

**Aus dem Institut für Klinisch Experimentelle Chirurgie
Universität des Saarlandes
Homburg (Saar)**

Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

**Wirkung des Phosphodiesterase-3-Hemmers Cilostazol
auf die Heilung von Kolonanastomosen in der Ratte**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2019**

**vorgelegt von
Cathrin Charlotte Hübner
geboren am 17.07.1989 in Idar-Oberstein**

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Abstract.....	2
3 Einleitung.....	3
3.1 Klinischer Hintergrund.....	3
3.1.1 Physiologie der Anastomosenheilung.....	3
3.1.2 Klinische Relevanz der Anastomoseninsuffizienz.....	7
3.2 Cilostazol.....	9
3.2.1 Wirkung.....	9
3.2.2 Pharmakokinetik und -dynamik.....	10
3.2.3 Nebenwirkungen und Wechselwirkungen.....	11
3.2.4 Mögliche Wirkung von Cilostazol auf Kolonanastomosen.....	11
4 Ziel der Studie.....	12
4.1 Fragestellung.....	12
5 Material und Methoden.....	13
5.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	13
5.2 Versuchsgruppen.....	13
5.3 Chirurgisches Vorgehen.....	14
5.3.1 Descendo-Descendostomie.....	14
5.3.2 Postoperativer Verlauf und Leckagen.....	16
5.3.3 Anastomosenentnahme.....	16
5.4 Physikalische und histologische Analysen.....	17
5.4.1 Berstungsdruck.....	17
5.4.2 Histologie.....	18
5.4.2.1 Quantitative Kollagenbestimmung.....	19
5.4.2.2 Immunhistochemie.....	20

5.4.2.2.1 Caspase 3.....	20
5.4.2.2.2 PCNA.....	21
5.4.2.2.3 CD31.....	22
5.4.2.2.4 CD68.....	23
5.4.2.2.5 MPO.....	24
5.4.2.2.6 Ki67.....	25
5.5 ELISA.....	26
5.5.1 Entzündungsmediatoren.....	26
5.5.1.1 IL-6.....	26
5.5.1.2 IL-8.....	26
5.5.2 TGF- β	27
5.5.3 VEGF.....	28
5.6 Datenerfassung und Statistik.....	29
6 Ergebnisse.....	30
6.1 Allgemeine Komplikationen.....	30
6.2 Analysen nach 3 Tagen.....	30
6.2.1 Berstungsdruck.....	30
6.2.2 Immunhistochemie.....	31
6.2.2.1 Caspase 3.....	31
6.2.2.2 PCNA	32
6.2.2.3 CD31.....	33
6.2.2.4 CD68.....	34
6.2.2.5 MPO.....	35
6.2.2.6 Ki67.....	36
6.2.3 Kollagen I/III.....	37
6.2.4 ELISA.....	38

6.2.4.1 Entzündungsmediatoren.....	38
6.2.4.1.1 IL-6.....	38
6.2.4.1.2 IL-8.....	38
6.2.4.2 TGF- β	38
6.2.4.3 VEGF.....	38
6.3 Analysen nach 7 Tagen.....	39
6.3.1 Berstungsdruck.....	39
6.3.2 Immunhistochemie.....	40
6.3.2.1 Caspase 3.....	40
6.3.2.2 PCNA.....	41
6.3.2.3 CD31.....	42
6.3.2.4 CD68.....	43
6.3.2.5 MPO.....	44
6.3.2.6 Ki67.....	45
6.3.3 Kollagen I/III.....	47
6.3.4 ELISA.....	48
6.3.4.1 Entzündungsmediatoren.....	48
6.3.4.1.1 IL-6.....	48
6.3.4.1.2 IL-8.....	48
6.3.4.2 TGF- β	48
6.3.4.3 VEGF.....	48
7 Diskussion.....	49
7.1 Diskussion von Material und Methoden.....	49
7.1.1 Anastomose und Berstungsdruckmessung.....	49
7.1.2 Dosierung und Applikation von Cilostazol.....	50
7.1.3 Kollagen I/III.....	50

7.2 Diskussion der Ergebnisse.....	50
7.3 Schlussfolgerung.....	55
8 Abkürzungsverzeichnis.....	56
9 Literaturverzeichnis.....	58
11 Publikationsliste.....	64
12 Danksagung.....	65

1 Zusammenfassung

In der Kolonchirurgie ist die Anastomoseninsuffizienz eine häufige postoperative Komplikation und führt zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität. Systemische und lokale Faktoren beeinflussen die Heilung von Anastomosen. Besonders im Falle von Anastomosen bei immunsupprimierten Patienten und bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion besteht ein hohes Risiko für eine Anastomoseninsuffizienz. Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Wirkung einer Therapie mit einem selektiven Phosphodiesterase-3-Inhibitor (Cilostazol) auf die Anastomosenheilung im Rattenmodell zu untersuchen. Dies sollte bei immunkompetenten Versuchstieren erfolgen. Die Hemmung der Phosphodiesterase-3 erhöht die Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP verbessert die Endothelfunktion und inhibiert die Aggregation von Thrombozyten. Durch die zusätzliche Hemmung von glatten Gefäßmuskelzellen wird eine gefäßerweiternde Wirkung erzielt. Ebenfalls sind proangiogene Wirkungen von Cilostazol beschrieben. Die vorliegende Studie hatte zum Ziel den Einfluss von Cilostazol auf die Heilung von Kolonanastomosen zu untersuchen. 48 Sprague-Dawley-Ratten erhielten nach 5 Tagen Vorbehandlung mit entweder Cilostazol (30mg/kg KG oder 60mg/kg KG) oder Kochsalzlösung eine Kolonanastomose des Colons descendens mit 6/0 PDS Einzelknopfnähten. 3 bzw. 7 Tage nach Anastomose wurden Verwachsungen und Berstungsdrücke untersucht und die Tiere anschließend getötet. Nach Gewebeentnahme erfolgte die histologische Aufarbeitung und Auswertung. Kein Versuchstier entwickelte einen intraabdominalen Abszess oder eine Anastomoseninsuffizienz. Der mittlere Berstungsdruck der Anastomosen der verschiedenen Versuchsgruppen betrug nach 3 Tagen ~50mmHg und nach 7 Tagen ~150mmHg. Signifikante Unterschiede wurden zwischen den Versuchsgruppen nicht beobachtet. Lediglich die Anzahl der MPO-positiven Zellen 3 Tage nach Anastomosennaht und die der CD68-positiven Zellen 7 Tage nach Anastomosennaht in der anastomosennahen Mukosa waren nach Cilo 60 Behandlung signifikant erhöht. Die weiteren Analysen von Entzündungsreaktion, Fibroblastenaktivität, Angiogenese, Apoptose, Proliferation und Kollagenstoffwechsel zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die ELISA-Messungen von IL-6, IL-8, VEGF und TGF- β waren zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen ebenfalls nicht signifikant verschieden. Die Applikation des Phosphodiesterase-3-Inhibitors Cilostazol bewirkte bei physiologischer Immunsituation und normaler Leberfunktion keine verbesserte lokale Mikrozirkulation und keine verbesserte Heilung von Kolonanastomosen.

2 Abstract

Anastomotic leakage is a frequent postoperative complication after colonic surgery and results in an increase of morbidity and mortality. Systemic and local factors have been shown to influence the healing of colon anastomosis. The aim of the present study was to evaluate the effect of a selective phosphodiesterase-3-inhibitor (Cilostazol) on anastomotic healing. The inhibition of phosphodiesterase-3 increases the concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). cAMP improves the endothelial function and inhibits the aggregation of platelets. By inhibiting the action of vascular smooth muscle cells it causes also vasodilation. The aim of the present study was to analyze if an improved rheology and microvascular blood perfusion cause an improved anastomotic healing. Forty-eight Sprague-Dawley rats received after 5 days of pretreatment with either Cilostazol (30mg/kg BW or 60mg/kg BW) or saline solution an anastomosis of the colon descendens with 6/0 PDS interrupted suture. After 3 or 7 days the animals were sacrificed and the anastomoses examined for their integrity and on bursting strength. A blind histological evaluation of the newly formed tissue was performed. None of the rats developed an intraabdominal abscess or an anastomotic insufficiency. All animals presented postoperative adhesion. Significant differences were not observed. In all experimental groups the median anastomotic bursting pressure after 3 days was ~50mmHg and after 7 days ~150mmHg. Only the number of MPO-positive cells in the mucosa near the anastomosis after 3 days and the analysis of CD68-positive cells in the mucosa near the anastomosis after 7 days were significant by higher after Cilo 60 treatment. Further analyses of lymphocyte infiltration, fibroblast activity, blood vessel density, apoptotic cell death, cell proliferation and collagen deposition showed no significant differences after Cilo compared to sham treated controls. The ELISA measurements analyzing IL-6, IL-8, VEGF and TGF- β demonstrated also no differences between the different experimental groups.

Thus, administration of a phosphodiesterase-3-inhibitor did not enhance the local microcirculation and thus did not improve anastomotic healing.

3 Einleitung

3.1 Klinischer Hintergrund

3.1.1 Physiologie der Anastomosenheilung

Um die Entstehung von Anastomoseninsuffizienzen im Intestinum zu verstehen, ist es erforderlich, sich mit der Physiologie der Wundheilung zu beschäftigen. Dazu teilt man den Heilungsprozess in drei Phasen ein, die inflammatorische, die proliferative und die reparative Phase. (Abbildung 1)

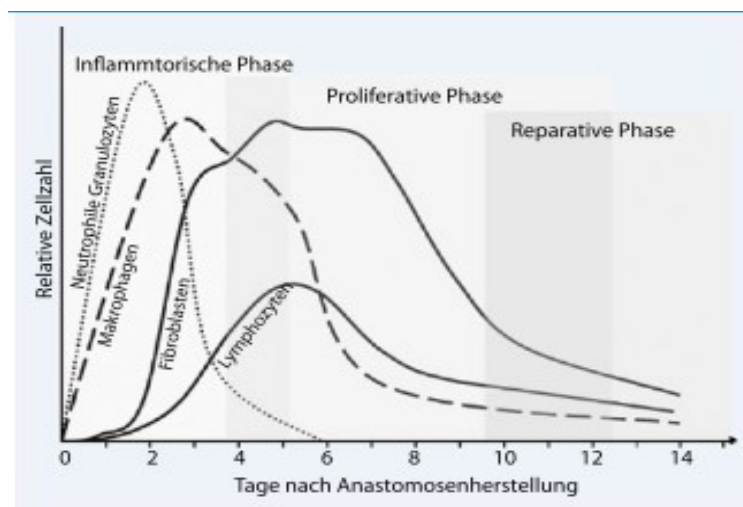


Abbildung 1 - Dargestellt sind die drei Phasen (inflammatorische, proliferative und reparative Phase) der Anastomosenheilung im Intestinum und der jeweilige Zeitpunkt, zu dem die Infiltration der neutrophilen Granulozyten, der Makrophagen, der Fibroblasten und der Lymphozyten ihren Höhepunkt erreicht.
(Marjanovic et Hopt, 2011)

Direkt nach der Anastomosennaht beginnt die inflammatorische Phase, die vier postoperative Tage dauert. Diese hat die Aufgabe die Wunde zu verschließen. Durch die Exposition von subendotheliale Kollagen wird die Gerinnungskaskade aktiviert. Es resultiert die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Dadurch wird die Migration von Neutrophilen, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten stimuliert. Es entsteht ein entzündliches Ödem sowie eine Exsudation von Fibrin, Fibrinogen und Blutbestandteilen. In diesem Zusammenhang sind Makrophagen besonders wichtig, da sie nicht nur Bakterien und Zellreste phagozytieren, sondern ebenfalls die Matrixsynthese regulieren. Außerdem sind sie für die Angiogenese und die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Zellen verantwortlich.

Durch parakrine Effekte der von Makrophagen sezernierten Zytokine werden die sich im Gewebe befindenden Lymphozyten aktiviert, die wiederum Interleukine und Interferone sezernieren. Hierdurch werden wiederum Makrophagen stimuliert. Durch diesen parakrinen Effekt wird die Präsenz von Zytokinen im Wundgebiet verlängert.

In den ersten fünf postoperativen Tagen wird die Stabilität durch die Nahthaltekapazität der mitgefassten Submukosa bestimmt. Die Nahthaltekapazität ist hauptsächlich vom Verhältnis des Auf- und Abbaus des Kollagens abhängig. Durch die Kollagenolyse nimmt der Kollagengehalt bis zum 3. postoperativen Tag um bis zu 70% ab und erreicht damit seinen Tiefpunkt. Ab dem 4. postoperativen Tag verliert die Nahthaltekapazität zunehmend an Bedeutung. Die entsprechenden Kollagenasen stammen aus neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen. Im Vergleich zum Kolon nimmt im Dünndarm die Kollagenkonzentration schneller zu. Dies könnte eine Erklärung für die höhere Komplikationsrate bei Anastomosen im Bereich des Kolons sein. Aus diesem Grund ist der 3. bis 5. postoperative Tag eine kritische Phase für die Entstehung von Anastomoseninsuffizienzen.

Es folgt bis zum 14. postoperativen Tag die proliferative Phase. Diese ist durch eine hohe Zelldichte, insbesondere an Fibroblasten und Endothelzellen, und dem Aufbau einer neuen Bindegewebsschicht gekennzeichnet. Während dieser Phase bildet sich die Reiß- und Zugfestigkeit der Wunde aus. Ab dem 5. postoperativen Tag erreicht die Kollagensynthese ihren Höhepunkt. Zunächst wird überwiegend Kollagen Typ III synthetisiert, das sich durch eine höhere Elastizität im Vergleich zu dem später synthetisierten Typ I auszeichnet. Dadurch und durch den TGF- β 1-vermittelten Phänotypenwechsel von Fibroblasten zu Myofibroblasten entsteht eine Wundkontraktion. Die zunehmende Festigkeit der Wunde beruht auf einer vermehrten Synthese von Kollagen Typ I. Dies besteht aus festeren Fibrillen. Die Synthese von Kollagen Typ III nimmt bereits nach einer Woche wieder deutlich ab. Dagegen hält die Synthese von Kollagen Typ I konstant über zwei Wochen an, weswegen sich im Laufe der Zeit das Verhältnis der beiden Kollagentypen zu Gunsten von Kollagen Typ I verschiebt. Dies kann als ein Indikator für die Qualität der Anastomosenheilung gewertet werden.

In dieser Phase nimmt die Angiogenese ab. Sie beginnt am 4. postoperativen Tag und hält bis zum Ende der Proliferationsphase an. Aus den Venolen der Submukosa wandern Endothelzellen mittels Pseudopodien in das Granulationsgewebe ein und bilden dort ein Kapillarnetz. Nach ca. zwei Wochen ist dieser Prozess abgeschlossen. Der wichtigste Regulationsfaktor für die Angiogenese ist VEGF. Auch in der Spätphase spielt die

Angiogenese eine wichtige Rolle und kann noch zu Insuffizienzen führen. Die Angiogenese hat ebenfalls Einfluss auf die Epithelheilung. Bei regelrechter Wundheilung ist der Epitheldefekt am Ende der Proliferationsphase komplett verheilt.

Zuletzt findet die reparative Phase statt, die länger als ein Jahr dauern kann. Während dieser Phase schreitet die Umwandlung von Kollagen Typ III zu Kollagen Typ I voran, wodurch die Festigkeit der Anastomose steigt. Außerdem verändert sich die strukturelle Anordnung der Kollagenfibrillen, was zu einer erhöhten Festigkeit führt. Zusätzlich kommt es zu einer Quervernetzung mittels Prolinhydroxylierung. Nach etwa vier Wochen hat die Narbe die gleiche mechanische Stabilität wie ein unversehrter Dünndarm. Durch die verzögerten Heilungsvorgänge im Kolon dauert es hier vier Monate, um eine 75% Wiederherstellung der normalen Festigkeit zu erreichen. (Marjanovic et Hopt, 2011)

Somit wird die Wundheilung neben der chirurgischen Technik von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst. Trotzdem ist eine spannungsfreie, gut durchblutete Anastomose, die primär suffizient genäht wurde, eine Grundvoraussetzung für eine komplikationslose Wundheilung. Jedoch bestehen viele andere Risikofaktoren, auf die im Folgenden weiter eingegangen werden soll (Abbildung 2).

Chirurgisch-technische Faktoren	Patienteneigene Faktoren	Äußere Faktoren
Anastomosenspannung	Peritonitis	Perioperative Volumentherapie
Durchblutung	Sepsis	Bluttransfusion
Wundrandapposition	Ileus	Bestrahlung
Nahttechnik	Niereninsuffizienz	Chemotherapie
Nahtmaterial	Intraabdomineller Druck	
	Kachexie	
	Leberzirrhose	
	Diabetes mellitus	
	Kortikosteroide	
	Immunsuppression	
	Hypertonie	
	Rauchen	
	Alkoholabusus	

Abbildung 2 - Risikofaktoren für eine Anastomoseninsuffizienz sortiert nach chirurgischen, patienteneigenen und äußeren Faktoren (Marjanovic et Hopt, 2011)

Ein wichtiger Risikofaktor für eine Anastomoseninsuffizienz ist ein erhöhter Blutverlust. Zum einen ist die Sauerstoffversorgung des Wundgebietes durch einen erniedrigten Hb-Wert herabgesetzt. Zum anderen wird durch Transfusionsblut die Anastomosenheilung gestört. Dies ist durch eine veränderte Antwort von T-Zellen und Makrophagen bedingt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kollagenqualität durch die Applikation von

Erythrozytenkonzentraten herabgesetzt wird (Boccola et al., 2010).

Hinzu kommt, dass die Gabe von mehr als 8000ml Flüssigkeit in einer Periode von 72 Stunden prä- und intraoperativ eine signifikante Erhöhung des Risikos einer Anastomoseninsuffizienz zur Folge hat. Der Grund hierfür liegt in der erhöhten Neigung zu interstitiellen Ödemen im Operationsgebiet bei Hyperhydratation (Boccola et al., 2010).

Weiterhin ist Tabakkonsum ein Risikofaktor. Dies liegt zum einen an der von Nikotin induzierten Vasokonstriktion und zum anderen an der von Kohlenstoffmonoxid induzierten zellulären Hypoxie. Die daraus resultierende Unterversorgung mit Sauerstoff führt zu einer Verminderung des Kollagenaufbaus (Sørensen et al., 1999).

Durch die bessere Behandlung von kolorektalen Karzinomen und die Resektionen in fortgeschrittenen Stadien werden nicht nur mehr Kolonanastomosen durchgeführt, sondern das Patientenkollektiv wird auch immer älter. Aus diesem Grund werden immer mehr multimorbide Patienten behandelt.

Diabetes mellitus ist ein wichtiger Risikofaktor für Anastomoseninsuffizienzen. Hauptgrund dafür ist eine verminderte Umwandlung von Kollagen Typ III zu Kollagen Typ I. Zwar ist so der Gesamtgehalt an Kollagen nicht vermindert aber die Festigkeit der Anastomose herabgesetzt. Der genaue Zusammenhang ist noch nicht abschließend geklärt. Vermutet wird eine höhere Glykosilierung der Proteine bei einer diabetischen Stoffwechsellage und dadurch eine Behinderung des Kollagenumbaus (Onodera et al., 2004). Außerdem ist die Aktivierung der Makrophagen verzögert und die T-Zell Migration behindert, was zu einer Verlängerung der inflammatorischen Phase führt (Rosenberg, 1990).

Auch mikrovaskuläre Erkrankungen verschlechtern die Anastomosenheilung. Die vorgeschädigten Intimazellen in den Gefäßen sind empfindlicher für Serotonin. Dies führt zu einer Vasokonstriktion und somit zu einer verminderten Durchblutung der Anastomose. Aufgrund des daraus resultierenden Sauerstoffmangels ist die Wundheilung beeinträchtigt (Fawcet et al., 1995).

Arteriosklerose ist ein weiterer Risikofaktor, der eine Anastomoseninsuffizienz begünstigen kann. Der Grund hierfür ist, dass Arteriosklerose zu einer Ischämie in den Randbereichen der Anastomose und damit zu einer gestörten Wundheilung führt. In diesem Zusammenhang konnte ein erhöhter Calcium-Spiegel als Risikofaktor nachgewiesen werden (Komen et al., 2011).

Auch eine Leberzirrhose wirkt sich negativ auf die Wundheilung im Anastomosenbereich aus. Der Kollagengehalt ist bei Leberzirrhose während der gesamten Wundheilung herabgesetzt. Außerdem liegt ein niedrigerer Hydroxyprolinegehalt vor. Hydroxyprolin ist

essentiell für die Quervernetzung von Kollagen und damit wichtig für die Festigkeit. Außerdem ist die VEGF Expression bei Leberzirrhose niedriger und damit auch die Angiogenese vermindert. Wie oben dargestellt ist somit eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine ungestörte Wundheilung nicht gegeben (di Bonifácio et al., 2011).

Neben diesen und anderen Erkrankungen haben auch verschiedene Medikamente einen negativen Einfluss auf die Wundheilung im Intestinum. Auf Grund der Tumorchirurgie haben Chemotherapeutika hier eine besondere Bedeutung. Diese wirken sich ebenfalls negativ auf die Wundheilung aus. Sie werden im Therapieregime von kolorektalen Karzinomen häufig neoadjuvant angewandt. Hier konnte gezeigt werden, dass es eine signifikant höhere Sepsisrate bei Patienten mit neoadjuvanter Chemotherapie gab als bei Patienten, bei denen präoperativ keine Chemotherapie durchgeführt wurde (Buie, 2005).

Ebenfalls ist in diesem Zusammenhang die präoperative Radiotherapie bei Rektumkarzinomen zu nennen. Sie stellt einen wichtigen Teil der Therapie dar. Aber gleichzeitig erhöht sie das Risiko einer Anastomoseninsuffizienz (Matthiessen, 2003).

3.1.2 Klinische Relevanz der Anastomoseninsuffizienz

Trotz technischer Fortschritte in der Viszeralchirurgie liegt die Rate von Anastomoseninsuffizienzen je nach Studie bei kolorektalen Anastomosen bei 4 bis 26% (Boccola et al., 2010). Anastomoseninsuffizienzen sind assoziiert mit schwerwiegenden Komplikationen, wie zum Beispiel Peritonitis und pelvinen Abszessen. Diese Komplikationen führen zu einer Mortalitätsrate von 6-39% und das Risiko einer permanenten intestinalen Diskontinuität mit Stomaanlage (10-100%). Diese Zahlen legen nahe, dass die Reduktion der Rate von Anastomoseninsuffizienzen für die Reduktion der Mortalität und Morbidität essentiell ist.

