	0	1	1	1
	28	3	0	1	0	1	1	1
	31	3	1	1	1	1	1	1
	34	2	2	1	2	1	1	1
	37	3	0	1	0	1	1	1
	40	3	1	1	1	2	2	x
	46	3	0	0	0	1	0	1
Everolimus	8	1	2	1	1	1	2	x
	14	0	3	2	x	3	3	x
	17	1	3	2	2	3	2	x
	26	1	2	1	3	3	2	3
	29	0	3	3	2	3	3	3
	32	1	2	2	3	1	2	1
	35	0	3	2	3	2	3	2
	38	0	2	1	2	0	1	x
	41	1	2	3	2	1	3	1
	44	0	3	2	1	0	2	1
47	0	2	3	1	2	2	x	
Everolimus + hGH	9	2	3	2	1	1	3	1
	12	1	1	2	2	2	2	x
	18	1	2	3	x	1	3	x
	21	1	3	3	1	1	2	1
	24	2	2	3	3	1	3	x
	27	0	1	2	3	2	1	2
	30	0	2	2	3	1	2	1
	33	1	2	3	3	1	3	3
	36	2	2	1	0	0	1	2
	39	1	3	3	2	2	2	2
	42	1	3	3	2	1	3	2
	45	0	2	3	3	0	3	x
48	0	3	3	3	2	1	3	1

In der Placebogruppe war gegenüber den beiden anderen Gruppen eine signifikant erhöhte Anzahl an Fibroblasten zu verzeichnen, wohingegen weit weniger Entzündungszeichen, Fibrin und Fettgewebe vorhanden war. Diese waren sowohl in Gruppe 2 als auch in Gruppe 3 signifikant erhöht. Zwischen den beiden Gruppen konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bezüglich der Gefäßeinsprossung waren zwischen alle 3 Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen, es waren jedoch bei Gruppe 2 und 3 signifikant mehr Nekrosen nachweisbar gegenüber der Kontrollgruppe. Auch bei der Beurteilung der Anastomose selbst waren deutliche Unterschiede hinsichtlich der bereits erfolgten Überwachsung durch Mukosa zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Everolimusgruppen festzustellen.

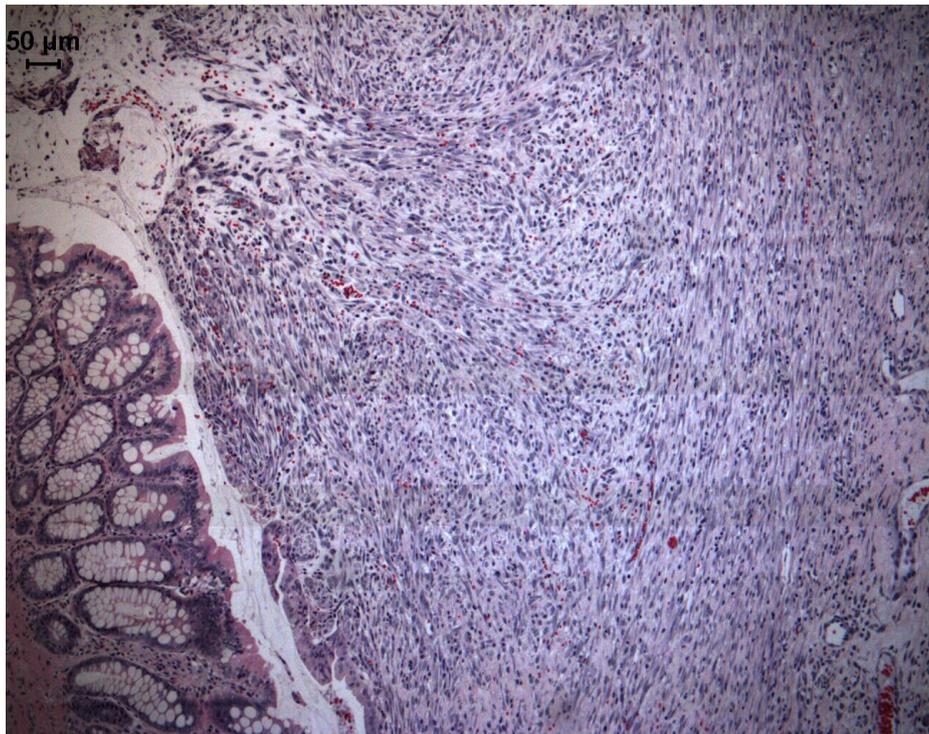


Abb. 9: HE-Färbung (100x) Placebo-Gruppe; nahezu im gesamten Bild ist reichlich Granulationsgewebe mit hohem Fibrosegrad zu sehen, am linken Bildrand befindet sich die ursprüngliche Darmschleimhaut (Ratte 7).

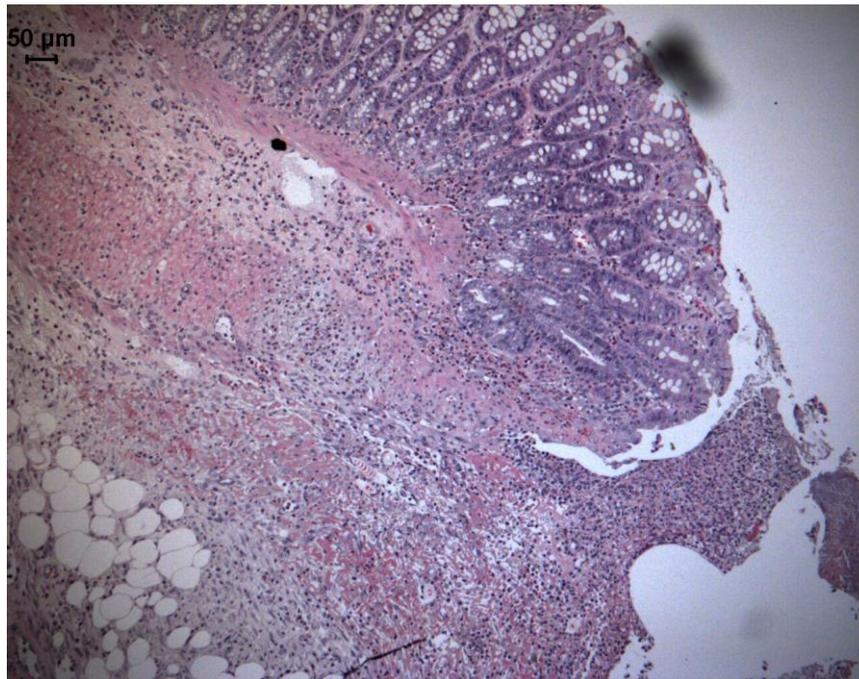


Abb. 10: HE-Färbung (100x) Everolimus-Gruppe; in der Bildmitte befindet sich die schräg verlaufende ehemalige Schnittstelle mit zellärmerem Bindegewebe und deutlich weniger ausgeprägter Fibrosierung, am oberen Bildrand ist die ursprüngliche Darmschleimhaut zu sehen, am linken unteren Bildrand befinden sich zahlreiche Fettvakuolen (Ratte 44).

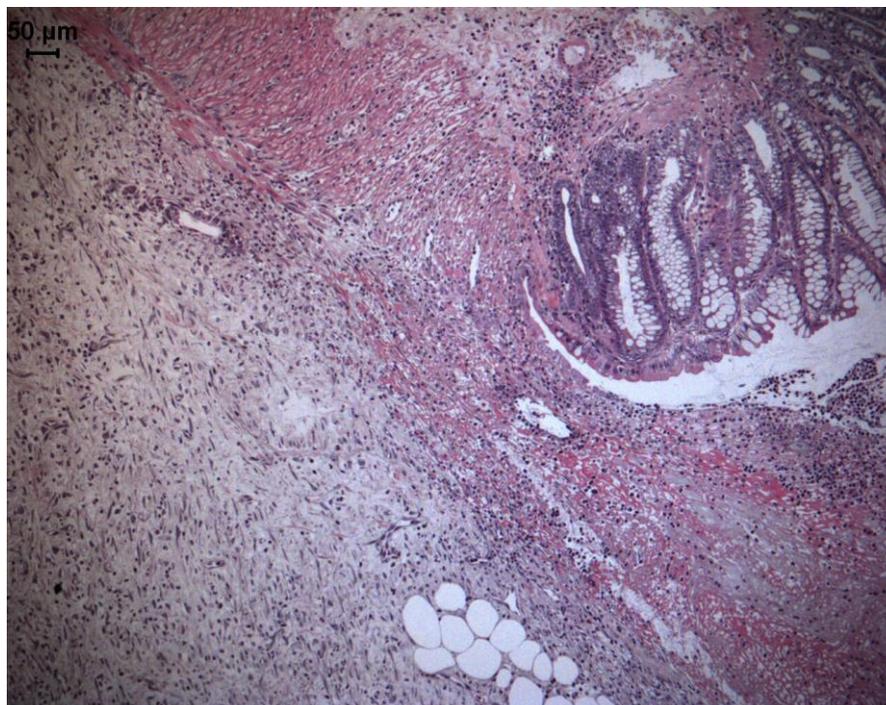


Abb. 11: HE-Färbung (100x) Everolimus+hGH-Gruppe; von links oben nach rechts unten verlaufende Schnittlinie mit reichlich Granulationsgewebe jedoch mit niedrigem Fibrosegrad, auf der rechten Seite ursprüngliche Darmschleimhaut, am oberen Bildrand ist die Muscularis, am unteren Bildrand einige Fettvakuolen zu erkennen.

