

Aus Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss der intraperitonealen
Applikation von Thalidomid auf die
Adhäsionsbildung im Kaninchenmodell –eine
tierexperimentelle randomisierte Studie**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –

Universitätsmedizin Berlin

von

Birgit Rabe

aus Zittau

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Gabriela Siegert

2. Prof. Dr. med. Samir Said

3. PD Dr. med. Julian Mall

Datum der Promotion: 10. August 2005

Zusammenfassung

Hintergrund: Abdominale Adhäsionen entstehen vor allem durch Operationen. Sie können ernste Beschwerden auslösen, wie Dünndarmileus, Infertilität und chronische Schmerzen. Eine allgemein anerkannte Prophylaxe und/oder Therapie existiert trotz intensiver Forschung nicht. Steigende Lebenserwartung und erweiterte Operationsindikationen verschärfen das Problem.

Ziel: Diese Studie soll zeigen, dass der Angiogeneseinhibitor Thalidomid postoperative Verwachsungen im Tiermodell hemmt ohne die Wundheilung zu gefährden.

Methoden: 40 New Zealand White Kaninchen wurden bei einem operativen Eingriff einmalig intraperitoneal mit Thalidomid oder einem Placebo behandelt. Nach drei oder sieben Tagen wurden die Tiere erneut operiert. Danach wurden Adhäsionsbildung und Angiogenese beurteilt. Von TNF-alpha, einem wichtigen Mediator für Adhäsionen, wurden die Serumspiegel ermittelt. Die Wundheilung wurde durch visuelle Inspektion sowie durch Bestimmung von Berstungsdruck und -stelle kontrolliert.

Ergebnisse: Thalidomid hemmt postoperative Adhäsionen. In der Therapiegruppe hatten 75 Prozent der Tiere keine und 25 Prozent minimale Adhäsionen. In der Kontrollgruppe dagegen traten bei knapp 50 Prozent der Tiere mäßige oder dichte Adhäsionen auf. Drei Mechanismen scheinen für die adhäsionsinhibierende Wirkung von Thalidomid verantwortlich zu sein: Hemmung der Angiogenese, Modulation der Fibrinolyse und Reduzierung der Entzündungsreaktion. Das Operationsergebnis gefährdet Thalidomid nicht. Bei der Inspektion wiesen alle Kaninchen regelgerechte Wundverhältnisse auf. Die ermittelten Berstungsdrücke und -stellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe.

Schlussfolgerungen: Wegen der entscheidenden Rolle der Angiogenese für die Wundheilung, aber auch wegen der teratogenen Effekte von Thalidomid, muss die adhäsionsinhibierende Wirkung von Thalidomid vor einem klinischen Einsatz in weiteren Tierversuchen verifiziert werden. Überprüft werden sollte dabei, ob neben den drei diskutierten Mechanismen, weitere vor allem immunmodulatorische Prozesse die Adhäsionshemmung bewirken.

Schlüsselwörter:

Adhäsionen, Thalidomid, Angiogenese, Fibrinolyse, Entzündung

Abstract

Background: Abdominal adhesions mainly result from surgery. They can cause severe trouble like small bowel obstruction, female infertility and chronic pain. A generally recognised prevention and/or therapy does not exist despite intensive research. Increasing life expectancy and a wider range of indications for operations make matters worse.

Objective: The purpose of the study is to demonstrate that the angiogenesis inhibitor thalidomide inhibits postsurgical adhesions in an animal model without impacting wound healing.

Methods: 40 New Zealand White rabbits were treated once in an operation intraperitoneal with either thalidomide or with a placebo. After three or seven days the animals again underwent an operation. Thereafter the adhesions formation and angiogenesis was assessed. The level of TNF-alpha, an important mediator for adhesions, in blood was measured. The wound healing was controlled by visual inspection and the determination of the bursting pressure und location.

Results: Thalidomid inhibits postsurgical adhesions. In the therapy sample 75 per cent of the animals had no and 25 per cent had minimal adhesions. In the control sample almost 50 per cent of the animals had moderate or dense adhesions. Three mechamisms appear to be responsible for thalidomide to inhibit adhesions: the inhibition of the angiogenesis, the modulation of the fibrinolysis and the reduction of the inflammation. The result of the operation was not impacted by thalidomide. All rabbits showed normal wound healing. The bursting pressure and location did not differ significantly between the therapy and the control sample.

Conclusions: Because of the importance of the angiogenesis for wound healing as well as the teratogenic effects of thalidomide, thalidomide must be further analysed in animal tests before being applied in clinical practice. As part of this it should be examined whether in addition to the three mechansims discussed, other proceeses, in particular immune modulating processes contribute to inhibit adhesions.

Key words:

Adhesion, thalidomide, angiogenesis, fibrinolysis, inflammation

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Adhäsionen	7
1.1.1 Einführung.....	7
1.1.2 Pathophysiologie.....	8
1.1.3 Prophylaxe	11
1.2 Angiogenese	13
1.3 Thalidomid.....	14
1.3.1 Einführung.....	14
1.3.2 Wirkungen.....	14
1.3.3 Nebenwirkungen	15
1.4 Zusammenfassung.....	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Operation und Betreuung	19
2.1.1 Einführung.....	19
2.1.2 Ablauf.....	19
2.2 Messung des Berstungsdrucks und Klassifizierung der Berstungsstelle.....	23
2.3 Immunhistochemische Aufarbeitung der Anastomosenpräparate	24
2.4 Messung von Gewebsplasmin Aktivator (tPA) und Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI)	26
2.4.1 Aktivität von tPA und PAI	27
2.4.2 Konzentration von tPA und PAI.....	29
2.5 Messung von Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-alpha).....	31
2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Monitoring	32
3.1.1 Allgemeinzustand, Aktivitätsstatus, Fressverhalten, Körpertemperatur und Gewicht	32