Auf den Risikofaktor der Lage der Anastomose kann keinen Einfluss genommen werden (Buchs et al., 2007). Auch der Versuch durch neue Operationsmethoden eine bessere Heilung zu gewährleisten, brachte keinen signifikanten Erfolg. So zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen handgenähten Anastomosen und Stapleranastomosen. Die Hoffnung, dass durch die gleichmäßige Anastomose des Staplers auch eine geringere Rate an Insuffizienzen entstehen würde, konnte nicht bestätigt werden. Es zeigte sich lediglich eine höhere Rate an Stenosen bei mit Stapler angelegten Anastomosen. Allerdings kann bei ultratiefen Anastomosen mittels Stapler eine Anastomose angelegt werden, wo zuvor nur die Anlage eines primären Anus praeter möglich war (Boccola et al, 2010).

Laparoskopische Operationen werden aufgrund der deutlich geringeren Invasivität als

Operationsmethode empfohlen. Es zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Anastomoseninsuffizienzen besteht (Boccola et al, 2010).

Eine weitere Überlegung bestand darin, die arterielle Versorgung nicht direkt proximal abzusetzen, sondern weiter distal. Dadurch sollte eine bessere Durchblutung der Wundränder gewährleistet werden. Allerdings zeigte sich sowohl im Dopplerultraschall als auch bei der Bestimmung des Sauerstoffgehaltes in den Wundrändern, dass zwischen den beiden Methoden kein Unterschied in der Durchblutung besteht. Doch da das proximale Absetzen der Gefäße technisch einfacher ist, wird diese Methode bevorzugt (Caziuc et al, 2015).

Die Anlage einer Drainage ist nur förderlich, um eine Anastomoseninsuffizienz des Kolons zu erkennen, indem man den Austritt von Eiter oder Faeces beobachtet. So können durch frühzeitige Intervention Komplikationen wie Peritonitis und die Ausbildung von Abszessen reduziert und Revisionen verringert werden. Allerdings senkt es nicht die Rate der aufgetretenen Insuffizienzen (Boccola et al., 2010).

Die Anlage eines protektiven Stomas zur Entlastung der Anastomose brachte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied beim Auftreten von Anastomoseninsuffizienzen (Boccola et al., 2010).

Es wurde der Versuch unternommen, über eine intraoperative Testung der Durchblutung und direkte Anastomosenkontrolle ein erhöhtes Risiko zu erkennen. Dabei hat sich allerdings keine der Methoden etabliert. Zwar zeigten sich gute Ergebnisse durch Laser-Doppler-Fluxmetrie und Dopplerultraschalluntersuchung zur Evaluation einer ausreichenden Durchblutung der Anastomosenränder, jedoch wurde die Technik noch nicht routinemäßig in der Klinik etabliert (Boccola et al, 2010).

Die Risikofaktoren zeigen, dass es wichtig ist, Möglichkeiten zu finden, um die Heilung der Anastomosen zu verbessern. Eine einfache Methode wäre dabei die Verabreichung von Medikamenten, die einen positiven Effekt auf die Heilungsvorgänge im Intestinum haben. Ein solcher Kandidat ist dabei Cilostazol.

3.2 Cilostazol

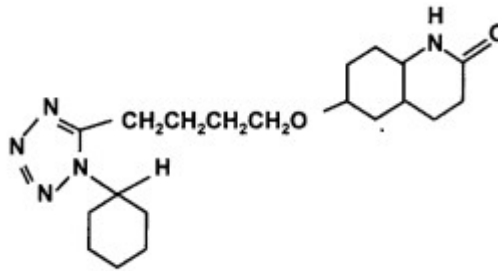


Abbildung 3 - Chemische Darstellung von Cilostazol (6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydrochinolin-2-on) (Schrör, 2002)

Cilostazol ist ein Phosphodiesterase-III-Hemmer, der aktuell eine Zulassung für die periphere arterielle Verschlusskrankheit hat (Abbildung 3). Diese Indikation zeigt bereits ein Potential für die Verbesserung der Durchblutung.

3.2.1 Wirkung

Cilostazol ist ein selektiv-reversibler Inhibitor der Phosphodiesterase Typ 3, den Subtyp des kardiovaskulären Systems. Die Zielzellen sind dementsprechend Thrombozyten, Gefäßendothelien, glatte Muskelzellen der Gefäße und Kardiomyozyten. Durch die Hemmung von Phosphodiesterase-3 wird der Abbau von cAMP in den Zellen gehemmt und die intrazelluläre Konzentration wird erhöht. Außerdem verhindert Cilostazol, dass Adenosin von Erythrozyten aufgenommen wird. So wird die Konzentration von Adenosin interstitiell erhöht. Dadurch werden die Adenosin-A₂-Rezeptoren vermehrt aktiviert. Über diese wird wiederum die Bildung von cAMP in den Zellen erhöht. Die einzige Ausnahme bilden hier die Herzmuskelzellen, die nicht über den Adenosin-Rezeptor aktiviert werden und in denen es deshalb nur über die Hemmung der Phosphodiesterase zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels kommt (Abbildung 4) (Schrör, 2002).

An den Thrombozyten bewirkt Cilostazol eine Hemmung der Aggregation ohne gleichzeitig die Blutungszeit zu verlängern. Nach dem Absetzen normalisiert sich die Thrombozytenaggregation innerhalb von 48-96h ohne eine überschießende Gerinnungsreaktion (Kambayashi et al., 2003).

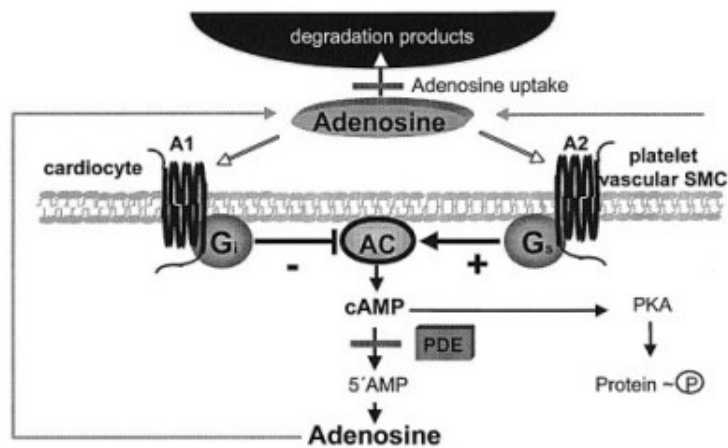


Abbildung 4 - Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Cilostazol. Durch die Hemmung der PDE3 wird cAMP interzellulär erhöht. Gleichzeitig steigt durch die verminderte Aufnahme von Adenosin in Erythrozyten der interstitielle Gehalt von Adenosin. Dies führt zu einer erhöhten Aktivierung der Adenosinrezeptoren und damit zu einer erhöhten Produktion von cAMP.
(Schrör, 2002)

An den glatten Muskelzellen der Gefäße hat Cilostazol eine relaxierende und antiproliferative Wirkung. An den Endothelzellen wirkt es ebenfalls antiproliferativ. Außerdem hemmt die intrazelluläre cAMP-Erhöhung die Expression der Adhäsionsmoleküle. Zusätzlich fördert es die Neoangiogenese und hemmt die Apoptose. An den Herzmuskelzellen wirkt es positiv chronotrop und ionotrop (Schrör, 2002).

Weiterhin führt Cilostazol zu einer Erhöhung der HDL bei gleichzeitiger Senkung der Triglyceride. Dabei bewirkt es keine Änderung der LDL oder des Gesamtcholesterins im Serum (Schrör, 2002).

3.2.2 Pharmakokinetik und -dynamik

Cilostazol sollte 30 min vor oder 2h nach dem Essen eingenommen werden, da die Einnahme mit Nahrungsmitteln zu einer erhöhten Aufnahme führen kann und damit zu einem Anstieg der maximalen Plasmakonzentration. Das wiederum kann zu einem erhöhten Auftreten von Nebenwirkungen führen. Nach etwa 4 Tagen wird ein steady state erreicht. Nach Resorption liegt der proteingebundene Anteil bei 95-98%.

Abgebaut wird Cilostazol durch das Cytochrom-P450 System, insbesondere durch die Isoenzyme CYP 3A4, CYP 2C19 und in geringerem Maß CYP 1A2. Durch die intrahepatische Metabolisierung entstehen als Hauptmetabolite Dehydro-Cilostazol und 4'-

trans-Hydroxy-Metabolite. Nach der Metabolisierung werden 74% renal und 26% hepatisch eliminiert. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 10h. Daraus ergeben sich auch die Kontraindikationen bei einer mittelschweren bis schweren Leberfunktionsstörung und bei einer schweren Niereninsuffizienz (GFR < 25ml/min). Außerdem ist Cilostazol bei Überempfindlichkeit, Schwangerschaft oder Blutungsneigung kontraindiziert (Schrör, 2002).

3.2.3 Nebenwirkungen und Wechselwirkungen

Die wichtigsten Nebenwirkungen entstehen durch die vasodilatatorische Wirkung von Cilostazol. Diese sind Kopfschmerzen und Diarrhoe, die mit einer Häufigkeit von bis zu 30% bzw. 15% auftreten. In der Regel nehmen sie nach 1-2 Wochen ab. Weitere beschriebene Nebenwirkungen sind Schwindel, periphere und Gesichtsoedeme, Palpitationen, Tachykardie, Arrhythmien (z.B. ventrikuläre Extrasystolen), Angina pectoris, Juckreiz und Hautausschlag. Dadurch dass Cilostazol über Cytochrom P450 abgebaut wird, kann es zu Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten führen. Bei gleichzeitiger Gabe von zum Beispiel Diltiazem und Omeprazol sowie Grapefruitsaft kann eine Erhöhung der Serumkonzentration auftreten.

3.2.4 Mögliche Wirkung von Cilostazol auf Kolonanastomosen

Wie oben beschrieben ist einer der wichtigsten Effekte von Cilostazol die Vasodilatation durch die Inhibition von Adenosin, welche als Nebeneffekt bei der Gabe von Cilostazol beobachtet wurde. Dies betrifft vor allem die arterielle Blutversorgung (Weintraub, 2006), die dann eine Verbesserung der Durchblutung bewirkt. Dies wurde auch im Intestinum beobachtet. Eine verbesserte Durchblutung ist wiederum essentiell für die Anastomosenheilung (Kambayashi et al., 2003).

Außerdem wurde eine gesteigerte Angiogenese durch die Gabe von Cilostazol beobachtet. Die Förderung der Angiogenese würde die Durchblutung der Wunde optimieren und dadurch die Wundheilung fördern (Hori et al., 2012). Außerdem wurde eine verbesserte Frakturheilung unter Cilostazolgabe festgestellt. Dies bewirkt Cilostazol unter anderem dadurch, dass es die Angiogenese fördert. (Herath et al., 2015).

Aufgrund der nicht verlängerten Blutungszeit trotz der Thrombozytenhemmung besteht kein erhöhtes Blutungsrisiko (Kambayashi et al., 2003).

All diese positiven Eigenschaften legen den Schluss nahe, dass die Gabe von Cilostazol einen günstigeren Einfluss auf die Heilung einer Anastomose haben könnte. Somit wollten wir in der vorliegenden Studie den positiven Effekt von Cilostazol auf die Anastomosenheilung überprüfen.

4 Ziel der Studie

4.1 Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von Cilostazol in zwei verschiedenen Dosierungen auf die Anastomosenheilung am Kolon gegenüber einer Sham-Gruppe untersucht. Das Medikament wurde Sprague Dawley Ratten oral verabreicht. Dabei waren folgende Fragestellungen von Interesse:

- Hat die Gabe von Cilostazol einen positiven Effekt auf die Festigkeit der Anastomose?
- Findet eine verbesserte Kollagensynthese statt?
- Wird die Angiogenese durch die Gabe von Cilostazol verstärkt?
- Hat Cilostazol einen Effekt auf die inflammatorische Reaktion nach Anlage der Anastomose?
- Zeigt sich ein zeitlich verändertes Verhältnis von Kollagen I und III?

5 Material und Methoden

5.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die Versuche wurden nach den Bestimmungen des bundesdeutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Der Versuch wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz Abteilung C „Lebensmittelwesen, Veterinärwesen“ genehmigt (Genehmigungsnummer: 4411, Tierschutz- beauftragte Frau Dr. med. vet. Monika Frings).

Die 48 Sprague Dawley Ratten stammten aus der eigenen Züchtung des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Im Institut wurden die Tiere für die Dauer der Versuche in vollklimatisierten Räumen mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten (Lufttemperatur 22°C, Luftfeuchtigkeit 55%, +/- 10%). Ihr Gewicht lag zu Beginn der Experimente bei durchschnittlich 262g.

Die Ratten erhielten Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, BRD). Nach der operativen Colonanastomose erhielten die Tiere 100 ml Fresubin Flüssignahrung pro Ratte pro Tag sowie zu jeder Zeit Wasser ad libidum. Postoperativ wurde dem Wasser Caprofen (Pfizer Inc., New York, USA) zur Schmerzbekämpfung zugesetzt. Aktivität und Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich überprüft.

5.2 Versuchsgruppen

Operiert wurden 48 weibliche Sprague Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 262g. Insgesamt bestand der Versuch aus 6 Gruppen à 8 Tieren. 16 Tiere erhielten täglich ab dem 5. präoperativen Tag 30mg Cilostazol/kg KG (Cilo 30-Gruppe), 16 Tiere 60mg Cilostazol/kg KG (Cilo 60-Gruppe), wobei das Cilostazol vollständig in NaCl gelöst wurde. Aus jeder der Gruppen wurde bei je 8 Tieren die Anastomosenentnahme am 3. postoperativen Tag und bei 8 Tieren am 7. postoperativen Tag durchgeführt. 16 Tiere erhielten täglich 0,2 ml NaCl pro 100g KG ab dem 5. präoperativen Tag als Kontrollgruppe (Sham-Gruppe). Auch hier wurde bei 8 Tieren die Anastomosenentnahme am 3. postoperativen Tag und bei 8 Tieren am 7. postoperativen Tag durchgeführt. Die Substanzen wurden per os über eine Knopfkanüle in einer Isoflurankurzknarkose verabreicht. Bei dieser Gelegenheit wurde der Allgemeinzustand der Tiere sowie die Operationswunden begutachtet, um bei möglichen Komplikationen gegebenenfalls einschreiten zu können und so ein unnötiges Leiden der Tiere zu verhindern.

5.3 Chirurgisches Vorgehen

5.3.1 Descendo-Descendostomie

Die Operationen fanden unter keimarmen Bedingungen in speziell dafür eingerichteten Räumen des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Gebäude 65 und 66, Campus Universitätsklinikum Homburg/Saar) statt.

Präoperativ wurde das Gewicht der Tiere bestimmt und dokumentiert. Anschließend wurde ihnen ihre tägliche Medikamentendosis verabreicht. Die Narkoseeinleitung wurde mittels Isofluran in speziellen Narkoseboxen bei einem O₂-Flow von 3l und einem Isofluran Anteil bis zu 5% vorgenommen. Anschließend erhielten die Ratten eine Mischung aus 5 mg/kg KG Xylazin (Rompun, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, BRD) und 80 mg/kg KG Ketamin (Pharmacia GmbH, Erlangen, BRD) intraperitoneal zur Aufrechterhaltung der Narkose. Eine selbstständige Atmung war dadurch jederzeit gegeben. Die durchschnittliche OP-Dauer betrug etwa 1h. Die Tiere wurden während dieser Zeit auf einer Platte gelagert, fixiert und mittels Infrarotlampe gewärmt.

Es folgten Rasur des Abdomens, Abwaschen mit Wasser und Tupfer und anschließende Desinfektion der Haut mittels Sprühdesinfektion (Softasept N B, Braun Melsungen GmbH, Melsungen, BRD).

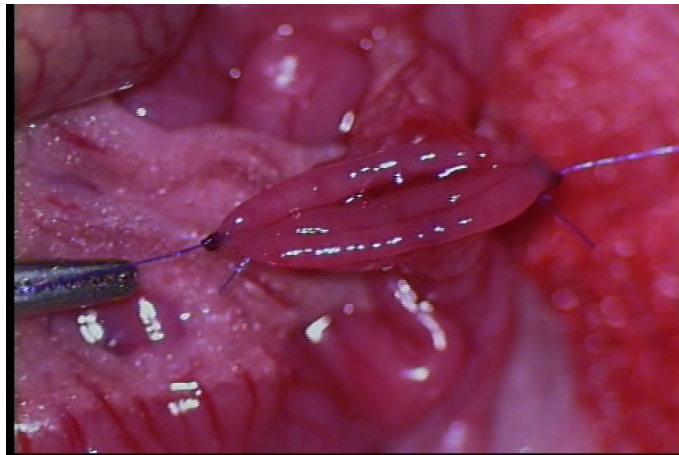


Abbildung 5 - Es wurden Haltefäden zu Beginn der Naht der Anastomose vorgelegt, die mittels Klemme (links im Bild) fixiert wurden. So konnte die Anastomose beim Nähen auseinander gehalten werden.

Nach medianer Laparotomie wurde der Dünndarm und das Coecum auf einer Kompresse ausgelagert und mittels einer in 0,9%-tiger NaCl-Lösung getränkten Kompresse feucht gehalten. Danach wurde mittels einer heparinisierten Hohlnadel 1ml Blut aus der Vena cava inferior entnommen. Nach ausreichender Blutstillung wurde das Colon transversum dargestellt und mittels Laser Doppler Blood Flow Monitor (Moor instruments Inc., Wilmington, UK) FLUX, CONC und DC an vier Stellen von proximal nach distal bestimmt. Anschließend wurde das Colon descendens dargestellt und ebenfalls FLUX, CONC und DC von proximal nach distal an vier Stellen bestimmt. Danach erfolgte die Transsektion des Colon descendens etwa 3 cm unterhalb der Flexura coli sinistra. Eventuell vorhandene Kotballen wurden mittels Wattestäbchen entfernt. Die Verletzung der blutversorgenden Gefäßarkade aus dem Bereich der A. mesenteria inferior konnte weitestgehend verhindert werden. Eine Blutstillung wurde, falls nötig, durch Kompression der Gefäße mit einem Wattestäbchen durchgeführt. Die gesamte Anastomose wurde mit einem PDS 6-0 Faden (Ethicon GmbH&Co.KG, Norderstedt, BRD) unter einer 10-fachen Vergrößerung genäht (Mikroskop: Zeiss AxioTech Mikroskop, Oberkochen, BRD). Zuerst wurden mesenterial und antimesenterial allschichtige Einzelknopfnähte vorgelegt. Die jeweiligen Enden des Fadens wurden mit einer Klemme versehen und der Darm durch leichten Zug in eine ideale Position gebracht (Abbildung 5). Danach wurde die Vorderseite mit Einzelknopfnähten in einem Abstand von etwa 2mm evertiert adaptiert (Abbildung 6). Die Einstiche erfolgten von extraluminal. Es wurde darauf geachtet, dass nur die äußere Schicht der Mukosa miterfasst wurde, um sogenannte Mukosalippen zu vermeiden. Anschließend wurde der Darm in seiner Sagittalachse gedreht und die Rückseite auf dieselbe Weise adaptiert. Anschließend wurde der Darm wieder in seine ursprüngliche Position gebracht. Pro Anastomose wurden auf diese Weise etwa 15 Einzelknopfnähte benötigt.



Abbildung 6 - Einzelknopfnahnt einer Kolonanastomose

Anschließend wurde die Bauchhöhle auf eventuelle Blutungsquellen inspiziert. Zum Abschluss wurde mit auf 30°C angewärmter 0,9% NaCl-Lösung mehrfach die Bauchhöhle gespült. Das Coecum und der Dünndarm wurden ins Abdomen zurückgelagert. Mit einem Propylen 3-0 Faden (Prolene, Ethicon GmbH&CoKG, Norderstedt, BRD) wurden gemeinsam das Peritoneum, die Bauchmuskulatur und die Faszie fortlaufend verschlossen. Anschließend wurde die Haut ebenfalls fortlaufend mit einem Polypropylen 3-0 Faden verschlossen. Abschließend wurde die Wunde erneut desinfiziert. Um einen eventuellen Wärmeverlust auszugleichen, wurden die Tiere für eine Stunde bis zu ihrem vollständigen Erwachen unter eine Rotlichtlampe gelegt.

5.3.2 Postoperativer Verlauf und Leckagen

Nach der Operation bis zum Entnahmetag erhielt jedes Tier etwa 100 ml/d Fresubin mit 2 kcal/ml (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, BRD) anstatt Nahrungspellets.

Bei der täglich fortgeführten Medikamentenverabreichung wurden die Ratten auf Zeichen einer möglichen Komplikation inspiziert. Die Tiere wurden weiterhin täglich gewogen. Es wurde auf möglichen Stuhlverhalt geachtet. Außerdem wurde kontrolliert, ob eine Verschlechterung des Allgemeinbefindens wie verminderter Bewegungsdrang, Verschmutzung um die Augen durch vernachlässigte Hygiene oder ein aufgetriebenes Abdomen auftrat.

5.3.3 Anastomosenentnahme

Am 3. bzw. 7. postoperativen Tag wurde die Narkose der Versuchstiere mit Isofluran in einer Narkosebox eingeleitet und mit 3ml/kg KG Narcoren (Merial GmbH, Halbergmoos, BRD) intraperitoneal fortgeführt. Anschließend wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und Coecum und Dünndarm ausgelagert. Dann wurden 2ml Blut aus der Vena cava inferior entnommen.

