

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztl. Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**Einfluß des Wachstumshormons (GH)
auf die gastrale Wundheilung
am Modell der Ratte**

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

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

**vorgelegt von
Nicole Class
aus Bad Urach
2006**

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. S. Coerper

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Köveker

Für meine Eltern

Abkürzungen

EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
GH	Wachstumshormon ; Somatotropin
GM-CSF	Granulozyten-Macrophagen Colony Stimulating Factors
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Bindungsproteine
IL	Interleukin
KDa	Kilo-Dalton
MCAF	Macrophage Chemotactant and Activating Factor
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MSA	Multiplication-Stimulating Activity
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
SD	Standard-Deviation
SE	Standard-Error
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
A) Einleitung	
1. Allgemeines	7
2. Pathophysiologie und Pathogenese des Ulcus ventriculi	8
3. Ulkusheilung	10
4. Wachstumsfaktoren	12
4.1 Epidermal Growth Factor	12
4.2 Biologische Wirkung von EGF	13
4.3 Insulin-like Growth Factor s	14
4.4 Insulin-like Growth Factor-I	15
4.5 Biologische Wirkung des IGF-I	15
4.6 Insulin-like Growth Factor Rezeptor	17
4.7 Insulin-like Growth Factor –II	18
4.8 Insulin-like Growth Factor Binding Proteins	18
5. Wachstumshormon (GH)	19
5.1 Biologische Wirkung von GH	20
B) Fragestellung	22
C) Material und Methoden	
1. Versuchstiere	23
1.1 Ulkusinduktion	23
1.2 Organentnahme und Dokumentation	24

Inhaltsverzeichnis	Seite
2. Histologische Techniken	24
2.1 Vorbehandlung der Objektträger	25
2.2 Nicht enzymatische Vorbehandlung	25
2.3 Immunhistochemie	25
2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	26
3. Auswertung	
3.1 Gewichtsverlauf	26
3.2 IGF-I – Serumspiegel	27
3.3 Ulcusgröße	27
3.4 Immunhistochemie	27
4. Statistik	28
D) Ergebnisse	28
1. Ulcusgrößen	
1.1 Vorversuche	28
1.2 Planimetrische Auswertung der Ulcusgrösse	29
1.3 Auswertung der Photoplanimetrie	30
1.4 Durchmesser des Granulationsgewebes	30
2. Gewichtsverlauf	31
3. Werte der Plasmaspiegel von IGF-I	32
4. Immunhistochemie	
4.1 PCNA-Färbung	33
4.2 Anti- α Smooth Muscle Actin -Färbung	34
E) Diskussion	35
F) Zusammenfassung	44
G) Anhang	45
H) Literatur	60
Lebenslauf	68

A) Einleitung

1. Allgemeines

Das Ulcus ventriculi ist mit einer jährlichen Inzidenz von 50/100 000 Einwohner eine der häufigsten gastroenterologischen Erkrankungen und stellt damit eine Erkrankung mit hoher klinischer Relevanz dar. Das Maximum der altersspezifischen Erkrankungshäufigkeit liegt bei 60-65 Jahren (W. Schepp 1998).

Die gastroduodenale Ulkuskrankheit manifestiert sich in Form histologisch gutartiger Geschwüre der Schleimhaut des Magens (Ulcus ventriculi) und des Zwölffingerdarms (Ulcus duodeni), welche durch Singularität, Chronizität und Rezidivneigung gekennzeichnet sind. Das akute Ulcus ist ein einmaliges Ereignis im Rahmen einer Schleimhautischämie.

Das Ulcus ist definiert als tiefe nekrotische Läsion der gastroduodenalen Mucosa. Es handelt sich um ein entzündliches Geschwür, bei welchem in ca. 3% der Fälle eine karzinomatöse Entartung beobachtet werden kann. Im Gegensatz zur Erosion, die auf die Mukosa beschränkt ist und ohne Narbenbildung abheilt, kommt es beim Ulcus zu einem Defekt, der über die Muscularis mucosae hinaus in tiefe gastroduodenale Wandschichten reicht und in benachbarte Organe penetrieren oder auch in den Intraabdominalraum perforieren kann (W. Schepp 1998).

Die Infektion mit Helicobacter pylori ist inzwischen als der bedeutendste ulzerogene Faktor anerkannt. Dies steht nicht im Widerspruch zu früheren Erkenntnissen, die die Magensäure ins Zentrum der Ätiologie der Ulkuskrankheit gestellt hatten. Vielmehr werden viele Anomalitäten der Säuresekretion bei Ulcuspatienten erst durch die Infektion und ihre Folgen erklärbar, da H. pylori die antrale Gastrinausschüttung und somit die Magensaftsekretion im Fundus stimulieren (Classen et al 1998). Die Sanierung der Helicobacter-Pylori Infektion ist als primäre Therapiemaßnahme indiziert. Die European Helicobacter pylori Study Group empfiehlt verschiedene Schemata, von denen die Kombination von

Clarithromycin + Amoxicillin + Protonenpumpeninhibitor, die besten Resultate zeigt. Der Verlauf der Ulkuskrankheit wird maßgeblich durch das Auftreten von Komplikationen bestimmt. Ein Drittel der Ulkuspatienten wird erst symptomatisch im Komplikationsstadium. Akut und oft ohne Vorboten kommt es bei 20% der Patienten zu Blutungen. In 5% der Fälle wird eine Magenperforation beobachtet mit hoher Letalität. Eine Penetration des Ulkus in Nachbarorgane erfolgt meist in das Pankreas. Zu den Spät komplikationen zählen die karzinomatöse Entartung eines chronischen Ulkus ventriculi und die narbige Magenausgangsstenose. Trotz der guten Behandlungserfolge durch Eradikation von *Helicobacter pylori*, stellt das gastroduodenale Ulkus nach wie vor ein klinisch relevantes Problem dar und es ist von großem Interesse, die Pathophysiologie der gastralen Wundheilung aufzudecken und die Qualität der Ulkusheilung zu verbessern.

Das chronische Ulkus zeichnet sich durch eine charakteristische Schichtenfolge aus (Siegenthaler, 1987).

1.1 Histologische Gliederung

- a. Oberflächliche Exsudatschicht aus Fibrin, Schleim, Erythrozyten und polymorphkernigen Leukozyten
- b. Schicht fibrinoider Nekrose (Nekrose mit Fibrin und Kerntrümmern)
- c. Das Granulationsgewebe grenzt die Nekrose ab. Man findet Kapillaren senkrecht zur Oberfläche aufsteigend, Fibroblasten, Lymphozyten und Histozyten, Granulozyten.
- d. Bindegewebige Narbe

2 . Pathophysiologie und Pathogenese des Ulcus ventriculi

Die Pathophysiologie bei der Ulkulentstehung wird im allgemeinen als Ungleichgewicht zwischen aggressiven Faktoren, die die Magenschleimhaut attackieren, und defensiven Faktoren, die der Ulkulentstehung entgegenwirken, beschrieben. Aggressive Faktoren sind Magensäure, Pepsin, Duodenalininhalt und exogene Noxen (Medikamente, Bakterien).

Defensive Faktoren werden unter den Stichworten Mucosabarriere, Mucussekretion, Epithelregeneration und Mucosadurchblutung beschrieben. Die Steuerung der Magensaftsekretion erfolgt neural, endokrin über den Blutkreislauf, parakrin durch unmittelbar benachbarte Drüsenzellen und autokrin als Selbstbeeinflussung mancher Drüsen. Stimulatorisch wirken Acetylcholin, Gastrin, das aus den G-Zellen des Antrums stammt, und Histamin, das von den ECL-Zellen („enterochromaffin-like“-Zellen) und Mastzellen der Magenwand sezerniert wird. Als Inhibitoren wirken Sekretin (endokrin) aus dem Dünndarm, Somatostatin (hemmt Gastrinsekretion) sowie Prostaglandine, TGF- α und Adenosin.

Da das Säure-Pepsin-Gemisch des Magensekrets Eiweiß verdaut und denaturiert, muß die ebenfalls proteinhaltige Magen- und Duodenalwand vor dem aggressiven Magensaft geschützt werden. Folgende Mechanismen sind daran beteiligt:

- a) Ein gelartiger Mucusfilm schützt die Oberfläche des Magenepithels, wobei der Mucus von den epithelialen Becherzellen sezerniert wird.
- b) Das Epithel sezerniert HCO_3^- , das nicht nur in der Flüssigkeitsschicht direkt über dem Epithel angereichert wird, sondern auch in den Mucusfilm diffundiert, wo es eingedrungene H^+ -Ionen abpuffert. Wesentliche Stimulatoren dieser HCO_3^- -Sekretion sind Prostaglandine.
- c) Die Barriere-Eigenschaften des Epithels: Tight junctions, apikale Zellmembran und Na^+/H^+ -Austauschcarrier. Reguliert werden diese Eigenschaften u.a. durch EGF (epidermal growth factor), welcher im Speichel enthalten ist und an Rezeptoren der apikalen Epithelzellmembran bindet.
- d) Eine gute Mucosadurchblutung dient dazu H^+ -Ionen rasch zu beseitigen und den Nachschub an HCO_3^- und Substraten des Energiestoffwechsels zu gewährleisten.

Für die Reparatur von Defekten im Epithel, welche trotz dieser Schutzvorkehrungen entstehen, sind folgende Mechanismen beschrieben:

Dem Defekt benachbarte Epithelzellen flachen ab und schließen die Lücke durch seitliche Migration entlang der Basalmembran. Diese Restitution dauert etwa 30 Minuten.

Mehr Zeit braucht der Lückenschluß durch Zellteilung. Stimulierend wirken hier Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor- β (TGF- β), Insulin-like growth factor-I (IGF-I) und Gastrin (Silbernagel et al 1998).

3 . Ulkusheilung

Auch das Abheilen des Magenulkus ist charakterisiert durch epitheliale Restitution und Epithelregeneration. Die Restitution des Epithels basiert auf dem Prozeß der schnellen Zellmigration, durch welchen oberflächliche Mucosadefekte gedeckt werden können. Im Gegensatz dazu, ist die Regeneration durch Zellteilung, Zellproliferation gekennzeichnet und involviert endotheliale, epitheliale und mesenchymale Zellpopulationen, um eine neue extrazelluläre Matrix aufzubauen . Bei einer oberflächlichen Erosion wird das Gewebe durch die originalen Epithelzellen ersetzt. Bei ausgeprägter Schädigung der Mucosa, in Form eines tiefen Ulkus, wird das verlorene Gewebe zuerst durch Granulationsgewebe ersetzt, welches aus schnell proliferierenden Fibroblasten, Endothelzellen, Kollagen, Lymphozyten und Makrophagen besteht (Coerper et al 1997). Das Granulationsgewebe durchläuft einen kontinuierlichen Umbau und Veränderungen der Zellzusammensetzung (Tarnawski et al 1995). So entsteht ein dichtes fibröses Netzwerk, welches Voraussetzung und Basis für Re-Epithelisation durch Restitution und Regeneration darstellt. Wachstumsfaktoren hingegen, können die zell-spezifische Geweberegeneration und neurale Regeneration direkt stimulieren. Somit wird die Rolle des Granulationsgewebes minimiert und eine komplette, hochwertige Restauration der Magenarchitektur erreicht. Das Endergebnis des Heilungsprozesses reflektiert eine dynamische Interaktion zwischen der epithelialen Komponente der Heilungszone am Ulkusrand und den Komponenten des Bindegewebes, einschließlich der Mikrogefäße, die aus dem Granulationsgewebe stammen (Tarnawski et al 1991).

Die modernen Ansätze der Therapie der Ulkuskrankheit konzentrieren sich hauptsächlich auf die Neutralisation oder Inhibition der Magensäuresekretion. Unter dieser Behandlung erleiden aber bis zu 80% der Patienten innerhalb eines Jahres ein Rezidivulcus, was für eine schlechte Qualität der

Ulkusheilung spricht. Schmassmann et al beschrieben, daß die Mucosa von abgeheilten Magenulcera prominente histologische und ultrastrukturelle Abnormalitäten aufweist, auch noch lange Zeit nach abgeschlossener Wundheilung. Da die Magenulcera dazu tendieren, mit hoher Frequenz und an derselben Lokalisation zu rezidivieren, könnten diese Abnormalitäten möglicherweise die Basis für die Rezidivulcera darstellen. In Ihrer Studie verglichen sie den Einfluss einer Behandlung mit Antacida und Omeprazol auf die Qualität der Wundheilung von kryoinduzierten Magenulcera bei der Ratte. Während Omeprazol zwar die Geschwindigkeit der Ulkusabheilung erhöhte, wurde nur bei der Therapie mit Antacida eine gesteigerte Zellproliferation beobachtet. Histologisch zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an glandulären Epithelzellen, weniger Bindegewebe zwischen den Drüsen und ein geringeres Drüsenlumen. Die verbesserte Qualität der Ulkusheilung durch eine gesteigerte Zellproliferation bei einer Therapie mit Antacida, ist möglicherweise durch erhöhte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren bedingt (Schmassmann et al 1994).

Neben der bekannten Säureneutralisation muß es auch möglich sein, das Abheilen der gastroduodenalen Ulcera durch eine direkte Stimulation der Zellproliferation zu erreichen. Einige Studien haben bereits gezeigt, daß die epitheliale Restitution und Regeneration durch Wachstumsfaktoren, wie EGF, TGF- α , PDGF (platelet-derived-growth factor) oder bFGF (basic fibroblast growth factor), stimuliert werden können. Für EGF und TGF- α wurde nachgewiesen, daß sie ihre Wirkung auf zellulärer Ebene entfalten. Dies ermöglicht somit die direkte Behandlung der Ulcera, anstatt indirekt die Heilung durch Änderungen der primären oder sekundären Sekretionsverhältnisse zu beeinflussen (Konturek et al 1997 / 1998).

Dieser Ansatz zu neuen Therapiemöglichkeiten beim Magenulkus war bereits Gegenstand einiger Vorarbeiten. S. von Kiparski konnte 1999 in ihrer Dissertation zeigen, daß es bei kryoinduzierten Magenulcera der Ratte unter lokaler IGF-I Behandlung zu einer signifikant schnelleren Abheilung der Ulcera ventriculi kommt. Die zelluläre Produktion von IGF-I und die Zellproliferation nahmen zu, während die Rezeptorexpression von IGF-I

herunterreguliert wurde. Desweiteren wurden 53% mehr Makrophagen rekrutiert und die Angiogenese war um 46% gesteigert. In der extrazellulären Matrix konnte deutlich weniger Fibronectin nachgewiesen werden, ein Hinweis, daß die Migration, Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten und der chemotaktisch angelockten Zellen weitgehend abgeschlossen war (von Kiparski 1999).

Im Rahmen einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, daß lokal oder systemisch verabreichtes TGF- β das Abheilen von kryoinduzierten Mabenulcera stimuliert. Die Zellproliferation war gesteigert und die intrazelluläre TGF- β Expression war erhöht, während es zu einer Downregulation der TGF- β Rezeptoren im Granulationsgewebe des Ulkusrandes kam (Coerper et al 1997).