3.1.2	Blutbild	33
3.2	Untersuchung.....	37
3.2.1	Adhäsionsbildung.....	37
3.2.2	Entzündungszeichen im Resektionsgebiet.....	38
3.2.3	Ischämie und Insuffizienz der Darmnaht	38
3.2.4	Berstungsdruck der Anastomosenpräparate	39
3.2.5	Berstungsstelle der Anastomosenpräparate	40
3.2.6	Angiogenese der Anastomosenpräparate.....	41
3.2.7	Gewebsplasmin Aktivator (tPA) und Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) in Peritonealbiopsien.....	43
3.2.8	TNF-alpha im Serum.....	46
4	Diskussion	47
4.1	Einführung.....	47
4.2	Wirkung von Thalidomid auf die Adhäsionsbildung.....	50
4.3	Wirkung von Thalidomid auf die Wundheilung und Blutgerinnung	53
5	Zusammenfassung.....	57
6	Abbildungsverzeichnis.....	59
7	Literaturverzeichnis	60
	Danksagung	67
	Lebenslauf.....	68
	Erklärung an Eides Statt.....	70

1 EINLEITUNG

1.1 Adhäsionen

1.1.1 Einführung

Abdominale Adhäsionen sind pathologische, flächenhafte und/oder strangförmige bindegewebige Verwachsungen zwischen Organen und/oder Gewebeoberflächen im Bauchraum. Sie treten vor allem nach Operationen auf, aber auch nach Infektionen, selten sind sie angeboren.

Schon im 19. Jahrhundert entdeckten Chirurgen, dass Adhäsionen bei sonst erfolgreichen Operationen mit unauffälligem Heilungsverlauf zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen können. So beschrieb Bryant 1872 einen letalen Adhäsionsileus nach Ovarialzystektomie [1]. Als Auslöser von Adhäsionen nannte 1889 von Dembowski „fremde Körper, Ligaturen mit den entsprechenden Schnürstücken“ und erkannte damit die ursächliche Rolle von Fremdkörpern und Ischämie für peritoneale Verwachsungen [2]. Der Chirurg Payr verwies bereits auf den Zusammenhang zwischen Adhäsionen und Fibrinolyse sowie die Bedeutung der ersten 48 Stunden. Darüber hinaus betonte er, dass die operativ gesetzten Serosaschäden vor allem am Peritoneum erheblicher sind als vermutet und dass die rasant steigende Zahl bauchchirurgischer Eingriffe das Problem Verwachsungen enorm verschärfen. In einer Publikation von 1924 heißt es dazu: „Falls es uns nicht gelingt, vorbeugend tatsächlich etwas Positives zu leisten, wird die Plage immer offenkundiger werden“ [3]. Neuere, postmortale Untersuchungen ergaben, dass 67 Prozent der abdominal operierten Patienten Adhäsionen entwickelt hatten und 28 Prozent ohne chirurgische Intervention, vorangegangen war hier meist eine intraabdominelle Infektion [4, 5, 6].

In der Regel lösen Adhäsionen allenfalls leichte Beschwerden aus, teilweise führen sie jedoch zu ernstesten Problemen, wie Dünndarmileus, Infertilität und chronische

Schmerzen. Immerhin sind Adhäsionen Anlass für etwa 3 Prozent aller Laparotomien [7]. Zudem verursachen sie inzwischen erhebliche Kosten. Allein für Adhäsioleusen wurden zum Beispiel 1994 in den USA rund 1,3 Milliarden Dollar aufgewendet [8].

Die am meisten gefürchtete Folge von Adhäsionen ist der Dünndarmileus. Vor dem II. Weltkrieg (und heute noch in Entwicklungsländern) sorgten vor allem inkarzerierte Hernien für Darmverschlüsse. Inzwischen werden (hierzulande) Bauchwandbrüche meist chirurgisch versorgt, bevor sich Komplikationen zeigen. Deshalb haben ihnen Verwachsungen den Rang abgelaufen und sind nun in bis zu 75 Prozent der Fälle die auslösende Ursache. Bei 10 bis 24 Prozent der Patienten tritt der Adhäsionsileus erst mehr als 20 Jahre nach dem Primärereignis auf. Appendektomien (40 Prozent) und gynäkologische Operationen (30 Prozent) sind wegen ihrer relativen und absoluten Häufigkeit dabei typische Anamnesen [9].

1.1.2 Pathophysiologie

Abgesehen von seltenen angeborenen Fällen entstehen Adhäsionen vor allem nach Operationen und/oder Infektionen. Folgende Faktoren können sie initiieren [9, 10]:

- mechanische Verletzung der Serosa (zum Beispiel Laparotomie, Trauma);
- Fremdkörper (beabsichtigt: zum Beispiel Nahtmaterial, Netze, unbeabsichtigt: zum Beispiel Handschuhpartikel, Tupfer);
- physikalische (zum Beispiel Wärme und Austrocknung durch Operationslampen) und chemische (zum Beispiel Insufflationsgas) Noxen;
- Entzündung und Ischämie (mit Operation: zum Beispiel durch Ligaturen und Koagulation, ohne Operation: zum Beispiel durch Infektionen und Perfusionsstörungen).

Diese Faktoren schädigen das Gewebe, vor allem die empfindlichen Mesothelzellen. Freigesetzte Mediatoren, wie Serotonin, Bradikinin, Histamin und Prostaglandin, erhöhen die Gefäßpermeabilität und ein sero-fibrinöses Exsudat gelangt in die Bauchhöhle (maximale Exsudation nach 24 Stunden, Resorption innerhalb von 5 Tagen). Gewebsthrombokinase wandeln Fibrinogen in Fibrin um (erstes Fibrin nach 10 Minuten nachweisbar), Verklebungen entstehen.