Bei Freilegung der Anastomose wurden, wenn nötig, Verwachsungen gelöst. Anschließend wurde mittels Laser Doppler Blood Flow Monitor (Moor instruments Inc., Wilmington, UK) FLUX, CONC und DC bestimmt. Zuerst wurden an vier Stellen am Colon transversum von proximal nach distal und anschließend am Colon descendens an je vier Stellen proximal und distal der Anastomose von links nach rechts Messungen durchgeführt. Danach wurde der Berstungsdruck wie unten beschrieben gemessen. Die Anastomose wurde entnommen und an der primären Insuffizienzstelle längs eröffnet. Das Präparat wurde in vier gleiche Teile aufgeteilt. Von links nach rechts wurden die Teile in den Lysis-Puffer, Kryo, Tissue-Tek

(Weckert Labortechnik, Kitzingen, BRD) und Formalin konserviert, so dass die schwächste Stelle der Anastomose im Lysis-Puffer und im Formalin zu finden ist. Bis auf die Formalinproben wurden alle Proben in flüssigem Stickstoff asserviert und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Tiere mittels einer Überdosis Narcoren eingeschläfert.

Zum Schluss wurde eine Probe der Leber entnommen und ebenfalls in Kryo, Tissue-Tek (Weckert Labortechnik, Kitzingen, BRD) und Formalin aufgeteilt.

5.4 Physikalische und histologische Analysen

5.4.1 Berstungsdruck

Das Colon descendens wurde etwa 3 cm proximal der Anastomose durchtrennt. Dann wurden die Kotballen aus dem distalen Teil des Colon und dem Rektum entfernt. Eine Knopfkanüle wurde über den Anus eingeführt und mittels Faden etwa 2 cm unterhalb der Anastomose fixiert. Außerdem wurde so der Darm nach distal wasserdicht verschlossen. Der Darm wurde über die Knopfkanüle mit Wasser gespült und so überflüssige Luft aus dem Darm entfernt. Anschließend wurde eine zweite Knopfkanüle über den eröffneten Darm proximal der Anastomose eingeführt und ebenfalls mit einem Faden fixiert. Nach erneuter Entlüftung des Darms über die Knopfkanüle wurde die proximale Knopfkanüle an einen Arterienkatheter angeschlossen (Aesculap AG, Tuttlingen, BRD). Über einen Patientenmonitor wird der Druck innerhalb des Kolons abgenommen (Infinity Omega S-Solution, Drägerwerk AG und

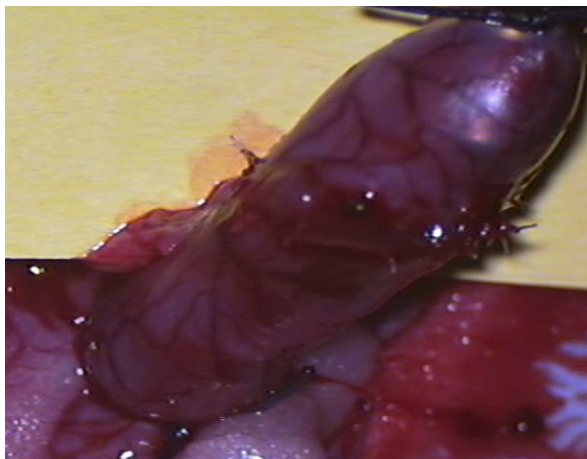


Abbildung 7 - Die Anastomose wurde auf Filterpapier gelagert, am proximalen Ende den Druckabnehmer, am distalen Ende die Pumpe angeschlossen.

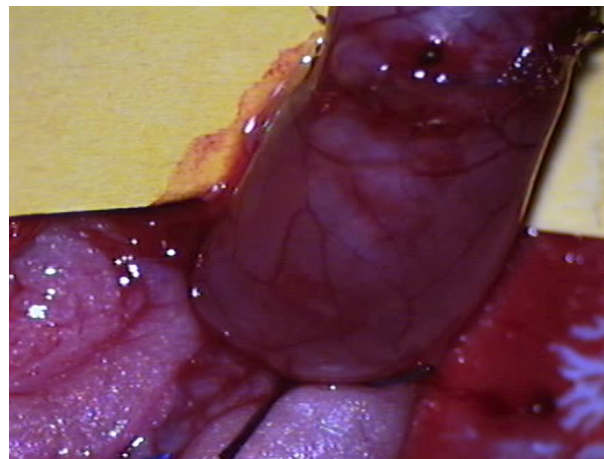


Abbildung 8 - Nach Ruptur der Anastomose ist Wasser auf dem Filterpapier zu sehen. Das Kolon ist prall gefüllt.

Co, Lübeck, BRD). Dann wurde der Darm vom Mesocolon abgetrennt und auf ein Löschpapier gelegt, um so eine bessere Beurteilung des Austritts von Wasser zu gewährleisten (Abbildung 7).

Der Darm wurde mit 2ml 0,9% NaCl gefüllt und dann die distal gelegene Knopfkanüle an einen Perfusor (Secura FT, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) angeschlossen, der auf 30ml/h eingestellt wurde. Über den Monitor wurde der Druck durchgehend abgeleitet bis an der Anastomose der erste Flüssigkeitsaustritt zu sehen war (Abbildung 8). Der Druckwert wurde zu diesem Zeitpunkt dokumentiert.

5.4.2 Histologie

Das nach Beendigung des Experimentes entnommene Stück Colon descendens wurde für drei Tage in 4% phosphatgepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von diesem Gewebe wurden Schnitte (5µm) angefertigt, die für die Hämatoxilin-Eosin Färbung (HE), die Sirius red Färbung und die weiteren immunhistologischen Färbungen verwendet wurden (Abbildung 9). Die CD31 Färbungen wurden aus den in Tissue tek fixierten Proben hergestellt.

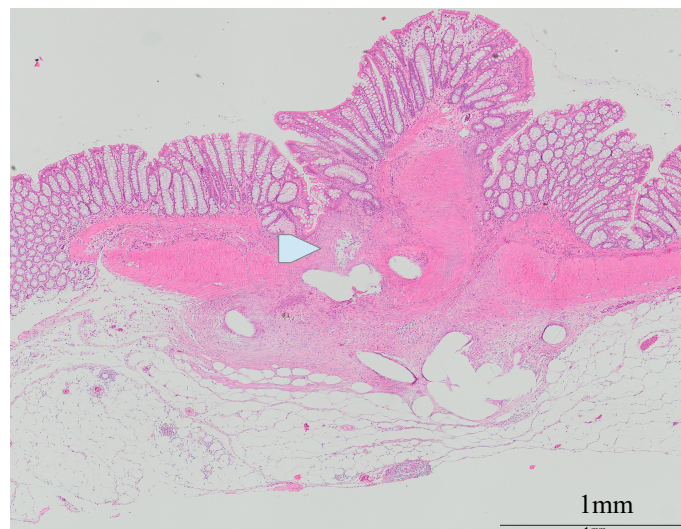


Abbildung 9 - Ausschnitt aus einer Kolonanastomose in Hämatoxilin-Eosin Färbung (HE). Der Pfeil markiert die Anastomose.

5.4.2.1 Quantitative Kollagenbestimmung

Die Paraffinschnitte wurden mit Sirius red-Lösung (Sigma-Aldrich, St- Louis, USA) eine Stunde lang gefärbt.

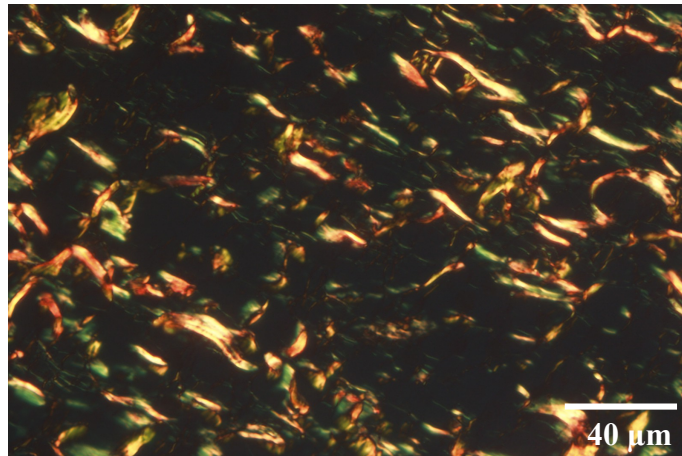


Abbildung 10 - In den mit Sirius red gefärbten Präparat aus einer Kolonanastomose wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie Kollagen I (gelb) und III (grün) dargestellt.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden die Sirius red gefärbten Schnitte verwendet. Über das Mikroskop (DP73, Olympus, Tokio, Japan) wurde nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 450-490nm die verschiedenen Kollagene sichtbar. Dabei war das festere Kollagen I in einem rot-orangen Farbton (600-650nm) und das weniger feste Kollagen III in einem grünlichen Farbton (500-550nm) zu sehen (Abbildung 10). Für jede Probe wurden 15 HPF der Kollagenschnitte ausgewertet. Anschließend wurde mittels cellSense Dimension (Olympus Corporation, Tokio, Japan) der Kollagengehalt anhand der Farbspektren als Fläche und als Anteil im Bild in Prozent bestimmt. In Excel (Microsoft Excel XP, Microsoft Cooperation, USA) wurde dann das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III anhand des prozentualen Anteils in den Schnitten gebildet (Grommes et al., 2013).

5.4.2.2 Immunhistologie

5.4.2.2.1 Caspase 3

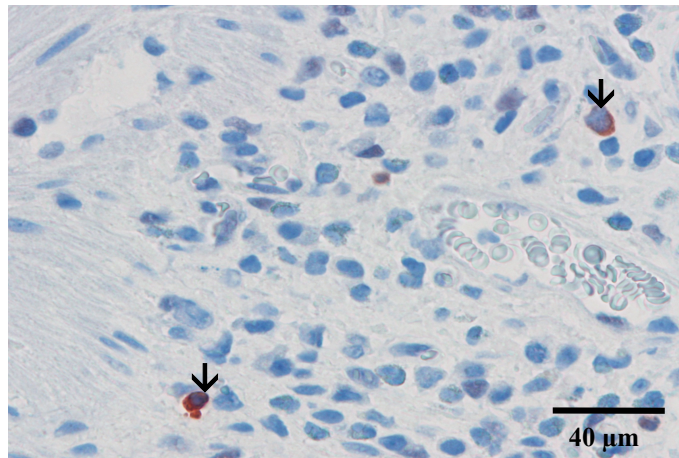


Abbildung 11 - Ausschnitt aus dem Granulationsgewebe einer Kolonanastomose nach Caspase 3-Färbung. Mit Pfeilen sind Caspase 3-positive Zellen markiert.

Als Indikator für apoptotischen Zelltod diente Caspase 3 (Cystein-Apartylproteasen). Zur immunhistochemischen Färbung wurde ein cleaved Caspase 3 Antikörper (1:100, New England Biolabs, Frankfurt, BRD) verwendet. Dieser erkennt Caspase-3-Fragmente (17/19 kDa) in Zellen, nicht aber Caspase 3 in voller Länge. Über Nacht wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mit diesem Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotin-markierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (ab3387, abcam, Cambridge, UK) verwendet und für 40 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurde Streptavidin-Peroxidase aufgetragen (1:50 in PBS verdünnt, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Chromogen wurde 3,3`Diaminobenzidin (DAB, D-4168, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt (Abbildung 11). Positive Zellen wurden in 15 HPF im Granulationsgewebe und in 15 HPF in der Mukosa der Anastomosenregion gezählt und in Zellen pro HPF angegeben.

5.4.2.2.2 PCNA

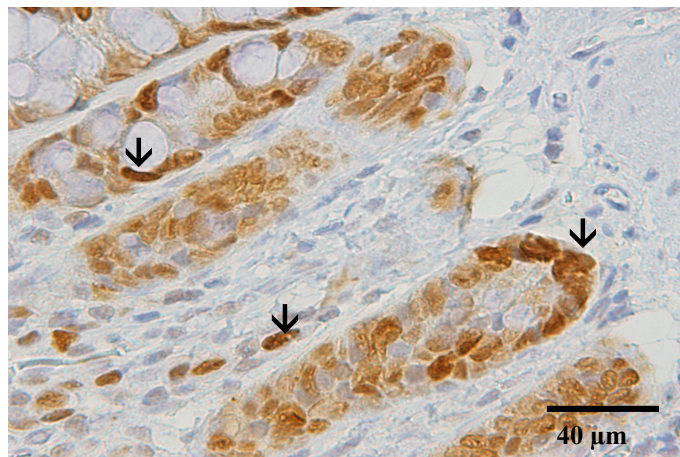


Abbildung 12 - Mukosa des Kolons nach PCNA-Färbung
Die Pfeile markieren PCNA-positive Zellen.

Als Indikator für die Zellproliferation diente PCNA (proliferation-cell-nuclear-antigen). Über Nacht wurden die Schnitte von in Paraffin eingebetteten Proben bei Raumtemperatur mit einem polyklonalen Kaninchen PCNA-Antikörper (1:200, abcam, Cambridge, UK) inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotin-markierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (ab3387, abcam, Cambridge, UK) verwendet und für 40min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurde Streptavidin-Peroxidase aufgetragen (1:50 in PBS verdünnt, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Chromogen wurde 3,3`Diaminobenzidin (DAB, D-4168, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland) gegengefärbt (Abbildung 12). Positive Zellen wurden in 15 HPF im Granulationsgewebe und in 15 HPF in der Mukosa der Anastomosenregion gezählt und in Zellen pro HPF angegeben.

5.4.2.2.3 CD31

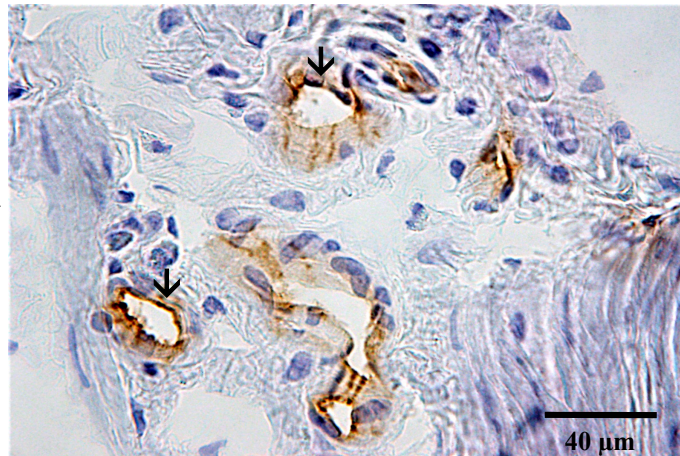


Abbildung 13 - Granulationsgewebe einer Kolonanastomose nach CD31-Färbung. Die mit Pfeilen markierten Zellen sind CD31-positiv.

Als Indikator für die Angiogenese wurde das ausschließlich auf Endothelzellen vorkommende CD31-Molekül (auch PECAM-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) verwendet. Als primärer Antikörper wurde ein Maus-anti-Ratte-CD31-Antikörper (1:250, Klon MEC13.3, BD Bioscience) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein kreuzreagibler peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:100, DAKO, Hamburg, BRD) verwendet und für 40 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Als Chromogen wurde 3,3`Diaminobenzidin (DAB, S 3000, Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland) gegengefärbt (Abbildung 13). CD31-positive Zellen wurden in 15 HPF im Granulationsgewebe und in 15 HPF in der Mukosa der Anastomosenregion gezählt und in positiven Zellen pro HPF angegeben.

5.4.2.2.4 CD68

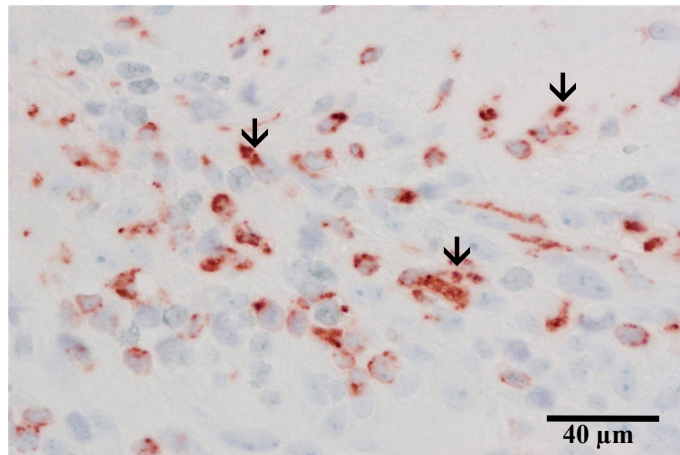


Abbildung 14 - Granulationsgewebe aus einer Kolonanastomose nach CD68-Färbung. Die mit Pfeilen markierten Zellen sind CD68-positiv.

Als Indikator für Makrophagen und Monozyten und somit für die Entzündungsreaktion wurde das CD68-Antigen verwendet. Zuerst wurden die Paraffinschnitte mit EDTA-Puffer pH 9,0 in Brutschrank bei 60°C für 17h angedaut. Anschließend wurde ein Maus-anti-Ratte-CD68 Antikörper (1:100, abcam, Cambridge, UK) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinmarkierter Ziege-anti-Maus IgG1-Antikörper (1:100, abcam, Cambridge, UK) für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Chromogen wurde 3,3`Diaminobenzidin (DAB, D-4168, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland) gegengefärbt (Abbildung 14). Die CD68-positiven Zellen wurden in 15 HPF im Granulationsgewebe und in 15 HPF in der Mukosa der Anastomosenregion gezählt und in positiven Zellen pro HPF angegeben.

5.4.2.2.5 MPO

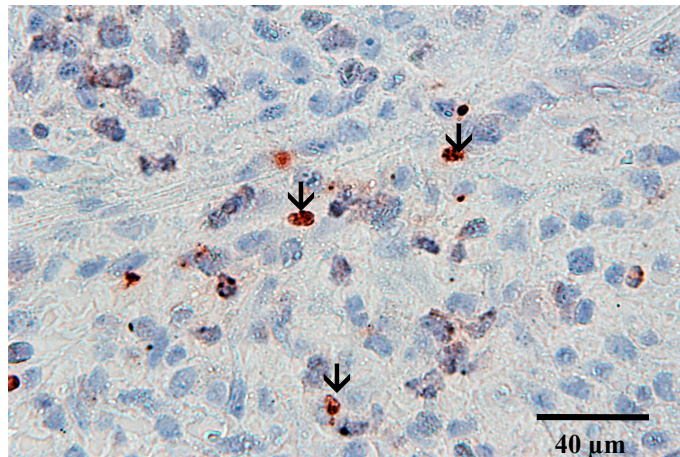


Abbildung 15 - Granulationsgewebe aus einer Kolonanastomose nach MPO-Färbung. Die mit Pfeilen markierten Zellen sind MPO-positiv.

Als Indikator für Granulozyten wurde die Myeloperoxidase (MPO) verwendet. Zuerst wurden die Paraffinschnitte angedaut, indem sie in der Mikrowelle bei 700W in 200ml EDTA-Puffer (pH 9,0) in einer großen Küvette für 15min gekocht wurden. Die Küvette wurde zwischendurch und nach dem Kochen mit aqua dest. aufgefüllt. Dann ließ man sie bei Raumtemperatur für 25 Minuten abkühlen. Als Primärantikörper wurde ein Maus-anti-Ratte-MPO Antikörper (1:100, ab3387, abcam, Cambridge, UK) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinmarkierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (ab64256, abcam, Cambridge, UK) für 40 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Als Chromogen wurde 3,3'Diaminobenzidin (DAB, D-4168, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland) gegengefärbt (Abbildung 15). Die MPO-positiven Zellen wurden in 15 HPF im Granulationsgewebe und in 15 HPF in der Mukosa der Anastomosenregion gezählt und in positive Zellen pro HPF angegeben.

5.4.2.2.6 Ki67

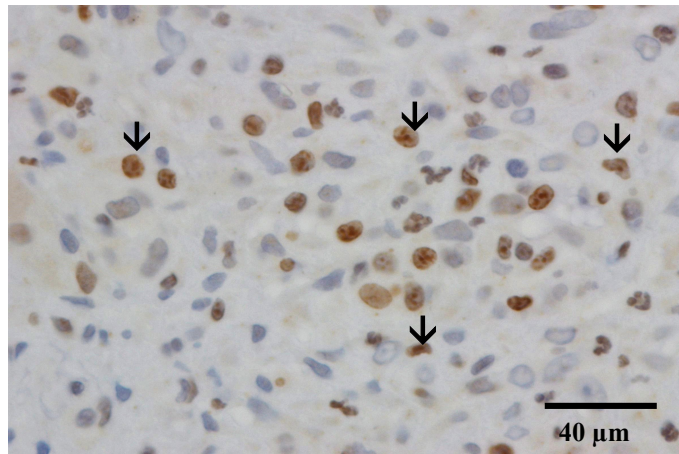


Abbildung 16 - Granulationsgewebe aus einer Kolonanastomose nach Ki67-Färbung. Die mit Pfeilen markierten Zellen sind Ki67-positiv.

Als Indikator für die Zellproliferation wurde das Ki67-Protein verwendet. Dieses ist bei Zellen in der Reproduktionsphase besonders aktiv (G1-, G1- und M-Phase), aber nicht in der G0-Phase. Zuerst wurden die Paraffinschnitte in Citrat-Puffer (pH 6,0) für 17h bei 60°C im Brutschrank angedaut. Anschließend wurde als Primärantikörper ein Kaninchen-anti-Ratte-Ki-67 Antikörper (1:100, ab66155, abcam, Cambridge, UK) über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Der Sekundärantikörper, ein biotinmarkierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (ready-to-use, abcam, Cambridge, UK), wurde aufgetragen und für 40 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Streptavidin-Peroxidase aufgetragen (1:50 in PBS verdünnt, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und für 12 Minuten inkubiert. Als Chromogen wurde AEC (ready-to-use, abcam, Cambridge, UK) verwendet. Anschließend wurden die Kerne mit Hämalaun nach Mayer (VWR, Rednor, Pennsylvania, USA) für 30 Sekunden gegengefärbt (Abbildung 16). Die Ki67-positiven Zellen wurden in 15 HPF im Granulationsgewebe und in 15 HPF in der Mukosa der Anastomosenregion gezählt und in positive Zellen pro HPF angegeben.

5.5 ELISA

Die ELISAs wurden mit den in Lysis-Puffer eingefrorenen Proben durchgeführt.

5.5.1 Entzündungsmediatoren

5.5.1.1 IL-6

Die ELISAs wurde mittels DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 (R&D Systems, Katalognummer DY008, McKinley Place NE, Minneapolis, USA) durchgeführt.