4. Wachstumsfaktoren

Der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf den Prozess der Wundheilung war bedeutender Forschungsgegenstand in den vergangenen Jahren. Diese Polypeptide und Glykoproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung, -wanderung und -differenzierung. Sie beeinflussen die Proteinexpression, Enzymproduktion, Angiogenese und den Aufbau der extrazellulären Matrix. Außerdem kommt die chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten und andere Entzündungszellen hinzu. Einige der bedeutendsten Hauptfamilien von Wachstumsfaktoren sind hier zu nennen: Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor- β (TGF), Insulin-Like Growth Factor (IGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Interleukine (IL's) und Colony-Stimulating Factor (CSF) (Komarcevic 2000).

4.1 Epidermal Growth Factor (EGF)

In der großen Familie der Wachstumsfaktoren, gehört EGF mit zu der für den GI-Trakt bedeutendsten Gruppe. EGF ist ein Polypeptid, aufgebaut aus 53 Aminosäuren. Es stimuliert mRNA, DNA und Proteinsynthese hauptsächlich in Epithelzellen. EGF stimuliert die Teilung von Keratinozyten in vitro und die

Regeneration von epidermalen Zellen in vivo. Die parenterale Zufuhr von EGF vermindert die Magensäureproduktion und stimuliert die DNA Synthese in der Magenmukosa am Modell der Ratte. In weiteren Nachforschungen hat sich gezeigt, daß EGF auch in den Brunner-Drüsen des Duodenums produziert wird und in der Darmflüssigkeit zu finden ist. EGF hemmt die Magensäureproduktion und stimuliert gleichzeitig die Bikarbonatsekretion im Duodenum. Die Konzentration von EGF ist bei Patienten mit Duodenalulcera niedriger, im Vergleich mit gesunden Personen (Szabo et al 1995).

4.2 Biologische Wirkung von EGF

EGF ist vor allem in die Heilung chronischer Wunden involviert und dabei hauptsächlich an der Restauration der epithelialen Komponente beteiligt. Diese neuen Epithelzellen sezernieren EGF und die Zellen des Wundrandes exprimieren verstärkt EGF-Rezeptoren (EGFR). Konturek et al. untersuchten die Zellproliferationsrate, die Magensäuresekretion und die EGF- Expression während der Heilung experimenteller Magenulcera. Die Säuresekretion war die ersten beiden Tage nach Ulkusinduktion signifikant reduziert, erreichte aber im Verlauf wieder Normalwerte. Je kleiner die Ulcera wurden, desto höher zeigte sich die Zellproliferationsrate und die Expression von EGF war signifikant erhöht. Beide Parameter erreichten ihr Maximum am vierten Tag. Zusätzlich war eine gesteigerte EGF-Rezeptor Expression im Wundgebiet zu beobachten. Dies läßt darauf schließen, daß EGF die Zellproliferation stimuliert und lokal die Magensäuresekretion inhibiert. Die lokale Wirkung läßt sich erklären durch Akkumulation von EGF im Ulcusareal, als Resultat der gesteigerten Produktion durch wund-assoziierte neue Zelllinien, zusammen mit der Überexpression von EGF-Rezeptoren während des Heilungsprozesses (Konturek et al 1981/1997).

4.3 Insulin-like Growth Factors (IGFs)

Insulin-like growth factors sind strukturell und funktionell eng verwandte Peptidhormone, die ihre Wirkung auf Proliferation und Differenzierung verschiedener Gewebe hauptsächlich unter dem Einfluß von Wachstumshormon (GH) entfalten.

Erstmals 1957 von Salmon und Daughaday als sulfation activity beschrieben und durch ihre biologischen Wirkungen definiert (sulfation factor, non-suppressible Insulin-like activity [NSILA], multiplication stimulating activity [MSA]), existierte zunächst eine scheinbare Vielzahl von Vertretern dieser Stoffgruppe. Anfangs wurden all diese Stoffe unter dem Namen Somatomedine zusammengefaßt. Mit Aufklärung der Struktur und Darstellung der einzelnen Substanzen erwiesen sich diese z.T. identisch, was nicht nur die Nomenklatur entsprechend vereinfachte (Baxter 1986). Die heute geläufige Bezeichnung ist IGF-I und IGF-II.

Nomenklatur:

⇒ Somatomedin A (SM-A): zunächst definiert durch die sulfation factor activity, d.h. Stimulation des Sulfat-Einbaus in Glycosaminoglycane von Knorpelgewebe. SM-A hat sich als desamidierte Form von IGF-I erwiesen (Enberg et al 1984).

⇒ Somatomedin B (SM-B): zunächst definiert über die Stimulation der DNA-Synthese in Glia-Zellen. Diese Wirkung wurde später Verunreinigungen durch EGF zugeschrieben (Heldin et al 1981).

⇒ Somatomedin C (SM-C): zunächst definiert durch die sulfation factor activity beim Rattenknorpel; wird jetzt synonym als IGF-I bezeichnet (Klapper et al 1983)

⇒ Multiplication stimulating activity (MSA) mit mitogenen Effekten an verschiedenen Geweben zeigte nach Strukturaufklärung eine über 90%ige Homologie mit IGF-II.

⇒ Non-suppressible Insulin-like activity (NSILA I und II) wurden in IGF-I und IGF-II umbenannt (Baxter 1986).

4.4 Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)

IGF-I und IGF-II wurden ursprünglich als Serumfaktoren mit insulinähnlicher Wirkung isoliert, deren Aktivität ließ sich aber nicht durch Anti-Insulin IgG neutralisieren.

IGF-I wird in großen Mengen von der Leber endokrin sezerniert (ca.10mg/Tag) und lokal von Chondroblasten, Fibroblasten und Osteoklasten. Die Serumkonzentrationen von gesunden Probanden liegen bei 200µg/l für IGF-I und bei 500µg/l für IGF-II.

IGF-I ist ein einkettiges, basisches Polypeptid (pH=8.4), bestehend aus 70 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht (MW) von 7649 Da. Es besitzt drei Disulfid-Brücken und hat hohe strukturelle Ähnlichkeit mit humanem Proinsulin. Vor allem in der Rezeptorregion zeigt sich eine ca. 50%ige Identität in der Sequenz mit Insulin. Während IGF-I von Mensch, Rind und Schwein in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind, unterscheiden sich IGF-I der Ratte in drei und IGF-I der Maus in vier Aminosäuren von humanem IGF-I (Baxter 1986).

IGF-I und II werden durch unterschiedliche Gene codiert, die Gewebe- und entwicklungspezifisch exprimiert werden. IGF-I ist auf dem langen Arm von Chromosom 12 (12q23) lokalisiert. IGF-II liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p5).

4.5 Biologische Wirkung des IGF-I

IGF-I wird vor allem in Hepatozyten und Fibroblasten gebildet, wird aber auch in Nervengewebe, Pankreas, Herz, Spermien, Ovar, Muttermilch, Nieren, Lunge und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen. Die Wirkung des IGFs ist von der Zielzelle abhängig: Im Knorpelgewebe kommt es zu einer gesteigerten Sulfat- und Leucinaufnahme (Salmon et al 1970), zudem wird die Umwandlung von Prolin zu Hydroxyprolin gefördert (Daughaday et al 1962). In Fettzellen zeigt sich insulin-ähnliche Wirkung in der Stimulation von Glykoneogenese und Lipogenese. In Fibroblasten wird durch IGF-I eine verstärkte DNA-Synthese und Zellproliferation induziert (Moses et al

1980). IGF-I hat einen großen Einfluß auf das Körpergewicht, Körperlänge und auf das Organgewicht (Tomas et al 1992).

Bei der Geburt liegen die Blutspiegel von IGF-I bei etwa der Hälfte der Werte von Erwachsenen. Vor der Pubertät kommt es zu einem steilen Anstieg der IGF-I Spiegel im Blut, wobei Mädchen einen 2-3fach höheren Anstieg aufweisen als Jungen. Ab einem Alter von ca. 25 Jahren bleiben die IGF-I Spiegel relativ konstant bis zum Alter von ca. 60 Jahren. In dieser Altersgruppe ist ein leichter Abfall der Serumspiegel zu verzeichnen (Daughaday et al 1989).

IGF-I war bereits Forschungsgegenstand zahlreicher Studien auf dem Gebiet der Wundheilung. Glukokortikoide sind in der Lage, die Genexpression von IGF-I in der Leber zu hemmen und die IGF-I Konzentration im Wundsekret lokaler Hautwunden ist unter systemischer Glukokortikoidtherapie deutlich erniedrigt. Der negative Effekt der Steroide auf die Wundheilung kann durch lokale IGF-I Applikation aufgehoben werden (Suh et al 1992). An hypophysectomierten Ratten konnte gezeigt werden, daß der DNA-Gehalt und der Hydroxyprolinegehalt von lokalen Hautwunden um 50% abnimmt, die Werte sich aber unter IGF-I Behandlung wieder normalisieren. Zudem steigt die Anzahl der Wundmakrophagen unter IGF-I Behandlung um 75% im Vergleich zur Normalgruppe an, während sie bei hypophysectomierten Tieren um 50% im Wundsekret abfällt (Mueller et al 1994). Muskelbiopsien von Patienten mit infantiler hypertropher Pylorusstenose (IHPS) wiesen deutlich erhöhte IGF-I Werte in der Schicht der glatten Muskelzellen auf, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Ohshiro et al 1998). Der Gastrointestinaltrakt ist ein wichtiges Zielgewebe für IGF-I. Bei Ratten mit Colon-Anastomosen wurde ein deutlich erhöhter Kollagengehalt der Anastomosen, nach IGF-I Behandlung, festgestellt. Das Wundgewebe der Anastomosen stellte sich, im Vergleich mit Kontrolltieren, in geringerer Ausprägung und von erhöhter Härte dar (Ingemann-Petersen et al 1996). Allerdings ließ sich eine erhöhte Reißfestigkeit der Anastomosen erst bei kombinierter Behandlung mit IGF-I und dephosphoryliertem IGF-Bindungsprotein-I nachweisen. Als positiver Effekt wurde die Reduktion des postoperativen Gewichtsverlusts verbucht (Jyung et al 1994). Cats et al. untersuchten bei Patienten mit Akromegalie den Zusammenhang von erhöhter epithelialer Zellproliferation im Colon und

IGF-I. Dabei stellten sie einen direkten stimulatorischen Effekt von IGF-I auf die epitheliale Proliferation fest. Auf den Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt wurden von Lobie et al IGF-I-Rezeptoren beschrieben (Lobie et al 1990). Bei Ratten, an denen eine Dünndarmresektion durchgeführt wurde, konnte durch IGF-I eine Verbesserung in der Glucose- und Wasserabsorption erzielt werden (Zhang et al 1994).

4.6 IGF-Rezeptoren

Trotz der Ähnlichkeit zwischen IGF-I und IGF-II sind zwei deutlich verschiedene Rezeptortypen zu unterscheiden. Die das Wachstum beeinflussenden Wirkungen der IGF werden hauptsächlich über den Typ-I-Rezeptor vermittelt.

Der Typ-I-Rezeptor ist ein 350 kD großes Transmembran-Glykoprotein. Der eigentliche Rezeptor ist ein Heterotetramer und besteht aus je zwei α und β Untereinheiten. Er hat strukturelle Ähnlichkeit mit dem Insulinrezeptor und bindet mit abnehmender Affinität IGF-I>IGF-II>>Insulin. Dabei scheint die Affinität zu IGF und Insulin unter anderem auch von der Calcium-Konzentration abhängig zu sein. Die extrazellulär gelegenen α -Ketten besitzen die IGF-Bindungsstellen und sind über Disulfidbrücken mit den β -Ketten gekoppelt. Diese sind in der Zellmembran verankert und enthalten im zytoplasmatisch gelegenen Anteil einen Tyrosin-Kinase-Bereich. Durch Bindung von IGF an den Rezeptor wird die Tyrosin-Kinase aktiviert und führt ihrerseits über Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Kinasen zu einer intrazellulären Antwort. Die IGF-Rezeptoren kommen ubiquitär in allen Geweben vor. Es wurden parakrine, autokrine, intrakrine und endokrine Mechanismen für die biologische Wirkung der Wachstumsfaktoren beschrieben.

Durch erhöhtes IGF-I bzw. Insulin kommt es zur Down-Regulation von Typ-I-Rezeptoren. Insulin bewirkt zudem eine Erhöhung der Zahl der Typ-II-Rezeptoren, evtl. durch Verschiebung der Rezeptoren aus einem mikrosomalen Pool an die Zelloberfläche (Herington et al 1991, LeRoith et al 1992).

4.7 Insulin-like Growth Factor II (IGF-II)

Beim IGF-II handelt es sich um ein leicht saures Polypeptid (pH=6.5) bestehend aus 67 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 7471 Da. IGF-II ist in seiner Struktur zu 60% identisch mit IGF-I (Rinderknecht et al 1978). Es wird vor allem in fetalem Lebergewebe gefunden und spielt eine wichtige Rolle als embryonaler und fetaler Wachstumsfaktor. IGF-II Spiegel in fetalem Rattenserum erreichen 20-100fach höhere Werte als in maternalem Serum (Moses et al 1980). In der Pubertät kommt es bei IGF-II im Gegensatz zu IGF-I nicht zu einem Anstieg der Serumspiegel (Daughaday et al 1989).

4.8 Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)

IGF liegen nicht in freier Form vor, sondern sind – unüblich für Peptidhormone – zu über 99% an spezifische Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden, von denen sich derzeit fünf unterscheiden lassen (Herington et al 1991).

Durch die Bindung an IGFBPs wird sowohl die biologische Aktivität der IGF als auch deren Verteilung in den verschiedenen Kompartimenten in erheblichem Maße reguliert. Zwischen den einzelnen Bindungsproteinen besteht eine über 50% Strukturhomologie. IGFBP-3 ist das quantitativ wichtigste Bindungsprotein. Es besteht aus drei Untereinheiten. Freies IGF bindet zunächst an eine säure-stabile 40 kDa-Untereinheit, das eigentliche IGFBP-3. Der entstandene Komplex lagert sich dann an eine säure-labile 80 kDa-Untereinheit (acid-labile subunit, ALS) an, es entsteht der 150 kDa-Komplex. Etwa 75% der im Plasma zirkulierenden IGF-I und IGF-II liegen im 150 kDa-Komplex gebunden vor. im 150 (Baxter et al 1989, Guler et al 1989, Blum et al 1991).

Die Bildung von IGFBP-3 wird, neben anderen Faktoren, hauptsächlich vom Wachstumshormon reguliert. Ein circadianer Rhythmus läßt sich nicht nachweisen. Die Serumspiegel sind altersabhängig: IGFBP-3 steigt im Verlauf der Kindheit an, erreicht während der Pubertät einen Gipfel und fällt im Erwachsenenalter etwas ab.

Durch die Bindungsproteine werden starke Schwankungen des Blutzuckerspiegels und Hypoglykämien infolge der Insulin-ähnlichen Wirkungen an den Insulinrezeptoren vermieden.