Bei normaler fibrinolytischer Aktivität löst das aus Plasminogen durch Gewebsplasmin Aktivator (tPA) gebildete Plasmin die Verklebungen und die Läsion heilt verwachsungsfrei aus. Gewebeschäden reduzieren jedoch gewöhnlich die lokale fibrinolytische Aktivität. Getriggert durch die posttraumatisch erhöhte Konzentration der inflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-alpha) und Interleukine (IL-1, IL-6) wird vermehrt Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI; gemeint ist hier und im folgenden Text PAI-1) vom Mesothel synthetisiert. Die Verklebungen können nicht oder nur unzureichend gelöst werden. Ein Fibrinnetz entsteht, das bereits nach 3 Stunden so fest ist, dass eine Trennung nur noch mit Mesotheldefekten möglich ist. Es bildet die Leitstruktur für einwandernde Fibroblasten, Granulozyten, Monozyten und einsprossende Kapillaren. Fortschreitende Kollagensynthese und bindegewebige Organisation führen schließlich zu permanenten Adhäsionen. Abgeschlossen ist dieser Prozess nach etwa 10 Tagen, dann beginnt der narbige Umbau [7, 9, 10, 11, 12].
Abbildung 1 fasst die Pathophysiologie schematisch zusammen.

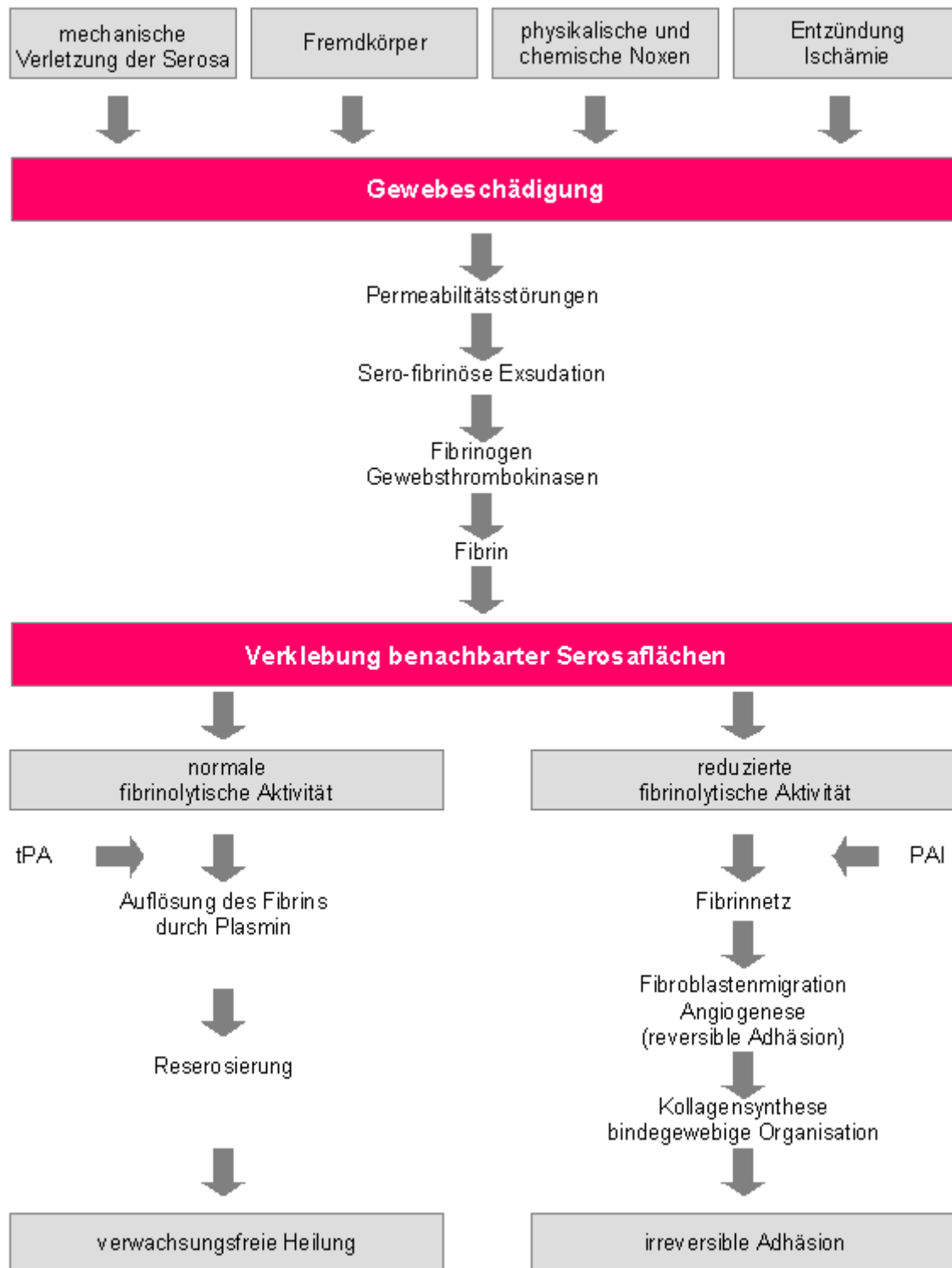


Abb. 1: Pathophysiologie von Adhäsionsbildung

1.1.3 Prophylaxe

Die Adhäsiolyse, als Therapie der Wahl, wird wegen der Gefahr neuer Verwachsungen und der extrem hohen Rezidivraten meist nur zur Behandlung von Komplikationen eingesetzt. Im Vordergrund steht die Prophylaxe. In über 100 Jahren intensiver Forschung ist über viele Methoden und Substanzen berichtet worden, keine konnte sich bisher als allgemein anerkannte klinische Routine durchsetzen. Folgend der Pathophysiologie sind die wichtigsten Ansätze:

1.1.3.a Gewebeschädigung reduzieren

Atraumatische und minimal-invasive (laparoskopische) Operationstechniken verletzen die Serosa weniger und verkleinern die Prädilektionsstellen für Adhäsionen. Erwärmte und befeuchtete Insufflationsgase vermindern die Reizung des Gewebes. Zudem treten nach laparoskopischen Adhäsiolysen seltener neue Verwachsungen und/oder Rezidive auf als nach konventionellen [9, 13, 14]. Fremdkörper provozieren Adhäsionen, lassen sich jedoch nicht völlig vermeiden, aber verringern. So verhindern puderfreie Handschuhe die Kontamination der Bauchhöhle mit Stärkepulver. Sorgsamer Umgang mit Tupfern und Tüchern sowie Schutz vor Austrocknung dezimieren Peritonealläsionen. Entzündungen und Ischämie können zum Beispiel durch streng aseptisches Vorgehen und konsequente Behandlung von Infektionen sowie Verzicht auf die Peritonealnaht limitiert werden [9, 15].