### 3.3.2 Azan-Färbung

Die Auswertung der Azan-Färbung erfolgte exemplarisch und spiegelt den Eindruck wider, die die Ergebnisse der Hydroxyprolinbestimmung ergaben.

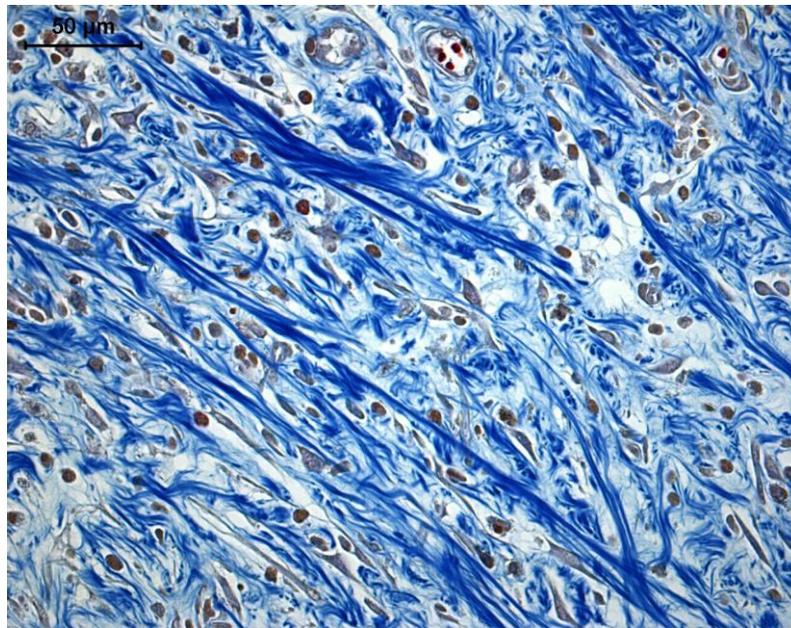


Abb. 12: Azan-Färbung (400x) Placebo-Gruppe, Kollagenfasern rel. dicht, parallel angeordnet, gut vernetzt, Zelldichte mäßig, angeschnittene Blutgefäße sichtbar (Ratte 46).

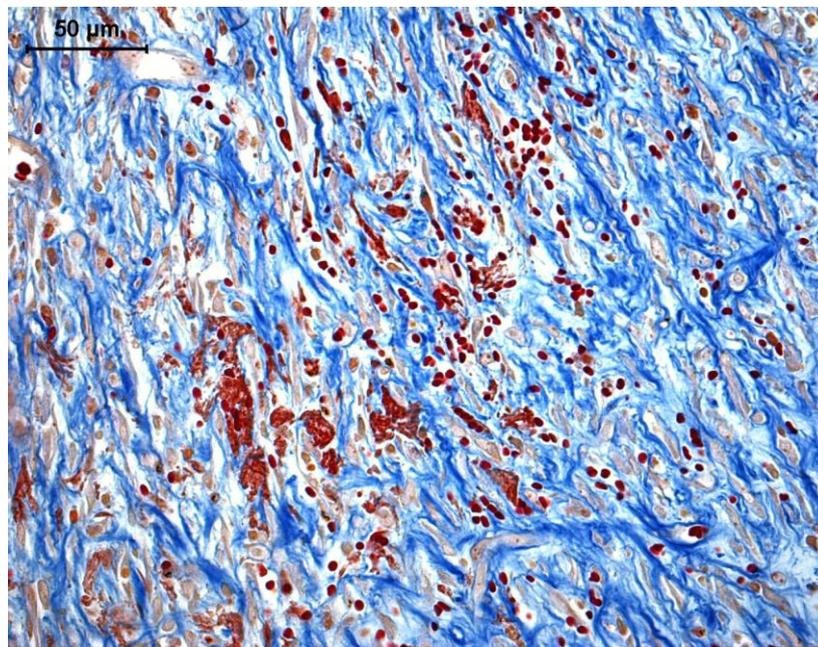


Abb. 13: Azan-Färbung (400x) Everolimus-Gruppe, Kollagenfasern dünn und ohne Struktur, paralleles Muster aufgelöst, schlechter Zusammenhalt, viele Zellkerne (Ratte 47)

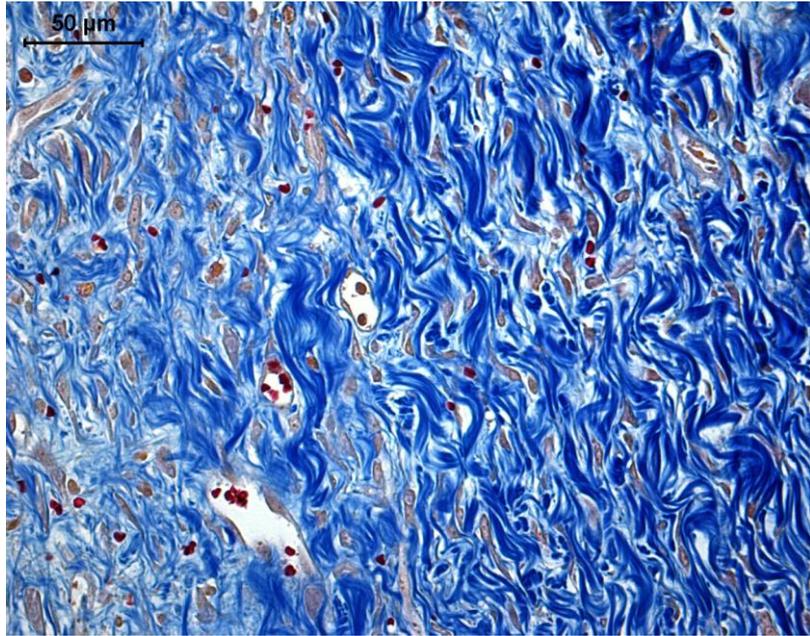


Abb. 14: Azan-Färbung (400x) Everolimus+hGH-Gruppe, übermäßig viel und dichtes kollagenes Bindegewebe, parallele Struktur vorhanden, dichte Vernetzung, viele Zellkerne vorhanden, mehrere Blutgefäße angeschnitten (Ratte 48).

### 3.4 Immunhistochemie: PCNA

Die Auszählung der PCNA-positiven Zellen ergab für Gruppe 1 durchschnittlich 28,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Standardabweichung +/- 16,8/mm). Für Gruppe 2 ergaben sich 11,9/mm<sup>2</sup> (+/- 2,9/mm) und für Gruppe 3 26,2/mm (+/- 12,0/mm).

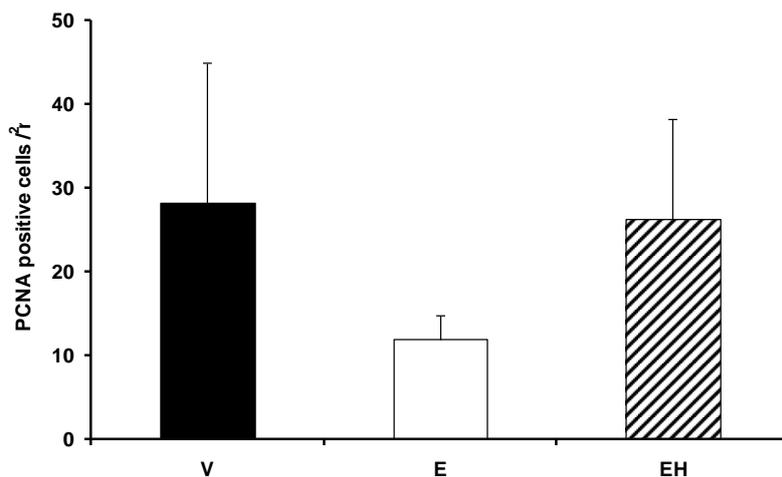


Abb. 15: Auszählung der PCNA-positiven Zellen

Die statistische Auswertung ergab eine Signifikanz mit  $p(V/E) = 0,049$  und  $p(EH/E) < 0,001$ .  $p(V/EH)$  war nicht signifikant.

### 3.5 Hydroxyprolinbestimmung

Bei der Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration im Anastomosengewebe ergab sich für die Gruppe 1 eine mittlere Konzentration von 14,85 µg/mg (+/- 2,47), in Gruppe 2 8,92 µg/mg (+/- 3,58) und in Gruppe 3 11,89 µg/mg (+/- 2,83).