Zunächst wurde die ELISA-Platte vorbereitet. Dazu wurden je 100µl Maus-anti-Ratte-IL-6 Antikörper als Fangantikörper in die Vertiefungen der Platte gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den Vertiefungen abgesaugt und die Vertiefungen mit je 400µl Waschpuffer zweimalig gewaschen. Der Waschpuffer wurde komplett entfernt. Um die Platte zu blocken, wurde je 300µl Reagenzverdünner hinzugegeben. Danach wurde der Waschschrift wiederholt.

Nach Abschluss der Vorbereitung der ELISA-Platte wurden je 100µl der Proben in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen abgedeckt und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut mit 400µl Waschpuffer zweimal gewaschen. Der Waschpuffer wurde komplett entfernt.

Es wurde eine Verdünnungsreihe der Suchantikörperlösung hergestellt. Dazu wurden 500µl der Standardsuchantikörperlösung (Ziege-anti-Ratte IL-6 Antikörper) mit 500µl Reagenzverdünner vermischt. Anschließend wurden 500µl der verdünnten Antikörperlösung entnommen und erneut mit 500µl des Reagenzverdünners vermischt. Der Schritt wurde insgesamt sieben mal wiederholt.

Anschließend wurden je 100µl der verdünnten Suchantikörperlösung in die zu der jeweiligen Verdünnungsreihe gehörigen Vertiefung gegeben. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen abgedeckt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut der Waschschrift mit 400µl Waschpuffer wiederholt. Es wurden 100µl Substratlösung als Farbreagenz hinzugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde 50µl der Stopplösung hinzugegeben. Zur Auswertung wurde die optische Dichte bei 450nm ausgelesen.

5.5.1.2 IL-8

Die ELISAs wurde mittels RAT IL8 ELISA Kit durchgeführt. (LifeSpan BioScience, Katalognummer: LS-F36750, Seattle, Washington State, USA). Für die Untersuchung

wurden bereits mit monoklonalen Ratten-IL8 Antikörpern als Fangantikörper beschichtete Platten verwendet. Die Vertiefungen der Platte wurden zunächst mit je 350µl Waschpuffer zweimal gereinigt. Der Waschpuffer wurde komplett entfernt. Dann wurden je 100µl der Proben in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Die Flüssigkeit wurde aus den Vertiefungen abpipettiert.

Es wurde eine Verdünnungsreihe aus den Standardantikörpern (biotynilierte Ratten-IL8 Antikörper) hergestellt. Hierfür wurde in 300µl Standardantikörper zu 300µl Standardverdünner gegeben. Daraus wurden wieder 300µl entnommen und erneut zu 300µl Standardverdünner gegeben. Dieser Schritt wurde siebenmal wiederholt. Diese wurden als Suchantikörper verwendet.

Anschließend wurden je 100µl der verdünnten Suchantikörperlösung in die zu der jeweiligen Verdünnungsreihe gehörigen Vertiefung gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Vertiefungen erneut dreimal mit 350µl Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer wurde anschließend komplett entfernt.

Anschließend wurde in jede Vertiefung 100µl HRP-Streptavidin Konjugat gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und der Waschvorgang erneut fünfmal durchgeführt. Dann wurde 90µl TMB Lösung hinzugegeben. Die Platte wurde abgedeckt und bei 37°C für 15-30 Minuten inkubiert. Danach wurden 50µl Stopplösung hinzugegeben. Zur Auswertung wurde die optische Dichte bei 450nm ausgelesen.

5.5.2 TGF-β

Die ELISAs wurde mittels Rat LAP ELISA Ready-SET-Go (affymetrix eBioscience, Katalognummer 88-50680, San Diego, USA) angefertigt. Die ELISA-Platte wurde mit 100µl/Vertiefung monoklonalem Ratte-anti-TGF-β1 Antikörper als Fangantikörper beschichtet. Anschließend wurde die Platte versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde aus den einzelnen Vertiefungen aspiriert und die Vertiefungen wurden zweimal mit 400µl/Vertiefung Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Vertiefungen mit 250µl Blockpuffer blockiert und bei Raumtemperatur für 2h inkubiert.

Es wurden die Verdünnungsreihen hergestellt. Hierfür wurden 100µl Assay-Puffer (PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA) zu je 100µl der standardisierten Antikörperlösung (rekombinierter Ratte-anti-TGFβ1 Antikörper) hinzugegeben und durch mehrfaches Aspirieren vermengt. Anschließend wurden 100µl der verdünnten Antikörper entnommen

und erneut mit 100µl Assay-Puffer vermischt. Dieser Schritt wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Es wurden 100µl Assay-Puffer A in die unverdünnte Suchantikörperlösung und 80µl Assay-Puffer A in die verdünnte Suchantikörperlösung hinzugefügt.

Es wurden 20µl der Proben in die Vertiefung gegeben und mit Assay-Puffer A um das hundertfache verdünnt. Anschließend wurden je 50µl der verdünnten Suchantikörperlösung in die zu der jeweiligen Verdünnungsreihe gehörigen Vertiefung gegeben. Danach wird die Platte versiegelt und bei Raumtemperatur für 2h inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben erneut dreimal mit 400µl Waschpuffer gewaschen. Dann wurde zu jeder Probe 100µl Streptavidin HRP zugefügt. Die Platte wurde erneut versiegelt und bei Raumtemperatur für 1h inkubiert. Es folgte erneut das viermalige Waschen der Proben mit 400µl Waschpuffer. Anschließend wurde den Proben je 100µl Tetramethylbenzidine Substrat Lösung hinzugefügt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde jeder Probe 100µl Stopplösung hinzugefügt. Zur Auswertung wurde die optische Dichte bei 450nm ausgelesen.

5.5.3 VEGF

Die ELISAs wurde mittels RAT VEGF Immunoassay durchgeführt. (Quantikine ELISA, Katalognummer: RRV00, R&D Systems, Minneapolis, USA). Für die Untersuchung wurden bereits mit monoklonalen Ratten-VEGF Antikörpern als Fangantikörper beschichtete Platten verwendet. In die Vertiefungen wurden jeweils 50µl Assay Verdünnung RD1-41 gegeben. Anschließend wurden je 50µl der Proben in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde mittels Klebestreifen verschlossen und für 2h bei Raumtemperatur in einen Orbitalschüttler für Mikroplattem bei einer Drehzahl von 500 +/- 50rpm gestellt. Anschließend wurden die Proben fünfmal mit 400µl Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer wurde komplett entfernt.

Es wurde eine Verdünnungsreihe aus den Standardantikörpern (rekombinanter Ratten-VEGF Antikörper) hergestellt. Hierfür wurde in 200µl Standardantikörper zu 200µl Kalibrierungsverdünner RD5-18 gegeben. Daraus wurden wieder 200µl entnommen und erneut zu 200µl Kalibrierungsverdünner RD5-18 gegeben. Dieser Schritt wurde 6 Mal wiederholt. Diese wurden als Suchantikörper verwendet.

Anschließend wurden je 100µl der verdünnten Suchantikörperlösung in die zu der jeweiligen Verdünnungsreihe gehörigen Vertiefung gegeben und bei Raumtemperatur für 1h auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Waschschrift wiederholt. Es wurden 100µl Substratlösung als Farbreagenz hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Dann wurden 10µl Stopplösung hinzugegeben. Zur Auswertung wurde die optische Dichte bei 450nm ausgelesen.

5.6 Datenerfassung und Statistik

Die ausgewerteten Daten wurden zunächst handschriftlich notiert und anschließend an einem Computer in eine Excel Tabelle übertragen (Microsoft Excel XP, Microsoft Cooperation, USA). Aus den so erfassten Daten wurde der Mittelwert und die Standardfehler (SEM, standard error of the mean) bestimmt. Nachdem die Werte auf Varianzgleichheit und Normalverteilung geprüft wurden, wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mittels ANOVA (one-way analyses of variance) bestimmt. Darauf erfolgte ein post-hoc Test, welche die Korrektur des alpha-Fehlers gemäß Bonferroni beinhaltete, um Mehrfachtestungen zu kompensieren. Ein Unterschied wurde ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit vom $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Zur statistischen Auswertung und zum Erstellen der Grafiken wurde SigmaPlot 13.0 (SPSS Inc., Chicaco Illinois, USA) verwendet.

6 Ergebnisse

6.1 Allgemeine Komplikationen

Die Anastomosenanlage erfolgte am Tag 0 in Ketamin/Rompun-Narkose, welche von 4 Tieren nicht vertragen wurde. Dies äußerte sich darin, dass diese Tiere im Laufe der Operation einen Atemstillstand erlitten und trotz Reanimation nicht wiederbelebt werden konnten. Ein Tier erlitt trotz täglicher Kontrolle einen Platzbauch. Keines der Versuchstiere zeigte Auffälligkeiten im Putz- oder Fressverhalten während der Dauer des Versuches. Zum Zeitpunkt der Relaparotomie war bei keinem der Tiere ein Anzeichen für eine Peritonitis oder eine Anastomoseninsuffizienz zu sehen.

6.2 Analysen nach drei Tagen

6.2.1 Berstungsdruck

Bei der Shamgruppe lag der Berstungsdruck durchschnittlich bei 46mmHg. Die Cilo 30-Gruppe hatte einen durchschnittlichen Berstungsdruck von 38mmHg und lag damit etwas unter dem Druck der Sham-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied war aber nicht festzustellen. Die Cilo 60-Tiere hatten einen durchschnittlichen Berstungsdruck von 74mmHg und lagen damit etwas höher als die Sham-Gruppe. Doch auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 17).

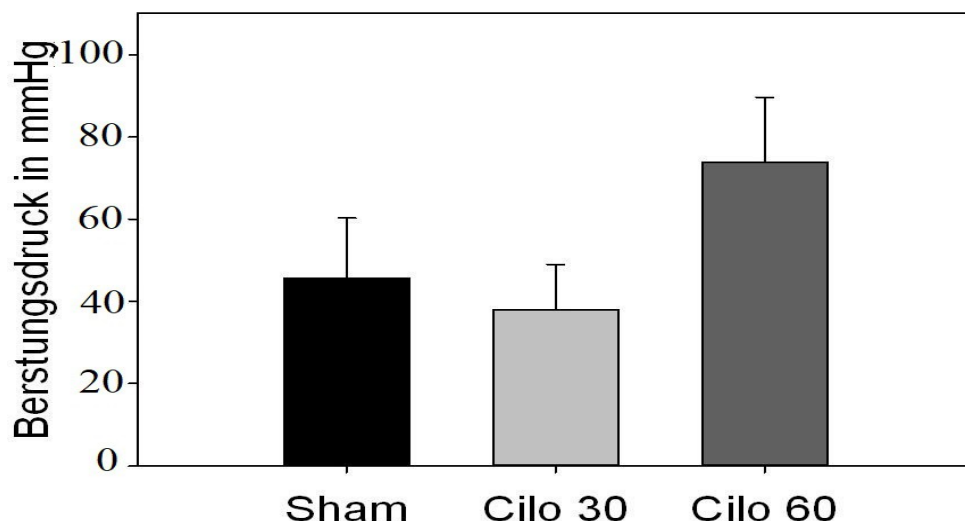


Abbildung 17 - Berstungsdruck von Colon descendens Anastomosen 3 Tage nach Anastomosennaht. Die Versuchstiere erhielten täglich 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol. Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG(Sham, schwarze Säule). Mittelwert \pm SEM

6.2.2 Immunhistochemie

6.2.2.1 Caspase 3

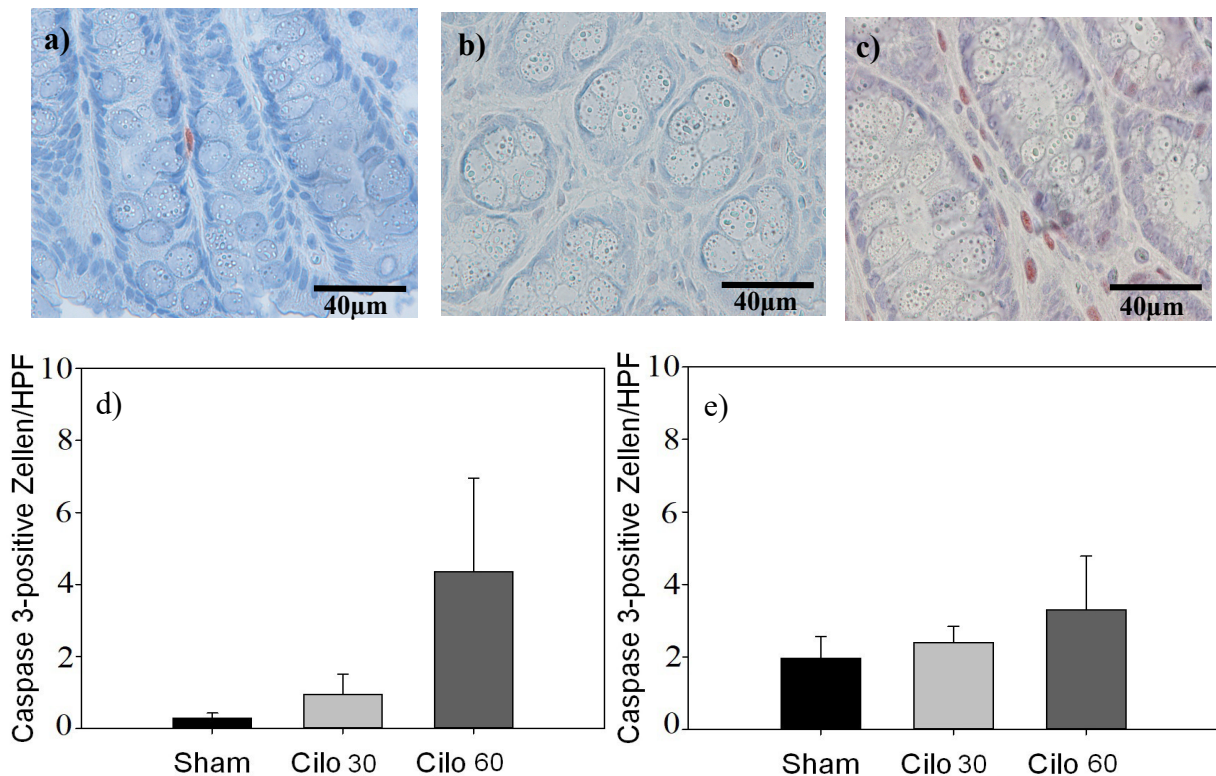


Abbildung 18 – Caspase 3-Färbung der Colon descendes Anastomosen 3 Tage nach Anastomosennaht

Caspase 3-Färbung der anastomosennahen Mukosa des Kolons eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl Caspase 3-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol.

Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert \pm SEM

Im Granulationsgewebe der Anastomose in der Sham-Gruppe zeigten sich im Durchschnitt 2 Caspase-3-positiven Zellen/HPF. Die Zahl der Caspase 3-positiven Zellen/HPF in der Cilo 30-Gruppe lag bei 2 und in der Cilo 60-Gruppe bei 3 (Abbildung 18). Die Analyse der anastomosennahen Mukosa ergab einen Trend zu einer höheren Apoptoserate unter Cilostazolgabe. Während in der Sham-Gruppe die Zahl der Caspase 3-positiven Zellen/HPF bei 0 lag, waren es in der Cilo 30-Gruppe 1 und in der Cilo 60-Gruppe 4 Caspase 3-positiven Zellen pro HPF. Allerdings war in der statistischen Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen nachweisbar.

6.2.2.2 PCNA

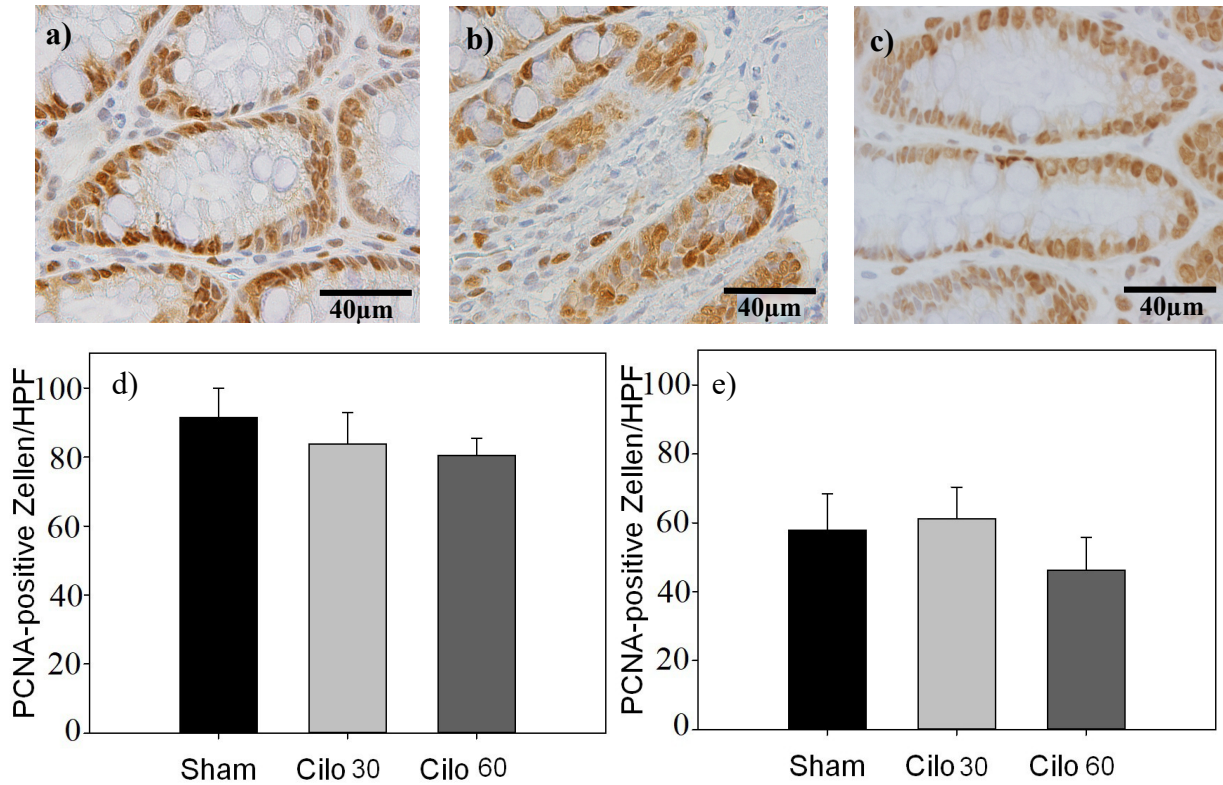


Abbildung 19 – PCNA-Färbung der Colon descendes Anastomosen 3 Tage nach Anastomosennaht

PCNA-Färbung der anastomosennahen Mukosa des Kolons eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl PCNA-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol.

Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

Mit 58 PCNA-positiven Zellen/HPF in der Sham-Gruppe und 61 PCNA-positiven Zellen/HPF in der Cilo 30-Gruppe zeigen diese beiden Gruppen im Granulationsgewebe keinen großen Unterschied. Lediglich die Cilo 60-Gruppe liegt mit 46 PCNA-positiven Zellen/HPF etwas niedriger als die anderen beiden. In der anastomosennahen Mukosa ist mit 91 PCNA-positiven Zellen/HPF in der Sham-Gruppe, 84 PCNA-positiven Zellen/HPF in der Cilo 30-Gruppe und 80 PCNA-positiven Zellen in der Cilo 60-Gruppe ein leicht abnehmender Trend bei höherer Dosierung von Cilostazol zu sehen (Abbildung 19). Ein signifikanter Unterschied bestand aber zwischen den Gruppen weder im Granulationsgewebe noch in der Mukosa.

6.2.2.3 CD31

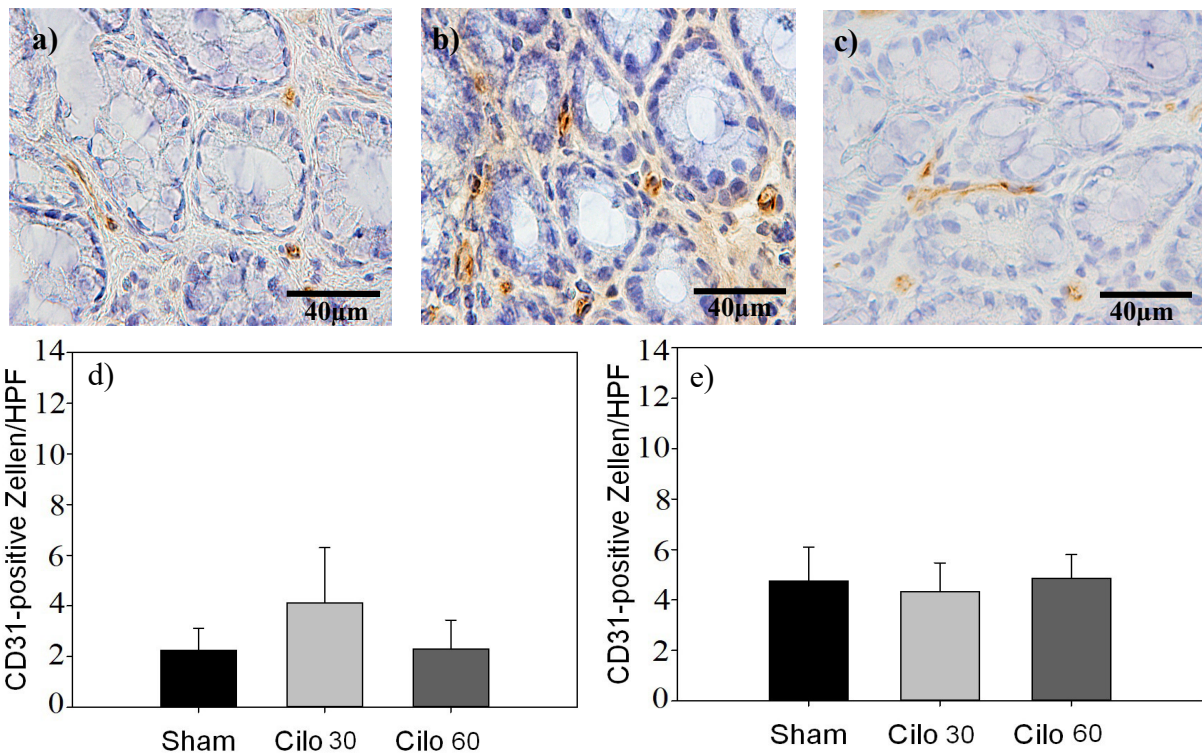


Abbildung 20 – CD31-Färbung der Colon descendes Anastomosen 3 Tage nach Anastomosennaht.