1.1.3.b Verklebung benachbarter Serosaflächen vermeiden

Hyaluronsäurederivate beispielsweise, wie Seprafilm[®] und Intergel[®], bilden eine physische Adhäsionsbarriere. Sie trennen die betroffenen Gewebeschichten in der kritischen Heilungsphase. Seprafilm[®] zum Beispiel verbleibt 7 Tage am Applikationsort und ist nach 28 Tagen vollständig abgebaut und ausgeschieden. Studien belegen, dass

Seprafilm® und Intergel® die Adhäsionsbildung deutlich reduzieren. Allerdings wurde auch berichtet, dass Seprafilm® vermehrt zu postoperativen Entzündungen und außerdem zu Fremdkörperreaktionen führt. Intergel® musste inzwischen u. a. wegen spät auftretender postoperativer Schmerzen und Fremdkörperreaktionen vom Markt genommen werden [9, 16, 17, 18, 19, 20].

1.1.3.c Fibrinolytische Aktivität steigern

Antikoagulantien, wie Heparin, oder Fibrinolytika, wie Plasminogen Aktivator, Streptokinase und Urokinase, greifen direkt in die Fibrinolyse ein. Sie können zwar Verwachsungen reduzieren, erhöhen aber gleichzeitig das Risiko postoperativer Blutungen und Heilungsstörungen, deshalb haben sie sich als Prophylaxe in der Klinik nicht etabliert [11, 21, 22].

1.1.3.d Bindegewebige Organisation behindern

Kortikosteroide, wie Dexamethason, und nichtsteroidale Antirheumatika, wie Ibuprofen, hemmen die Proliferation des Bindegewebes und damit die Bildung fibröser (irreversibler) Adhäsionen. Sie führen aber auch zu Immunsuppression und Wundheilungsstörungen (Kortikosteroide) sowie Schleimhautschäden (nichtsteroidale Antirheumatika) und haben sich darum nicht durchgesetzt [23].

Aussichtsreicher könnten Versuche sein, in der pathophysiologischen „Endstrecke“, statt Fibrinolyse oder Bindegewebsorganisation, die Angiogenese zu beeinflussen.

1.2 Angiogenese

Die Angiogenese ist das Aussprossen von Kapillaren aus bereits vorhandenen Gefäßen. Sie wird durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Zytokinen, den so genannten angiogenic switch, gestartet. Die wichtigsten Stimulatoren scheinen dabei vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) zu sein. Sie aktivieren über Tyrosinkinase-Rezeptoren Endothelzellen. Außerdem erhöht sich die Gefäßpermeabilität und Plasmaproteine treten aus. Sie bewirken, dass die Endothelzellen proteolytische Enzyme, Matrixmetalloproteasen (MMP), produzieren, proliferieren und migrieren. Es entstehen primitive tubuläre Strukturen, die sich später zu Kapillaren umformen.

Die Inhibitoren sind vorwiegend proteolytische Spaltprodukte von Proteinen, die selbst die Angiogenese nicht beeinflussen. Sie gehören meist zur extrazellulären Matrix, wie Kollagen XVIII und Thrombospondin, oder zum Gerinnungssystem, wie Antithrombin III und Plasminogen. Die dazugehörigen antiangiogenetischen Substanzen sind: Endostatin, Thrombospondinfragment, Antithrombinfragment und Angiostatin [24, 25]. Neben diesen endogenen Inhibitoren gibt es zahlreiche exogene. Zu den potentesten Angiogenesehemmern zählt der Wirkstoff Thalidomid.

1.3 Thalidomid

1.3.1 Einführung

Thalidomid (Contergan[®]) wurde ursprünglich als Sedativum erstmals 1954 vom Chemiker Kunz synthetisiert (Grünenthal AG, Aachen, Deutschland). Das Medikament war in Deutschland weit verbreitet, bis es im November 1961 wegen seiner teratogenen Nebenwirkungen vom Markt genommen werden musste.

Biochemisch betrachtet ist Thalidomid ein 2-(2,6-Dioxo-3-PiperidinyI)-Isoindol-1,3-Dion, das in Vollblut mit einer Halbwertszeit von 2,25 Stunden in ein rechts- und ein linksdrehendes Enantiomer razematisiert und zu etwa gleichen Teilen über Niere und Leber ausgeschieden wird. Das Medikament ist oral verabreicht gut verträglich und weist eine hohe Bioverfügbarkeit auf [26, 27, 28].

1.3.2 Wirkungen

Die vielfältigen Wirkungen von Thalidomid sind trotz intensiver Forschung noch nicht ganz geklärt [29, 30]. Die wichtigsten bisher bekannten immunmodulatorischen, antiangiogenetischen und antiinflammatorischen Eigenschaften nennt Abbildung 2.