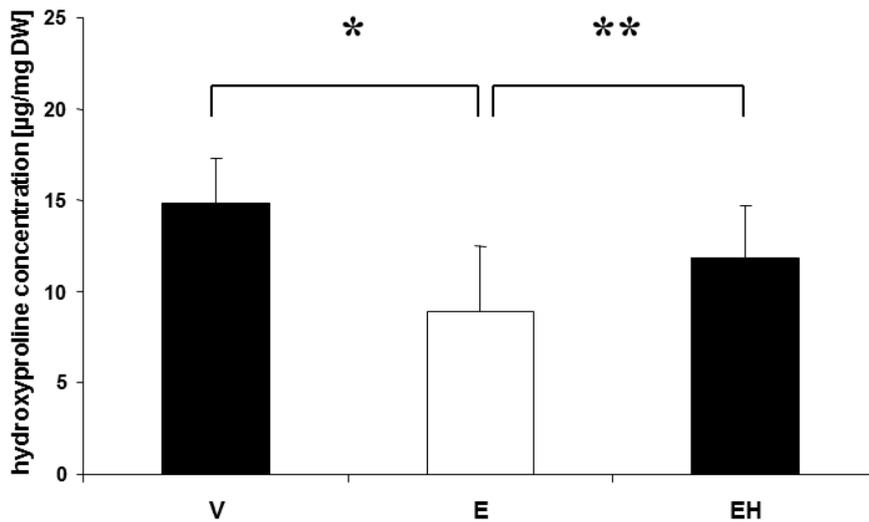


Abb. 16: Hydroxyprolinkonzentration in der Anastomosenregion

#### **anastomotic region wound:**

V (vehicel); n = 12

E (everolimus 3 mg/kg); n = 12

EH (everolimus + human growth hormon);  
n = 15

P = < 0.001 *versus* V / E

t-test ; power of performed test with alpha = 0.050: 0.997

P = 0.030 *versus* E / EH

t-test ; power of performed test with alpha = 0.050: 0.509

P = 0.011 *versus* V / EH

t-test ; power of performed test with alpha = 0.050: 0.701

Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen Gruppe 1 und 2 ( $P \leq 0,001$ ), zwischen Gruppe 2 und 3 ( $P = 0,030$ ) und zwischen Gruppe 1 und 3 ( $P = 0,011$ ) nachgewiesen werden.

Beim Kontrollgewebe des Dickdarms konnte für Gruppe 1 eine mittlere Konzentration von 13,05 µg/mg (+/- 3,09), für Gruppe 2 12,83 µg/mg (+/- 5,40)

und für Gruppe 3 14,31 (+/- 3,52) ermittelt werden. Daraus ergibt sich folgendes Diagramm:

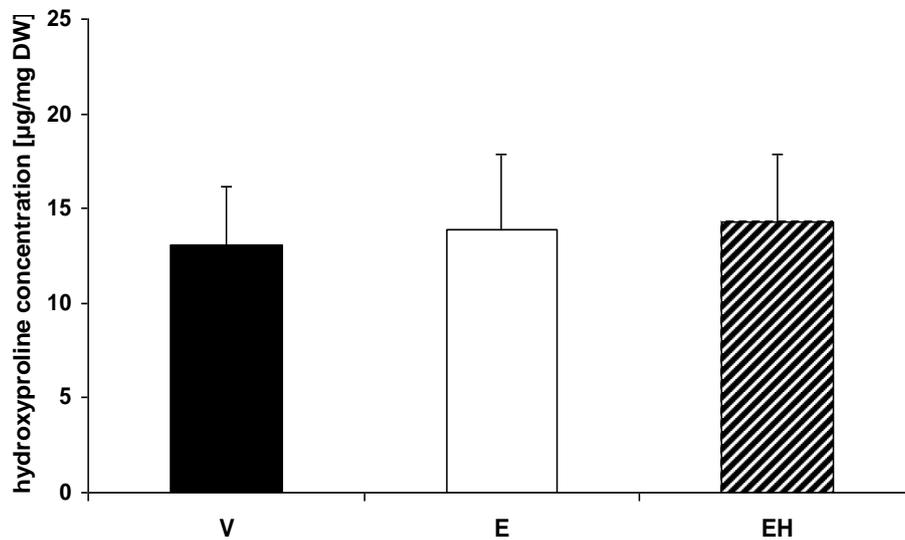


Abb. 17: Hydroxyprolinkonzentration im Kontrollgewebe

**anastomotic region control:**

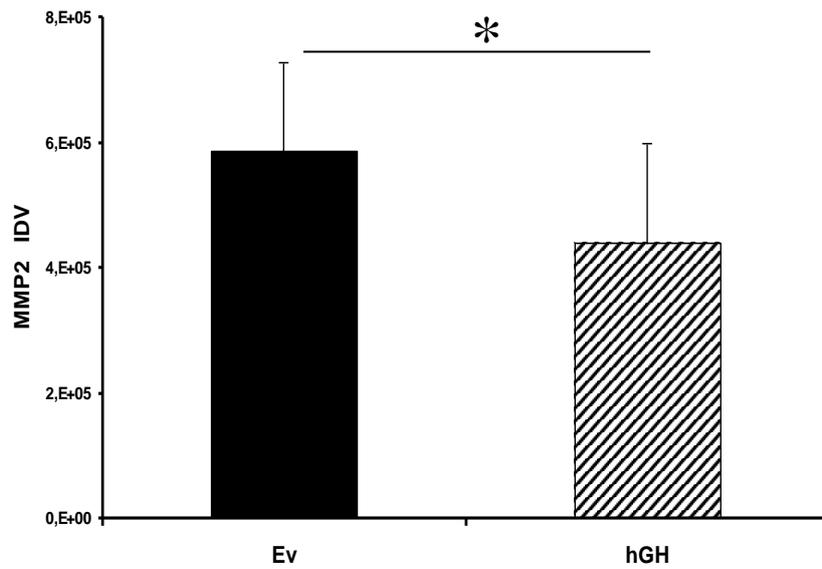
V (vehicle); n = 12

E (everolimus 3 mg/kg); n = 13

EH (everolimus + human growth hormone); n = 15

### 3.6 Zymographie

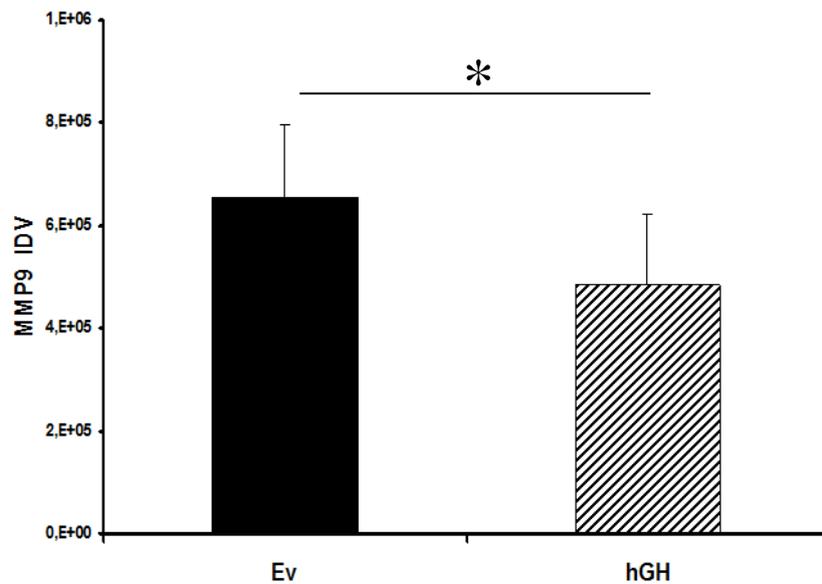
Die Auswertung der Dichtewerte der MMP2 ergab für die Everolimus-Gruppe eine mittlere Dichte von 585226 (+/- 143698) und für die Everolimus+hGH-Gruppe ein Wert von 440536 (+/- 157814), der signifikant niedriger war ( $p = 0,036$ ).