IGFBP-1 hat ein Molekulargewicht von 25-28 kDa, bindet mit gleicher Affinität IGF-I und -II und ist an der Regulation der Aktivität von IGF-I beteiligt. Ein weiterer wichtiger Regulator ist Insulin, das auf IGFBP-1 einen stark suppressiven Effekt in Dezidualzellen hat (Lee et al 1993).

5. Wachstumshormon

Das Wachstumshormon (GH, Somatotropin) ist ein artspezifisches Proteohormon mit einem Molekulargewicht von 22 kDa, welches im Hypophysenvorderlappen gebildet wird. Die GH-Sekretion wird im wesentlichen von 2 Peptiden des Hypothalamus reguliert. Der „growth hormone releasing factor „ (GRF) verursacht eine Steigerung der GH-Freisetzung. Somatostatin (SRIF) dagegen hemmt die Sekretion von GH aus der Adenohypophyse (Raff et al 1997). Die Synthese und Abgabe von GRF im Hypothalamus steht unter neuraler und humoraler Kontrolle. Aminosäuren, Hypoglykämie, Glucagon, Dopamin, Vasopressin, α_2 -Agonisten und Glucocorticoide steigern die GRF-Freisetzung, während sie durch Hyperglykämie, Hyperlipidazidämie, Adipositas und Kälte gesenkt wird (Silbernagel et al 1998). Der Schlaf-Wach-Rhythmus regelt über das limbische System zusätzlich die GRF-Abgabe.

Ein Merkmal der normalen Hypothalamus-Hypophysen-Funktion ist die pulsatile Freisetzung von GH. Beim Menschen hängt der pulsatile Charakter der Hormonfreisetzung hauptsächlich vom SRIF ab. Die GH-Freisetzung korreliert mit den oszillierenden Veränderungen der SRIF-Plasmaspiegel, selbst wenn die GRF-Spiegel kontinuierlich erhöht sind. Der pulsatile Charakter der GH-Freisetzung bleibt beim Menschen während des ganzen Lebens erhalten. Die Pulsfrequenz wird zwischen einem Puls pro Stunde bis zu einem Puls alle vier Stunden angegeben. Erhöhte GH-Spiegel werden in der Regel durch größere Pulsamplituden und nicht durch eine Steigerung der Pulsfrequenz verursacht. Die GH-Sekretion erfolgt primär während des

Schlafes. Die höchsten GH-Spiegel treten während der ersten „Slow-wave-Schlafphase“ auf.

GH unterstützt die Stickstoffretention sowie die Lipolyse und spielt bei der Aufrechterhaltung der Serumglucosespiegel eine wichtige Rolle. Komponenten und Metabolite der Ernährung beeinflussen die GH-Sekretion. Ihr pulsatiler Charakter wird beim Menschen durch die Wirkung von Nahrungsmetaboliten tagsüber verdeckt. Die Wirkungen von Glucose, Arginin und freien Fettsäuren (FFA) auf die GH-Synthese sind besonders gut untersucht. Glucosegabe verursacht zunächst einen deutlichen Abfall der GH-Sekretion, gefolgt vom Anstieg des GH-Spiegels nach 3-5 Stunden (Valcavi et al 1992). Arginin führt zu einem Anstieg der GH-Spiegel. Die Infusion von FFA unterdrückt die Stimulation der GH-Freisetzung durch GRF, Insulin, Arginin oder körperliche Belastung.

Im Plasma ist GH an 2 unterschiedliche GH-Bindungsproteine (GHBP) gebunden. Davon besitzt das eine geringe Kapazität aber hohe Affinität und das andere eine geringere Affinität mit einer hohen Kapazität. Im Gewebe wird GH an Glycoproteinrezeptoren gebunden.

5.1 Biologische Wirkungen des Wachstumshormons

GH hat eine direkte Wirkung auf Zellen und Gewebe und bewirkt eine Stimulation der Gewebsdifferenzierung, Zellproliferation und Proteinsynthese. GH wirkt über eigene GH-Rezeptoren direkt an den Erfolgsorganen. Teilweise wird die GH-Wirkung über den Mediator IGF-I vermittelt. Die IGF-I-Synthese findet unter dem Einfluß von GH in zahlreichen Geweben statt. Bei Individuen mit GH-Mangel ist die Synthese von IGF-I bis hin zur fehlenden Nachweisbarkeit im Plasma unterdrückt. Sie kann aber durch exogenes GH stimuliert werden.

Die Auswirkungen von GH auf den Kohlehydratstoffwechsel sind komplex. Exogenes GH hat einen kurzen, insulinähnlichen und insulinunabhängigen blutzuckersenkenden Effekt (Fineberg et al 1974). Diese Wirkung wird bei GH-Anstiegen im physiologischen Bereich nicht beobachtet. Die Sensibilität peripherer Gewebe für Insulin wird herabgesetzt und der Glucosetransport in die Zellen verringert. Die Glucoseoxidation wird unmittelbar nach GH-Gabe

gesteigert, aber nach ungefähr einer Stunde reduziert. Gleichzeitig erhöht GH durch direktes Einwirken auf die B-Zellen des Pankreas die Insulinsekretion. Die beschriebenen Vorgänge müssen durch die direkte GH-Wirkung erklärt werden, da sie innerhalb der ersten Stunden nach GH-Gabe ablaufen, während der GH bedingte IGF-I-Anstieg erst nach 3-6 Stunden erfolgt. Insgesamt senkt GH die Glucosetoleranz. Die tägliche Applikation von GH kann zur Hyperglykämie führen, die auf eine gesteigerte Insulinresistenz zurückzuführen ist (Kostyo et al 1976).

Im Fettstoffwechsel wirkt GH hauptsächlich lipolytisch. Nach einer kurzen Phase mit niedrigen Spiegeln freier Fettsäuren ein Anstieg der freien Fettsäuren und der Triglyzeride. IGF-I hingegen begünstigt die Lipogenese und hemmt die Lipolyse.

Im Rahmen des Proteinmetabolismus steigert GH vor allem die Proteinsynthese und den Aminosäuretransport in die Zellen, ohne die Proteolyse wesentlich zu beeinflussen. Gleichzeitig scheint es aber den antiproteolytischen Effekt von Insulin zu antagonisieren (Fryburg et al 1992).

Zu den weiteren Effekten von GH gehören eine Steigerung der Kollagensynthese und Erythropoetinbildung. GH stimuliert außerdem die enterale Absorption von Calcium und Phosphat sowie die renale Ausscheidung von Calcium. GH fördert die T-Zell-Proliferation, IL-2-Bildung und die Aktivität von natürlichen Killerzellen, zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen. Dies erklärt die besondere Rolle von GH bei der Entwicklung, Erhaltung und Steuerung der Immunfunktion.

Lobie et al. untersuchten die Expression von Wachstumshormon-Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt. In der Studie wird eine heterogene Verteilung von GH-Rezeptoren in epithelialen Komponenten des Gastrointestinaltrakts beschrieben. Die mesenchymalen Gewebe wiesen ebenfalls GH-Rezeptoren auf, aber in einem geringeren Ausmaß. Die Autoren erklärten diese Verteilung als übereinstimmend mit einschlägiger Literatur, welche Wachstumshormon eine proliferative und differenzierende Rolle im GIT zuschreibt. In den übrigen Gewebestrukturen war es nicht möglich GH-Rezeptoren nachzuweisen. Dies wird auch in ähnlichen Studien für weitere nicht-hepatische Gewebe berichtet (Posner et al 1974). Auch Insulin-like growth factor I zeigt eine heterogene Verteilung im Gastrointestinaltrakt und alle Lokalisationen weisen sowohl IGF-

I, als auch GH – Rezeptor Aktivität auf. So reduzierte eine Hypophysektomie die Mitoserate in den Lieberkühn´schen Krypten, welche aber durch Gabe von Wachstumshormon wieder gesteigert werden konnte (Schnabel et al 1999). Diese Forschungsergebnisse würden zu einem Teil der Somatomedin – Hypothese (Daughaday 1989) passen, welche aussagt, daß die Wirkungen des Wachstumshormons durch GH-abhängige lokale, wie auch hepatische Produktion von IGF-I vermittelt werden.

Neue Daten an isolierten Kardiomyozyten zeigen die schnelle Induktion von c-myc, c-fos und c-jun durch GH und IGF-I. Um festzustellen, ob GH seine hypertrophe Wirkung über eine auto-/oder parakrine Freisetzung von IGF-I ausübt oder ob es sich um einen IGF-I-unabhängigen Effekt handelt, wurden Kardiomyozyten mit dem blockierenden Peptid IGF-I Analog vorinkubiert. Hierdurch wurde der hypertrophe Effekt von IGF-I, nicht aber von Wachstumshormon aufgehoben (Schnabel et al 1999). Diese Daten sprechen für eine IGF-I unabhängige Wirkung von GH am Herzen, dessen Signaltransduktion am Kardiomyozyten jedoch noch nicht näher beleuchtet ist. Man muß davon ausgehen, daß die Effekte von GH organspezifisch sind. Somit kann bei der Betrachtung des Gastrointestinaltrakts nicht von der gleichen Wirkungsweise des Wachstumshormons ausgegangen werden.

B) Fragestellung

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist die Wundheilung ein sehr komplexes Geschehen, abhängig von vielen einzelnen Komponenten, die in einem perfekten Zusammenspiel zur Reparatur eines Defektes führen.

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung von systemisch appliziertem Wachstumshormon auf die gastrale Wundheilung untersucht werden. Da Vorversuche gezeigt haben, daß IGF lokal appliziert die gastrale Wundheilung stimuliert, müßte Wachstumshormon zum Einen durch eine Stimulation der IGF-Synthese und zum Anderen durch direkte Wirkung an den Wachstumshormon-Rezeptoren die gastrale Wundheilung stimulieren.

C) Material und Methoden

1. Versuchstiere

Zur Verfügung standen männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von durchschnittlich 285 Gramm ($\pm 37,86$ Gramm SD) am Operationstermin. Die Tiere waren in Einzelkäfigen untergebracht. In den Stallungen herrschte ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, eine konstante Temperatur von 20-22°C und eine Luftfeuchtigkeit von 60-70%. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter, bestehend aus den handelsüblichen Pellets.

1.1 Ulcusinduktion

Tierversuchsmodell:

24 Stunden präoperativ wurden die Tiere nüchtern gehalten, mit Wasser ad libitum. 30 Minuten vor Operationsbeginn erhielten die Tiere wieder freien Zugang zum Futter. Dadurch soll eine sehr gute Füllung des Magens erreicht werden. Diese ist notwendig, um eine gleichmäßige und vergleichbare Auflagefläche der Kryosonde (Erbokryo; Erbe, Tübingen) zu gewährleisten. Die Sonde wurde mit Lachgas gekühlt. Die Narkotisierung der Tiere erfolgt intraperitoneal mit Ketamin (100mg/kg Körpergewicht) und Rompun (16mg/kg Körpergewicht). Nach Rasur und Desinfektion des Abdomens erfolgte die Laparotomie entlang der Linea alba. Der gut gefüllte Magen wurde mobilisiert und aus der Laparotomie-Wunde herausluxiert. Auf die distale Magenvorderwand wurde eine Kryosonde (Temperatur -60°C , Fläche : 19mm^2 , Zeitdauer: 45 Sekunden) unter leichtem, konstantem Druck aufgelegt. Anschließend wurde der Magen in seine ursprüngliche Lage repositioniert. Es erfolgte anschließend der schichtweise Bauchdeckenverschluß (Ethylene[®], Ethicon Ltd., Nordersted, Germany). Postoperativ hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Nahrung. In der Versuchsgruppe (n=10) erfolgte die Injektion von Wachstumshormon intramusculär (Dosis: 2,5mg/kg Körpergewicht/Tag). Das Wachstumshormon wurde in Zweikammerampullen geliefert und in einem speziellen Kabi-Mixer erst unmittelbar vor einer Injektion gemischt (Genotropin 40-50mg ; Firma Pharmacia+Upjohn GmbH). Der Kontrollgruppe (n=10) wurde lediglich die

entsprechende Menge Solvens verabreicht. Die Injektionen erfolgten an den darauf folgenden sieben Tagen, jeweils zur gleichen Uhrzeit.

1.2 Organentnahme und Dokumentation

Versuchsende war am siebten postoperativen Tag. Die Tiere wurden gewogen und in gleicher Weise intraperitoneal mit Ketamin und Rompun narkotisiert. Es erfolgte die Laparotomie und Thorakotomie. Aus dem rechten Ventrikel des Herzens wurde mit einer Butterfly-Kanüle Blut abgenommen, zentrifugiert und der Serumüberstand zur späteren IGF-Spiegelbestimmung eingefroren. Nach Durchtrennung der Nierenarterien beidseits, wurde über die Kanüle im Ventrikel mit ausreichend physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, um eine bestmögliche Blutleere der entnommenen Organe zu erzielen. Der Magen wurde reseziert, entlang der kleinen Kurvatur eröffnet und gründlich gesäubert. Die Größenerfassung (Fläche) erfolgte photoplanimetrisch und durch Abzeichnen der Ulkusfläche (Opsite-Folie). Zur weiteren Verarbeitung werden die Präparate in 4% Paraformaldehyd-Lösung für 12-24 Stunden fixiert und schließlich in Paraffin eingebettet.

2. Histologische Techniken

Initial wurde von allen Präparaten eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefertigt. Dann folgte der immunhistologische Nachweis von Proliferating Cell Nuclear Antigen (Monoclonal Anti-PCNA, Dako). Alle Färbepreparate wurden durch Paraffinschnitte hergestellt. Die Schnittdicke am Mikrotom betrug 2 μ m. Die Schnitte wurden einige Minuten in 40°C warmes Aqua dest. gelegt, um eine vollständige Gewebeglättung zu erreichen. Nach Aufziehen auf entsprechend beschichtete Objektträger, konnten die Präparate für 24 Stunden auf einer Wärmeplatte mit einer Temperatur von 50°C trocknen.

2.1 Vorbehandlung der Objektträger

Um eine optimale Haftung der Paraffinschnitte auf den Objektträgern zu erreichen, wurden diese mit 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTEX) beschichtet. Die Objektträger wurden hierfür zunächst mit Aceton entfettet, anschließend in 2% APTEX für 5min inkubiert, abgespült und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Anfertigung der Schnitte mit dem Mikrotom, wurden diese auf die APTEX beschichteten Objektträger aufgezogen.

2.2 Nicht enzymatische Vorbehandlung

Die entparaffinierten Schnitte wurden in einem mikrowellengeeigneten Gefäß mit 10mM Citratpuffer, pH 6,0, 6x5 Minuten bei 600 Watt in einer Mikrowelle gekocht und vor der immunhistochemischen Färbung 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und in TBS-Puffer (0,05M, pH 7,6) gewaschen.

2.3 Immunhistochemie

Die Anfärbung der Schnitte erfolgte über die indirekte Immunhistochemie mit der Avidin-Biotin –Methode. Als Chromogen wurde 3,3-Diaminobenzidin (DAB) verwendet.