- Inhibition der TNF-alpha Produktion von Makrophagen und Monozyten
- Beschleunigter Abbau von TNF-alpha mRNA
- Modulation der TNF-alpha induzierten Dichte von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten
- Inhibition der Chemotaxis von Leukozyten
- Blockade von VEGF und bFGF
- Inhibition der IL-6 und IL-12 Produktion von Monozyten
- Stimulierung der IL-4 und IL-5 Produktion von mononukleären Zellen
- Inhibition der Phagozytose von polymorphkernigen Granulozyten und Monozyten

Abb. 2: Wirkungen von Thalidomid

TNF-alpha, ein immunmodulatorisches, inflammatorisches und proangiogenetisches Zytokin, wird vor allem von Makrophagen und Monozyten produziert. Thalidomid hemmt die TNF-alpha Produktion zum Beispiel von Alveolarmakrophagen bei Patienten mit Tuberkulose, Sarkoidose, Bronchialkarzinom, chronischer Bronchitis oder Pneumonie sowie dosis- und/oder enantiomerabhängig von humanen Monozyten [31, 32, 33]. Die TNF-alpha Produktion wird zudem behindert, weil Thalidomid die Halbwertszeit der TNF-alpha mRNA reduziert [34]. Bei Leukozyten moduliert Thalidomid die TNF-alpha induzierte Dichte von Adhäsionsmolekülen und beeinträchtigt ihre Chemotaxis [35, 36]. Die proangiogenetischen Zytokine VEGF und bFGF werden von Thalidomid blockiert, der genaue Mechanismus ist bisher nicht geklärt [37]. Interleukine beeinflusst Thalidomid unterschiedlich. Es inhibiert die Produktion von IL-6 und IL-12 und stimuliert die Produktion von IL-4 und IL-5 [38, 39, 40]. Außerdem bremst Thalidomid die Phagozytose von polymorphkernigen Granulozyten und Monozyten [41].

1.3.3 Nebenwirkungen

Hier sind vor allem die teratogenen Effekte von Thalidomid zu nennen, wie Phokomelie und Dymelie der Extremitäten, Duodenalatresien, Ösophagusfisteln, Neuralrohrdeformationen, Mikroophthalmie, Ohrmissbildungen und Mittellinienhämangiome [42, 43, 44].

Darüber hinaus kam es zu peripheren Neuropathien (je nach Quelle bei 1 bis 70 Prozent). Klinisch manifestierten sie sich in symmetrischen, schmerzhaften Parästhesien an Händen und Füßen oft kombiniert mit einem Sensibilitätsverlust in den Oberschenkeln. Zwischen dem Auftreten der Neuropathie und der Dosis sowie Länge der Thalidomidtherapie war kein Zusammenhang nachweisbar. Allerdings fiel auf, dass Frauen und ältere Patienten (> 70 Jahre) häufiger betroffen waren. Diese Nebenwirkung zu beurteilen fällt schwer, weil die meisten Daten aus retrospektiven

Studien mit sehr inhomogenen Patientengruppen stammen, häufig Krankheiten untersucht wurden, die selbst eine periphere Neuropathie hervorrufen können (zum Beispiel Lepra oder Aids) und weil Thalidomid oft mit neuropathisch wirksamen Medikamenten verabreicht wurde (zum Beispiel Zytostatika). Zudem variierten die Untersuchungsmethoden von lediglich klinischer Einschätzung und Patientenangaben bis zu regelmäßigen Nervenleitgeschwindigkeitsmessungen und intensivem neurophysiologischen Monitoring [45, 46, 47].

Weitere Nebenwirkungen waren Obstipation (10 bis 30 Prozent) und passagere Hautrötungen (2 bis 10 Prozent) [47].

1.4 Zusammenfassung

Abdominale Adhäsionen entstehen vor allem durch Operationen und Infektionen. Sie können ernste Beschwerden auslösen, wie Dünndarmileus, Infertilität und chronische Schmerzen. Eine allgemein anerkannte Prophylaxe und/oder Therapie existiert trotz intensiver Forschung noch nicht. Steigende Lebenserwartung und erweiterte Operationsindikationen verschärfen das Problem zusätzlich.

Ein aussichtsreicher Ansatz für die Prophylaxe könnte die Inhibition der Angiogenese sein. Damit würde der pathophysiologische Ablauf unterbrochen und die Bildung irreversibler Adhäsionen verhindert.

Ein potenter Angiogenesehemmer ist der Wirkstoff Thalidomid. Es blockiert die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF, hemmt das Zytokin TNF-alpha, moduliert bei Leukozyten die Dichte der Adhäsionsmoleküle und beeinträchtigt ihre Chemotaxis.

Diese Arbeit untersuchte, wie Thalidomid auf die Adhäsionsbildung wirkt. Da nicht geklärt ist, wie die Substanz Wundheilung und Blutgerinnung beeinflusst, musste vor einem klinischen Einsatz die intraperitoneale (i. p.) Applikation im Tiermodell überprüft werden. Ein dafür etabliertes Versuchstier ist das Kaninchen [26]. In dieser Studie wurden 40 New Zealand White Kaninchen bei einem standardisierten operativen Eingriff geblindet i. p. mit Thalidomid oder einem Placebo behandelt.

- H0: Thalidomid hemmt nach Zökumresektion und Reanastomosierung i. p. appliziert postoperative Adhäsionen im Kaninchenmodell nicht.
- H1: Thalidomid hemmt nach Zökumresektion und Reanastomosierung i. p. appliziert postoperative Adhäsionen im Kaninchenmodell.

Die Adhäsionsbildung wurde mit einem klinischen Adhäsionsscore beurteilt (Hauptzielkriterium) und die Angiogenese mit einem immunhistochemischen Angiogenesecore. Von TNF-alpha, einem wichtigen Mediator für Adhäsionen, wurden die Serumspiegel ermittelt (Nebenzielkriterien).

Wundheilung und Blutgerinnung wurden durch visuelle Inspektion (Entzündungszeichen im Resektionsgebiet, Ischämie und Insuffizienz der Darmnaht), die Messung des Berstungsdrucks der Anastomosenpräparate, die Klassifizierung der Berstungsstelle sowie durch die laborchemische Bestimmung der Fibrinolyseparameter tPA und PAI in Peritonealbiopsien kontrolliert (Nebenzielkriterien).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Operation und Betreuung

2.1.1 Einführung

Nachdem das Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit des Senats von Berlin das Versuchsvorhaben (Protokoll Nr. Reg 0201/00) genehmigt hatte, lieferte die Charles River Wiga Deutschland GmbH insgesamt 40 New Zealand White Kaninchen, alle weiblich, 2 bis 3 Monate alt und durchschnittlich knapp 2 kg schwer. Sie wurden in der Tierexperimentellen Abteilung der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte, unter Standardbedingungen gehalten und nach einer Eingewöhnungsphase von jeweils einer Woche operiert.