\* p = 0,036 n=11

Abb. 18: MMP2 Dichtewerte

Bei der Auswertung der MMP9 ergab sich für Gruppe 2 ein mittlerer Dichtewert von 654849 (+/-138751), für Gruppe 3 war der Mittelwert 484716 (+/- 135730). Hierbei konnte ebenfalls eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden (p = 0,009).



t-test \* p=0,009, n=11

Abb. 19: MMP9 Dichtewerte

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von Wachstumshormon auf die Wundheilungsstörung unter Therapie mit Everolimus. Das erhöhte Risiko für Wundheilungsstörungen durch mTor-Inhibitoren wurde sowohl für Sirolimus als auch für Everolimus klinisch und experimentell gut belegt. In einer Fall-Kontroll-Studie mit Patienten nach Nierentransplantation kam es bei den mit Sirolimus behandelten Patienten in 53% zu einer Komplikation bezüglich der Wundheilung, wohingegen in der Kontrollgruppe nur 7% betroffen waren ( $P=0,014$ ). Das Transplantatüberleben sowie das Gesamtüberleben der Patienten waren hingegen nicht beeinflusst [Troppmann et al 2003]. Die Fallberichte von Guilbeau 2002 demonstrieren Patienten mit Sirolimustherapie nach Lebertransplantation. Hier kam es postoperativ zu Wunddehizens, die eine stationäre Wiederaufnahme erforderlich machte [Guilbeau 2002]. Nach Absetzen von Sirolimus und Umsetzen auf andere immunsuppressive Therapeutika gestaltete sich das Abheilen der Wunde völlig komplikationslos. In einer anderen retrospektiven Studie untersuchten Kuppahally et al. 2006 das „outcome“ von Patienten nach Herztransplantation unter Sirolimustherapie im Vergleich zur Therapie mit MMF. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sowohl das Auftreten von Wundheilungsstörung allgemein als auch das Auftreten von tiefen operativen Wundkomplikationen in der Sirolimusgruppe signifikant häufiger war (52% vs. 28%,  $p=0.019$  bzw. 35% vs. 13%,  $p=0.012$ ). Darüber hinaus hatten die Patienten unter Sirolimustherapie häufiger symptomatische Ergüsse in der Pleura ( $p=0,035$ ) und dem Herzbeutel ( $p=0,033$ ), welche interventionsbedürftig waren [Kuppahally et al 2006].

Van der Vliet untersuchte 2006 den dosisabhängigen Einfluss von Everolimus auf die Wundheilung von Darmanstomosen. Vier Gruppen zu je 26 Ratten wurden zwischen 0 und 3mg/kg Everolimus pro Tag verabreicht, vom Tag der Operation bis zum Tod. Es wurde ein 1cm langes Segment des Colon descendens entfernt und eine Anastomose angelegt, die Tiere wurden entweder 3 oder 7 Tage später getötet und die Wundheilung auf mechanische, biochemische und histologische Parameter hin untersucht. Am dritten Tag nach Operation konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden,

an Tag 7 war eine dosisabhängige Reduktion der Bruchfestigkeit und des „bursting pressure“ messbar, begleitet von einer Abnahme des Hydroxyprolinegehaltes und verminderter Kollageneinlagerung im Wundbereich [Van der Vliet et al 2006].

Küper et al. untersuchten ebenfalls 2011 die Wundheilung unter Everolimustherapie im Hinblick auf die Wirkweise von Everolimus auf intestinaler Ebene. Hierzu wurde bei 30 Ratten eine Colonanastomose angelegt und anschließend täglich entweder mit Placebo oder mit Everolimus in einer Dosis von 1 und 3 mg/kg behandelt. Nach 7 Tagen wurden die Tiere getötet und hinsichtlich der Wundheilung untersucht. Der „bursting pressure“ war in beiden Everolimusgruppen signifikant erniedrigt, wohingegen der Hydroxyprolinegehalt nur bei der Hochdosis-Gruppe verringert war. Darüber hinaus schwächte Everolimus die Zellteilung und das Wachstum von neuen Gefäßen. Sowohl die Menge als auch die Qualität des neu synthetisierten Kollagens im Anastomosengewebe war reduziert. Jedoch waren die Myeloperoxidase-positiven Zellen, die Konzentration von Interleukin-6 und die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 erhöht. So konnte gefolgert werden, dass insbesondere die inflammatorische Phase der Wundheilung betroffen ist, wie die Studien bei van der Vliet vermuten ließen [Küper et al 2011].

Auf der anderen Seite wird die Wundheilung durch die Gabe von humanem Wachstumshormon positiv beeinflusst. Dass die Therapie vor allem einen positiven Effekt in der frühen Phase der Wundheilung hat, konnte von Christensen et al. bereits 1990 gezeigt werden. Er untersuchte den Einfluss von Wachstumshormon auf die Wundheilung bei Darmanastomosen am Tiermodell. Hierbei konnte er feststellen, dass der „bursting pressure“ doppelt so hoch nach dem zweiten post-operativen Tag und dreimal so hoch an dem vierten Tag waren, am sechsten postoperativen Tag konnte hingegen kein signifikanter Unterschied gefunden werden [Christensen et al 1990]. Der „bursting pressure“ der Anastomosen in der vorliegend beschriebenen Studie wurden alle am siebten post-operativen Tag gemessen. Dass diese Verbesserung der Anastomose insbesondere durch Einlagerung von Kollagen bewirkt wird, konnte

in einer Folgestudie der gleichen Autorengruppe dargelegt werden [Christensen et al 1994]. Jorgensen et al. untersuchten in ihrer Studie des Weiteren den Einfluss von Wachstumshormon auf die biomechanischen Eigenschaften und die Einlagerung von Kollagen in die Hautwunde bei Ratten nach einer Heilungszeit von 4 Tagen. Wachstumshormon bewirkte eine dosisabhängige Erhöhung der mechanischen Festigkeit der Wunde im Dosisbereich von 0,125 bis 2 mg/kg/Tag und der Kollageneinlagerungsrate um 149% bei den 2 mg/kg/Tag behandelten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe [Jorgensen et al 1996]. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Verbesserung der mechanischen Festigkeit wie bei der Darmanastomose durch die vermehrte Kollageneinlagerung zu Stande kommt.

Beckert et al. untersuchten 2004 die Auswirkung von systemisch appliziertem Wachstumshormon auf die Heilung von gastralen Ulzera. Diese wurden mit einer Kryosonde in Ratten erzeugt, wobei eine Gruppe zusätzlich eine tägliche Dosis von 2,5mg/kg Wachstumshormon erhielt, während die zweite Gruppe lediglich mit Placebo behandelt wurde. Nach 7 Tagen wurde die Ulkusgröße bestimmt und der Ulkusrand bezüglich Zellteilung und Gefäßeinsprossung immunhistochemisch untersucht. Die Applikation von Wachstumshormon führte sowohl zu einer signifikanten Erhöhung des Körpergewichts und einer Reduktion der Ulkusgröße (5.6±/0.8 mm<sup>2</sup> vs. 9.9±/1 mm<sup>2</sup>; p=0,005) als auch zu einer signifikant gesteigerten Zellteilung und Gefäßeinsprossung, woraus geschlossen werden konnte, dass die beschleunigte Ulkushheilung durch Stimulation der Zellteilung und des Gefäßwachstums vermittelt wird [Beckert et al 2004].

Dass Wachstumshormon für die physiologische Wundheilung des Kolons jedoch kein essentieller Faktor ist, bewiesen Tei et al. 2006 in einer Studie mit GH-defizienten Zwergratten. Die Behandlung mit Wachstumshormon begann 7 Tage vor Operation und wurde bis zum 4. postoperativen Tag durchgeführt. Hierdurch wurde die Entwicklung der Festigkeit der Anastomose stark beschleunigt, was darauf schließen lässt, dass GH unterstützend vor allem in der frühen Phase der Heilung wirkt. Es konnten jedoch keine Unterschiede im Heilungsverlauf zwischen den unbehandelten GH-defizienten Ratten und den

Ratten mit normaler Hypophysenfunktion festgestellt werden, sodass Wachstumshormon nicht als essentiell für den physiologischen Heilungsprozess angesehen werden kann [Tei et al 2006].

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von humanem Wachstumshormon (hGH) auf die durch Everolimus induzierte Wundheilungsstörung von Kolonanastomosen bei Ratten untersucht. Für die Versuche dieser Arbeit wurden aus verschiedenen Gründen Ratten gewählt. Der Aufbau des Darmes der Ratte ist dem des Menschen ähnlich, ebenso die bakterielle Besiedlung [Herrmann et al 1964]. Auch bei der Wundheilung laufen die gleichen Mechanismen ab und die gleichen Phasen werden durchlaufen, sodass aus dem Versuchsaufbau Rückschlüsse auf die Heilung der Darmanastomosen beim Menschen möglich sind. Darüber hinaus sind die Tiere leicht zu halten und in ausreichender Zahl mit ähnlicher Genetik verfügbar. Bei der Operation sind keine zusätzlichen Sterilitätsmaßnahmen notwendig, da die Ratte relativ unempfindlich auf ins Peritoneum eingebrachte Keime reagiert, was besonders bei Darmoperationen eine entscheidende Rolle spielt und die Reaktion auf Nahtmaterial ist mit der des Menschen vergleichbar [Nöthiger et al 1980].

Der Zeitraum der postoperativen Nachbehandlung wurde auf 7 Tage limitiert, aufgrund der fehlenden Eigenstabilität der Anastomose zu einem früheren Zeitraum [Lünstedt und Debus 1990]. Da in den ersten Tagen nach Operation an der Wunde durch lokale Hypoxie eine katabole Phase entsteht, kommt es zur Kollagenolyse. Somit ist bei noch fehlender Kollagenneusynthese die Stabilität der Anastomose nur durch das Nahtmaterial sichergestellt [Lünstedt und Debus 1990]. Eine Messung zu diesem Zeitpunkt wäre somit nur wenig aussagekräftig. Ein längerer Beobachtungszeitraum wurde wiederum durch die Untersuchung mittels „bursting pressure“ verhindert. Hierbei ist eine Aussage über die Stärke der Anastomose nur möglich, solange die Zerreißung innerhalb der Naht stattfindet [Hendriks und Mastboom 1990].