Nach Entparaffinierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe, wurde die endogene Oxydase mit 3% H₂O₂/Methanol (Merck) 15 Minuten geblockt. Nach jeweils einem Waschschrift in Leitungswasser, Aqua dest. und TBS-Puffer wurden die Schnitte, wie oben dargestellt, nicht – enzymatisch vorbehandelt. Für die Blockung der unspezifischen Bindungsstellen wurde Nonimmunserum (DAKO X902) 1:5 mit 5% BSA (Fraction V, Serva)/TBS-Puffer verdünnt, aufgetropft, und 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Das Normalserum stammt aus derselben Spezies, aus der der Sekundärantikörper gewonnen worden war (normales Kaninchenserum, DAKO). Anschließend wurde mit dem Primärantikörper (monoklonales Mäuse-IgG gegen PCNA) über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach drei Waschriffen mit TBS-Puffer folgte die Inkubation

mit dem Sekundärantikörper (Rabbit-anti-Mouse; biot.), 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Dieser wurde zur Vorbereitung mit normalem Rattenserum auf Eis inkubiert, zentrifugiert und der Überstand 1:400 mit 5% BSA/TBS-Puffer verdünnt. Der Sekundärantikörper wurde mit TBS-Puffer abgewaschen und im Anschluß wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (DAKO K377) in der Feuchtkammer inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBS-Puffer erfolgte schließlich die Detektion mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB 0.05%, Fluka) und die Gegenfärbung in Hämatoxylin nach Mayer (1:5 Verdünnung, Merck). Zuletzt wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Histomount (Shandon) eingedeckt.

2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach Entparaffinierung der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe (Xylol 3x10 Minuten, Ethanol 100% 2x5 Minuten, Ethanol 96% 5 Minuten, Ethanol 70% 5 Minuten) wurden die Kerne 5 – 10 Minuten in Hämalaun nach Mayer (1:5 mit Aqua dest. verdünnt, Merck), gefärbt, und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Schließlich erfolgte die Zytoplasmafärbung 1 – 2 Minuten in Eosin gelblich 1 % (Merck), es wurde kurz in Aqua dest. gespült, die aufsteigende Alkoholreihe angeschlossen und mit Histomount eingedeckt.

3. Auswertung

3.1 Gewichtsverlauf

Alle Tiere wurden präoperativ vor Ulcusinduktion, sowie am Versuchsende gewogen.

3.2 IGF-I-Serumspiegel

Allen Tieren wurde bei Versuchsende Blut aus der rechten Herzkammer abgenommen. Aus diesen Proben wurde vom Hormonlabor Prof. Ranke (Universitätskinderklinik Tübingen) der IGF-Serumspiegel bestimmt.

3.3 Ulcusgröße

Die Ulcusgröße wurde mittels drei unterschiedlicher Methoden bestimmt:

- a) Folienplanimetrie: planimetrische Ausmessung der OPSite-Folien, auf welchen die Durchmesser der Ulcera direkt nach Organentnahme dokumentiert wurden.
- b) Photoplanimetrie: Ausmessung der Ulcusgröße anhand von DIA-Aufnahmen, welche direkt nach der Organentnahme von den Präparaten angefertigt wurden.
- c) Histoplanimetrie: Histologische Auswertung der Ulcusgröße anhand der HE-Schnitte, welche von jedem Präparat angefertigt wurden.

3.4 Immunhistochemie

a) PCNA

Es wurde der Zell-Index berechnet: Zur Vermeidung von systematischen Fehlern bei der Auszählung der positiven Zellen aufgrund der unterschiedlichen Ulcusgrößen, wurde das auszuwertende Ulcus in vier Quadranten unterteilt. Davon wurde jeweils der linke obere und rechte untere Quadrant ausgezählt, so daß trotz unterschiedlicher Ulcusgröße immer relativ dasselbe Gebiet bewertet wurde. Bei der Auszählung wurden zuerst die positiven Zellen ausgezählt und anschließend die Gesamtzellzahl bestimmt. Die positiven Zellen konnten somit in Relation zur Gesamtzellzahl angegeben werden. Statistisch wurden dieselben Zielgrößen erhoben wie bei der Beurteilung der Ulcusgröße.

b) Anti- α Smooth Muscle Actin

Bei der Auswertung der Gefäßanzahl wurde wieder die Fläche unter dem Ulcus in vier Quadranten unterteilt und jeweils der linke obere und der rechte untere Quadrant ausgezählt. So wurde dieselbe Region wie bei der PCNA bewertet und der Gefäß-Index errechnet. Die gesamte Histologie wurde mit der Quantimed Software quantifiziert.

4. Statistik

Die Werte der beiden Gruppen sind als Tabellen angegeben und statistische Zielgrößen, die erhoben wurden, waren Mittelwert, Varianz, Standardabweichung, sowie Standardfehler des Mittelwertes.

Die unterschiedlichen Diskussionsgrößen beider Gruppen wurden parametrisch durch den Wilcoxon-Test berechnet, wobei $p < 0,05$ als Signifikanzniveau gewählt wurde.

Die Mittelwerte der untersuchten Parameter wurden graphisch in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

D) Ergebnisse

1. Ulcusgrößen

1.1 Vorversuche

Es wurde mit sieben Tieren Vorversuche durchgeführt, um das Verfahren der Ulcusinduktion an eine neue Kryosonde zu adaptieren. Dabei wurde die Temperatur konstant bei -60°C gehalten und die Zeitdauer variiert.

Tier 1+2: Auflagezeit 15 Sekunden

Tier 3+4: Auflagezeit 30 Sekunden

Tier 5-7: Auflagezeit 45 Sekunden

Erst bei einer Auflagezeit von 45 Sekunden bei -60°C war die Ulcusgröße von ausreichendem Durchmesser und reproduzierbar.

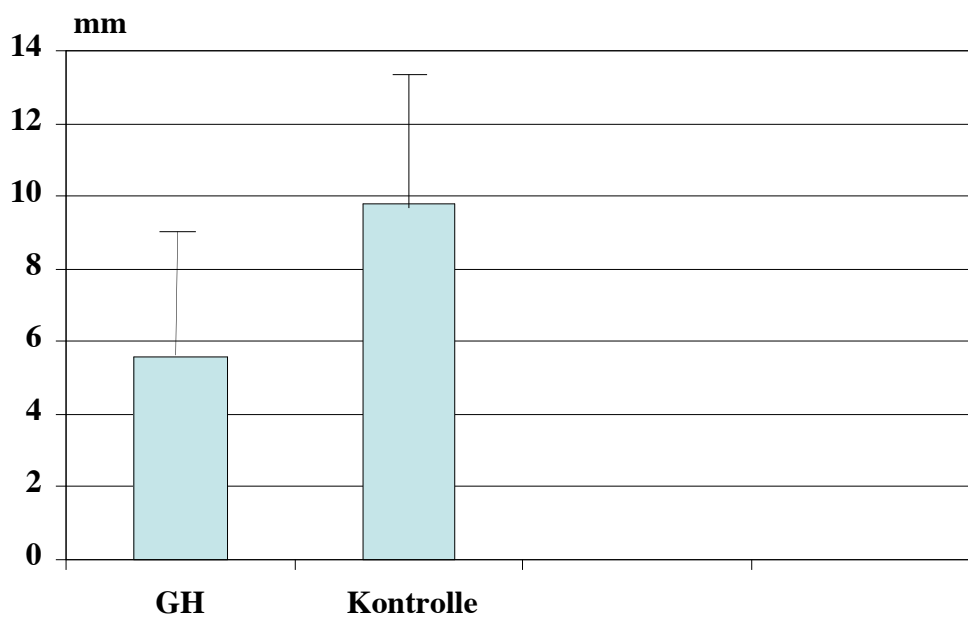
1.2 Planimetrische Auswertung der Ulcusgröße

Die planimetrische Auswertung der Ulcusgröße sieben Tage postoperativ nach Ulcusinduktion, ergab für die Versuchsgruppe nach systemischer Behandlung mit Wachstumshormon einen Mittelwert von $5.6 \text{ mm} \pm 0.83$ [2mm – 11mm]. Die Standardabweichung betrug 2.63mm.

Bei der Kontrollgruppe ergab sich nach entsprechender Verabreichung von Solvens ein Mittelwert von $9.8 \text{ mm} \pm 1.05$ [6mm – 15mm]. Die Standardabweichung betrug 3.33 mm.

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0,003$ und somit eine eindeutige Signifikanz.

Abbildung 1: Mittelwert und Standardabweichung der Auswertung der Ulcusgröße bei Versuchsende durch Folienplanimetrie



1.3 Auswertung der Photoplanimetrie

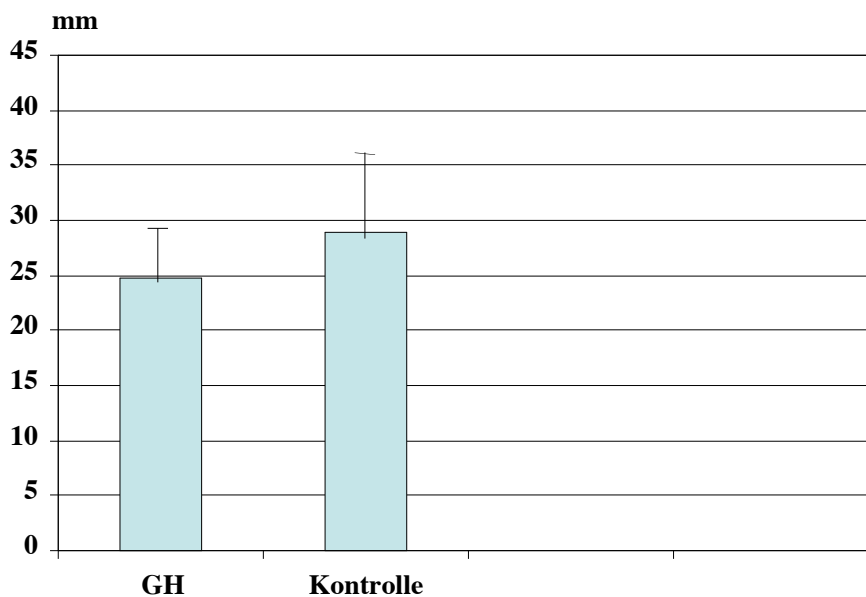
Auswertung der Ulcusgröße durch Vermessen der DIA-Aufnahmen. 10mm vom Dia entsprechen 1mm.

Für die Versuchsgruppe ergab sich ein Mittelwert von $24.7\text{mm} \pm 1.55$ [18mm – 35mm]. Die Standardabweichung beträgt 4.901mm.

Für die Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von $29.0\text{mm} \pm 2.04$ [18mm – 38mm]. Die Standardabweichung beträgt 6.45mm.

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0,089$ und somit eine eindeutige Signifikanz.

Abbildung 2: Mittelwert und Standardabweichung der Auswertung der Ulcusgröße bei Versuchsende durch Photoplanimetrie



1.4 Durchmesser des Granulationsgewebes

Bestimmung des Durchmessers des Granulationsgewebes anhand histologischer Auswertung der HE-gefärbten Präparate. Die Auswertung

erfolgte nur an gleich fixierten Präparaten (4% Paraformaldehyd), da die Gewebe bei der Fixierung einer Schrumpfung unterliegen.

Für die Versuchsgruppe ergab sich ein Mittelwert von $1.45\text{mm} \pm 0.12$

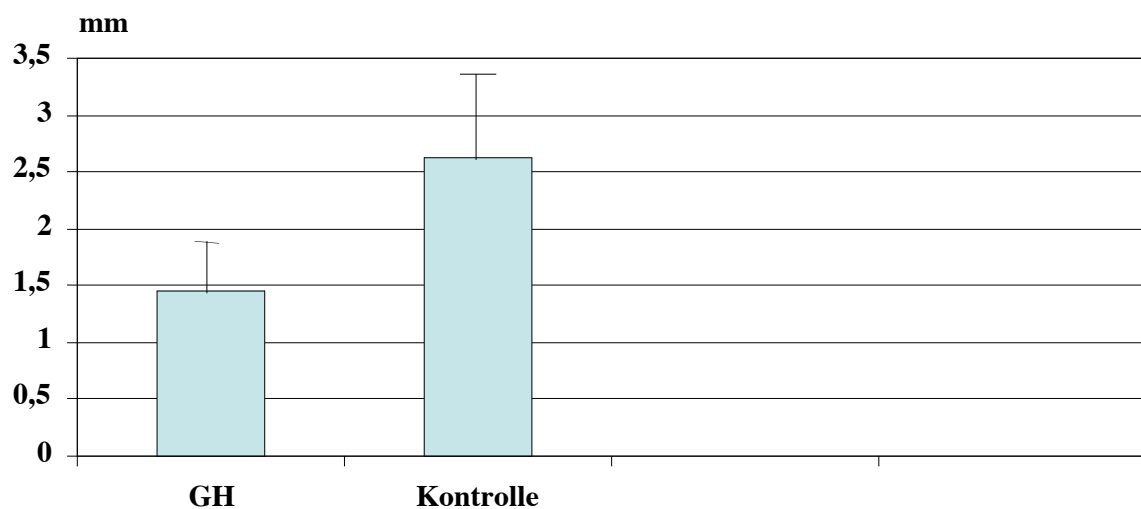
[$0.9\text{ mm} - 1.45\text{ mm}$]. Die Standardabweichung beträgt 0.34 mm .

Für die Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von $2.62\text{ mm} \pm 0.18$

[$1.8\text{ mm} - 3.4\text{ mm}$]. Die Standardabweichung beträgt 0.54 mm .

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = <0.0001$ und somit eine eindeutige Signifikanz.

Abbildung 3: Mittelwert und Standardabweichung der Auswertung der Ulcusgrösse bei Versuchsende durch Histoplanimetrie



2. Gewichtsverlauf

Darstellung der Differenz aus präoperativem Gewicht (in g) und Gewicht bei Versuchsende nach 7 Tagen .

Für die Versuchsgruppe ergab sich ein Mittelwert von $42.9\text{ g} \pm 9.86\text{ g}$

[$18\text{ g} - 104\text{ g}$]. Die Standardabweichung beträgt 31.19 g .

Für die Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von $0.7\text{ g} \pm 10.32\text{ g}$

[-49g – 53g]. Die Standardabweichung beträgt 32.62g.

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0.002$. Somit ergibt sich ein signifikanter Unterschied des postoperativen Gewichtsverlaufs.