CD31-Färbung der anastomosennahe Mukosa des Kolons eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl CD31-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahe Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol. Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert \pm SEM

Zwischen den drei verschiedenen Gruppen bestand im Granulationsgewebe der Kolonanastomose nur sehr geringe Unterschiede. Im Bereich der anastomosennahe Mukosa war die Anzahl der CD31-positiven Zellen/HPF in der Cilo 30-Gruppe zwar etwas höher als in den anderen beiden Gruppen, aber auch dieser Unterschied war nicht signifikant (Abbildung 20).

6.2.2.4 CD68

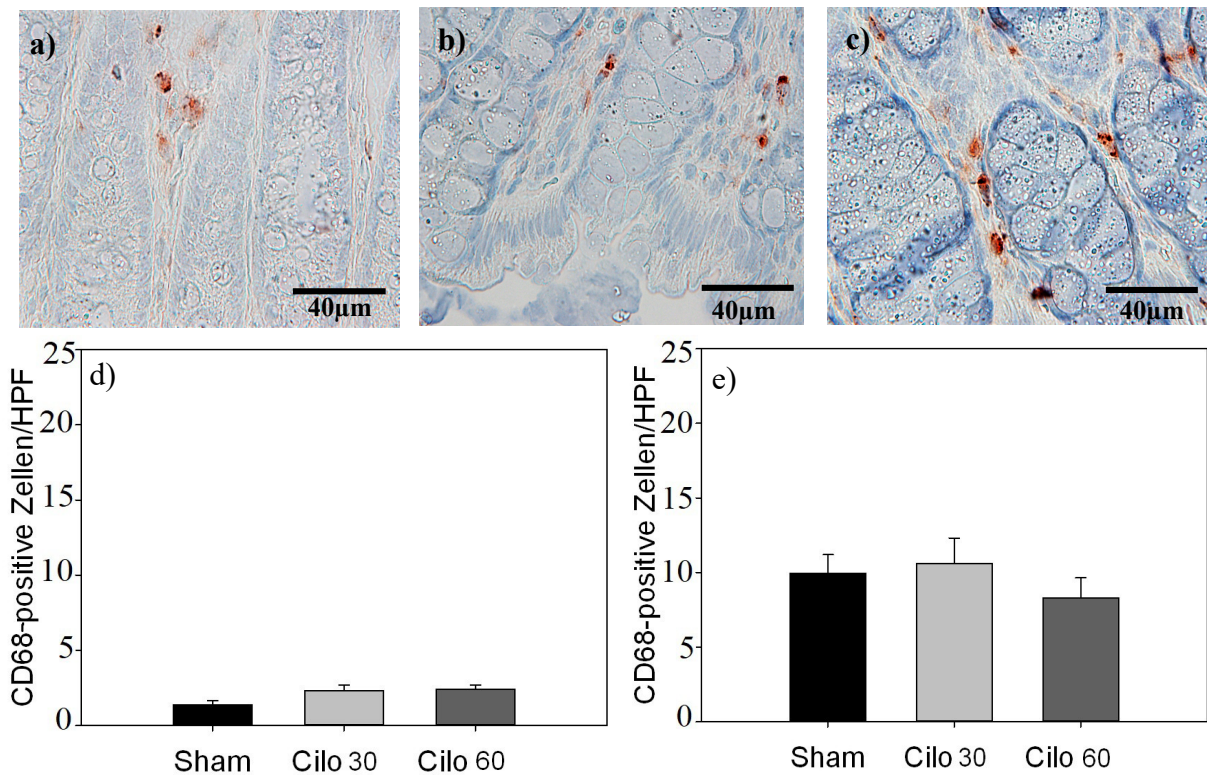


Abbildung 21 – CD68-Färbung der Colon descensum Anastomosen 3 Tage nach Anastomosennaht.

CD68-Färbung der anastomosennahen Mukosa des Kolons eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl CD68-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol. Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

Im Granulationsgewebe der Kolonanastomosen waren die Ergebnisse mit 10 CD68-positiven Zellen/HPF in der Sham-Gruppe und 11 CD68-positiven Zellen/HPF in der Cilo 30-Gruppe vergleichbar. Lediglich in der Cilo 60-Gruppe war die Anzahl mit 8 CD68-positiven Zellen/HPF etwas niedriger, aber auch hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. In der anastomosennahen Mukosa nahm die Anzahl die Zellen unter Cilostazolgabe mit 1 CD68-positiven Zelle/HPF in der Sham-Gruppe, 2 CD68-positiven Zellen/HPF in der Cilo 30-Gruppe und 2 CD68-positiven Zellen/HPF in der Cilo 60-Gruppe leicht zu (Abbildung 21). Aber auch hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen.

6.2.2.5 MPO

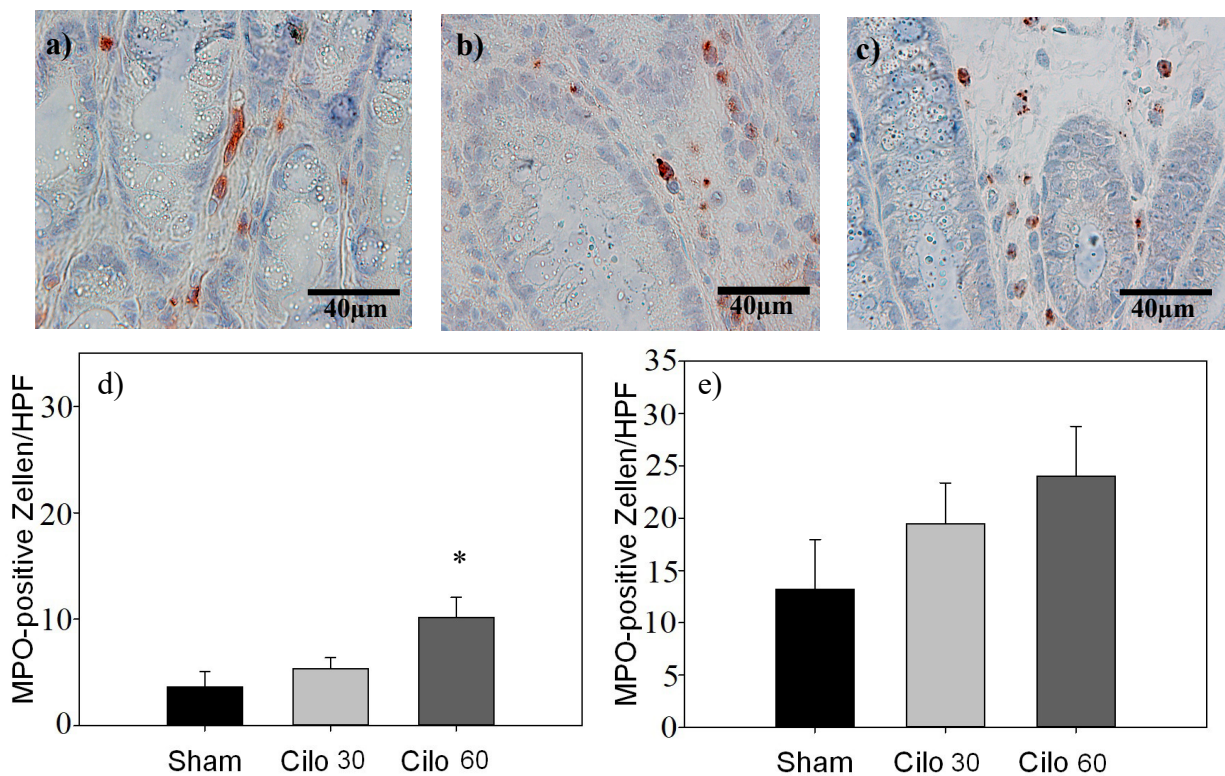


Abbildung 22 – MPO-Färbung der Colon descensus Anastomosen 3 Tage nach Anastomosennaht.

MPO-Färbung der anastomosennahe Mukosa des Kolons eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl MPO-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahe Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol.

Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM, *p<0,05 vs. Sham

Sowohl im Granulationsgewebe der Kolonanastomosen als auch in der anastomosennahe Mukosa sah man eine Tendenz zur Zunahme der MPO-positiven Zellen/HPF unter Cilostazolgabe. Jedoch nur die 10 MPO-positiven Zellen/HPF in der anastomosennahe Mukosa von den Cilo 60-Tieren waren gegenüber den 4 MPO-positiven Zellen/HPF der Sham-Gruppe mit einem p-Wert von 0,018 signifikant erhöht. Der Durchschnittswert der Cilo 30-Gruppe lag bei 5 MPO-positiven Zellen/HPF in der anastomosennahe Mukosa. Ein signifikanter Unterschied zur Sham-Gruppe lag nicht vor (Abbildung 22).

Im Granulationsgewebe der Kolonanastomose lag der Durchschnittswert der Sham-Gruppe

bei 13 MPO-positiven Zellen/HPF, der Cilo 30-Gruppe bei 19 MPO-positiven Zellen/HPF und der Cilo 60-Gruppe bei 24 MPO-positiven Zellen/HPF. Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen bestand nicht.

6.2.2.6 Ki67

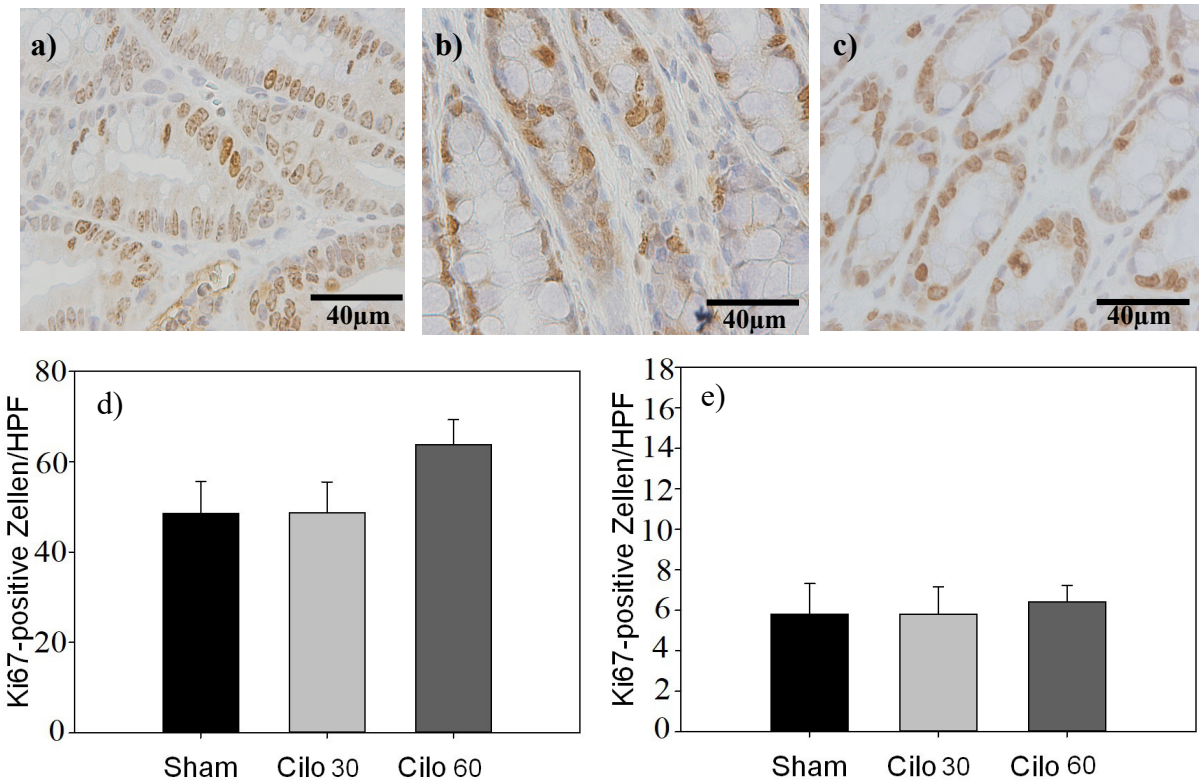


Abbildung 23 – Ki67-Färbung der Colon descendes Anastomosen 3 Tage nach Anastomosennaht.

Ki67-Färbung der anastomosennahen Mukosa des Kolons eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl Ki67-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol. Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert \pm SEM

Im Granulationsgewebe der Kolonanastomosen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden. Ähnliches gilt für die anastomosennahe Mukosa. Hier war die Anzahl die positiven Zellen in der Shamgruppe mit 49 Ki67-positiven Zellen/HPF und in der Cilo 30-Gruppe mit 49 Ki67-positiven Zellen/HPF

identisch. Die Anzahl der Zellen in der Cilo 60-Gruppe war mit 64 Ki67-positiven Zellen etwas höher (Abbildung 23). Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen bestand hier jedoch ebenfalls nicht.

6.2.3 Kollagen I/III

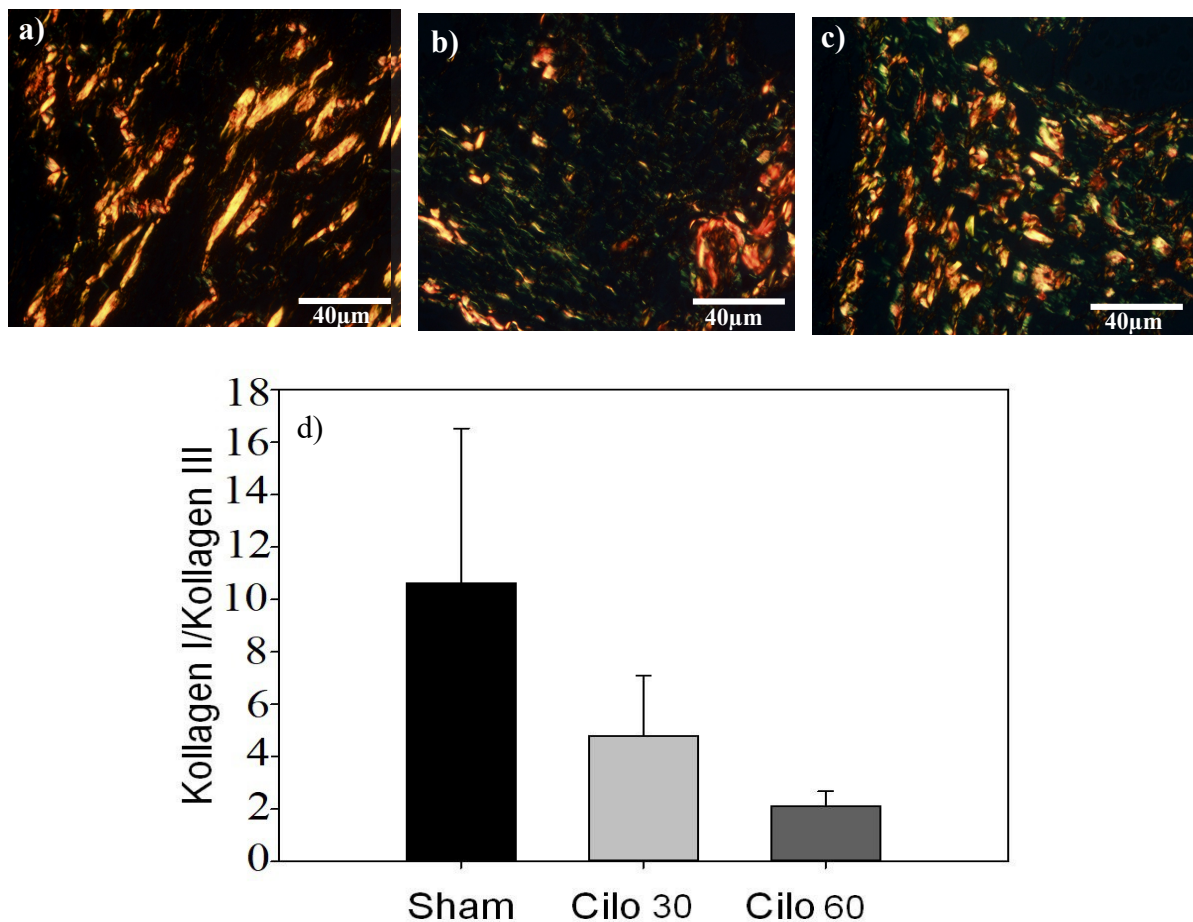


Abbildung 24 - Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III 3 Tage nach Anastomosennaht

Sirius red-Färbung des Granulationsgewebes der Kolonanastomosen unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Verhältnis des prozentualen Anteils von Kollagen Typ I (orange-gelb) zu Kollagen Typ III (grün) (d). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol. Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

Das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III nahm mit zunehmender Erhöhung der Cilostazoldosis ab. Das heißt, dass es sich zu Ungunsten des stabileren Kollagen Typ I

verschob. So lag das Verhältnis in der Sham-Gruppe noch bei 11, in der Cilo 30-Gruppe bei 5 und in der Cilo 60-Gruppe nur noch bei 2. Dieser Unterschied zwischen den drei Gruppen war allerdings statistisch nicht signifikant (Abbildung 24).

6.2.4 ELISA

6.2.4.1 Entzündungsmediatoren

6.2.4.1.1 IL-6

In der ELISA Untersuchung von IL-6 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe. In der Sham-Gruppe wurden durchschnittlich $292\text{pg/ml} \pm 20\text{pg/ml}$ Gewebe IL-6, in der Cilo 30-Gruppe $355\text{pg/ml} \pm 21\text{pg/ml}$ Gewebe IL-6 und in der Cilo 60-Gruppe $352\text{pg/ml} \pm 33\text{pg/ml}$ Gewebe IL-6 gemessen.

6.2.4.1.2 IL-8

In der ELISA Untersuchung von IL-8 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe. In der Sham-Gruppe wurden durchschnittlich $7\text{pg/ml} \pm 4\text{pg/ml}$ Gewebe IL-8, in der Cilo 30-Gruppe $7\text{pg/ml} \pm 2\text{pg/ml}$ Gewebe IL-8 und in der Cilo 60-Gruppe $10\text{pg/ml} \pm 4\text{pg/ml}$ Gewebe IL-8 gemessen.

6.2.4.2 TGF- β

In der ELISA Untersuchung von TGF- β zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe. In der Sham-Gruppe wurden durchschnittlich $151\text{pg/ml} \pm 33\text{pg/ml}$ Gewebe TGF- β , in der Cilo 30-Gruppe $199\text{pg/ml} \pm 18\text{pg/ml}$ Gewebe TGF- β und in der Cilo 60-Gruppe $116\text{pg/ml} \pm 20\text{pg/ml}$ Gewebe TGF- β gemessen.

6.2.4.3 VEGF

In der ELISA Untersuchung von VEGF zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe. Im Großteil der untersuchten Proben lag VEGF unter der Nachweisgrenze.

6.3 Analysen nach 7 Tagen

6.3.1 Berstungsdruck

Nach 7 Tagen lag der durchschnittliche Berstungsdruck der Sham-Gruppe bei 161 mmHg. In der Cilo 30-Gruppe lag der durchschnittliche Wert bei 148 mmHg und damit etwas unter dem der Sham-Gruppe. Allerdings lag kein signifikanter Unterschied vor. In der Cilo 60-Gruppe betrug der durchschnittliche Wert 150 mmHg und lag damit ebenfalls unter dem der Sham-Gruppe. Auch hier bestand jedoch kein signifikanter Unterschied (Abbildung 25).

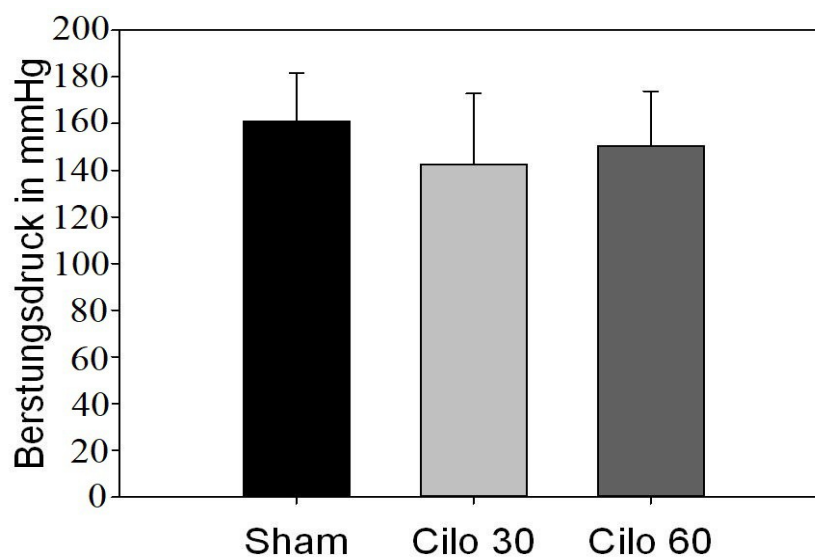


Abbildung 25 - Berstungsdruck von Colon descendens Anastomosen 7 Tage nach Anastomosennaht

Die Versuchstiere erhielten täglich 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol. Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule). Mittelwert ± SEM

6.3.2 Immunhistochemie

6.3.2.1 Caspase 3

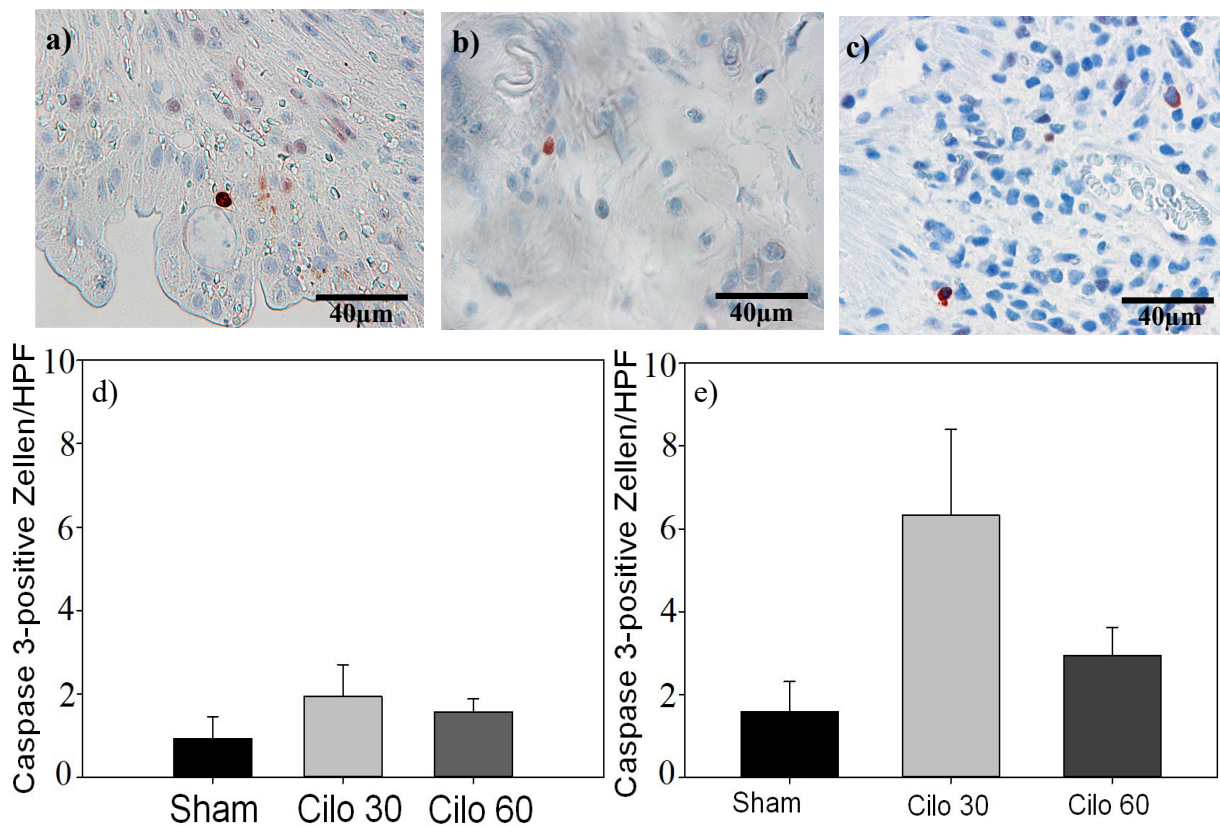


Abbildung 26 – Caspase 3-Färbung der Colon descensum Anastomosen 7 Tage nach Anastomosennaht.