2.1.2 Ablauf

Betäubt wurden die Kaninchen mit einer intramuskulären (i. m.) Injektion von Ketanest[®] und Rompun[®] (Ketaminhydrochlorid, 50 mg/kg KG, Hoechst AG, Frankfurt/Main, Deutschland; Xylazin 5 mg/kg KG, Bernburg AG, Bernburg, Deutschland). In Rückenlage wurden sie dann mit Betaisodona desinfiziert, steril abgedeckt und über eine 5 cm lange Mittellinieninzision laparotomiert. Operiert wurde mit puderfreien Latex-Handschuhen (Gammex[®]PF, Ansell GmbH, München, Deutschland). Alle Tiere hatten präoperativ einen adhäsionsfreien Bauchraum. Das Zökum wurde mobilisiert und das Mesenterium auf einer Länge von 2 cm disseziert, danach wurde eine Peritonealbiopsie entnommen (Peritonealstanze, Baxter Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die Proben wurden sofort gewogen, mit NaCl in einem Eppendorfröhrchen eingefroren und bei – 70 °C gelagert. Anschließend wurden 2 cm des Zökums reseziert und mit einer fortlaufenden zweireihigen Naht in End-zu-End-Technik mit 5-0 PDS[®] (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) reanastomosiert. Es folgte eine weitere Peritonealbiopsie.

Vor dem Laparotomieverschluss wurden die Tiere in 4 Gruppen à 10 Tiere randomisiert. Die Gruppen 1 und 2 erhielten eine i. p. Injektion von 200 mg/kg KG Thalidomid gelöst in 10 ml Carboxymethylzellulose (CMZ) (Thalidomid und CMZ, Grünenthal AG, Aachen, Deutschland). Die Dosis von Thalidomid wurde gewählt, weil in tierexperimentellen Studien wirksame Serumspiegel bei Kaninchen nach einer i. p. Applikation von mindestens 187 mg/kg KG nachweisbar waren [33]. Die Gruppen 3 und 4 wurden mit 10 ml CMZ i. p. behandelt. Die Gabe der Versuchsmedikation erfolgte geblindet. Danach bekamen alle Tiere einmalig ein Antibiotikum (0,5 g Unacid[®]; Ampicillin und Sulbactam, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Verschluss wurde das Abdomen durch fortlaufende 2-0 PDS[®] Fasziennaht, 4-0 Vicryl[®] Subkutannaht und 4-0 Ethibond[®] Einzelknopfnähte (Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Die Kaninchen wurden täglich überwacht. Dabei wurden u. a. der Aktivitätsstatus und das Fressverhalten beurteilt sowie die Körpertemperatur und das Gewicht gemessen. Um das Blutbild zu kontrollieren, wurde allen Tieren am Operationstag prä- und postoperativ, am 3. postoperativen Tag und den Gruppen 2 und 4 zudem am 7. postoperativen Tag Blut abgenommen.

Die Tiere der Gruppen 1 und 3 wurden am 3., die Tiere der Gruppen 2 und 4 am 7. postoperativen Tag erneut, wie oben beschrieben, narkotisiert und laparotomiert. Die Zeitpunkte wurden gewählt, weil am 3. Tag bereits erste primitive Gefäßstrukturen entstanden sind [48] und weil eine schwerwiegende Komplikation zwischen dem 5. und 7. Tag die Nahtinsuffizienz ist.

Zwei geblindete Untersucher (Dr. Julian Mall und Dr. Christian Pollmann, beide Mitarbeiter der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte) beurteilten unabhängig voneinander die Bildung von Adhäsionen. Sie

verwendeten dabei den von Tyrell et al. beschriebenen Score – einen etablierten Bewertungsmaßstab für Adhäsionen im Kaninchenmodell, siehe 3 [49].

Grad 0	Keine Adhäsionen
Grad 1	Minimale Adhäsionen, die sich stumpf leicht von der Serosa trennen lassen
Grad 2	Mäßige Adhäsionen, die sich stumpf schwer von der Serosa trennen lassen
Grad 3	Dichte Adhäsionen, die sich nur scharf von der Serosa trennen lassen

Abb. 3: Adhäsionsscore nach Tyrell et al.

Außerdem untersuchten sie das Resektionsgebiet nach Entzündungszeichen sowie die Darmnaht nach Ischämie und Insuffizienz. Danach wurde, in gleicher Technik wie oben beschrieben, eine weitere Peritonealbiopsie entnommen, dann das Zökum komplett mobilisiert, ein 10 cm langer Teil des Kolon ascendens mit der Anastomose in der Mitte reseziert und in Ringerlösung gelagert. Die Tiere wurden anschließend durch eine intravenöse hypertone Kaliumchloridinjektion schmerzlos getötet.