Die mit Wachstumshormon behandelten Tiere weisen eine deutliche Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

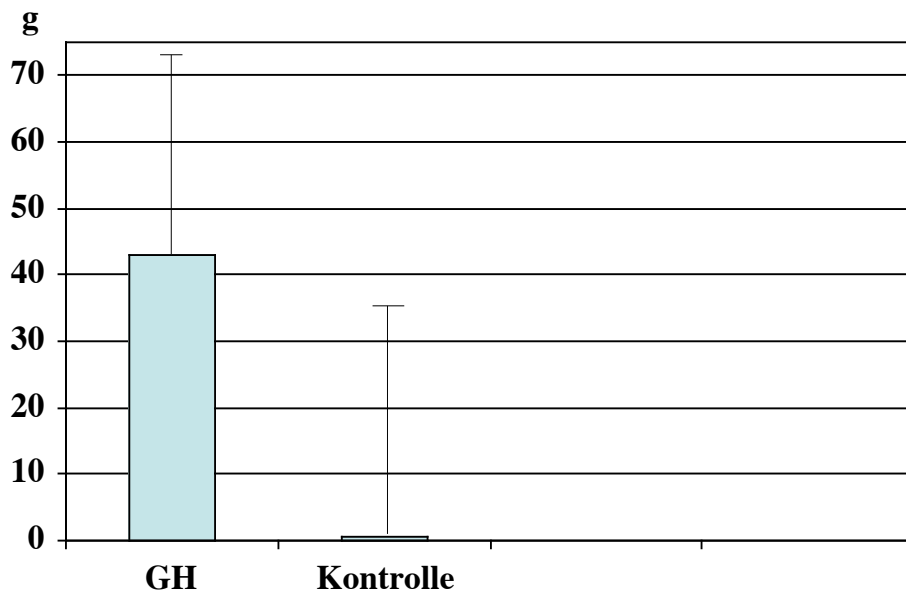


Abbildung 4: Mittelwert und Standardabweichung der Differenz aus prä- und postoperativem Gewicht bei Versuchsende

3. Werte der Plasmaspiegel von Insulin-like growth factor-I

IGF-I Serumwerte bei Versuchsende nach sieben Tagen. Die Blutproben wurden allen Tieren bei Organentnahme aus der rechten Herzkammer entnommen.

Für die Versuchsgruppe ergab sich ein Mittelwert von $1032.2 \text{ U} \pm 36.1 \text{ U}$ [878 U – 1222 U]. Die Standardabweichung beträgt 114.2 U.

Für die Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von $697.2 \text{ U} \pm 33.8 \text{ U}$ [544 U – 937 U]. Die Standardabweichung beträgt 106.9 U.

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0,0001$. Somit ergibt sich ein hoch signifikanter Anstieg der IGF-I Serumwerte nach sieben Tagen systemischer Applikation von Wachstumshormon im Vergleich zur Kontrollgruppe.

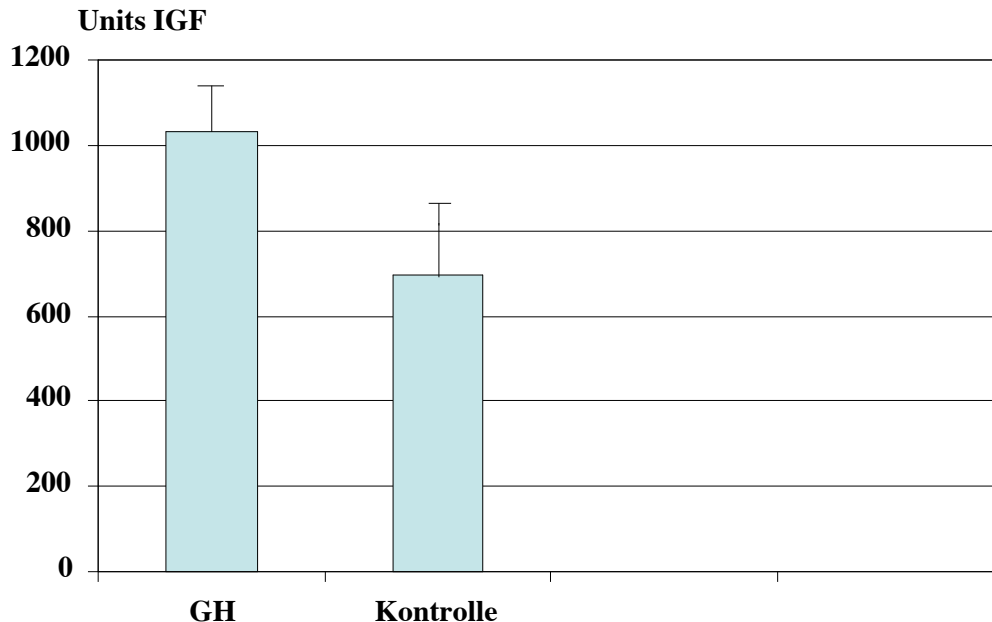


Abbildung 5: Mittelwert und Standardabweichung der IGF-Serumwerte bei Versuchsende

4. Immunhistochemie

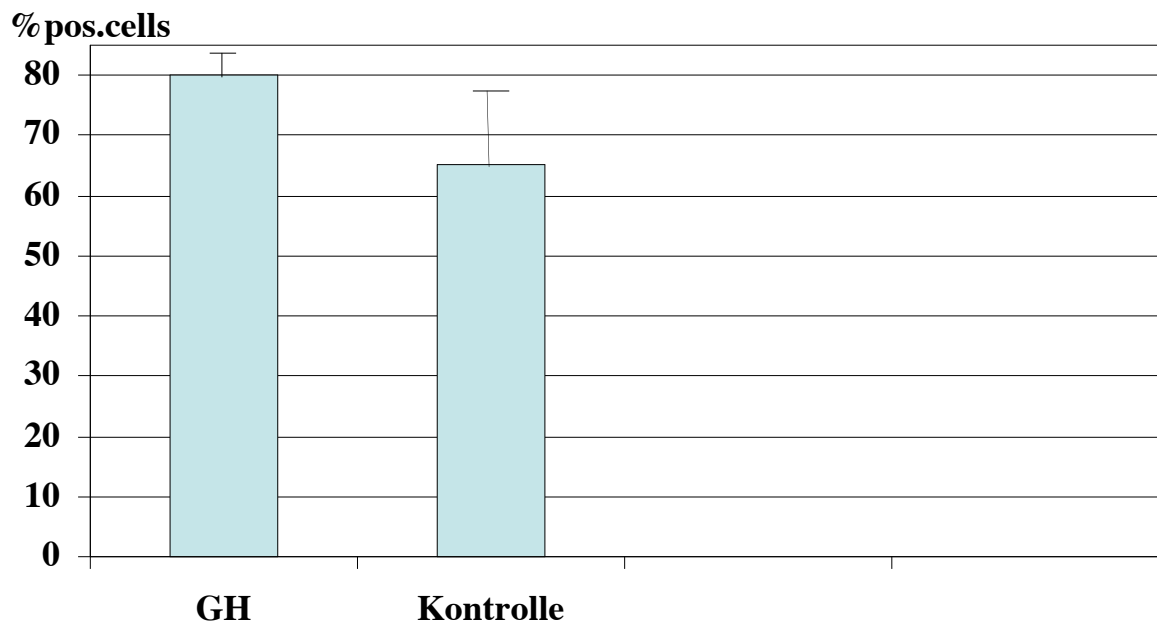
4.1 PCNA-Färbung

Es wurde der Zell-Index berechnet. Somit ergab sich das Verhältnis der positiven Zellen (in %) zur Gesamtzellzahl.

Für die Versuchsgruppe ergab sich bei den statistisch errechneten Daten ein Mittelwert von $79.74 \% \pm 0.96$ [$76.09\% - 85.27\%$]. Die Standardabweichung beträgt 3.03%. Für die Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von $65.14\% \pm 1.79$ [$56.57\% - 73.07\%$]. Die Standardabweichung beträgt 5.67%.

Das Signifikanzniveau ergab einen p-Wert von $p = 0.0001$. Dies zeigt die deutliche Zunahme der sich in Teilung befindenden Zellen bei den Tieren, die systemisch mit Wachstumshormon behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher Solvens verabreicht wurde.

Abbildung 6: Mittelwert und Standardabweichung des Zellindex der sich in Teilung befindenden Zellen (PCNA)



4.2 Anti- α Smooth Muscle Actin-Färbung

Bei der Auswertung der Anzahl der Gefäße im Wundrand wurde wie bei der PCNA-Färbung der Zell-Index berechnet.

Mit einem monoklonalen Anti- α Smooth Muscle Actin können alle Gefäße dargestellt werden außer den Kapillaren. Für die Versuchsgruppe ergab sich ein Mittelwert von 1762.3 ± 124.6 [1299 – 2466]. Die Standardabweichung beträgt 394.1.

Für die Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von 1096.8 ± 92.6 [772 – 1632]. Die Standardabweichung beträgt 292.8.

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p=0,001$. Die Anzahl der Gefäße am Wundrand bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren zeigt sich also signifikant erhöht, gegenüber der Kontrollgruppe.

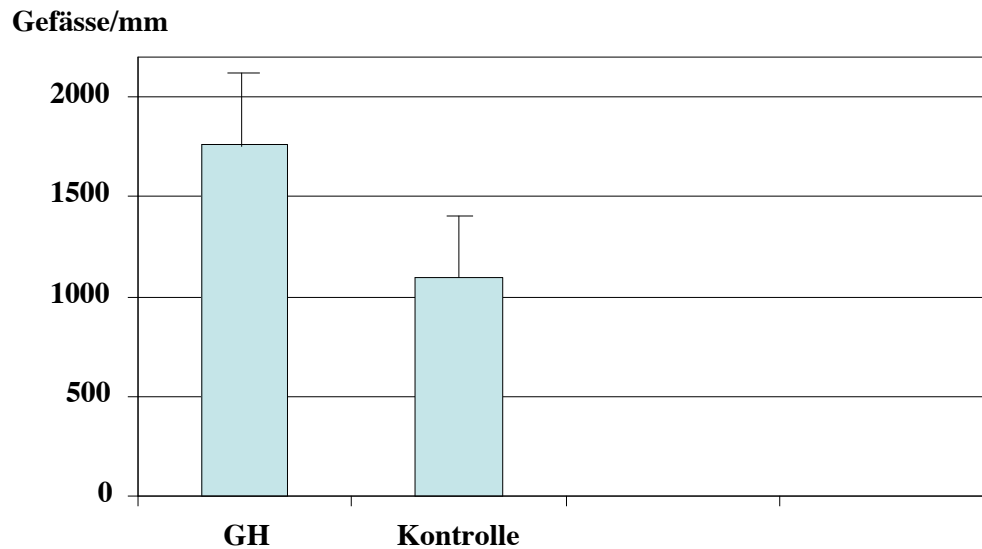


Abbildung 7: Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl der Gefäße am Wundrand pro Quadratmillimeter

E) Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß von Wachstumshormon auf die gastrale Wundheilung am Modell der Ratte aufgezeigt werden. Die Studie zeigt, daß systemisch verabreichtes GH die gastrale Wundheilung stimuliert, nach experimenteller Kryoiduktion der Ulcera. Die positive Wirkung des GH verdeutlicht sich sowohl in einer signifikanten Abnahme der Ulcusgröße, als auch in einer gesteigerten Zellproliferation und Angiogenese. Diese Effekte müßte GH durch Stimulation der IGF-I-Synthese, durch direkte Wirkung an GH-Rezeptoren und durch seinen anabolen Stoffwechseleinfluß erbringen.

Der Einfluss von GH auf den Organismus ist charakterisiert durch eine direkte, akute, sofortige Wirkung auf gewisse Zielorgane über GH-Rezeptoren und einen langanhaltenden Einfluss, welcher über Mediatoren vermittelt wird. Die GH-Rezeptoren sind Mitglieder einer Superfamilie, zu der auch der Prolaktinrezeptor, einige Cytokine Rezeptoren und der lösliche Rezeptor GHBP gehören. Die direkte anabole Wirkung von GH beeinflusst die Lipolyse durch Stimulation von Beta-adrenergen Rezeptoren in den Adipozyten, Mobilisation von Fettsäuren aus den Fettdepots und Verschiebung hin zur Muskelmasse. Proteinsynthese, Aminosäuretransport in die Muskelzellen, Glukoseuptake und Oxidation werden ebenso wie der Knochenumsatz gesteigert. Insgesamt besitzt GH einen direkten Effekt auf den Metabolismus der Kohlenhydrate, Fette und Eiweisse, die in ihrer Natur insulinähnlich sind. Die Effekte sind insgesamt aber transient und nach repetierter Zufuhr (pulsatile Ausschüttung) von GH werden die peripheren Wirkungen schwächer, wahrscheinlich aufgrund von Feedback-Mechanismen, eher aber aufgrund einer verminderten lokalen Gewebeantwort.

Wohl zur Minimierung dieser Abschwächung wird GH pulsatil mit einem Tag-Nachtrhythmus ausgeschieden.

Die indirekte Wirkung von GH durch Stimulation der Produktion von IGF-1 in der Leber lässt keinen Rhythmus mehr erkennen und weist demzufolge eine ausgeglichene 24 Stundenwirkung auf.

Die Auswertung des postoperativen Gewichtsverlaufs ergab eine deutliche Gewichtszunahme der mit Wachstumshormon behandelten Tiere, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0.002$). Wachstumshormon wirkt hauptsächlich lipolytisch und steigert vor allem die Proteinsynthese und den Aminosäuretransport in die Zelle, ohne die Proteolyse wesentlich zu beeinflussen. Außerdem besitzt exogenes Wachstumshormon einen kurzen insulinähnlichen Effekt. Die akute Streßantwort des Metabolismus ist von einer Steigerung des Energiebedarfs, verbunden mit erheblich gesteigertem Proteinabbau gekennzeichnet. Dem steht eine geringere Steigerung der Proteinsynthese gegenüber. Weder parenterale noch enterale Ernährung können während kataboler Phasen die Proteinhomöostase erhalten. Das anabole Potential einer adjuvanten Wachstumshormontherapie zeigte in

klinischen Studien überzeugende Verbesserungen der metabolischen Situation bei Patienten. Es kommt zu einer deutlichen Stabilisierung des Proteinhaushalts und zu einer Reduktion des Gewichtsverlusts. Christensen et al konnten in ihrer Studie über die erhöhte Reißfestigkeit von Colon-Anastomosen nach Wachstumshormontherapie eine gesteigerte Gewichtszunahme der Versuchsgruppe um 14% im Vergleich mit den Kontrolltieren aufweisen. Vara-Thorbeck et al. beschreiben zusätzlich erhöhte postoperative Level von Serumalbumin und Immunglobulinen bei GH-behandelten Patienten nach elektiver Cholecystektomie. Die Verbrennungspatienten, welche in der Studie von Ramirez et al. mit exogenem Wachstumshormon behandelt wurden, benötigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe 65% weniger Albumin-Substitution. Dies läßt insgesamt auch einen günstigen Einfluß des Wachstumshormons auf die Albuminsynthese in der Leber vermuten.