Caspase 3-Färbung des Granulationsgewebes der Kolonanastomosen eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl Caspase 3-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol.

Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

Auch 7 Tage nach Anastomosennaht zeigte sich eine höhere Apoptoserate in den Cilostazol-Gruppen gegenüber der Sham-Gruppe, wobei weder in der Cilo 30- noch in der Cilo 60-Gruppe ein signifikanter Unterschied gegenüber der Shamgruppe vorlag. In der Shamgruppe lag die durchschnittliche Anzahl der Caspase 3-positiven Zellen im Granulationsgewebe der Kolonanastomosen bei 2/HPF und in der anastomosennahen Mukosa bei 1/HPF. In der Cilo 30-Gruppe betrug der Durchschnittswert im Granulationsgewebe 6 Caspase 3-positiv Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa 2 Caspase 3-positiv Zellen/HPF. In der

Cilo 60-Gruppe lag der durchschnittliche Wert im Granulationsgewebe bei 3 Caspase 3-positiven Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa bei 2 Caspase-3-positiven Zellen/HPF (Abbildung 26).

6.3.2.2 PCNA

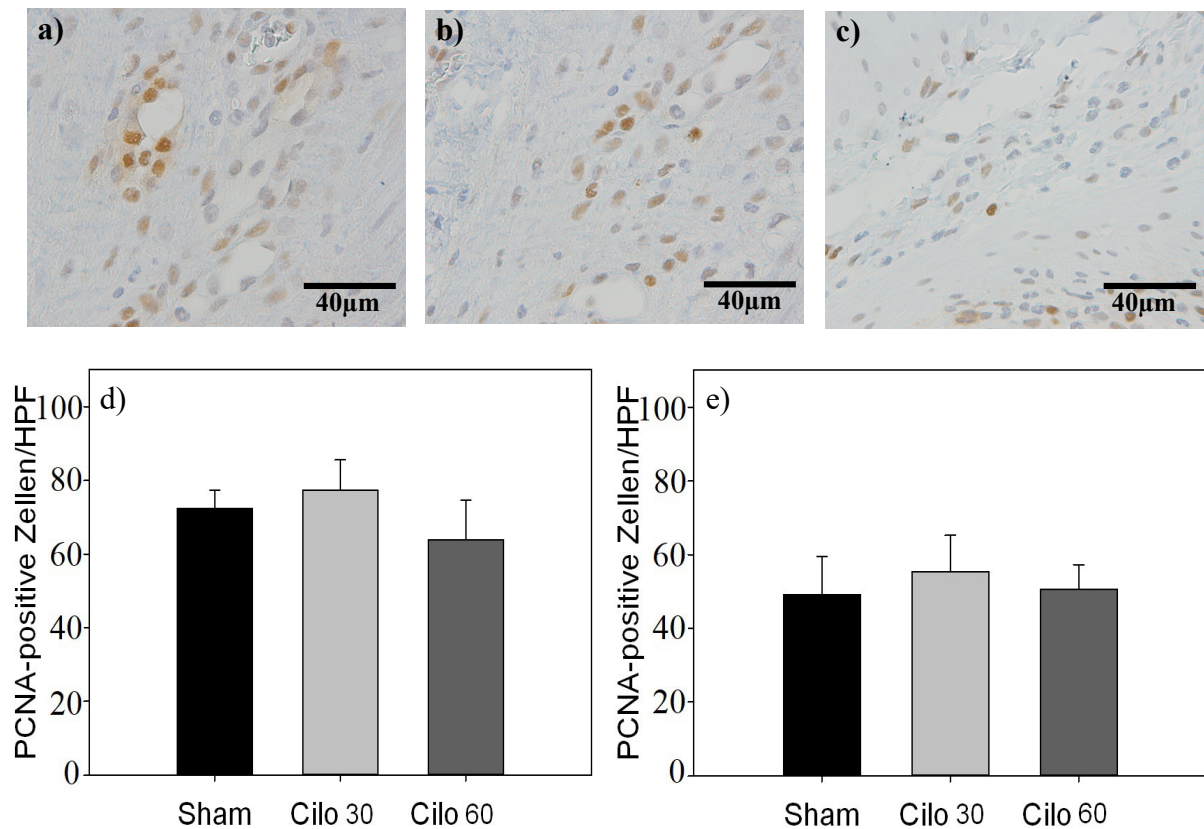


Abbildung 27 – PCNA-Färbung der Colon descendes Anastomosen 7 Tage nach Anastomosennaht.

PCNA-Färbung des Granulationsgewebes der Kolonanastomosen eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl PCNA-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol.

Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

In der Sham-Guppe waren im Durchschnitt im Granulationsgewebe der Kolonanastomose 49 PCNA-positiv Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa 73 PCNA-positiv Zellen/HPF zu finden. In der Cilo 30-Gruppe lag die durchschnittliche Anzahl der PCNA-positiv Zellen im Granulationsgewebe bei 55/HPF und in der anastomosennahen Mukosa bei 77/HPF. In der Cilo 60-Gruppe betrug der durchschnittliche Wert im Granulationsgewebe

51 PCNA-positive Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa 64 PCNA-positive Zellen/HPF (Abbildung 27). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe bestand nicht.

6.3.2.3 CD31

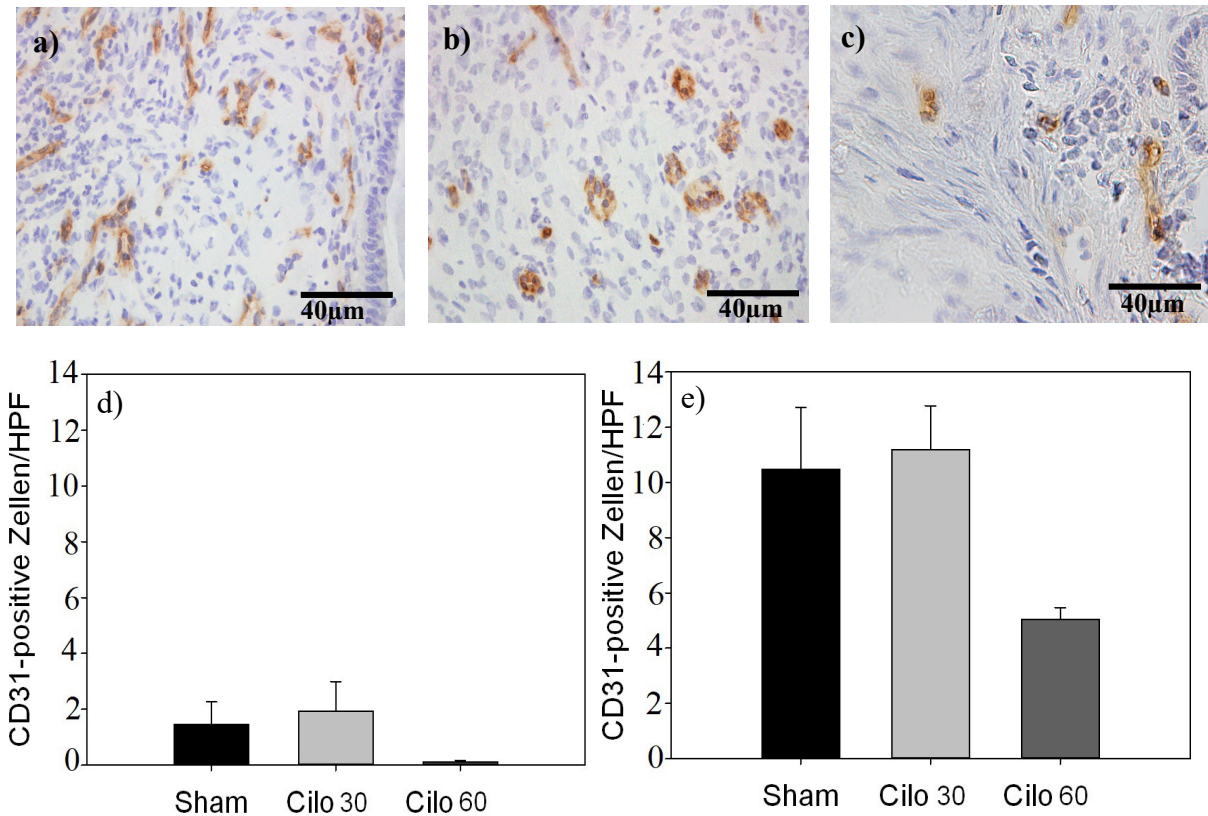


Abbildung 28 – CD31-Färbung der Colon descendes Anastomosen 7 Tage nach Anastomosennaht.

CD31-Färbung des Granulationsgewebes der Kolonanastomosen eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl CD31-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol.

Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

Die CD31 Analyse zeigte in der Sham-Gruppe betrug im Granulationsgewebe 10 CD31-positive Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa 1 CD31-positive Zelle/HPF. Die Cilo 30-Gruppe hatte im Granulationsgewebe mit 11 CD31-positiven Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa mit 2 CD31-positiven Zellen/HPF etwas höhere Durchschnittswerte als die Sham-Gruppe. Dagegen lag die Cilo 60-Gruppe im Durchschnitt

im Granulationsgewebe mit 5 CD31-positiven Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa 0 CD31-positiven Zellen/HPF deutlich unterhalb der Sham-Gruppe (Abbildung 28). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe bestanden allerdings nicht.

6.3.2.4 CD68

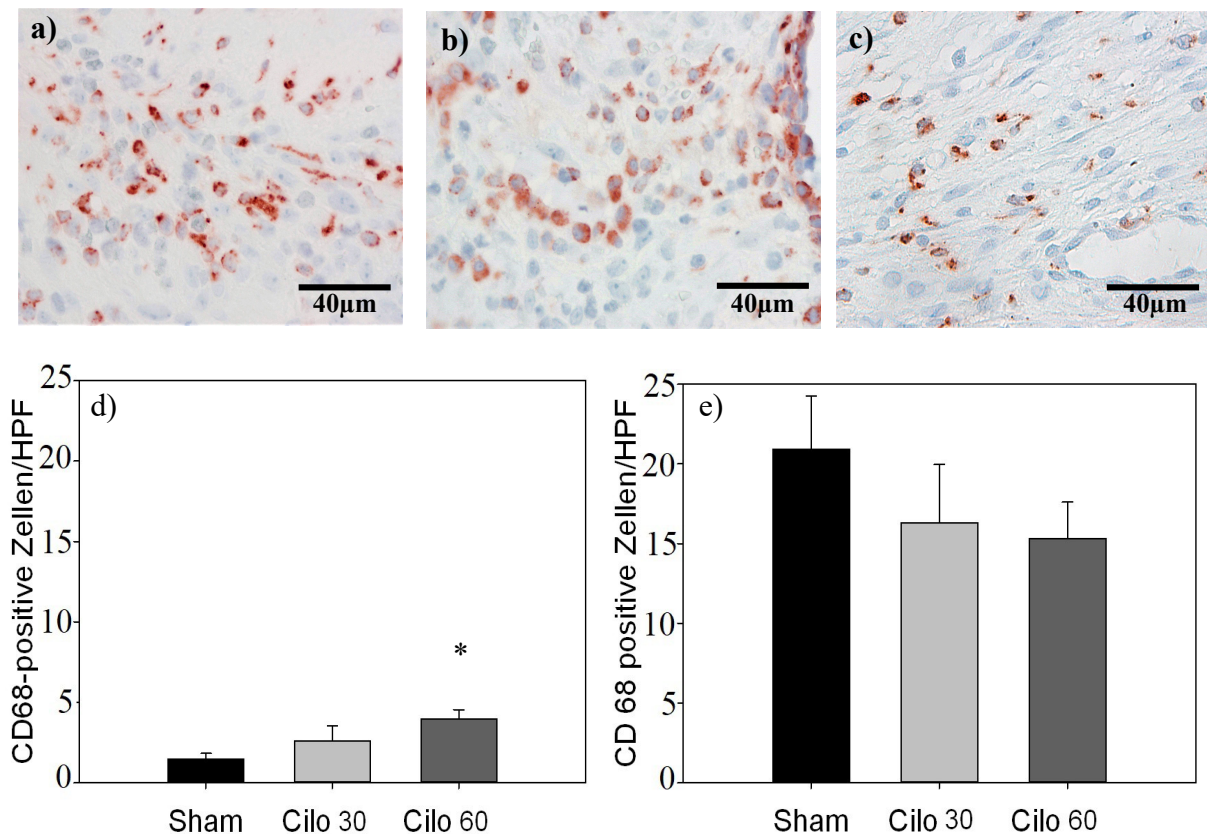


Abbildung 29 – CD68-Färbung der Colon descendes Anastomosen 7 Tage nach Anastomosennaht.

CD68-Färbung des Granulationsgewebes der Kolonanastomosen eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl CD68-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol. Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Sham

Der durchschnittliche Wert der CD68-positiven Zellen in der Sham-Gruppe lag im Granulationsgewebe bei 21 Zellen/HPF, in der Cilo 30-Gruppe bei 16 Zellen/HPF und in der

Cilo 60-Gruppe bei 15 Zellen/HPF. Hier bestand kein signifikanter Unterschied. In der anastomosennahen Mukosa fand sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Sham-Gruppe und der Cilo 60-Gruppe mit einem p-Wert von 0,038. Der durchschnittliche Wert der Sham-Gruppe betrug 1 CD68-positive Zelle/HPF und der der Cilo 60-Gruppe 4 CD68-positive Zellen/HPF. Der Durchschnittswert der Cilo 30-Gruppe betrug 3 CD68-positive Zellen/HPF (Abbildung 29). Hier bestand kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Sham-Gruppe.

6.3.2.5 MPO

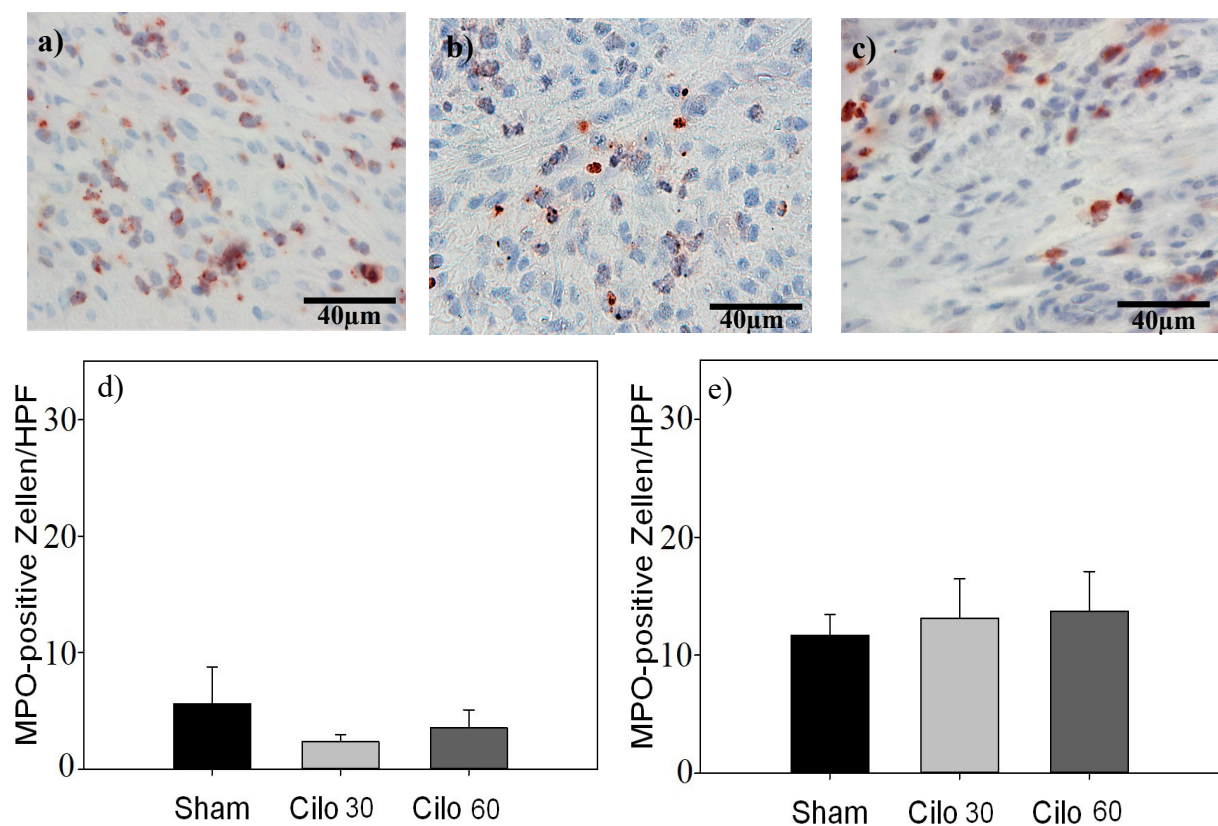


Abbildung 30 – MPO-Färbung der Colon descendes Anastomosen 7 Tage nach Anastomosennaht.

MPO-Färbung des Granulationsgewebes der Kolonanastomosen eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl MPO-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol.

Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

Im Granulationsgewebe war eine Tendenz zur Zunahme von MPO-positiver Zellen zu sehen. Es bestand allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. In der Sham-Gruppe waren im Durchschnitt 12 MPO-positive Zellen/HPF, in der Cilo 30-Gruppe 13 MPO-positive Zellen/HPF und in der Cilo 60-Gruppe 14 MPO-positive Zellen/HPF zu finden (Abbildung 30).

In der anastomosennahen Mukosa bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Die Sham-Gruppe lag durchschnittlich bei 5 MPO-positiven Zellen/HPF, die Cilo 30-Gruppe bei 2 MPO-positiven Zellen/HPF und die Cilo 60-Gruppe bei 4 MPO-positiven Zellen/HPF (Abbildung 30).

6.3.2.6 Ki67

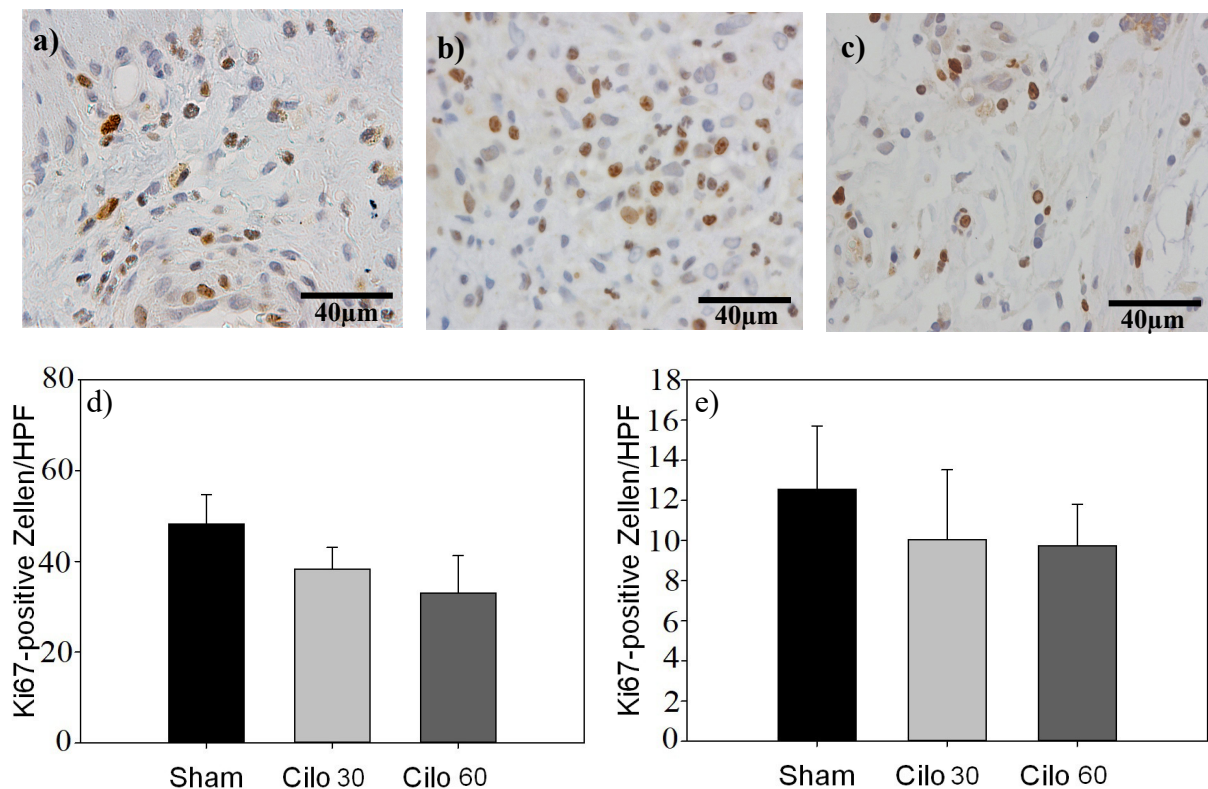


Abbildung 31 – Ki67-Färbung der Colon descendes Anastomosen 7 Tage nach Anastomosennaht.