Bei der Dosierung von Everolimus wurde 3mg/kg Körpergewicht gewählt. Dies entspricht einer etwa 4-fach stärkeren Immunsuppression als in der aktuellen

klinischen Anwendung. Hier wird Everolimus jedoch mit Kortikosteroiden und Calcineurininhibitoren kombiniert. Der therapeutische Zielbereich beim Menschen liegt bei einer Blutkonzentration von 3 bis 8ng/ml, die beim Menschen individuell mit 0,75-1,5mg Everolimus pro Tag erreicht wird [Kovarik et al. 2004]. Küper et al. zeigten jedoch 2011, dass erst ab einer Dosierung von 3,0mg/kg Körpergewicht therapeutische Spiegel erreicht werden [Küper et al 2011]. Somit liegt mit der Dosierung von 3,0mg/kg Körpergewicht bei der Ratte ein dem Menschen äquivalenter Plasmaspiegel vor.

Bei der Dosierung des Wachstumshormons wurde 2,5mg/kg Körpergewicht pro Tag gewählt. Die klinisch bei Kindern eingesetzte Dosis beträgt, abhängig von der Erkrankung, bis zu 0,067mg/kg pro Tag. Bei Erwachsenen mit Wachstumshormonmangel ist eine Dosierung bis maximal 0,016mg/kg Körpergewicht pro Tag möglich. Christensen und Flyvbjerg untersuchten 1992 bereits die dosisabhängige Wirkung von Wachstumshormon auf die Wundheilung von Kolonanastomosen bei Ratten mit einem Dosisbereich von 0,125-8mg/kg Körpergewicht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass es ab einer Dosierung von 2mg/kg Körpergewicht zu einem signifikanten Anstieg des postoperativen Gewichtes, der „bursting strength“ und des Hydroxyprolinegehaltes im Anastomosensegment kommt. Unsere Dosierung war somit im sicher wirksamen Bereich und wurde bereits in anderen Versuchen zur Wundheilung erfolgreich eingesetzt [Beckert et al 2004].

Bereits präoperativ traten bei den verschiedenen Gruppen Gewichtsunterschiede auf. Zu Beginn der Behandlung wogen die Tiere in allen Gruppen im Durchschnitt etwa 344g. Am Tag der Operation war das Gewicht der Placebogruppe durchschnittlich bei 348g, das der Everolimusgruppe bei 332g und das der Everolimusgruppe mit hGH bei 338g. Es ist festzustellen, dass es durch die Einnahme des Everolimus zu einem Gewichtsverlust kam, der in der dritten Gruppe partiell durch das Wachstumshormon antagonisiert wurde. Im postoperativen Verlauf kam es initial zu einer Gewichtsabnahme in allen drei Gruppen was sich durch den Stress der Operation und die postoperativen Schmerzen bei der Nahrungsaufnahme erklären lässt. Die erste

Gruppe konnte jedoch im Laufe der Woche wieder zunehmen und hatte am Tag der Organentnahme ein durchschnittliches Gewicht von 340g. In der Gruppe 2 war hingegen ein kontinuierlicher Gewichtsabfall zu verzeichnen, sodass im Durchschnitt ein Endgewicht von nur 300g erreicht wurde. Dies deckt sich in etwa mit dem postoperativen Verlauf der Tiere aus der Studie von Küper et al. [2011], wobei der initiale Gewichtsabfall dort größer war und dann nahezu konstant blieb, während es in unserem Fall zu einer stetigen Gewichtsabnahme kam. In der dritten Gruppe kam es ebenfalls zu einem Gewichtsabfall, der sich jedoch an dem vierten postoperativen Tag auf ein Level einpendelte und dann konstant blieb, sodass die Tiere am Ende im Durchschnitt 321g wogen. Auch hier lässt es sich am ehesten mit dem anabolischen Effekt des Wachstumshormons erklären, der die weitere Gewichtsabnahme in der dritten Gruppe verhinderte. Auch toxische Effekte des Everolimus sind denkbar, durch die Ergebnisse vorhergehender Versuche jedoch unwahrscheinlich [van der Vliet et al 2006, Küper et al 2011].

Zwischen den drei Gruppen konnten deutliche Unterschiede bei der Anastomosenheilung und dem Auftreten von Insuffizienzen festgestellt werden. Insgesamt kam es bei 9 Tieren zu einer Insuffizienz (18,75%), was im Gegensatz zu den Daten bereits publizierter Studien zu hoch ist. Hier liegen die Ergebnisse im Bereich von 3,4 bis 15,9% [Rullier et al. 1998, Sørensen et al. 1999, Golub et al. 1997]. Als Erklärung ist zuallererst anzuführen, dass es bei einem Wurf der Ratten, der aus 12 Tieren bestand, während der Versuchsphase zu Problemen kam, da diese die Narkose und die Medikation schlecht tolerierten. Innerhalb dieser Gruppe starben bereits 6 Tiere prä- und intraoperativ. Von den 9 aufgetretenen Insuffizienzen fanden sich 5 in dieser Gruppe unabhängig von der vorangegangenen Therapie. Lässt man diese 12 Tiere unberücksichtigt, ergaben sich bei 4 Tieren Insuffizienzen (11,11%), was sich mit den in der Literatur beschriebenen Angaben deckt. Von diesen 4 Tieren waren 3 Tiere aus der zweiten Gruppe, die ausschließlich Everolimus bekam. Ein Tier war aus der Gruppe, die Everolimus und Wachstumshormon erhielt, in der Placebogruppe kam es zu keiner Insuffizienz.

Die mechanische Stabilität wurde, analog zu früheren Versuchen, über die Messung des „bursting pressure“ ermittelt. Dies ist eine etablierte Methode zur Beurteilung von Anastomosen bei Ratten [Cihan et al. 2003; Mansson et al. 2002; Attard et al. 2005]. Ikeuchi et al. verglichen 1999 die Methode des „bursting pressure“ mit der der „tensile strength“. Es konnte keine Korrelation zwischen beiden Methoden gefunden werden, weshalb sie unter Berücksichtigung der Vorversuche zu dem Schluss kamen, dass die „minimal tensile strength“ die geeignetste Methode zur Beurteilung der Heilung der Anastomosen sei. In der Untersuchung von Mansson et al. 2002 konnte jedoch gezeigt werden, dass insbesondere in der frühen Phase der Wundheilung die Methode des „bursting pressure“ sensitiver und hierbei der des „breaking strength“ überlegen ist. Da Everolimus besonders die frühe Phase der Wundheilung beeinflusst, wurde in unserer Studie der „bursting pressure“ gewählt.

Die Auswertung wurde durch die zuvor beschriebenen Verwachsungen erschwert. Insgesamt war bei zu wenigen Tieren der Gruppen 2 und 3 eine Messung möglich. Anhand der gemessenen Tiere lässt sich dennoch deutlich erkennen, dass die Tiere der Gruppe 3 zwar schlechter als die Placebogruppe abschneiden, jedoch durch das hGH eine deutliche Verbesserung, verglichen mit den Tieren der Gruppe 2, zu erkennen ist, sodass man insgesamt davon ausgehen kann, dass die Schwächung der Anastomose durch Everolimus teilweise durch die Gabe von Wachstumshormon kompensiert wird.

Nachdem nun die physikalischen Ergebnisse diskutiert wurden, sollen nun die biochemischen und histologischen Resultate näher erörtert werden.

HE-Färbungen sind ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung verschiedener Parameter des Heilungsverlaufes. Auch im Hinblick auf gastrointestinale Anastomosen wurde diese Färbung bereits von vielen Autoren zur Beurteilung von Nekrosen, Entzündungszeichen, Ödembildung und der Regeneration des Epithels angewandt [Verhofstad et al. 2001; Rosch et al. 2005]. In unserer Auswertung wurde besonders auf die Anzahl der Fibroblasten,

Entzündungszeichen, der Einsprossung von Blutgefäßen und dem Vorhandensein von Fibrin, Fettgewebe und Nekrosen geachtet. Hierbei konnten deutliche Unterschiede zwischen der Placebogruppe und den beiden Everolimusgruppen festgestellt werden, zwischen letzteren jedoch waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Besonders im Hinblick auf die Anzahl an Fibroblasten und die Entzündungsreaktion ist festzustellen, dass das Wachstumshormon hier die Wirkung des Everolimus nicht signifikant beeinflusst, was auch die erhöhte Anzahl an Nekrosen in den Everolimus-Gruppen gegenüber der Placebogruppe erklären kann. Bezüglich der Gefäßeinsprossung konnte in unserer Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen festgestellt werden, dies widerspricht den Versuchen von Küper et al. 2011, in welchen die Anzahl an Gefäßen bei den Everolimusgruppen dosisabhängig verringert war. Die Architektur der Anastomosen hingegen war in den Gruppen 2 und 3 gegenüber Placebo verändert, dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche von Küper et al. 2011, jedoch nicht mit den Ergebnissen der histologischen Auswertung bei van der Vliet et al. 2006. Auch in Hinblick auf die Zahl der Fibroblasten in Gruppe 3 wäre eine Zunahme denkbar gewesen, da es in anderen Versuchen unter intraperitonealer Gabe von IGF-I zu einer Vermehrung und gesteigerten Aktivität der Fibroblasten kam [Zacharakis et al. 2007]. Eine mögliche Erklärung hierzu könnte das Überwiegen der Everolimuswirkung auf die Vermehrung der Fibroblasten sein.