Die Untersuchung der gastralen Wundheilung ist prinzipiell mit unterschiedlichen Tiermodellen möglich. So kann die Ulcusinduktion durch lokale Applikation von 100% Essigsäure auf den Serosaüberzug der Magenwand erfolgen. Nach einer Einwirkungszeit von 90 Sekunden folgt eine gründliche Spülung mit isotoner Kochsalzlösung (Konturek et al 1997). Chronische Ulcera können auch durch mehrtägige Verabreichung von 0.1% Iodoacetamid im Trinkwasser induziert werden. Weitere Möglichkeiten der Ulcusinduktion wären zum einen die orale Gabe von 1ml HCl mit einer anschließenden Nüchternperiode von 18h und zum anderen die i.v.-Applikation von 2-Desoxy-D-Glucose. Durch die chemische Induktion können allerdings Größe, Tiefe und Lokalisation nicht exakt festgelegt werden. Diese Parameter sind jedoch durch das angewandte Verfahren der Ulkusinduktion mittels Laparotomie und Kryosonde definiert und reproduzierbar bei geringer Standardabweichung und Variabilität. Ein weiterer großer Vorteil des angewandten Modells besteht darin, daß keine Substanzen systemisch oder intraperitoneal wirken und somit unbemerkten und ggf. unbekanntem zusätzlichen Einfluß auf die Immunologie der Wundheilung nehmen können. Da in dieser Arbeit auch eine quantitative Bewertung der Ulcera erfolgte, ist die Reproduzierbarkeit von Größe und Tiefe ein wichtiger Aspekt.

Desweiteren wird bei der technischen Induktionsmethode keine chemische Substanz eingesetzt, welche die Therapie mit Wachstumshormon zusätzlich beeinflussen könnte. Deshalb wurde für dieses Studiendesign die Ulcusinduktion mittels Kryosonde gewählt.

Die planimetrische Auswertung der Ulcera nach sieben Tagen ergab eine signifikante Reduktion der Ulcusgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0.003$) unter systemischer Behandlung mit Wachstumshormon in einer Dosierung von 2,5 mg/ kg Körpergewicht. Dieses Ergebnis wird durch die Beurteilung der Ulcera am HE-gefärbten Präparat bestätigt. Auch bei der Auswertung des Granulationsgewebes konnte eine signifikante Reduktion des Durchmessers des Granulationsgewebes beobachtet werden ($p = <0.001$). Dies kann als Hinweis auf eine fortgeschrittene Wundheilung gewertet werden. Somit kann in dieser Arbeit der stimulierende Effekt des GH auf die Abheilung der Ulcera durch drei unterschiedliche Messmethoden nachgewiesen werden.

Der stimulierende Effekt von humanem Wachstumshormon auf den Prozeß der Wundheilung war in den letzten Jahren Gegenstand vieler Forschungsarbeiten.

Die Auswirkungen von GH auf die Wundheilung, wurden z.B. an verschiedenen Hautdefekten untersucht.

Der Kollagengehalt des Bindegewebes und die Balance zwischen Kollagenauf- und abbau spielen eine zentrale Rolle bei der Wundheilung. Die wichtigsten Zellen für die Kollagenproduktion sind die Fibroblasten. In vitro Experimente zeigten, daß Wachstumshormon eine Stimulation der Fibroblasten bewirkt (Christensen et al 1990).

Ein gut beschriebenes Modell, um die in vivo Effekte von GH auf die Neuf ormation von Granulations- und Bindegewebe zu evaluieren, bietet ein subkutan implantierter Celluloseschwamm bei der Ratte. Jorgensen et al zeigten in ihrer Studie, daß es nach 7-tägiger systemischer Verabreichung von Wachstumshormon möglich ist, sowohl den Kollagengehalt des Granulationsgewebes, als auch die mechanische Stärke der Wunden zu verbessern. Der beste Effekt wurde erzielt, wenn die Behandlung 7 Tage vor Implantation begonnen wurde. In den Schwämmen wird Kollagen

hauptsächlich von Fibroblasten gebildet und Wachstumshormon stimuliert deren Proliferationsrate. Fibroblasten sind aber während der Proliferationsphase nicht in der Lage extrazelluläre Proteine zu bilden. Dies könnte der Grund sein, für die besseren Resultate bei bereits präoperativem Therapiebeginn. Die Stimulation erreichte ihr Maximum bei einer GH-Dosis von 2,0mg/kg/Tag (Jorgensen et al 1987).

In einem anderen Modellansatz wurde der Ratte am Rücken ein Mash-Graft bis auf die subkutane Muskelschicht entnommen und nach gründlicher Blutstillung sofort wieder replaziert und fixiert. Die systemische GH-Therapie begann bereits 2 Tage präoperativ. Es zeigte sich eine deutlich verbesserte Adhärenz des Grafts bei der Versuchsgruppe, was auf eine verbesserte Durchblutungssituation hinweisen könnte. Der postoperative Gewichtsverlust wurde durch das Wachstumshormon positiv beeinflusst (Jorgensen et al 1992).

Den positiven Effekt von Wachstumshormon machte man sich auch in der Verbrennungschirurgie zunutze. Die erste klinische prospektive Studie über die Wirkung von Wachstumshormon auf die Wundheilung bei Verbrennungspatienten wurde 1988 von Shernan et al. veröffentlicht. Bei einer Hormondosis von 10mg pro Tag wurde eine signifikante Verringerung der Heilung der Spalthautentnahmestelle von 10 auf 8 Tage beobachtet. Beim Abheilen der Verbrennungswunden kommt es unter Wachstumshormontherapie zu einer signifikant beschleunigten Bildung der Basallamina. Ebenso konnte gezeigt werden, daß Wachstumshormon die Proteinsynthese um bis zu 25% steigerte und die Proteinbalance bei diesen katabolen Verbrennungspatienten entscheidend verbesserte, vermutlich durch den erhöhten IGF-1 Serumlevel (Ramirez et al 1998).

Beim Betrachten dieser Studien wird deutlich, daß der positive Einfluß von Wachstumshormon auf verschiedenen Mechanismen basieren muß: Der Einfluß von Wachstumshormon kann zum Einen aus seinen anabolen Effekten resultieren, welche die meist katabole Stoffwechsellage in der Rekonvaleszenz von Verletzungen günstig beeinflussen.

Zum Anderen interagiert Wachstumshormon direkt mit seinen spezifischen Rezeptoren und übt unmittelbaren, trophischen Einfluß auf die Epithelien, die glatten Muskelzellen und die Fibroblasten aus.

Bei intakten endokrinen Regelkreisläufen führt die Ausschüttung von GH aus der Hypophyse zur Produktion von IGF-I in der Leber und im mesenchymalen Bindegewebe. Es ist bekannt, daß zusätzlich zum direkten Effekt von Wachstumshormon auf mesenchymales Gewebe auch ein indirekter, IGF-I vermittelter, Einfluß existiert (Raschke et al 2000). Deshalb kann die Wirkung von Wachstumshormon letztlich auch begründet sein, durch indirekte Effekte, aufgrund einer Stimulation der IGF-I-Produktion.

Um die endokrine Antwort der Wachstumshormon – Applikation zu überprüfen, wurden die Serumspiegel von Insulin-like growth factor (IGF-I) bestimmt. Ein systemischer Anstieg von IGF-I nach Verabreichung von Wachstumshormon bedeutet, daß der Wachstumshormon – IGF-I Regelkreis intakt ist, und daß eine IGF-I Antwort hervorgerufen wurde. Der hoch signifikante Anstieg von IGF-I ($p=0.0001$) auf die tägliche Applikation von 2.5mg/kg/KG Wachstumshormon bedeutet, daß das Hormon in dieser Studie ausreichend hoch dosiert war. Neue Arbeiten zeigen ,daß eine Korrelation zwischen dem IGF-I-Spiegel in der Wundflüssigkeit und dem Serumspiegel besteht (Wicke et al).

Die oben aufgeführte Hypothese, daß die Wirkung von Wachstumshormon auf die Wundheilung als Folge des proliferationsfördernden Effekts von IGF-I an verschiedenen Geweben zu bewerten ist, wird durch die weiteren immunhistologischen Auswertungen unterstützt. Die Ergebnisse der PCNA – Färbung zeigen eine signifikant gesteigerte Zellteilungsaktivität im Wundrand ($p=0.0001$) und bestätigt die von vielen Autoren bereits beschriebene Funktion des IGF-I als potentes Mitogen, das die Zelldifferenzierung und Zellreplikation beeinflusst (Moses et al 1980, Pierson et al 1972, Qu et al 1999).

In Studien mit hypophysektomierten Ratten verringerte sich der Wundgehalt an IGF-I um bis zu 90%. Die Zellreplikationsrate ging zurück und die Kollagenexpression war beeinträchtigt. Experimentelle Wunden, in welchen

freies IGF-I durch hohe Dosen von IGF-Bindungsprotein gebunden war, zeigten eine Reduktion der Kollagenproduktion um 40% und deuten auf die wichtige Rolle von IGF-I in der Wundheilung hin. Untermuert wird dies durch die Tatsache, daß in vielen Quellen IGF-I Wundspiegel während des Heilungsprozesses von bis zu zwei Dritteln der Plasmakonzentrationen beschrieben werden (Mueller et al 1994).

Gilhar et al. untersuchten in diesem Zusammenhang den Effekt von Antiinsulin-like growth factor I auf die epidermale Proliferation während einer Wachstumshormon-Behandlung. Sie verpflanzten menschliche Haut auf nackte Mäuse und verabreichten ihnen Wachstumshormon. Dabei zeigte sich eine signifikant gesteigerte epidermale Proliferationsrate. Die intradermale Injektion von anti-IGF-I reduzierte signifikant diesen stimulierenden Effekt von Wachstumshormon auf die Proliferation (Gilhar et al 1994).

Auch Steenfos et al beschrieben die Rolle von IGF-I als Mediator der Effekte von GH auf die Wundheilung. Sie zeigten eine erhöhte Expression der IGF-I-Gene, sowie erhöhte IGF-I-Spiegel in der Wundflüssigkeit von Hautinzisionen nach GH-Behandlung (Steenfos et al 1992).

Diese Daten unterstützen die These, daß die Effekte von Wachstumshormon auf die Wundheilung durch IGF-I vermittelt werden.

Am komplexen Prozeß einer optimalen Wundheilung kommt der Angiogenese eine entscheidende Bedeutung zu. Durchblutung und Gefäßversorgung sind maßgebliche und limitierende Faktoren bei der Wundheilung und deren Vorhandensein ist Basis und Voraussetzung für den weiteren Verlauf. Spärlich vaskularisiertes Granulationsgewebe ist keine gute Grundlage für die Re-epithelialisierung und dies könnte ein Hauptgrund für die schlechte Qualität der Ulcusheilung und das Auftreten von Rezidiven darstellen. Die Angiogenese basiert auf der Ausweitung des Gefäßnetzes durch differenzierte Endothelzellen Wachstumsfaktoren stimulieren die Migration und Proliferation von Endothelzellen. Weitere wichtige Elemente dieses komplexen Prozesses sind die Ausbildung eines Lumens und der Erhalt oder Umbau der neu gebildeten Gefäße (Kalka et al 2000).

IGF-I ist ein wichtiges Mitogen für glatte Muskelzellen in den Gefäßen und steigert deren Proliferation sowohl in vitro, als auch in vivo (Chen et al 1998).

In der Literatur wird IGF-I eine essentielle Rolle bei der Angiogenese zugeschrieben. Dies steht im Einklang mit der immunhistologischen Auswertung der Gefäßzahl, ermöglicht durch Anfärben des Aktins in den glatten Muskelzellen der Präparate. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte Anzahl der Gefäße am Wundrand ($p=0,001$) bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren, im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Auch dies wurde als weiterer, durch IGF-I vermittelter Effekt von GH und als zusätzlicher Hinweis auf eine fortgeschrittene Wundheilung bewertet.

Bereits 1955 wurde von Leblond und Carriere erstmals ein mitogener Effekt von GH auf die Lieberkühn'schen Krypten des Duodenum beschrieben. Neben der Wachstumsförderung beeinflusst GH auch die intestinale Physiologie, im Sinne einer Förderung des Elektrolyttransports, der Calciumabsorption und der Vitamin-D-abhängigen Synthese des Calcium-Bindungs-Proteins. Wachstumshormon steigert zudem den Gastrin- und Somatostatingehalt im Magen der Ratte. Lobie et al beschäftigten sich mit der Frage, ob diese Einflüsse der direkten Wirkung an spezifischen GH-Rezeptoren zuzuschreiben sind, oder ob sie indirekt durch GH abhängige IGF-I-Produktion vermittelt werden. Sie bestimmten deshalb immunhistochemisch die Verteilung der GH-Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt. Die intensivste heterogene Reaktivität wurde in den Epithelzellen der Mucosa beobachtet. Mesenchymale Elemente des GIT waren homogen und nur moderat reaktiv. Die Autoren erklärten diese Verteilung als übereinstimmend mit einschlägiger Literatur, welche Wachstumshormon eine proliferative und differenzierende Rolle im GIT zuschreibt. Im Magen zeigte sich intensive Immunreaktivität an den Oberflächenepithelzellen und den Hauptzellen der Drüsen. Keine Reaktivität fand sich bei den basalen Drüsenzellen der Kardie und des Pylorus, sowie bei den Oberflächenepithelzellen des Fundus. Man kann daraus schließen, daß an einigen epithelialen Zellpopulationen und ihren Derivaten GH eine direkte Wirkung entfaltet. Auch Insulin-like growth factor I zeigt eine heterogene Verteilung im Gastrointestinaltrakt und alle Lokalisationen weisen sowohl IGF-I, als auch GH – Rezeptor Aktivität auf. Diese Forschungsergebnisse würden zu einem Teil der Somatomedin – Hypothese passen, welche aussagt, daß

die Wirkungen des Wachstumshormons durch GH-abhängige lokale, wie auch hepatische Produktion von IGF-I vermittelt werden (Daughaday 1989).

Christensen et al untersuchten den stimulierenden Effekt von Wachstumshormon auf das Abheilen experimenteller Colon – Anastomosen bei der Ratte. Sie erreichten eine erhöhte Reißfestigkeit der Anastomosen, wenn die Tiere während der Wundheilungsphase mit Wachstumshormon behandelt wurden. Die besten Resultate wurden erzielt, wenn die Hormongabe bereits 7 Tage präoperativ erfolgte. Dieser positive Einfluß auf die Reißfestigkeit der Anastomosen wurde durch einen deutlich erhöhten Kollagengehalt im Wundsegment erzielt. Die Autoren konnten in ihrer Studie eine gesteigerte Gewichtszunahme der mit Wachstumshormon behandelten Tiere um 14% im Vergleich mit den Kontrolltieren aufweisen (Christensen et al 1990/1994). Auch Jiang et al. konnten in einer Studie mit Patienten nach einem großen elektiven Eingriff am Gastrointestinaltrakt, welche anschließend mit einer niedrigen Dosis Wachstumshormon behandelt wurden, einen signifikant reduzierten postoperativen Gewichtsverlust beobachten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß auch der anabolen Potenz von GH eine wichtige Rolle zukommt bei der verbesserten Wundheilung.

IGF-I Immunreaktivität wurde an verschiedenen Epithelzellen des GIT, sowie im Pankreas und in Speicheldrüsen lokalisiert ⇒ alle diese Regionen zeigten auch GH-Rezeptoren, was für eine zusätzliche indirekte Wirkung über GH-vermittelte IGF-I-Synthese spricht (Lobie et al 1990).