Ki67-Färbung des Granulationsgewebes der Kolonanastomosen eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Quantitative Bestimmung der Anzahl Ki67-positiver Zellen pro HPF in der anastomosennahen Mukosa (d) und dem Granulationsgewebe der Kolonanastomose (e). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol.

Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

Sowohl im Granulationsgewebe der Kolonanastomose als auch in der anastomosennahen Mukosa zeigte sich bei zunehmender Cilostazoldosierung eine abnehmende Anzahl von Ki67-positiven Zellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen bestand aber weder im Granulationsgewebe noch in der anastomosennahen Mukosa. Durchschnittlich fanden sich in der Sham-Gruppe im Granulationsgewebe 13 Ki67-positiv Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa 48 Ki67-positiv Zellen/HPF. In der Cilo 30-Gruppe befanden sich im Granulationsgewebe 10 Ki67-positiv Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa 38 Ki67-positiv Zellen/HPF. In der Cilo 60-Gruppe befanden sich im Granulationsgewebe 10 Ki67-positiv Zellen/HPF und in der anastomosennahen Mukosa 33 Ki67-positiv Zellen/HPF (Abbildung 31).

6.3.3 Kollagen I/III

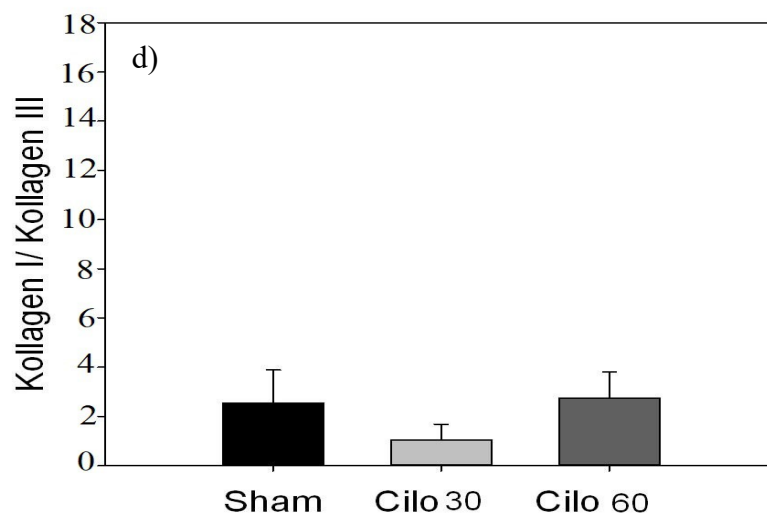
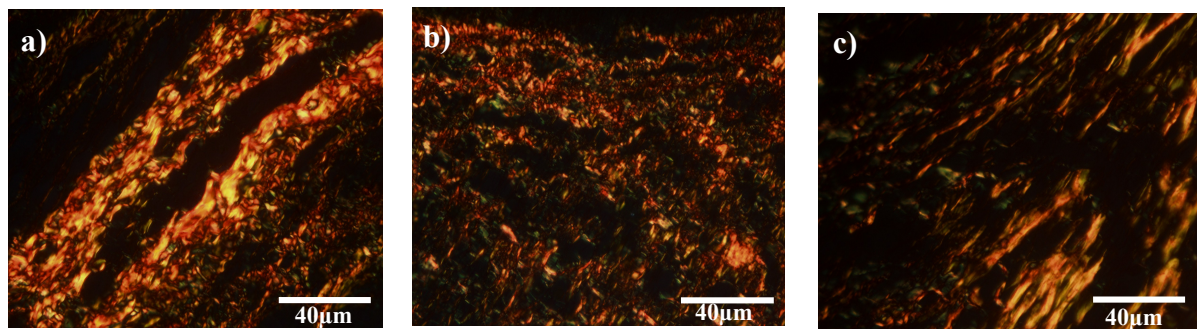


Abbildung 32: Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III 7 Tage nach Anastomosennaht

Sirius red-Färbung des Granulationsgewebes der Kolonanastomosen unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung eines Sham Tiers (a), eines Cilo 30-Tiers (b) und eines Cilo 60-Tiers (c). Verhältnis des prozentualen Anteils von Kollagen Typ I (orange-gelb) zu Kollagen Typ III (grün) (d). Die Versuchstiere erhielten 30mg/kg KG (Cilo 30, hellgraue Säule) oder 60mg/kg KG (Cilo 60, dunkelgraue Säule) Cilostazol. Die Kontrolltiere erhielten 0,2ml NaCl/100g KG (Sham, schwarze Säule).

Mittelwert ± SEM

Das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III zeigte keine eindeutige Tendenz zwischen den Gruppen. So lag das Verhältnis in der Sham-Gruppe bei 3, in der Cilo 30-Gruppe jedoch lediglich bei 1. In der Cilo 60-Gruppe war das Verhältnis wieder 3. Dieser Unterschied zwischen den drei Gruppen war statistisch nicht signifikant (Abbildung 32).

6.3.4 ELISA

6.3.4.1 Entzündungsmediatoren

6.3.4.1.1 IL-6

In der ELISA Untersuchung von IL-6 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe. In der Sham-Gruppe wurden durchschnittlich 311pg/ml \pm 70pg/ml Gewebe IL-6, in der Cilo 30-Gruppe 289pg/ml \pm 16pg/ml Gewebe IL-6 und in der Cilo 60-Gruppe 296pg/ml \pm 23pg/ml Gewebe IL-6 gemessen.

6.3.4.1.2 IL-8

In der ELISA Untersuchung von IL-8 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe. In der Sham-Gruppe wurden durchschnittlich 11pg/ml \pm 2pg/ml Gewebe IL-8, in der Cilo 30-Gruppe 12pg/ml \pm 3pg/ml Gewebe IL-8 und in der Cilo 60-Gruppe 13pg/ml \pm 3pg/ml Gewebe IL-8 gemessen.

6.3.4.3 TGF- β

In der ELISA Untersuchung von TGF- β zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe. In der Sham-Gruppe wurden durchschnittlich 387pg/ml \pm 73pg/ml Gewebe TGF- β , in der Cilo 30-Gruppe 365pg/ml \pm 140pg/ml Gewebe TGF- β und in der Cilo 60-Gruppe 323pg/ml \pm 81pg/ml Gewebe TGF- β gemessen.

6.3.4.4 VEGF

In der ELISA Untersuchung von VEGF zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Cilostazol-Gruppen und der Sham-Gruppe. In einem Großteil der untersuchten Proben lag VEGF unter der Nachweisgrenze.

7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Einfluss einer Cilostazol Therapie auf die Heilung von Kolonanastomosen zu untersuchen. Dabei wurde Cilostazol 5 Tage vor der Anlage der Anastomose sowie postoperativ bis zum Entnahmetag oral verabreicht. Es wurde zum einen die Festigkeit der Anastomose getestet, zum anderen der Kollagengehalt, die Angiogenese, die Apoptoserate, sowie die Entzündungsreaktion untersucht. Außerdem wurde die Aktivität von IL-6, IL-8, TGF- β und VEGF in der Anastomosenregion gemessen. Alle Versuche wurden an anästhesierten, spontanatmenden Sprague Dawley Ratten durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit ist eine in vivo Studie, die im Gegensatz zu einer in vitro Studie den Vorteil hat, dass die Ergebnisse immer der komplexen Heilung in einem lebenden Organismus entsprechen. Außerdem spiegeln die Ergebnisse die Auswirkungen auf den kompletten Organismus mit den Interaktionen der verschiedenen Organsysteme wieder (Menger und Lehr, 1993).

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Anastomose und Berstungsdruckmessung

Die Anlage der Anastomose ist durch bereits vorab durchgeführte Studien standardisiert (Agren et al., 2011). Wir entschieden uns für die Anlage der Anastomose im Colon descendens aufgrund der standardisierten Lage und guten Zugänglichkeit. Außerdem wird durch den geringeren Abstand zum Rektum die Einführung der Knopfkanüle zur Messung des Berstungsdruckes erleichtert.

Neben der Berstungsdruckmessung besteht prinzipiell die Möglichkeit der Messung der Zerreißkraft der Anastomose. Wir entschieden uns für die Messung des Berstungsdruckes, da er zum einen besser geeignet ist, um das Risiko für eine Anastomoseninsuffizienz abzuschätzen und zum anderen mit diesem Verfahren der schwächste Punkt der Anastomose festgestellt werden kann. Außerdem entspricht er mehr einer physiologischen Belastungssituation (Duraes et al., 2013).

Der Zeitpunkt für die Entnahmen und die Messung des Berstungsdruckes orientierten sich an der physiologischen Anastomosenheilung, da der 3. und der 7. postoperative Tag den Zeitpunkten entspricht, an dem die Anastomose am schwächsten ist und es am häufigsten zu einer Anastomoseninsuffizienz kommt. Somit wäre eine gesteigerte Festigkeit zu diesen

Zeitpunkten am relevantesten (Marjanovic et Hopt, 2011).

7.1.2 Dosierung und Applikation von Cilostazol

Wir wählten für das Experiment weibliche Ratten aus, da gezeigt werden konnte, dass die Pharmakokinetik und -dynamik von Cilostazol in weiblichen Ratten, im Gegensatz zu männlichen Ratten, ähnlich ablaufen wie im Menschen (Kamada et al., 2011).

Neben der Sham-Gruppe, die ausschließlich NaCl oral in einer äquivalenten Menge erhielt, wählten wir eine Dosierung von 30mg/kg KG und 60mg/kg KG pro Tag oral. 30mg/kg KG liegt bereits im oberen Bereich der üblichen Dosierungen im Rattenmodell bei in vivo Experimenten mit Cilostazol (Kwon et al., 2013). Da das Ziel dieses Experimentes darin bestand, einen möglichen Effekt auf die Anastomosenheilung im Sinne eines „proof of principle“ zu detektieren, entschlossen wir uns in einer weiteren Gruppe die doppelte Dosis von Cilostazol zu verabreichen.

7.1.3 Kollagen I/III

Es konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Wundheilung zuerst das dünnere und instabilere Kollagen Typ III entsteht, dass dann im Verlauf zum festeren und dickeren Kollagen Typ I umgewandelt wird. Deshalb ist das Verhältnis der beiden Kollagenarten auch ein Indikator dafür, wie gut die Heilung voranschreitet und wie fest die Anastomose schlussendlich ist (Marjanovic et Hopt, 2011).

Wir entschieden uns deshalb gegen die häufig durchgeführte Messung des Kollagengehaltes mittels Hydroxyprolin. Stattdessen führten wir eine Messung des Verhältnisses von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III mittels Polarisationsmikroskopie durch. So konnten die beiden Kollagenarten getrennt von einander untersucht und eine gewünschte vermehrte Synthese von Kollagen I detektiert werden (Grommes et al., 2013).

7.2 Diskussion der Ergebnisse

Cilostazol ist ein Phosphodiesterase-3-Hemmer, der in der Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit eingesetzt wird. Neben der Hemmung der Thrombozytenaggregation hat Cilostazol einen vasodilatatorischen Effekt, der zu einer verstärkten Durchblutung der Anastomosenregion führen sollte (Kabayashie et al., 2013). Dadurch erhofften wir uns eine bessere Anastomosenheilung und dadurch wiederum eine größere Festigkeit der Anastomose. Es zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied des Berstungsdruckes unter Cilostazolgabe gegenüber der Sham-Gruppe. Hier gibt es

mehrere mögliche Ursachen, warum Cilostazol keinen positiven Effekt auf die Anastomosenheilung hatte.

Ein wichtiger Punkt ist die verminderte Freisetzung von VEGF unter Cilostazolgabe. Dies konnte in mehreren Studien gezeigt werden, auch wenn noch nicht im Bereich von Kolonanastomosen (Mendes et al., 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese im Anastomosenbereich besonders durch VEGF initiiert und aufrechterhalten wird. Eine niedrigere Konzentration von VEGF führt gegebenenfalls zu einer geringeren Angiogenese, da VEGF bekanntermaßen essentiell für die Wundheilung im Intestinaltrakt ist (Marvanovic et Hopt, 2011). Eine verminderte Angiogenese führt zu einer geringeren Durchblutung der Anastomosenregion und somit zu einer geringeren Sauerstoffzufuhr. Es konnte gezeigt werden, dass bei reduzierter Angiogenese trotz ausreichender mechanischer Festigkeit der Anastomose noch nach Wochen eine Anastomoseninsuffizienz entstehen kann (Deshias et al., 2010).

Ein weiterer negativer Effekt auf die Anastomosenheilung ist die herabgesetzte Synthese von Kollagen durch Cilostazol (Koh et al., 2015). Da die Festigkeit der Anastomose und damit auch das Risiko für eine Anastomoseninsuffizienz in erster Linie mit der Bildung von Kollagen zusammenhängt, ist eine rasche und qualitativ hochwertige Bildung von Kollagen äußerst wichtig zur Reduktion des Risikos einer Anastomoseninsuffizienz. Durch die Verminderung der Kollagenbildung verzögert sich auch die Heilung der Anastomose und damit steigt das Risiko, dass es zu Komplikationen bei der Heilung kommen kann. Die herabgesetzte Kollagensynthese durch Cilostazol wird in erster Linie durch den hohen cAMP Spiegel verursacht. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass Cilostazol einen protektiven Effekt auf die Entstehung von intraperitonealen Verwachsungen hat (Menders et al., 2009). Da in der ersten Heilungsphase ein Abbau des Kollagens erfolgt, ist am dritten postoperativen Tag der geringste Gehalt an Kollagen nachweisbar. Dieser Schritt bleibt durch Cilostazol unbeeinflusst. Anschließend erfolgt der erneute Aufbau zunächst durch das elastischere Kollagen Typ III, das im Verlauf durch das stabilere und dickere Kollagen Typ I ersetzt wird (Marvanovic et Hopt, 2011). Eine Reduktion der Kollagensynthese durch Cilostazol, die bereits in anderen Organsystemen nachgewiesen werden konnte, wäre deshalb für die Anastomosenheilung im Kolon von Nachteil (Menders et al., 2009).

Bereits unter physiologischen Bedingungen zeigen sich unterschiedliche Verläufe der Kollagensynthese während der Anastomosenheilung im Dün- und Dickdarm. So ist die Reaktion im Dünndarm auf eine Verletzung der Darmintegrität schneller und es wird die

Synthese von Kollagen sofort drastisch erhöht. Als Ursache hierfür wird die bereits unter physiologischen Bedingungen höhere Konzentration von Kollagen im Kolon gegenüber dem Dünndarm diskutiert. Dadurch produzieren die Fibroblasten sowie die glatten Muskelzellen der Muscularis mucosae und der Muscularis propria des Kolon von vorneherein mehr Kollagen als im Dünndarm. Deshalb wird vermutlich im Kolon ein stärkerer Stimulus zur Erhöhung der Kollagensynthese benötigt. Aufgrund dieser Unterschiede im Heilungsverlauf von Dünn- und Dickdarm zeigt sich auch, warum die Anastomosenheilung kritischer im Dick- als im Dünndarm verläuft und es zu einer Verzögerung der Heilung im Dickdarm kommt (Marvanovic et Hopt, 2011).

Ein wichtiger Effekt von Cilostazol ist die Entzündungshemmung. Über diesen Mechanismus wird die positive Wirkung von Cilostazol auf die glatten Muskelzellen bei Arteriosklerose erklärt, da es dadurch zu einem langsamerem Fortschreiten der Erkrankung kommen kann (Aoki et al. 2010). Im Rahmen der Anastomosenheilung ist die Entzündungsreaktion und gerade die Einwanderung von Monozyten jedoch sehr wichtig. Bei Störungen kann es zu einer verzögerten Wundheilung kommen (Marvanovic et Hopt, 2011). Im Rahmen unserer Studie zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der CD68-positiven Zellen zwischen den einzelnen Gruppen im Granulationsgewebe. Lediglich in der anastomosennahen Mukosa kam es zu einer signifikanten Zunahme von CD68-positiven Zellen der Cilo-60-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe. Damit kam es also zu einer Zunahme der Entzündungsreaktion. Eine überschießende Entzündungsreaktion kann auch zu einer vermehrten Ödembildung und damit zu einer schlechteren Perfusion des Gewebes führen. Durch eine relative Unterversorgung der Anastomose mit Sauerstoff könnte es dabei zu einer Verschlechterung der Wundheilung kommen. Doch auch für eine überschießende Entzündungsreaktion zeigte sich kein Hinweis. Die Analyse der MPO-positiven Zellen konnte lediglich einen signifikanten Unterschied zwischen der Cilo 60-Gruppe und der Sham-Gruppe 3 Tage nach Anastomosennaht in der anastomosennahen Mukosa zeigen. Ansonsten bestand kein signifikanter Unterschied. Auch die Entzündungsmediatoren, getestet durch den Gehalt von IL-6 und IL-8, auf deren Freisetzung Cilostazol im Besonderen neben der Wirkung auf Monozyten wirkt, waren nicht signifikant reduziert gegenüber der Sham-Gruppe (Mendes et al., 2009).

Eine besondere Rolle nimmt hier TGF- β ein, da dieser Entzündungsmediator gleichzeitig durch Aktivierung von Fibroblasten die Synthese von Kollagen fördert (Park et al., 2014). Da wie oben bereits dargestellt die Kollagensynthese einen essenziellen Baustein für die suffiziente Heilung einer Anastomose bildet, ist eine erhöhte Sekretion von TGF- β durchaus

gewünscht. Es konnte in verschiedenen Studien jedoch gezeigt werden, dass Cilostazol die Freisetzung von TGF- β hemmt, unter anderem in Rattennieren (Wang et al., 2009). Für eine suffiziente Anastomosenheilung wäre dies allerdings hinderlich, da dadurch weniger Fibroblasten aktiviert und weniger Kollagen synthetisiert werden würde. Die Daten der hier vorliegenden Studie zeigten keinen signifikanten Unterschied im TGF- β Gehalt zwischen den verschiedenen Gruppen.

Ein weiterer positiver Effekt von Cilostazol, den wir erwartet haben, war die Reduktion des apoptotischen Zelltodes im Anastomosengebiet. Durch eine geringere Rate von programmiertem Zelltod würde es zu einem geringeren Abbau und ggf. auch einem schnelleren Wiederaufbau kommen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Cilostazol die durch Angiotensin II-induzierte Apoptose in Endothelzellen hemmt (Shi et al., 2016). Außerdem wurde dasselbe auch für durch Lipoproteine induzierte endotheliale Apoptose nachgewiesen (Shin et al., 2004). Allerdings konnten wir diesen Effekt in unserer Studie für Zellen des Intestinums nicht nachweisen.

Es liegen keine einheitlichen Ergebnisse in der Literatur bezüglich des Einflusses von Cilostazol auf die Proliferation von Zellen vor. Einerseits konnte in vitro gezeigt werden, dass Cilostazol die Proliferationsrate bei MDCK-Zellen senkt. Dies wird durch eine intrazelluläre cAMP Erhöhung und die dadurch stattfindende c-Myc Herabregulierung verursacht (Munos et al., 2009). Andererseits konnte eine Steigerung der Proliferation bei lymphatischen Endothelzellen in Mäusen gezeigt werden. Hierbei waren die Zellen sogar funktionsfähig (Kimura et al., 2014). Für eine optimale Heilung der Anastomose, die dabei besonders stabil sein sollte, wäre eine Steigerung der Proliferationsrate wünschenswert. Allerdings deutet unserer Studie bei nicht signifikantem Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen im Bezug auf Ki67-positive und PCNA-positive Zellen darauf hin, dass es keinen proliferationsfördernden Effekt bei Zellen im Intestinum gibt.

Dies könnte allerdings gleichzeitig als ein positives Resultat in Hinblick darauf gewertet werden, dass die meisten Resektionen des Kolon mit anschließender Anastomosenanlage im Rahmen der Tumorchirurgie stattfinden. Wenn es im Rahmen dessen zu keiner Proliferationsförderung von möglichen Mikrometastasen unter der Therapie mit Cilostazol kommen würde, wäre dies als positiv zu werten. Eine Studie, die den Einfluss von PDE-3-Inhibitoren auf Kolonkarzinometastasen der Leber untersuchte, bestätigte diese Hypothese bereits (Strowitzki et al., 2014).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Phosphodiesterase-Hemmer die mikrovaskuläre Permeabilität für Proteine herabsetzen und damit einen negativen Effekt auf die Wundheilung

haben. Dadurch können die nötigen Substanzen und auch Botenstoffe schlechter in die Anastomosenregion vordringen (Sugiura et al., 2014).

Ein weiterer negativer Effekt ergibt sich aus der eigentlichen Aufgabe von Cilostazol. Da Cilostazol über seine Phosphodiesterase-3-Hemmung die Thrombozytenaggregation hemmt, kommt es zu einer verzögerten Blutstillung und damit zu einem erhöhten Blutungsrisiko. Bei Divertikulose konnte bereits ein erhöhtes Risiko für Blutungen unter Cilostazolgabe festgestellt werden (Nagata et al., 2014).

Bei einem erhöhten Blutungsrisiko besteht immer auch das Risiko eines Abfalls des Hämoglobins. Durch einen erniedrigten Hb-Wert nimmt die Sauerstoffversorgung des Anastomosengebietes ab und damit verschlechtert sich die Wundheilung.