Die Azanfärbungen wurden aufgrund der Ergebnisse der Hydroxyprolinmessungen nur exemplarisch durchgeführt, decken sich aber mit ebendiesen Resultaten. Während in der Placebogruppe die Kollagenfasern dicht und parallel angeordnet sind und eine gute Vernetzung aufweisen, sind die Kollagenfasern bei Gruppe 2 dünn, ohne Struktur und noch kein paralleles Muster erkennbar. In der Gruppe 3 hingegen ist erwartungsgemäß übermäßig viel und dichtes kollagenes Bindegewebe vorhanden, welches bereits eine parallele Struktur und gute Vernetzung aufweist.

PCNA ist als Marker für die Proliferationsfähigkeit eines Gewebes etabliert. Es sind somit Aussagen über Proliferationshemmung und -förderung des Everolimus und des hGH möglich. Die meisten proliferierenden Zellen konnten in der Placebogruppe nachgewiesen werden, in der Gruppe 2 waren diese erwartungsgemäß stark reduziert, wohingegen in der dritten Gruppe fast wieder das Niveau der Gruppe 1 erreicht wurde. Wachstumshormon antagonisiert somit den proliferationshemmenden Effekt des Everolimus nahezu vollständig, erzielt jedoch nicht mehr die Wirkung wie in anderen Studien, in denen die Proliferationsrate nach Gabe von Wachstumshormon gegenüber Placebo deutlich gesteigert ist [Beckert et al. 2004].

Die Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration erfolgte, da diese Messungen direkt mit der Menge des vorhandenen Kollagens korrelieren [Hendriks et al 1990]. In der Hautnarbe war die mittlere Konzentration von Hydroxyprolin in Gruppe 3 signifikant gegenüber den anderen beiden Gruppen erhöht, was sich durch die Wirkung des Wachstumshormons auf den Kollageneinbau im Gewebe erklären lässt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren [Christensen et al. 1990 und 1995; Beckert et al. 2004]. Beim Anastomosengewebe hingegen war die mittlere Konzentration in der Placebogruppe signifikant gegenüber den anderen beiden Gruppen erhöht. Die Hydroxyprolinkonzentration war jedoch auch in der Gruppe 3 gegenüber der Gruppe 2 signifikant höher. Dies deckt sich hinsichtlich der Hydroxyprolinmessungen unter Everolimus im Anastomosengewebe mit den Ergebnissen von van der Vliet et al. [2006] und Küper et al. [2011], lässt jedoch die Vermutung zu, dass Everolimus im Darmgewebe stärker auf die Kollagensynthese wirkt als in der Haut, da hier die Wirkung des Wachstumshormons quasi unbeeinflusst blieb. In den Kontrollgeweben von Haut und Dickdarm konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Hydroxyprolingehaltes festgestellt werden.

Bei der Auswertung der Zymographie konnten signifikante Unterschiede zwischen der Everolimus-Gruppe und der Everolimus+hGH-Gruppe bezüglich

der Konzentrationen der beiden Enzyme MMP2 und MMP9 gemessen werden. Diese Ergebnisse decken sich größtenteils mit den Ergebnissen von Szczepańska-Kostro et al. 2006, bei dem die Serum-Spiegel von MMP2 bei Kindern und Jugendlichen mit Wachstumshormonmangel erhöht waren. MMP9 war zwar ebenfalls erhöht, jedoch konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Everolimus erhöht nachweislich ebenfalls die Aktivität der Metalloproteinasen [Küper et al. 2011], weshalb in Hinblick auf unsere Ergebnisse ein antagonisierender Effekt von hGH auf die Wirkung des Everolimus festgestellt werden kann. Zu dem gleichen Ergebnis kamen die Untersuchungen von Weinreich et al. 2011, der die Wundheilung bei Mäusen unter Everolimus untersuchte und eine Erhöhung der MMP2- und MMP9 –Aktivität in den mit Everolimus behandelten Tieren feststellte und einen durch Everolimus induzierten Umbau der extrazellulären Matrix folgerte. Da die erhöhte Aktivität der MMP ein Anhalt für eine prolongierte Inflammationsreaktion in heilendem Gewebe ist, wird dieser negative Effekt von Everolimus durch die zusätzliche Gabe von hGH zumindest teilweise antagonisiert.

Nicht nur die direkte Wirkung von hGH, auch die indirekte Wirkung über IGF-I auf die Wundheilung ist ausreichend belegt. Frühere Studien zeigten bereits, dass durch die Gabe von Wachstumshormon nicht nur die Reifestigkeit der Kolonanastomose durch Kollageneinbau verbessert wird [Christensen et al. 1990 und 1994], sondern auch die intravasale Menge von Serumalbumin und Immunglobulinen erhöhten sich bei Patienten nach Cholezystektomie [Vara-Thorbeck et al. 1993]. Dass appliziertes Wachstumshormon seine Wirkung auch über die Ausschüttung von IGF-I vermittelt, konnte auch bei Raschke et al. 2000 nachgewiesen werden, bei dem nach Gabe von rekombinantem porcinen Wachstumshormon bei Schweinen die IGF-I Serumspiegel um mehr als das Vierfache erhöht waren. Bereits 1992 wiesen Steenfos et al. eine erhöhte Genexpression der IGF-I Gene durch die Applikation von Wachstumshormon nach. Eine Studie von Petersen et al. im Jahre 1996 ergab nach Gabe von IGF-I einen erhöhten Hydroxyprolinegehalt in der Kolonanastomose und ein erhöhtes postoperatives Gewicht, die Reifestigkeit der Anastomose blieb jedoch

unverändert. Die Wirkung des hGH auf den Hydroxyprolinegehalt in unserer Studie kann somit auch auf die indirekte Wirkung über IGF-I zurückgeführt werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Gabe von Wachstumshormon einen positiven Einfluss auf die Wundheilungsstörung unter Everolimustherapie besitzt. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Wirkweisen der beiden Medikamente. Sowohl die histologischen Veränderungen als auch die mechanische Stabilität der Anastomose wurden durch die zusätzliche Gabe verbessert, sodass vermutet werden kann, dass bei Patienten unter Everolimustherapie nach Operation in einer frühen Phase die Wundheilung durch Gabe von hGH gefördert werden kann. Aktuell kann mit der Gabe von Everolimus erst etwa zwei bis drei Wochen nach Operation begonnen werden. Ein unmittelbar postoperativer Einsatz und somit Gewährleistung einer dauerhaften Immunsuppression in begleitender Therapie mit Wachstumshormon erscheint möglich, weitere Studien vor allem in Hinblick auf Wechselwirkungen mit Kortikosteroiden und Calcineurininhibitoren sind notwendig. Des Weiteren gilt es festzustellen, ob die Gabe von Wachstumshormon auch Auswirkungen auf die Everolimus-bedingte Immunsuppression hat.

## 5 Zusammenfassung

Everolimus, ein Immunsuppressivum aus der Gruppe der m-TOR-Inhibitoren, verursacht in klinisch relevanter Dosierung Wundheilungsstörungen. Dies betrifft insbesondere die inflammatorische Phase der Wundheilung. Aus diesem Grund wird Everolimus aktuell bei Patienten erst nach etwa zwei bis drei Wochen nach Operation verabreicht. Wachstumshormon (hGH) fördert die Wundheilung, ebenfalls bereits in einer frühen Phase der Wundheilung vor allem über einen vermehrten Kollageneinbau, welches zudem eine verbesserte Struktur besitzt. Inwieweit die negativen Wirkungen von Everolimus auf die intestinale Wundheilung durch die simultane Wachstumshormongabe positiv beeinflusst werden können, war Gegenstand der vorliegenden Studie.

Es wurden 48 männliche Sprague-Dawley-Ratten in drei Gruppen unterteilt und je nach Gruppe entweder mit Placebo, mit Everolimus (3mg/kg KG) oder mit Everolimus (3mg/kg KG) und zusätzlich Human growth hormon (hGH) in einer Dosierung von 2,5mg/kg KG über insgesamt 2 Wochen behandelt. Nach einer Woche Vorbehandlung erfolgte die Laparotomie mit anschließender Anlage einer Dickdarmanastomose. Nach einer weiteren Woche medikamentöser Behandlung erfolgte die Organentnahme mit physikalischer, histologischer und immunhistochemischer Aufarbeitung.