Abbildung 4 zeigt den Versuchsablauf schematisch:

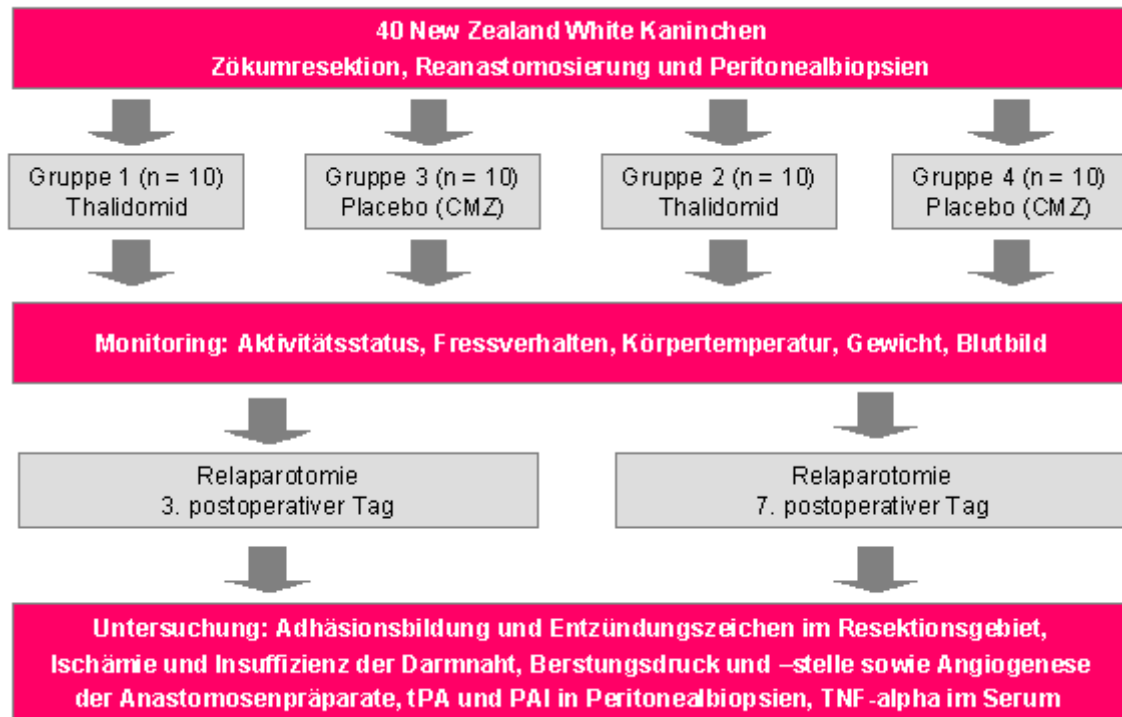


Abb. 4: Versuchsablauf

2.2 Messung des Berstungsdrucks und Klassifizierung der Berstungsstelle

Als klinisch relevant galten Berstungsdruckunterschiede von mindestens 25 mmHg. Die Fallzahlschätzung ergab, dass dann pro Untersuchungsgruppe 10 Tiere nötig sind.

Der Berstungsdruck wurde gemessen, indem an einem Ende des Darmresektats ein Füllungskatheter eingeführt und mit einer Tabaksbeutelnaht flüssigkeits- und gasdicht fixiert wurde. Am anderen Ende wurde ein Druckabnehmer (arterieller Druckmessungskatheter, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in gleicher Weise angebracht, mit einem computergestützten Monitorsystem verbunden (Sirecust, Siemens AG, München, Deutschland) und alle 0,5 Sekunden der intraluminale Druck gemessen. Das Darmresektat wurde zunächst manuell mit 100 ml Ringerlösung (Baxter Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland) gefüllt. Danach wurde eine Rollerpumpe angeschlossen. Kontinuierlich wurden 50 ml pro 5 Minuten Ringerlösung bis zum Bersten des Resektats infundiert. Der Berstungsdruck wurde ermittelt und die Berstungsstelle als in der Anastomose, anastomosennah oder anastomos fern klassifiziert. Danach wurde die Anastomose aus dem Kolonresektat herausgelöst, in Formalin fixiert und immunhistochemisch aufbereitet.

2.3 Immunhistochemische Aufarbeitung der Anastomosenpräparate

Die Präparate wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité, Campus Mitte, (Direktor: Prof. Dr. Manfred Dietel) nach der von Saclarides et al. beschriebenen capillary-gap Technik aufbereitet [50]. Dafür wurden die formalinfixierten Anastomosen zunächst zerteilt und Paraffinblöcke hergestellt. Mit dem Mikrotom wurden die Blöcke in 4 µm dünne Schichten geschnitten und nach der Streptavidin-Biotin-Methode weiterverarbeitet. Auf einem Objektträger wurden die Präparate für die hitzeinduzierte Epitopdarstellung 24 Stunden bei 60 °C inkubiert, anschließend in Xylen deparaffinisiert und rehydriert sowie mit Zitratpuffer versetzt. Dann wurden sie 10 Minuten bei Raumtemperatur in Proteinase K-Enzymlösung (1:40 in Tris-Puffer; DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert, danach 5 Minuten bei Raumtemperatur in Ziegenserum (BioTek Solutions, Inc., Santa Barbara, USA). Dann wurde der primäre Antikörper (CD 31 polyklonale Antikörper, 1:800 in PBS; DakoCytomation GmbH, Hamburg Deutschland) für 25 Minuten bei Raumtemperatur dazugegeben und danach der sekundäre (biotynilierte) Antikörper ebenfalls für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit 3prozentiger H₂O₂ gestoppt und anschließend 25 Minuten lang Avidin-Biotin-Merettich-Peroxidase hinzugegeben. Gefärbt wurden die Präparate dann dreimal jeweils 5 Minuten mit Di-Amino-Benzidin und 1 Minute mit Hämatoxylin. Mit graduerter Alkohollösung wurden sie dehydriert, mit Xylen ausgewaschen und mit Deckgläschen zugedeckt. Bei allen Färbungen wurden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt.

Der Angiogenesescore (AS) wurde nach der von Saclarides et al. beschriebenen Methode ermittelt [50]. Zwei geblindete Untersucher mikroskopierten unabhängig voneinander die gefärbten Schnitte. In jedem Präparat wurden unter 200facher Vergrößerung die Gefäße in sechs 1 cm² großen Feldern ausgezählt und der Mittelwert

berechnet. Zwei Felder lagen dabei in der Anastomose und vier anastomosenfern. Um einen AS-Referenzwert zu ermitteln, wurden 10 zusätzliche Kaninchendarmpräparate in gleicher Weise aufgearbeitet und untersucht.