Das Ziel der Studie von Petersen et al war es, den Effekt einer exogenen Behandlung mit IGF-I auf das Abheilen experimenteller Colon-Anastomosen bei der Ratte zu untersuchen. Betrachtet wurde die wichtige frühe Heilungsphase in den ersten 3 postoperativen Tagen. Durch die Therapie konnte ein um 23% erhöhter Kollagengehalt der Anastomosen erreicht werden und eine deutliche postoperative Gewichtszunahme. Die Reißfestigkeit der Anastomosen blieb durch die IGF-I-Gabe allerdings unbeeinflusst (Petersen et al 1995).

In eigenen Studien wurde bereits die Wundheilung kryoinduzierter Magengeschwüre bei der Ratte unter lokaler IGF-I Behandlung untersucht.

Die perifokale Infiltration von IGF-I führte zu einer beschleunigten Ulcusheilung, repräsentiert durch signifikante Reduktion der Ulcusgröße. Die zelluläre Produktion von IGF-I und die Zellproliferation nahmen zu. Desweiteren kam es zu einer gesteigerten Angiogenese und Makrophagenrekrutierung (von Kiparski 1999).

Insgesamt müssen die positiven Effekte der GH-Therapie auf die gastrale Wundheilung als Synergismus, aus direkter Wirkung über GH-Rezeptoren, aus indirekter Wirkung durch gesteigerte IGF-I Produktion und durch seinen anabolen Stoffwechseleinfluß, betrachtet werden.

Weiterführende Versuche, in denen Wachstumshormon in Kombination mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und / oder mit säuresekretionshemmenden Pharmaka eingesetzt wird, simultan und in zeitlichem Abstand, könnten weitere Erkenntnisse zur optimalen Ulcusbehandlung erbringen und zum Verständnis des komplexen GH-Wirkmechanismus beitragen.

Insgesamt konnten wir eine verbesserte Abheilung des Magenulcus der Ratte nach Behandlung mit GH zeigen. Der positive Einfluss des Wachstumshormons lässt sich, zumindest teilweise, auf die Stimulation der Zellproliferation und Angiogenese zurückführen. Ein zusätzlicher Benefit ergibt sich aus dem inhibitorischen Effekt des GH auf die Magensäureproduktion. Die vorliegenden Ergebnisse einer überzeugenden positiven Wirkung des exogen verabreichten Wachstumshormons, auf die Heilung kryoinduzierter Magenulcera bei der Ratte könnten in Zukunft neue Therapieansätze ergeben.

F) Zusammenfassung

Die Abheilung der gastralen Ulcera beinhaltet die Wiederherstellung der epithelialen Strukturen und des darunter liegenden Bindegewebes durch Zellproliferation, Migration und Differenzierung. Die systemische Applikation von Wachstumshormon (GH) zeigte anabolische Effekte sowohl bei der postoperativen Therapie, wie auch bei der Behandlung von Verbrennungen,

durch Steigerung der Proteinsynthese und Herabsetzung des Proteinkatabolismus. Es gibt zudem Belege, dass GH die Zellproliferation und Differenzierung stimuliert. In der vorliegenden Studie wird der Einfluss von GH auf die Abheilung des gastralen Ulcus evaluiert.

Die Magenulcera wurden mit einer Kryosonde bei männlichen Wistar-Ratten induziert ($285 \pm 11\text{g}$). Die erste Gruppe der Tiere ($n=10$) erhielt während einer Woche täglich eine Dosis GH von $2,5\text{mg/kg KG}$ subkutan injiziert. Der zweiten Tiergruppe wurde lediglich Kochsalzlösung verabreicht. Nach 7 Tagen wurde die Ulcusgröße photoplanimetrisch bestimmt. Zellproliferation und Angiogenese im Ulcusrand wurden durch quantitative immunhistologische Färbungen für "proliferation cell nuclear antigen" (PCNA) und "smooth muscle actin" (SMA) jeweils ausgewertet.

Die systemische Verabreichung von GH bewirkte eine signifikante Zunahme des Körpergewichts ($332 \pm 7\text{g}$ vs $289 \pm 13\text{g}$). Die Ulcusgröße zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant reduziert ($5.5\text{mm}^2 \pm 0.8\text{mm}^2$ vs $9.9 \pm 1\text{mm}^2$). Die immunhistologischen Analysen offenbarten eine signifikante Steigerung der Zellproliferationsrate ($79.7 \pm 0.9\%$ pos. Cells vs $64.7 \pm 1.9\%$ pos. Cells), verdeutlicht durch die PCNA-Expression und eine signifikante Zunahme der Angiogenese ($1762 \pm 124\text{ cells/mm}^2$ vs $1067 \pm 77\text{ cells/mm}^2$) – demonstriert durch die SMA-Expression.

GH beschleunigt die gastrale Wundheilung durch Stimulation von Zellproliferation und Angiogenese.

G) Anhang

1. Ulcusgrößen

1.1 Planimetrische Auswertung der Ulcusgröße

Tabelle 1: Ulcusgröße sieben Tage postoperativ

Tier-Nr	Kontrolle in mm	Growth Hormon in mm
1	14	
2	11	
3	15	
4	13	
5		7
6		6
7		5
8		2
9		6
10	8	
11	10	
12		2
13	7	
14		7
15		11
16	6	
17		4
18	8	
19		6
20	6	

Statistisch ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 2: Für beide Versuchsgruppen wurden Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts, Varianz und Standardabweichung errechnet.

	Kontrolle	Growth Hormon
n:	10	10
Summe:	98	56
Mittelwert:	9,8	5,6
SD:	3,3267	2,6331
SE:	1,0520	0,8327
Minimum:	6	2
Median:	9	6
Maximum:	15	11
Varianz:	11,067	6,933

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0,003$ und somit eine eindeutige Signifikanz.

1.2 Auswertung der Ulcusgröße vom DIA

Tabelle 3: Darstellung der Ulcusgröße durch Vermessen der DIA-Aufnahmen.
10mm vom Dia entsprechen 1mm

Tier-Nr.	Kontrolle in mm	Growth Hormon in mm
1	38	
2	30	
3	37	
4	30	
5		35
6		25
7		28
8		18
9		25
10	18	
11	31	
12		25
13	31	
14		26
15		25
16	30	
17		18
18	20	
19		22
20	25	

Statistisch ergaben sich folgende Werte:

	Kontrolle	Growth Hormon
n:	10	10
Summe:	290	247
Mittelwert:	29,0	24,7
SD:	6,4464	4,9001
SE:	2,0385	1,5496
Minimum:	18	18
Median:	30	25
Maximum:	38	35
Varianz:	41,556	24,011

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0.089$ und somit eine eindeutige Signifikanz.

1.3 Durchmesser des Granulationsgewebes

Tabelle 4: Durchmesser des Granulationsgewebes anhand histologischer Auswertung der HE-gefärbten Präparate

Tier-Nr	Kontrolle in mm	Growth Hormon in mm
1	2,5	
2	2,9	
3	3,3	
4	3,4	
5		1,5
6		1,6
7		1,6
8		1,2
9		1,0
10	2,1	
11	2,7	
12		2,0
13	2,5	
14		1,4
15		1,8
16	2,0	
17		0,9
18	3,0	
19		1,5
20	1,8	

Die Auswertung erfolgte nur an gleich fixierten Präparaten (4% Paraformaldehyd), da die Gewebe bei der Fixierung einer Schrumpfung unterliegen.

Statistisch errechnete Werte:

	Kontrolle	Growth Hormon
n:	10	10
Summe:	26,2	14,5
Mittelwert:	2,62	1,45
SD:	0,5432	0,3408
SE:	0,1761	0,1188
Minimum:	1,8	0,9
Median:	2,6	1,5
Maximum:	3,4	1,45
Varianz:	0,295	0,116

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = <0.0001$, ein hochsignifikantes Resultat.

2. Gewichtsverlauf

Tabelle 4: Darstellung der Differenz aus präoperativem Gewicht und Gewicht bei Versuchsende nach 7 Tagen

Tier-Nr.	Kontrollgruppe in g	Growth Hormon in g
1	-10	
2	-33	
3	23	
4	-35	
5		21
6		50
7		37
8		20
9		25
10	53	
11	25	
12		25
13	-49	
14		18
15		94
16	19	
17		35
18	20	
19		104
20	-6	

Darstellung der statistisch errechneten Daten:

	Kontrolle	Growth Hormon
n:	10	10
Summe:	7	429,0
Mittelwert:	0,7	42,9
SD:	32,609	31,1928
SE:	10,3119	9,8640
Minimum:	-49	18
Median:	6,5	30
Maximum:	53	104
Varianz:	1063,344	972,989

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0,002$. Somit ergibt sich ein signifikanter Unterschied des postoperativen Gewichtsverlaufs. Die mit Wachstumshormon behandelten Tiere weisen eine deutliche Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

3. Werte der Plasmaspiegel von Insulin-like growth factor-I

Tabelle 5: IGF-I Serumwerte nach sieben Tagen

Tier-Nr.	Kontrolle	Growth Hormon
1	665	
2	701	
3	712	
4	678	
5		1047
6		1222
7		1102
8		915
9		1071
10	654	
11	937	
12		1039
13	744	
14		882
15		1152
16	583	
17		878
18	544	
19		1014
20	754	

Darstellung der statistisch errechneten Daten:

	Kontrolle	Growth Hormon
n:	10	10
Summe:	58	152
Mittelwert:	697.2	1032.2
SD:	106.9	114.2
SE:	33.8	36.1
Minimum:	544	878
Median:	698.5	1043
Maximum:	937	1222

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0,0001$. Somit ergibt sich ein hoch signifikanter Anstieg der IGF-I Serumwerte nach sieben Tagen systemischer Applikation von Wachstumshormon im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4. Immunhistochemie

4.1 PCNA-Färbung

Tabelle 6: Verhältnis der positiven Zellen (in %) zur Gesamtzellzahl

Tier-Nr.	Kontrolle %Positive Zellen	Growth Hormone %Positive Zellen
1	59,33	
2	65,48	
3	56,57	
4	58,45	
5		76,09
6		77,79
7		81,82
8		83,26
9		77,36
10	71,89	
11	69,46	
12		79,75
13	63,24	
14		85,27
15		79,10
16	66,47	
17		80,57
18	67,42	
19		76,35
20	73,07	

Darstellung der statistisch errechneten Daten:

% Positive Zellen

	Kontrolle	Growth Hormon
n:	10	10
Summe:	651,38	797,36
Mittelwert:	65,138	79,736
SD:	5,6741	3,0309
SE:	1,7943	0,9585
Minimum:	56,57	76,09
Median:	65,975	79,425
Maximum:	73,07	85,27
Varianz:	32,196	9,186

Das errechnete Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p = 0,0001$. Dies zeigt die deutliche Zunahme der sich in Teilung befindenden Zellen bei den Tieren, die systemisch mit Wachstumshormon behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher Solvens verabreicht wurde.

4.2 Gefäße

Tabelle 7 : Anzahl der Gefäße im Wundrand

Tier - Nr	Kontrolle Gefäße pro mm ²	Growth Hormone Gefäße pro mm ²
1	899	
2	1057	
3	1064	
4	787	
5		1699
6		1377
7		1427
8		1299
9		2466
10	1349	
11	772	
12		2089
13	1378	
14		2246
15		1476
16	1222	
17		1757
18	808	
19		1787
20	1332	

Mit einem monoklonalen Anti- α Smooth Muscle Actin können alle Gefäße dargestellt werden außer den Kapillaren. Durchblutung und Gefäßversorgung sind maßgebliche und limitierende Faktoren bei der Wundheilung und deren Vorhandensein ist Basis und Voraussetzung für den weiteren Verlauf. In den Arterien zeigt die Media einen großen Anteil an glatten Muskelzellen. Auch die Venenwand enthält neben Kollagenfasern und Retikulinfasern glatte

Muskelzellen und eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Media mit glatten Muskelzellen.

Darstellung der statistisch errechneten Daten:

	Kontrolle	Growth Hormon
n:	10	10
Summe:	62	148
Mittelwert:	1096.8	1762.3
SD:	292.8	394.1
SE:	92.6	124.6
Minimum:	772	1299
Median:	1060.5	1728
Maximum:	1632	2466

Das Signifikanzniveau ergab einen P-Wert von $p=0,001$. Die Anzahl der Gefäße am Wundrand bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren zeigt sich also signifikant erhöht, gegenüber der Kontrollgruppe.

H) Literatur

- 1)Baxter, R.C. (1986)
The somatomedins: insulin-like growth factors.
Clin Chemistry, **25**: 49-115

- 2)Baxter, R.C., Martin, J.L. (1989)
Structure of the Mr 140,000 growth hormon dependent insulin-like growth factor binding protein complex: Determination by reconstitution and affinity-labeling.
Proc. Natl. Acad. Sci, USA, **86** : 6898-6902

- 3)Bermont, L., Lamielle, F., Fauconnet, S., Esumi, H., Weisz, A., Adessi, G.L. (2000)
Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells.
Int J Cancer , **85** (1) : 117.123

- 4)Blum, W.F., Ranke, M.B. (1991)
Plasma IGFBP-3 levels as clinical indicators.
Elsiever, New York : 381-393

- 5)Chen, Y., Capron, L., Magnusson, J.O., Wallby, L.A., Arnqvist, H.J. (1998)
Insulin-like growth factor I stimulates vascular smooth muscle cell proliferation in rat aorta in vivo.
Growth Horm IGF Res , **8** (4) : 299-303

- 6)Cats, A., Dullaart, R.P., Kleibeuker, J.H., Kuipers, F., Sluiter, W.J., Hardonk, M.J., de Vries, E.G. (1996)
Increased epithelial cell proliferation in the colon of patients with acromegaly.
Cancer Res ; **56** (3) : 523-526

- 7)Christensen H., Oxlund, H., Laurberg, S. (1990)
Growth hormone increases the bursting strength of colonic anastomoses.
Int. J. Colorect. Dis. , **5** : 130-134

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

- 9)Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. (1998)
Innere Medizin
Urban&Schwarzenberg Verlag, München, 4. Aufl.