Die Messungen des „bursting pressure“ waren aufgrund der zahlreichen Verwachsungen nur bedingt möglich, bezogen auf die Placebo-Gruppe wies die Everolimus-Gruppe jedoch eine massive Abnahme des mittleren Drucks auf, wohingegen die Everolimus-hGH-Gruppe wieder deutlich verbessert war. Die histologischen Schnitte der Anastomose wurden mit HE und Azan gefärbt, hierbei fand sich insbesondere in der Placebogruppe gegenüber den beiden anderen Gruppen eine signifikant erhöhte Anzahl an Fibroblasten wohingegen weit weniger Entzündungszeichen, Fibrin und Fettgewebe vorhanden war. Bezüglich der Gefäßeinsprossung waren zwischen alle 3 Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen, es waren jedoch bei beiden Everolimus-Gruppen signifikant mehr Nekrosen nachweisbar. Mittels PCNA wurde die Proliferationsfähigkeit des Gewebes gemessen, die meisten

proliferierenden Zellen konnten in der Placebogruppe nachgewiesen werden, in der Gruppe 2 waren diese stark reduziert, wohingegen in der dritten Gruppe fast wieder das Niveau der Gruppe 1 erreicht wurde. Bei der Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration, welche direkt Rückschlüsse auf die Menge an Kollagen zulässt, war sowohl in der Hautnarbe als auch in der Anastomose die Gruppe 3 signifikant erhöht gegenüber den anderen beiden Gruppen. Bei der Auswertung der Zymographie waren die Konzentrationen in der Everolimus-Gruppe und der Everolimus+hGH-Gruppe bezüglich der beiden Enzyme MMP2 und MMP9 signifikant erhöht, was für eine Antagonisierung des Everolimus-induzierten Umbaus der extrazellulären Matrix durch hGH spricht.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass Wachstumshormon einen positiven Einfluss auf die Everolimus-bedingte Wundheilungsstörung besitzt. Dies geschieht primär nicht durch Unterdrückung der durch Everolimus hervorgerufenen Entzündungsreaktion, sondern es wird ein Umbau der extrazellulären Matrix verhindert und die Proliferationsfähigkeit des Gewebes bleibt erhalten. Darüber hinaus wird besonders durch vermehrten Kollageneinbau eine Stabilisierung der Anastomose erreicht, was zu einem deutlich besseren „outcome“ der Tiere führte.

Inwieweit die immunsupprimierende Wirkung des Everolimus durch Gabe von hGH beeinträchtigt wird, gilt es in weiteren Studien zu klären. Darüber hinaus sind Untersuchungen im Hinblick auf Wechselwirkungen des Wachstumshormones mit den Kombinationspartnern von Everolimus wie Kortikosteroide und Calcineurininhibitoren für einen Einsatz in der klinischen Praxis notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

Atkins, Michael B., Uma Yasothan u. Peter Kirkpatrick: Everolimus. In: Nature reviews. Drug discovery 8 (2009) H. 7. S. 535–536.

Attard, Jo-Anne P., Manoj J. Raval u. a.: The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model. In: Diseases of the colon and rectum 48 (2005) H. 7. S. 1460–1470.

Azzola, Andrea, Adrian Havryk u. a.: Everolimus and mycophenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation. In: Transplantation 77 (2004) H. 2. S. 275–280.

Baumann, G. u. M. Mercado: Growth hormone-binding proteins in plasma. In: Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif) 9 (1993) H. 6. S. 546–553.

Beckert, Stefan, Nicole Class u. a.: Growth hormone enhances gastric ulcer healing in rats. In: Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research 10 (2004) H. 8. S. BR255-8.

Biller, Beverly M. K., Hyi-Jeong Ji u. a.: Effects of once-weekly sustained-release growth hormone: a double-blind, placebo-controlled study in adult growth hormone deficiency. In: The Journal of clinical endocrinology and metabolism 96 (2011) H. 6. S. 1718–1726.

Christensen, H., J. Chemnitz u. a.: Collagen structural organization of healing colonic anastomoses and the effect of growth hormone treatment. In: Diseases of the colon and rectum 38 (1995) H. 11. S. 1200–1205.

Christensen, H. u. A. Flyvbjerg: Dose-dependent stimulatory effect of human growth hormone on the strength and collagen deposition of colonic anastomoses in the rat. In: Acta endocrinologica 126 (1992) H. 5. S. 438–443.

Christensen, H., P. H. Jørgensen u. a.: Growth hormone increases the mass, the collagenous proteins, and the strength of rat colon. In: Scandinavian journal of gastroenterology 25 (1990) H. 11. S. 1137–1143.

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

Christensen, H., H. Oxlund u. S. Laurberg: Growth hormone increases the bursting strength of colonic anastomoses. An experimental study in the rat. In: *International journal of colorectal disease* 5 (1990) H. 3. S. 130–134.

Cihan, Alper, Ferah Armutcu u. a.: Comparison of the measurement methods of bursting pressure of intestinal anastomoses. In: *Hepato-gastroenterology* 50 Suppl 2 (2003). S. ccxxxii–ccxxxiv.

Cowell, C. T.: Effects of growth hormone in short, slowly growing children without growth hormone deficiency. Australasian Paediatric Endocrine Group. In: *Acta paediatrica Scandinavica. Supplement* 366 (1990). S. 29-30; discussion 31.

Dancey, Janet E.: Therapeutic targets: MTOR and related pathways. In: *Cancer biology & therapy* 5 (2006) H. 9. S. 1065–1073.

Dean, Patrick G., William J. Lund u. a.: Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. In: *Transplantation* 77 (2004) H. 10. S. 1555–1561.

Dutly, André E., Ariana Gaspert u. a.: The influence of the rapamycin-derivate SDZ RAD on the healing of airway anastomoses. In: *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 24 (2003) H. 1. S. 154-8; discussion 158.

Eisen, Howard J., E. Murat Tuzcu u. a.: Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. In: *The New England journal of medicine* 349 (2003) H. 9. S. 847–858.

Fineberg, S. E. u. T. J. Merimee: Acute metabolic effects of human growth hormone. In: *Diabetes* 23 (1974) H. 6. S. 499–504.

Fingar, Diane C. u. John Blenis: Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. In: *Oncogene* 23 (2004) H. 18. S. 3151–3171.

Fingar, Diane C., Celeste J. Richardson u. a.: mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. In: *Molecular and cellular biology* 24 (2004) H. 1. S. 200–216.

Flanagan, W. M. u. G. R. Crabtree: Rapamycin inhibits p34cdc2 expression and arrests T lymphocyte proliferation at the G1/S transition. In: Annals of the New York Academy of Sciences 696 (1993). S. 31–37.

Fryburg, D. A., R. J. Louard u. a.: Growth hormone stimulates skeletal muscle protein synthesis and antagonizes insulin's antiproteolytic action in humans. In: Diabetes 41 (1992) H. 4. S. 424–429.

Gasco, Valentina, Flavia Prodam u. a.: GH therapy in adult GH deficiency: a review of treatment schedules and the evidence for low starting doses. In: European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 168 (2013) H. 3. S. R55-66.

Golub, R., R. W. Golub u. a.: A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomoses. In: Journal of the American College of Surgeons 184 (1997) H. 4. S. 364–372.

Guertin, David A. u. David M. Sabatini: Defining the role of mTOR in cancer. In: Cancer cell 12 (2007) H. 1. S. 9–22.

Guilbeau, Jane M.: Delayed wound healing with sirolimus after liver transplant. In: The Annals of pharmacotherapy 36 (2002) H. 9. S. 1391–1395.

Gupta, Vishal u. Marilyn Lee: Growth hormone in chronic renal disease. In: Indian journal of endocrinology and metabolism 16 (2012) H. 2. S. 195–203.

Hendriks, T. u. W. J. Mastboom: Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. In: Diseases of the colon and rectum 33 (1990) H. 10. S. 891–901.

HERRMANN, J. B., S. C. WOODWARD u. E. J. PULASKI: HEALING OF COLONIC ANASTOMOSES IN THE RAT. In: Surgery, gynecology & obstetrics 119 (1964). S. 269–275.

Ikeuchi, D., H. Onodera u. a.: Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. In: Digestive surgery 16 (1999) H. 6. S. 478–485.

Inoki, Ken, Yong Li u. a.: Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. In: *Genes & development* 17 (2003) H. 15. S. 1829–1834.

Jacinto, Estela, Robbie Loewith u. a.: Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. In: *Nature cell biology* 6 (2004) H. 11. S. 1122–1128.

Jørgensen, P. H. u. H. Oxlund: Growth hormone increases the biomechanical strength and collagen deposition rate during the early phase of skin wound healing. In: *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 4 (1996) H. 1. S. 40–47.

Kahn, D., C. W. Spearman u. a.: Effect of rapamycin on the healing of the bile duct. In: *Transplantation proceedings* 37 (2005) H. 2. S. 832–833.