Außerdem besteht bei einem Abfall des Hb-Wertes gleichzeitig auch immer das Risiko, dass Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden müssen. Das wiederum steigert das Risiko für eine Anastomoseninsuffizienz (Boccola et al., 2010).

Eine der Hauptnebenwirkungen von Cilostazol betrifft zudem den Gastrointestinaltrakt. So kamen Diarrhoe, abnormale Stühle und abdominelle Schmerzen häufiger als in der Placebogruppe vor (Pratt, 2001). Außerdem ist gleichzeitig die Diagnose einer möglicherweise auftretenden Komplikation bei Auftreten der Nebenwirkungen erschwert, da diese sich in ähnlichen bis gleichen Symptomen äußern.

Zudem besteht das Risiko, dass die frische Anastomose durch die vermehrte Darmtätigkeit bei Diarrhoe eventuell überbeansprucht und damit mechanisch zu stark belastet wird, was wiederum zu möglichen Komplikationen führen kann.

Schlussendlich besteht durch die Diarrhoe ein erhöhter Verlust von Flüssigkeit. Daher müsste zusätzlich Flüssigkeit infundiert werden. Eine Infusionsmenge von über 8000ml in den ersten 72 Stunden postoperativ erhöht wiederum das Risiko für eine Anastomoseninsuffizienz (Boccola et al., 2010).

Der gewünschte positive Effekt auf die Heilung von Kolonanastomosen, den wir durch die Gabe von Cilostazol erwartet haben, konnte nicht nachgewiesen werden. Wenn man die oben aufgeführten Argumente betrachtet, kann der ausgebliebene Effekt nach Gabe von Cilostazol erklärt werden.

7.3 Schlussfolgerung

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Cilostazol keinen signifikanten Effekt auf die Anastomosenheilung im Kolon hat. Wie oben aufgeführt, gibt es mehrere Gründe, warum Cilostazol für eine Verbesserung der Anastomosenheilung im Kolon nicht geeignet sein kann. Allerdings konnte durch die Studie auch gezeigt werden, dass Cilostazol, wenn es im Rahmen einer pAVK gegeben wird, vor der Anlage einer Kolonanastomose nicht abgesetzt werden muss. Auf ein zusätzliches Risiko oder einen negativen Effekt durch die Gabe von Cilostazol weist unsere Studie nicht hin. Deshalb sollte es möglich sein, dass die Patienten von der positiven Wirkung, die Cilostazol im Rahmen der Arteriosklerose bietet, profitieren, auch wenn eine Anlage einer Kolonanastomose nötig sein sollte.

8 Abkürzungsverzeichnis

ml	–	Milliliter
kg	–	Kilogramm
g	–	Gramm
mg	–	Milligramm
ng	–	Nanogramm
pg	–	Picogramm
nm	–	Nanometer
mmHg	–	Millimeter Quecksilbersäule
d	–	Tag
h	–	Stunde
min	–	Minute
°C	–	Grad Celsius
kcal	–	Kilokalorien
rpm	–	Revolutions per minute
KG	–	Körpergewicht
Hb	–	Hämoglobin
VEGF	–	Vascular endothelial growth factor
NSAID	–	Nicht-steroidale Antiphlogistika
cAMP	–	cyclisches Adenosinmonophosphat
IL	–	Interleukin
CD	–	Cluster of Differentiation
TGF β	–	Transforming growth factor β
ELISA	–	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
MPO	–	Myeloperoxidase
PCNA	–	Proliferating-cell-nuclear-antigen
SEM	–	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SD	–	standard deviation (Standardabweichung)
HPF	–	High Power Field
ANOVA	–	Analysis of variance
Cilo 30	–	Gruppe mit einer Dosis von 30mg Cilostazol/kg KG/d
Cilo 60	–	Gruppe mit einer Dosis von 60mg Cilostazol/kg KG/d
HDL	–	high density Lipoprotein

LDL	–	low density Lipoprotein
CYP	–	Cytochrom-P450
NaCl	–	Natriumchlorid
GFR	–	Glomeruläre Filtrationsrate
HE-Färbung	–	Hämatoxylin Eosin Färbung
ca.	–	circa
bzw.	–	beziehungsweise
z.B.	–	zum Beispiel
UK	–	United Kingdom (Vereinigtes Königreich)
pAVK	–	periphere arterielle Verschlusskrankheit
MDCK Zellen	–	Madin-Darby Canine Kidney Epithelzellen
vs.	–	versus
BRD	–	Bundesrepublik Deutschland
USA	–	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)

9 Literaturverzeichnis

1. Adas G, Kemik O, Eryasar B, Okcu A, Adas M, Arikan S, Erman G, Kemik AS, Kamali G, Dogan Y, Karaoz E. Treatment of ischemic colonic anastomoses with systemic transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013 ;17:2275-85.
2. Adas G, Percem A, Adas M, Kemik O, Arikan S, Ustek D, Cakiris A, Abaci N, Kemik AS, Kamali G, Karahan S, Akcakaya A, Karatepe O. VEGF-A and FGF gene therapy accelerate healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). *Int J Surg.* 2011 ;9:467-71.
3. Ågren MS, Andersen TL, Andersen L, ,Schjødt CB Surve V, Andreassen TT, Risteli J, Franzén LE, Delaissé JM, Heegaard AM, Jorgensen LN. Nonselective matrix metalloproteinase but not tumor necrosis factor- α inhibition effectively preserves the early critical colon anastomotic integrity. *Int J Colorectal Dis.* 2011 ;26:329-37.
4. de Albuquerque RM, Virgini-Magalhães CE, Lencastre Sicuro F, Bottino DA, Bouskela E. Effects of cilostazol and pentoxifylline on forearm reactive hyperemia response, lipid profile, oxidative stress, and inflammatory markers in patients with intermittent claudication. *Angiology.* 2008 ;59:549-58.
5. Aoki C, Hattori Y, Tomizawa A, Jojima T, Kasai K. Anti-inflammatory role of cilostazol in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J Atheroscler Thromb.* 2010 ;17:503-9.
6. Binnebösel M, Schuler T, Klink CD, Busch D, Schöb DS, von Trotha KT, Neumann UP, Junge K. Influence of CD68⁺ macrophages and neutrophils on anastomotic healing following laparoscopic sigmoid resection due to diverticulitis. *Int J Colorectal Dis.* 2014 ;29:681-8.
7. Boccola MA, Lin J, Rozen WM, Ho YH. Reducing anastomotic leakage in oncologic colorectal surgery: an evidence-based review. *Anticancer Research. Anticancer Res.* 2010 ;30:601-7.
8. di Bonifácio M, Parra RS, Almeida AL, Rocha JJ, Feres O. Liver cirrhosis on the colonic anastomotic healing in rats. *Acta Cir Bras.* 2011 ;26:415-20.
9. Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P. Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study. *Int J Colorectal Dis.* 2008 ;23:265-70.
10. Buie WD, MacLean AR, Attard JA, Brasher PM, Chan AK. Neoadjuvant chemoradiation increases the risk of pelvic sepsis after radical excision of rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2005 ;48:1868-74.
11. Durães Lde C, Durães EF, Lobato LF, Oliveira PG, Sousa JB. Correlation between bursting pressure and breaking strength in colonic anastomosis. *Acta Cir Bras.* 2013 ; 28:447-52.

12. Caziuc A, Dindelegan GC, Mironiuc A. Operator-related risk factors of anastomotic leaks after colorectal surgery: an up-to-date. *Clujul Med.* 2015 ;88:124-7.
13. Chao TH, Tseng SY, Chen IC, Tsai YS, Huang YY, Liu PY, Ou HY, Li YH, Wu HL, Cho CL, Tsai LM, Chen JH . Cilostazol enhances mobilization and proliferation of endothelial progenitor cells and collateral formation by modifying vasculo-angiogenic biomarkers in peripheral arterial disease. *Int J Cardiol.* 2014 ;172:e371-4.
14. Chattipakorn SC, Thummasorn S, Sanit J, Chattipakorn N. Phosphodiesterase-3 inhibitor (cilostazol) attenuates oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the heart. *J Geriatr Cardiol.* 2014 ;11:151-7.
15. Cheung KP, Taylor KR, Jameson JM. Immunomodulation at epithelial sites by obesity and metabolic disease. *Immunol Res.* 2012 ;52:182-99.
16. Deshaies I, Malka D, Soria JC, Massard C, Bahleda R, Elias D. Antiangiogenic agents and late anastomotic complications. *J Surg Oncol.* 2010 ;101:180-3.
17. Durães Lde C, Durães EF, Lobato LF, Oliveira PG, Sousa JB. Correlation between bursting pressure and breaking strength in colonic anastomosis. *Acta Cir Bras.* 2013 ;28:447-52.
18. Erginel B, Erginel T, Aksoy B, Dokucu Aİ. Effect of Ozone Therapy (OT) on Healing of Colonic Anastomosis in a Rat Model of Peritonitis. *Balkan Med J.* 2014 ;31:249-53.
19. Fawcett A, Vashisht R, Shankar A, Dawson PM, O'Malley MK, Nott DM, Springall RG. Microvascular disease and anastomotic dehiscence in the colon. *Br J Surg.* 1995 ;82:1483-5.
20. Genstorfer J, Schäfer J, Kettelhack C, Oertli D, Rosenthal R. Surgery for ischemic colitis: outcome and risk factors for in-hospital mortality. *Int J Colorectal Dis.* 2014 Apr;29(4):493-503.
21. Grommes J, Binnebösel M, Klink CD, von Trotha KT, Schleimer K, Jacobs MJ, Neumann UP, Krones CJ. Comparison of intestinal microcirculation and wound healing in a rat model. *J Invest Surg.* 2013 ;26:46-52.
22. Herath SC, Lion T, Klein M, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Mörsdorf P, Rollmann MF, Pohlemann T, Menger MD, Histing T. Stimulation of angiogenesis by cilostazol accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res.* 2015 ;33:1880-7.
23. Hori A, Shibata R, Morisaki K, Murohara T, Komori K. Cilostazol stimulates revascularisation in response to ischaemia via an eNOS-dependent mechanism. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012 ;43:62-5.
24. Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Takuhiro K, Ouchi M, Ito Y. Comparison of the protective effects of type III phosphodiesterase (PDE3) inhibitor (cilostazol) and acetylsalicylic acid on intestinal microcirculation after ischemia reperfusion injury in mice. *Shock.* 2006 ;26:522-6.

25. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. *Am J Surg.* 1980 ; 139:398-405.
26. Kamada N, Yamada K, Odomi M, Mukai T, Nishibayashi T, Ogawara K, Kimura T, Higaki K Sex differences in pharmacokinetics of cilostazol in rats. *Xenobiotica.* 2011 ;41:903-13.
27. Kambayashi J, Liu Y, Sun B, Shakur Y, Yoshitake M, Czerwiec F. Cilostazol as a unique antithrombotic agent. *Curr Pharm Des.* 2003;9:2289-302.
28. Kim HY, Park SY, Lee SW, Lee HR, Lee WS, Rhim BY, Hong KW, Kim CD. Inhibition of HMGB1-induced angiogenesis by cilostazol via SIRT1 activation in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2014 ;9:e104743.
29. Kimura T, Hamazaki TS, Sugaya M, Fukuda S, Chan T, Tamura-Nakano M, Sato S, Okochi H. Cilostazol improves lymphatic function by inducing proliferation and stabilization of lymphatic endothelial cells. *J Dermatol Sci.* 2014 ;74:150-8.
30. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis, and treatment. *J Am Coll Surg.* 2009 ;208:269-78.
31. Kiudelis M, Jonciauskiene J, Deduchovas O, Radziunas A, Mickevicius A, Janciauskas D, Petrovas S, Endzinas Z, Pundzius J. Effects of different kinds of meshes on postoperative adhesion formation in the New Zealand White rabbit. *Hernia.* 2007 ;11:19-23.
32. Koh JS, Yi CO, Heo RW, Ahn JW, Park JR, Lee JE, Kim JH, Hwang JY, Roh GS. Protective effect of cilostazol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Free Radic Biol Med.* 2015 ;89:54-61.
33. Komen N, Klitsie P, Dijk JW, Sliker J, Hermans J, Havenga K, Oudkerk M, Weyler J, Kleinrensink GJ, Lange JF. Calcium score: a new risk factor for colorectal anastomotic leakage. *Am J Surg.* 2011 ;201:759-65.
34. Kwon JS, Kim YS, Cho HH, Kee HJ, Hong MH, Kang WS, Jeong HY, Jeong MH, Ahn Y. Cilostazol protects vessels against hyperglycemic injury and accelerates healing after implantation of drug-eluting stent in a type 1 diabetes mellitus rat aorta stent model. *Atherosclerosis.* 2013 ;228:332-8.
35. Machado JL, Ortolan EV, Spadella CT. Anastomotic healing in ileum and colon of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2009 ;24:57-61.
36. Mäkelä JT, Kiviniemi H, Laitinen S. Risk factors for anastomotic leakage after left-sided colorectal resection with rectal anastomosis. *Dis Colon Rectum.* 2003 ;46:653-60.
37. Marjanovic G., Hopt U.T. Physiologie der Anastomosenheilung. *Chirurg.* 2011;82:41-47.

38. Marjanovic G, Villain C, Juettner E, zur Hausen A, Hoepfner J, Hopt UT, Drognitz O, Obermaier R. Impact of Different Crystalloid Volume Regimes on Intestinal Anastomotic Stability. *Ann Surg.* 2009 ;249:181-5.
39. Matthiessen P. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection of the rectum. *Colorectal Dis.* 2006 ;8:366.
40. Matthiessen P, Hallböök O, Rutegård J, Sjødahl R. Population-based study of risk factors for postoperative death after anterior resection of the rectum. *Br J Surg.* 2006 ; 93:498-503.
41. Mendes JB, Campos PP, Rocha MA, Andrade SP. Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sci.* 2009 ;84:537-43.
42. Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today.* 1993 ;14:519-22.
43. Muñoz B, Huerta M, López-Bayghen E. Cilostazol reduces proliferation through c-Myc down-regulation in MDCK cells. *Eur J Pharmacol.* 2009 ;616:22-30.
44. Nagata N, Niikura R, Aoki T, Shimbo T, Kishida Y, Sekine K, Tanaka S, Watanabe K, Sakurai T, Yokoi C, Akiyama J, Yanase M, Mizokami M, Uemura N. Colonic diverticular hemorrhage associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, low-dose aspirin, antiplatelet drugs, and dual therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 ;29:1786-93.
45. Netherton SJ, Maurice DH. Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis. *Mol Pharmacol.* 2005 ;67:263-72.
46. Frias Neto CA, Koike MK, Saad KR, Saad PF, Montero EF. Effects of ischemic preconditioning and cilostazol on muscle ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2014;29 Suppl 3:17-21.
47. Ohba R, Otaka M, Odashima M, Jin M, Komatsu K, Konishi N, Wada I, Horikawa Y, Matsushashi T, Oyake J, Hatakeyama N, Watanabe S. Effect of cilostazol, a selective type-III phosphodiesterase inhibitor, on water-immersion stress-induced gastric mucosal injury in rats. *J Gastroenterol.* 2006 ;41:34-40.
48. Onodera H, Ikeuchi D, Nagayama S, Imamura M. Weakness of anastomotic site in diabetic rats is caused by changes in the integrity of newly formed collagen. *Dig Surg.* 2004;21:146-51.
49. Ortolan EV, Spadella CT, Caramori C, Machado JL, Gregorio EA, Rabello K. Microscopic, morphometric and ultrastructural analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008 ;116:198-202.

50. Park S, Park M, Kim BH, Lee JE, Park HJ, Lee SH, Park CG, Kim MH, Kim R, Kim EH, Heo CY, Choy YB. Acute suppression of TGF- β with local, sustained release of tranilast against the formation of fibrous capsules around silicone implants. *J Control Release*. 2015 ;200:125-37.
51. Pavlidis ET, Ballas KD, Symeonidis NG, Psarras K, Koliakos G, Kouzi-Koliakos K, Topouridou K, Rafailidis SF, Pavlidis TE, Marakis GN, Sakantamis AK. The effect of bevacizumab on colon anastomotic healing in rats. *Int J Colorectal Dis*. 2010 ; 25:1465-73.
52. Pratt CM. Analysis of the cilostazol safety database. *Am J Cardiol*. 2001 ;87:28D-33D.
53. Pueyo ME, Chen Y, D'Angelo G, Michel JB. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by cAMP in rat aortic smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 1998 1;238:354-8.
54. Rosenberg CS. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nurs Clin North Am*. 1990 ;25:247-61.
55. Rudinskaite G, Tamelis A, Saladzinskas Z, Pavalkis D. Risk factors for clinical anastomotic leakage following the resection of sigmoid and rectal cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2005;41:741-6.
56. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg*. 1998 ;85:355-8.
57. Sanada F, Kanbara Y, Taniyama Y, Otsu R, Carracedo M, Ikeda-Iwabu Y, Muratsu J, Sugimoto K, Yamamoto K, Rakugi H, Morishita R. Induction of Angiogenesis by a Type III Phosphodiesterase Inhibitor, Cilostazol, Through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ and cAMP Pathways in Vascular Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 ;36:545-52.
58. Schnüriger B, Inaba K, Wu T, Eberle BM, Belzberg H, Demetriades D. Crystalloids after primary colon resection and anastomosis at initial trauma laparotomy: excessive volumes are associated with anastomotic leakage. *J Trauma*. 2011 ;70:603-10.
59. Schrör K. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes, Diabetes Obes Metab*. 2002 ;4 Suppl 2:S14-9.
60. Shi MQ, Su FF, Xu X, Liu XT, Wang HT, Zhang W, Li X, Lian C, Zheng QS, Feng ZC. Cilostazol suppresses angiotensin II-induced apoptosis in endothelial cells. *Mol Med Rep*. 2016 ;13:2597-605.
61. Shin HK, Kim YK, Kim KY, Lee JH, Hong KW. . Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD(P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 activation: prevention by cilostazol. *Circulation*. 2004 2;109(8):1022-8.
62. Sim DS, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B, Flaumenhaft R. Initial accumulation of

platelets during arterial thrombus formation in vivo is inhibited by elevation of basal cAMP levels. *Blood*. 2004 ;103:2127-34.

63. Son KH, Jeong HW, Jung WW, Kim HS, Lee SK, Kim KT, Ahn CB, Park KY, Kim BM, Lee SH. The use of collagen content as determined by spectral domain polarization-sensitive optical coherence tomography to assess colon anastomosis healing in a rat model. *Eur Surg Res*. 2014;52:32-40.
64. Sørensen LT, Jørgensen T, Kirkeby LT, Skovdal J, Vennits B, Wille-Jørgensen P. Smoking and alcohol abuse are major risk factors for anastomotic leakage in colorectal surgery. *Br J Surg*. 1999 ;86:927-31.
65. Strowitzki MJ, Dold S, von Heesen M, Körbel C, Scheuer C, Moussavian MR, Schilling MK, Kollmar O, Menger MD. The phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol does not stimulate growth of colorectal liver metastases after major hepatectomy. *Clin Exp Metastasis*. 2014 ;31:795-803.
66. Sugiura Y, Morikawa T, Takenouchi T, Suematsu M, Kajimura M. Cilostazol strengthens the endothelial barrier of postcapillary venules from the rat mesentery in situ. *Phlebology*. 2014 ;29:594-9.
67. Suri A, Forbes WP, Bramer SL. Pharmacokinetics of multiple-dose oral cilostazol in middle-age and elderly men and women. *The Journal of Clinical Pharmacology*. *J Clin Pharmacol*. 1998 ;38:144-50.
68. Tadros T, Wobbes T, Hendriks T. Blood transfusion impairs the healing of experimental intestinal anastomoses. *Ann Surg*. 1992 ;215:276-81.
69. Veneziano SG, Ramalho LN, Ramalho FS, Campos AD, Rocha JJ, Feres O. Effect of thalidomide on the healing of colonic anastomosis, in rats. *Acta Cir Bras*. 2008;23 Suppl 1:17-23; discussion 23.
70. Wang X, Yan L, Chen W, Xu L, Zhang X. The renal protective effects of cilostazol on suppressing pathogenic thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Int Med Res*. 2009 ;37:145-53.
71. Weber T., Meyer F., Weber M., Halloul Z. Die Rolle von Cilostazol im sequentiellen Therapiespektrum der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). *Dtsch Med Wochenschr*. 2012; 137:1051-1055.
72. Weintraub WS. The vascular effects of cilostazol. *Can J Cardiol*. 2006 Feb;22 Suppl B:56B-60B.
73. Wolf A.-M., Henne-Bruns D. Anastomoseninsuffizienz im Gastrointestinaltrakt Diagnostik und Therapie. *Chirurg*. 2002; 73:394-407.

10 Publikationsliste

1. DGVS 2016

→ Hübner C., Ziemann C., Roller J., Laschke M.W., Kollmar O., Glanemann M., Menger M.D. Der Phosphodiesterase-3-Inhibitor Cilostazol verbessert die Anastomosenheilung von Colonanastomosen im Rattenmodel nicht. Gastroenterol.2018; 54:KV-012.

2. under review

→ Ziemann C., Roller J., Hübner C., Laschke M. W., Kollmar O., Sperling J., Glanemann M., Menger M.D. Inhibition of phosphodiesterase-III does not improve anastomotic healing of the rat colon.

11 Danksagung

Ich danke meinem Ehemann Marco Loch, ohne dessen Nachhaltigkeit und seelisch-moralische Unterstützung ich die Arbeit wahrscheinlich nie zu Ende geschrieben hätte. Vielen Dank für das gute Zureden und die vielen Stunden der Beschwerden, die du dir von mir angehört hast!

Außerdem danke ich meinen Eltern Margareta und Klaus Hübner, die mich immer bedingungslos unterstützt haben und ohne die mein Medizinstudium nicht so entspannt möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die finanzielle und psychische Unterstützung ohne jede Diskussion oder Bedingung dahinter!

Professor Michael Menger danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit der Durchführung der Experimente im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie und die Hilfe bei den Korrekturen der Arbeit.

Dr. med. Christian Ziemann danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und der Korrektur der Arbeit. Janine Becker danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der Immunhistochemischen Schnitte und der ELISAs. Außerdem danke ich Dr. Claudia Scheuer für die Unterstützung bei der Herstellung des Lysis Puffers.