- 10)Coerper, S., Sigloch, E., Cox, D., Starlinger, M., Köveker, G., Becker, H.-D. (1997)
Recombinant human transforming growth factor beta 3 accelerates gastric ulcer healing in rats.
Scand J Gastroenterol ; **32** : 985-990

- 11) Daughaday, W.H., Mariz, I.Z. (1962)
Conversion of Prolin-U-C to labelled hydroxyproline by rat cartilage i.v.
J Lab Clin Med, **59**: 741-752
- 12) Daughaday W.H. (1989)
A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity.
Perspect Biol Med , **32** : 194
- 13) Daughaday, W.H., Rotwein, P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II: Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev, **10**: 68-86
- 14) Enberg, G., Carlquist, M., Jornvall, H., Hall, K. (1984)
The characterization of somatomedin A, isolated by microcomputer-controlled chromatography, reveals an apparent identity to insulin-like growth factor I.
Eur J Biochem, **143**: 117-124
- 15) Fineberg, S.E., Merimee, T.J. (1974)
Acute metabolic effects of human growth hormone.
Diabetes, **23** : 499
- 16) Fryburg, D.A., Louard, R.J., Gerow, K.E., Gelfand, R.A., Barrett, E.J. (1992)
Growth hormone stimulates skeletal muscle protein synthesis and antagonizes insulin antiproteolytic action in humans.
Diabetes, **41** : 424
- 17) Garrel, D.R., Gaudreau, P., Zhang, L., Reeves, I., Brazeau, P. (1991)
Chronic administration of growth hormone-releasing factor increases wound strength and collagen maturation in granulation tissue
J Surg Res, **51** : 297-302
- 18) Gilhar, A., Ish-Shalom, S., Pillar, T., Etzioni, A., Silbermann, M. (1994)
Effect of antiinsulin-like growth factor I on epidermal proliferation of human skin transplanted onto nude mice treated with growth hormone.
Endocrinology , **134** (1) : 229-232
- 19) Goad, D.L., Rubin, J., Wang, H., Tashjian, A.H. Jr., Patterson, C. (1996)
Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by IGF-I
Endocrinology, **137** (6) : 2262-2268
- 20) Guler, H.P., Zapf, J., Schmid, C., Froesch, E.R (1989)
Insulin-like growth factor I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates.
Acta Endocrinologica (Copenh.), **121** : 753-758

- 21)Heintze, K. (1989)
Pharmaka mit Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt, 343-344
In: Estler, Lehrbuch der allgemeinen und systemischen Pharmakologie und Toxikologie; 2. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart
- 22)Heldin, C.H., Wasteson, A., Fryklund, L., Westermark, B. (1981)
Somatomedin B: mitogenic activity derived from contaminant epidermal growth factor.
Science, **213**: 1122-1123
- 23)Hellstrom, A., Svensson, E., Carlsson, B., Niklasson, A., Albertsson-Wikland, K. (1999)
Reduced retinal vascularization in children with growth hormone deficiency.
J Clin Endocrinol Metab , **84** (2) : 795-798
- 24)Herington, A.C. (1991)
Insulin-like growth factors: biochemistry and physiology.
Balliere's Clin Endocrinol and Metabol, Vol.**5**, No.4
- 25)Ingemann-Petersen, P., Kissmeyer-Nielsen, P., Flyvbjerg, A., Laurberg, S., Christensen, H. (1996)
Effect of IGF-I administration on the healing of colonic anastomoses in rats.
Int J Colorect Dis, **11**: 19-24
- 26)Jiang, Z.M., He, G.Z., Zhang, S.Y., Wang, X.R., Yang, N.F., Zhu, Y., Wilmore, D.W. (1989)
Low-dose growth hormone and hypocaloric nutrition attenuate the protein-catabolic response after major operation.
Ann Surg , **210** (4) : 513-524
- 27) Jorgensen, P., Andreassen, T. (1987)
A dose-response study of the effects of biosynthetic human growth hormone on formation and strenght of granulation tissue
Endocrinology, **121** (5) : 1637-1641
- 28)Jorgensen, P., Andreassen, T. (1988)
Influence of biosynthetic human growth hormone on biomechanical properties of rat skin incisional wounds
Acta Chir Scand, **154** : 623-626
- 29)Jorgensen, P., Bang, Ch., Andreassen, T., Flyvbjerg, A., Orskov, H. (1995)
Dose-Response Study of the effect of growth hormone on mechanical properties of skin graft wounds
J Surg Res, **58** (3) : 295-301
- 30)Jyung, R.W., Mustoe, J.A., Busby, W.H., Clemmons, D.R (1994)
Increased wound-breaking strenght induced by insulin-like growth factor I in combination with insulin-like growth factor binding protein-I.
Surgery, **115** (2): 233-239

- 31)Kalka, C., Asahara, T., Krone, W., Isner, J.M. (2000)
Angiogenese und Vaskulogenese
Herz , **25** (6) : 611-621
- 32)Klapper, D.G., Svoboda, M.E., Van Wyk J.J. (1983)
Sequence analysis of somatomedin C: Confirmation of identity with insulin-like growth factor-I.
Endocrinology (Baltimore), **112**: 2215-2217
- 33)Komarcevic, A. (2000)
The modern approach to wound treatment
Med Pregl **53** (7-8) :363-368
- 34)Konturek, S.J., Radecki, T., Brzozowski, T., Piastucki, I., Dembinski, A. (1981)
Gastric cytoprotection by epidermal growth factor. Role of endogenous prostaglandins and DNA synthesis.
Gastroenterology ; **81** (3) : 438-443
- 35)Konturek, P.C., Brzozowski, T., Konturek, S.J., Ernst, H., Drozdowicz, D., Pajdo, R., Hahn, E.G. (1997)
Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha during ulcer healing.
Scand J Gastroenterol ; **32** (1) : 6-15
- 36)Konturek, P.C., Brzozowski, T., Konturek, S.J., Ernst, H., Faller, G., Klingler, C., Hahn, E.G. (1997)
Mucosal expression and luminal release of epidermal and transforming growth factors in patients with duodenal ulcer before and after eradication of Helicobacter pylori.
Gut ; **40** (4) : 463-469
- 37)Kostyo, J.L., Reagan, C. (1976)
The biology of growth hormone.
Pharmacol Ther, **2** : 591
- 38)Lee, P.D., Concover, C.A., Powell, D.R. (1993)
Regulation and function of Insulin-like growth factor-binding protein-I.
Proc Soc Exp Biol Med ; **204** (1) : 4-29
- 39)Le Roith, D. (1992)
Insulin-like growth factors in health and disease.
Ann. Intern Med, **116**: 854-862
- 40)Lin, B., Kinoshita, Y., Hato, F., Tsuji, Y. (1997)
Enhancement of DNA synthetic activity of thymic lymphocytes by the culture supernatant of thymus epithelial cells stimulated by growth hormone.
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) , **43** (3) : 351-359

- 41) Lobie, P.E., Breipohl, W., Waters, M.J. (1990)
Growth hormone receptor expression in the rat gastrointestinal tract.
Endocrinology , **126** : 299-306
- 42) Moses, A.C., Nissley, S.P., Short, P.A., Rechler, M.M., White, R.M., Knight, A.B., Higa, A.Z. (1980)
Increased levels of multiplication-stimulating activity, an insulin-like growth factor, in fetal rat serum.
Proc Natl Acad Sci USA, **77**: 3649
- 43) Mueller, R.V., Hunt, T.K., Tokunaga, A., Spencer, E.M. (1994)
The effect of insulin-like growth factor-I on wound healing variables and macrophages in rats.
Arch Surg, **129**: 262-265
- 44) Oertel, H., Strasburger, C.J., Kann, P., Quabbe, H.J. (1998)
Empfehlungen zur Indikation der Wachstumshormon-Substitution im Erwachsenenalter.
Dtsch med Wschr., **123** : 883-886
- 45) Ohshiro, K., Puri, P. (1998)
Increased insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor system in the pyloric muscle in infantile hypertrophic pyloric stenosis.
J Pediatr Surg, **33**,(2): 378-381
- 46) Pierson, R.W. jr., Temin, H.M. (1972)
The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity.
J Cell Physiol ; **79** (3) : 319-330
- 47) Posner, B.I., Kelly, P.A., Shiu, R.P.C., Friesen, H.G. (1974)
Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding : tissue distribution, species variation and characterization.
Endocrinology , **95** : 521
- 48) Qu, B.H., Karas, M., Koval, A., LeRoith, D. (1999)
Insulin receptor substrate-4 enhances insulin-like growth factor-I-induced cell proliferation.
J Biol Chem , **274** (44) : 31179-84
- 49) Raff, T., Germann, G. (1997)
Wachstumshormon in der Chirurgie – eine Standortbestimmung
Der Chirurg, **68** : 995-1003
- 50) Ramirez, R.J., Wolf, S.E., Barrow, R.E., Herndon, D.N. (1998)
Growth hormone treatment in pediatric burns. A safe therapeutic approach.
Annals of Surgery , **228** : 439-438

51) Raschke, M.J., Kolbeck, S.F., Dahne, M., Lindner, T., Raun, K., Bail, H. (2000)

Rekombinantes Wachstumshormon beschleunigt die Regeneratorkonsolidierung bei der Distraktionsosteogenese.

Chirurg, **71** : 1009-1015

52) Rinderknecht, E., Humbel, R.E. (1978)

Primary structure of human Insulin-like growth factor-II.

FEBS Letters, **89**: 283-286

53) Salmon, W.D., Daughaday, W.H. (1957)

A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro.

J Lab Clin Med, **49**: 825-236

54) Salmon, W.D., Du Vall, M.R. (1970)

A serum fraction with "sulfation factor activity".

Endocrino, **86**: 721-727

55) Schmassmann, A., Tarnawski, A., Gerber, H.A., Flogerzi, B., Sanner, M., Varga, L., Halter, F. (1994)

Antacid provides better restoration of glandular structures within the gastric ulcer scar than omeprazole

Gut, **35** : 896-904

56) Schnabel, P., Mies, F., Böhm, M. (1999)

Hormontherapie bei Herzinsuffizienz: Wachstumshormon und Insulin-like growth factor-I.

Z Kardiologie, **88** : 1-9

57) Schwarz, K. (1910)

Über penetrierende Magen- und Jejunalgeschwüre.

Brunns Beitr Klein Chir, **67** : 96-128

58) Shernan, S.K., Demling, R.H., Lalonde, C., Lowe, D.K. (1989)

Growth hormone enhances reepithelialization of human split-thickness skin graft donor sites.

Surg Forum, **40** : 37

59) Silbernagel, S., Lang, F. (1998)

Atlas der Pathophysiologie

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1. Aufl.

60) Smith, L.E., Shen, W., Perruzzi, C., Soker, S., Kinoshita, F., Xu, X., Robinson, G., Driver, S., Bischoff, J., Zhang, B., Schaeffer, J.M., Senger, D.R. (1999)

Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor I receptor.

Nat Med, **5** (12) : 1390-1395

- 61)Steenfos, H., Jansson, J.-O. (1992)
Gene expression of Insulin-like growth factor-I and IGF-I Receptor during wound healing in rats
Eur J Surg, **158** : 327-331
- 62)Steenfos, H. (1994)
Growth factors and wound healing
Scand J Plast Reconstr Hand Surg, **28** : 95-105
- 63)Suh, D.Y., Hunt, T.K., Spencer, E.M. (1992)
Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats.
Endocrinology, **131**: 2399-2403
- 64)Szabo, S., Kusstatscher, Z., Sandor, Z., Sakoulas, G. (1995)
Molecular and cellular basis of ulcer healing
Scand J Gastroenterol, **30**, Suppl 208 : 3-8
- 65)Tarnawski, A., Stachura, J., Douglass, T.J., Krause, W.J, Gergely, H., Krause, W.H., (1991)
Quality of gastric ulcer healing-a new, emerging concept.
J. Clin. Gastroenterol. **13**(Suppl 1) : 45-47
- 66)Tarnawski, A., Santos, M., Hanke, S., Stachura, J., Douglass, T.G., Sarfeh, I.J. (1995)
Quality of gastric ulcer healing. Is it influenced by Antiulcer Drugs?
Scand. J. Gastroenterol. **30**(Suppl. 208) : 9-13
- 67)Tomas, F.M., Knowles, S.E., Owens, P.C., Chandler, C.S., Francis, G.L., Read, L.C., Ballard, F.J. (1992)
Insulin-like growth factor (IGF) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats.
Biochem J, **282** (Pt 1): 91-97
- 68)Valcavi, R., Zini, M., Davoli, S., Porrtioli, I. (1992)
The late growth hormone rise induced by oral glucose is enhanced by cholinergic stimulation with pyridostigmine in normal subjects.
Clin Endocrinol, **37** : 360
- 69)Vara-Thorbeck, R., Guerrero, J.A., Rosell, J., Ruiz-Requena, E., Capitan, J.M. (1993)
Exogenous growth hormone : effects on the catabolic response to surgically produced acute stress and on postoperative immune function.
World J Surg , **17** : 530
- 70)von Kiparski, S. (1999)
Wundheilung und Histologie kryoinduzierter Magenulcera bei Ratten unter lokaler IGF-I Behandlung.
Dissertation, Universität Tübingen

71)Williams, K.L., Fuller, C.R., Dieleman, L.A., DaCosta, C.M., Haldeman, K.M., Sartor, R.B., Lund, P.K. (2001)
Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone.
Gastroenterology , **120** : 925-937

72)Zhang, W., Frankel, W.L., Roth, J., Mantell, M.P., Bain, A., Klurfeld, D.M. (1994)
Insulin-like growth factor-I improves mucosal structure and function in small bowel transplantation in the rat.
Transpl Proceed, **26**: 1458-1459

LEBENS LAUF

Name: Class
Vorname: Nicole
Geburtsdatum: 16.07.1976
Geburtsort: Bad Urach/Deutschland

Vater: Dr. Dipl. Ing. Fritz Class
Mutter: Ingeborg Class, geborene Katz, Lehrerin
Geschwister: Andreas Class und Florian Christian Class

Bisheriger Werdegang:

1983 – 1987 Grundschule in Römerstein-Zainingen
1987 – 1996 Graf-Eberhardt-Gymnasium Bad Urach
Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife

Aug. – Okt. 1996 Krankenpflegepraktikum im Kreiskrankenhaus
Bad Urach

Oktober 1996 Beginn Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1997-2002 Studentische Nachtwache auf der Wachstation
Neurochirurgie der Universitätsklinik Tübingen

März – Sept. 1998 Tutorin am Anatomischen Institut der
Universität Tübingen

September 1998 Ärztliche Vorprüfung

Feb./März 1999 Famulatur in der chirurgischen Abteilung der
Universitätsklinik Tübingen

August 1999 Erste Ärztliche Prüfung (Erstes Staatsexamen)

Feb./März 2000 Famulatur am Universitätsklinikum Rechts der
Isar, München , Abt. Gynäkologie/Geburtshilfe

Aug./Sep. 2000 Famulatur in Tübingen, Praxis Dr. von
Puttkammer Pädiatrie / Neuropädiatrie

Feb./März 2001 Famulatur am Royal Alexandra Hospital for
Children, Sydney/Australien

März 2002 Zweite Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)

*Mai bis
August 2002* PJ – Tertiär Pädiatrie im Kantonsspital
Münsterlingen/CH

<i>August bis November 2002</i>	PJ – Tertial Innere Medizin Kreiskrankenhaus Reutlingen
<i>Dezember 2002 bis März 2003</i>	PJ – Tertial Chirurgie Kantonsspital Bruderholz, Basel/CH
<i>28.Mai 2003</i>	Dritte Ärztliche Prüfung (Drittes Staatsexamen)
<i>Juli 2003- Juli 2005</i>	Assistenzärztin Kantonsspital Aarau, Abteilung für Chirurgie
<i>Seit Juli 2005</i>	Assistenzärztin in der Klinik für Plastische- und Handchirurgie , St. Georgen