Kahn, D., C. W. Spearman u. a.: The effect of rapamycin on the healing of the ureteric anastomosis and wound healing. In: *Transplantation proceedings* 37 (2005) H. 2. S. 830–831.

Kim, Myoung Soo, Jehyun Park u. a.: Rapamycin inhibits platelet-derived growth factor-induced collagen, but not fibronectin, synthesis in rat mesangial cells. In: *Yonsei medical journal* 45 (2004) H. 6. S. 1121–1126.

Kostyo, J. L. u. C. R. Reagan: The biology of growth hormone. In: *Pharmacology & therapeutics. Part B: General & systematic pharmacology* 2 (1976) H. 3. S. 591–604.

Kuo, C. J., J. Chung u. a.: Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. In: *Nature* 358 (1992) H. 6381. S. 70–73.

Küper, Markus A., Nadja Schölzl u. a.: Everolimus interferes with the inflammatory phase of healing in experimental colonic anastomoses. In: *The Journal of surgical research* 167 (2011) H. 1. S. 158–165.

Kuppahally, S., A. Al-Khaldi u. a.: Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients. In: *American journal of transplantation: official journal of the*

American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 6 (2006) 5 Pt 1. S. 986–992.

Kwiatkowski, David J. u. Brendan D. Manning: Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. In: Human molecular genetics 14 Spec No. 2 (2005). S. R251-8.

Lau, Man-Tat u. Leung, Peter C K: The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway mediates insulin-like growth factor 1-induced E-cadherin down-regulation and cell proliferation in ovarian cancer cells. In: Cancer letters 326 (2012) H. 2. S. 191–198.

Lünstedt, B. u. S. Debus: Wundheilungsdauer und Gewebewiderstand als wichtige Kriterien für die Wahl des Nahtmaterials in der Colonchirurgie. In: Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin 61 (1990) H. 10. S. 717–719.

Månsson, Peter, Xiao Wei Zhang u. a.: Anastomotic healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. In: International journal of colorectal disease 17 (2002) H. 6. S. 420–425.

Mita, Monica M., Alain Mita u. Eric K. Rowinsky: The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. In: Cancer biology & therapy 2 (2003) 4 Suppl 1. S. S169-77.

Nöthiger, F., W. J. Ziegler u. a.: Nahtmaterial in der Darmanastomose. In: Helvetica chirurgica acta Suppl 14 (1980). S. 1–42.

Petersen, T. I., P. Kissmeyer-Nielsen u. a.: Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) administration on the healing of colonic anastomoses in rats. In: International journal of colorectal disease 11 (1996) H. 1. S. 19–24.

Ramirez, R. J., S. E. Wolf u. a.: Growth hormone treatment in pediatric burns: a safe therapeutic approach. In: Annals of surgery 228 (1998) H. 4. S. 439–448.

Ranke, M., B. Weber u. J. R. Bierich: Long-term response to human growth hormone in 36 children with idiopathic growth hormone deficiency. In: European journal of pediatrics 132 (1979) H. 4. S. 221–238.

Raschke, M. J., S. F. Kolbeck u. a.: Rekombinantes Wachstumshormon beschleunigt die Regeneratkonsolidierung bei der Distraktionsosteogenese. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 71 (2000) H. 9. S. 1009–1015.

Rhoads, J. Marc, Xiaomei Niu u. a.: Role of mTOR signaling in intestinal cell migration. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 291 (2006) H. 3. S. G510-7.

Rieder, Simon, Christoph W. Michalski u. a.: Insulin-like growth factor signaling as a therapeutic target in pancreatic cancer. In: *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 11 (2011) H. 5. S. 427–433.

Rosch, R., M. Stumpf u. a.: Influence of pneumoperitoneum on small bowel anastomoses: a histological analysis in the rat model. In: *Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research* 18 (2005) H. 2. S. 63–69.

Rosenfeld, R. G., K. M. Attie u. a.: Growth hormone therapy of Turner's syndrome: beneficial effect on adult height. In: *The Journal of pediatrics* 132 (1998) H. 2. S. 319–324.

Rullier, E., C. Laurent u. a.: Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. In: *The British journal of surgery* 85 (1998) H. 3. S. 355–358.

Sarbassov, D. D., Siraj M. Ali u. a.: Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. In: *Current biology: CB* 14 (2004) H. 14. S. 1296–1302.

Sarbassov, Dos D., Siraj M. Ali u. a.: Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. In: *Molecular cell* 22 (2006) H. 2. S. 159–168.

Sengupta, Shomit, Timothy R. Peterson u. a.: mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. In: *Nature* 468 (2010) H. 7327. S. 1100–1104.

Sørensen, L. T., T. Jørgensen u. a.: Smoking and alcohol abuse are major risk factors for anastomotic leakage in colorectal surgery. In: *The British journal of surgery* 86 (1999) H. 7. S. 927–931.

Steenfos, H. H. u. J. O. Jansson: Gene expression of insulin-like growth factor-I and IGF-I receptor during wound healing in rats. In: The European journal of surgery = Acta chirurgica 158 (1992) 6-7. S. 327–331.

Szczepańska-Kostro, Jolanta, Marek Kowalewski u. a.: Ocena steżenia metaloproteinazy macierzy pozakomorkowej 2 (MMP-2), metaloproteinazy macierzy pozakomorkowej 9 (MMP-9) i tkankowego inhibitora metaloproteinazy 2 (TIMP-2) u dzieci i młodzieży z niedoborem hormonu wzrostu. In: Endokrynologia, diabetologia i choroby przemiany materii wieku rozwojowego : organ Polskiego Towarzystwa Endokrynologów Dziecięcych 12 (2006) H. 4. S. 257–260.

Takala, J., E. Ruokonen u. a.: Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. In: The New England journal of medicine 341 (1999) H. 11. S. 785–792.

Tei, T. M., P. Kissmeyer-Nielsen u. a.: Growth hormone is a stimulating but not an essential factor in healing of colon. A study in GH-deficient dwarf rats. In: Scandinavian journal of surgery: SJS: official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society 95 (2006) H. 3. S. 205–210.

Troppmann, Christoph, Jonathan L. Pierce u. a.: Higher surgical wound complication rates with sirolimus immunosuppression after kidney transplantation: a matched-pair pilot study. In: Transplantation 76 (2003) H. 2. S. 426–429.

Valente, John F., Donald Hricik u. a.: Comparison of sirolimus vs. mycophenolate mofetil on surgical complications and wound healing in adult kidney transplantation. In: American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 3 (2003) H. 9. S. 1128–1134.

van der Vliet, J Adam, Willems, Martine C M u. a.: Everolimus interferes with healing of experimental intestinal anastomoses. In: Transplantation 82 (2006) H. 11. S. 1477–1483.

Vara-Thorbeck, R., J. A. Guerrero u. a.: Exogenous growth hormone: effects on the catabolic response to surgically produced acute stress and on postoperative immune function. In: World journal of surgery 17 (1993) H. 4. S. 530-7; discussion 537-8.

Verhofstad, M. H., W. P. Lange u. a.: Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. In: Diseases of the colon and rectum 44 (2001) H. 3. S. 423–431.

Wahdan-Alaswad, Reema S., Kyung Song u. a.: Insulin-like growth factor I suppresses bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cells by activating mTOR signaling. In: Cancer research 70 (2010) H. 22. S. 9106–9117.

Wahdan-Alaswad, Reema S., Kyung Song u. a.: Insulin-like growth factor I suppresses bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cells by activating mTOR signaling. In: Cancer research 70 (2010) H. 22. S. 9106–9117.

Wullschleger, Stephan, Robbie Loewith u. a.: Molecular organization of target of rapamycin complex 2. In: The Journal of biological chemistry 280 (2005) H. 35. S. 30697–30704.

Yarimkaya, Ali, Berat Apaydin u. a.: Effects of recombinant human growth hormone and nandrolone phenylpropionate on the healing of ischemic colon anastomosis in rats. In: Diseases of the colon and rectum 46 (2003) H. 12. S. 1690–1697.

Yellen, Paige, Mahesh Saqcena u. a.: High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. In: Cell cycle (Georgetown, Tex) 10 (2011) H. 22. S. 3948–3956.

Youssef, Doaa Mohammed: Results of recombinant growth hormone treatment in children with end-stage renal disease on regular hemodialysis. In: Saudi journal of kidney diseases and transplantation: an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia 23 (2012) H. 4. S. 755–764.

Zacharakis, Emmanouil, Haralampos Demetriades u. a.: Contribution of insulin-like growth factor I to the healing of colonic anastomoses in rats. In: Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research 20 (2007) H. 1. S. 9–14.

# **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med Markus Küper durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. med Markus Küper in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Stefan Beckert.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. med Markus Küper von mir mit Unterstützung durch Dr. hum. biol. Jürgen Weinreich durchgeführt. (Die histologische Aufarbeitung und die immunhistochemischen Färbungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Anita Hack und Michaela Weis-Klemm durchgeführt.)

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. hum. biol. Jürgen Weinreich durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 11.11.2020

Sebastian Trütschel