2.4 Messung von Gewebsplasmin Aktivator (tPA) und Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI)

Die Fibrinolyseparameter tPA und PAI wurden in Peritonealbiopsien bestimmt. Pro Kaninchen wurden drei Proben ausgewertet: Beim primären Eingriff wurde eine Probe nach Dissektion des Mesenteriums entnommen und eine weitere vor i. p. Applikation von Thalidomid beziehungsweise CMZ. Die dritte Probe wurde bei der Relaparotomie am 3. postoperativen Tag (Gruppen 1 und 3) beziehungsweise am 7. postoperativen Tag (Gruppen 2 und 4) entnommen. Die Proben wurden gewogen, mit NaCl in einem Eppendorfröhrchen eingefroren und bei – 70 °C gelagert.

Vor der weiteren Untersuchung wurden die Peritonealbiopsien homogenisiert. Dafür wurden sie aufgetaut, abgetupft, mit Homogenisierungspuffer (PBS mit NaCl 0,5 mol/l und Triton-X-100-Lösung 0,01 %, 1 ml Puffer auf 40 mg Nassgewebe; PBS, Gibco[®], Invitrogen Ltd., Paisley, Vereinigtes Königreich; Triton, Ferak Berlin GmbH, Berlin, Deutschland) versetzt und mit einem Homogenisierungsgerät (Heidoph REAX 2000, Heidoph Elektro GmbH & Co. KG, Kehlheim, Deutschland) mit 900 Schlägen pro Minute zerkleinert. Das Homogenisat wurde mit 10.000 Umdrehungen pro Minute für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, wieder eingefroren und bei – 70 °C gelagert.

2.4.1 Aktivität von tPA und PAI

Die Aktivität von tPA und PAI wurde mit dem chromogenen Test Spectrolyse[®] (fibrin) bestimmt (Produkt # 101101, American Diagnostica GmbH, Pfungstadt, Deutschland).

2.4.1.a Aktivität von tPA

Die Proben wurden mit chromogenem Glu-Plasminogen und Fibrin versetzt. In Anwesenheit von Fibrin wandelt tPA Plasminogen in Plasmin um. Plasmin spaltet das chromogene Substrat. Der entstehende Farbstoff ist quantitativ proportional zur tPA-Aktivität.

Die wichtigsten Arbeitsschritte: Die Proben wurden 1:2 mit 1,0 mol/l Acetat stabilisiert und 1:41 mit 0,15 mol/l NaCl verdünnt (auf 50 µl Probe/Acetat 2 ml NaCl). PAI-freies Plasma wurde 1:1 mit 1,0 mol/l Acetat (auf 300 µl PAI-freies Plasma 300 µl Acetat) angesäuert und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für die Kalibrationskurve wurden dann folgende tPA-Standards hergestellt: 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2 und 3 IU/ml tPA.

Auf die Mikrotiterplatte wurden jeweils 20 µl Probe beziehungsweise tPA-Standard und 200 µl Plasminogen Aktivator Reagenz pipettiert und 15 Minuten bei 2 bis 8 °C gekühlt. Dann wurden 10 µl Desafib[®]-X (Fibrin I) hinzugegeben, die Platte 19 Stunden bei 37 °C inkubiert und danach die Reaktion mit jeweils 25 µl Stop/fibrin angehalten. Die Färbung wurde bei 405 nm (Farbreaktion) und 492 nm (Eigenfärbung der Probe) bestimmt (Reader 530, Organon Teknika N.V., Turnhout, Belgien). Aus der Differenz (Wert bei 405 nm minus Wert bei 492 nm) wurde mit der Kalibrationskurve die tPA-Aktivität ermittelt. Alle Proben wurden doppelt gemessen und dann die Mittelwerte berechnet.

2.4.1.b Aktivität von PAI

Die Aktivität von PAI wurde indirekt über die tPA-Restaktivität bestimmt. Die Proben wurden mit einem tPA-Überschuss versetzt, dieser reagiert mit dem PAI der Probe. Dann wurde die tPA-Restaktivität gemessen. Die PAI-Aktivität ergab sich als Differenz aus tPA-Überschuss minus tPA-Restaktivität minus tPA-Aktivität (wie unter Punkt 2.4.1.a) ermittelt).

Die wichtigsten Arbeitsschritte: Zu 25 µl Probe wurden 25 µl 40 IU/ml tPA (tPA-Überschuss) gegeben. Dann wurden der 40 PAI-Standard (25 µl PAIfreies Plasma und 25 µl Tris-Puffer) und der 0 PAI-Standard (25 µl PAIfreies Plasma und 25 µl 40 IU/ml tPA) gemischt und zusammen mit den vorbereiteten Proben 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben und Standards mit 50 µl 1,0 mol/l Acetat angesäuert, 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und jeweils 2 ml 0,15 mol/l NaCl hinzugegeben. Für die Kalibrationskurve wurden dann folgende PAI-Standards hergestellt: 0, 5, 10, 20, 30 und 40 U/ml PAI.

Auf die Mikrotiterplatte wurden jeweils 20 µl Probe beziehungsweise PAI-Standard und 200 µl Plasminogen Aktivator Reagenz pipettiert und 15 Minuten bei 2 bis 8 °C gekühlt. Dann wurden 10 µl Desafib[®]-X (Fibrin I) hinzugegeben, die Platte 135 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach die Reaktion mit jeweils 25 µl Stop/fibrin angehalten. Die Färbung wurde bei 405 nm (Farbreaktion) und 492 nm (Eigenfärbung der Probe) bestimmt (Reader 530, Organon Teknika N.V., Turnhout, Belgien). Aus der Differenz (Wert bei 405 nm minus Wert bei 492 nm) wurde mit der Kalibrationskurve die tPA-Restaktivität ermittelt. Die PAI-Aktivität ergab sich als Differenz aus tPA-Überschuss minus tPA-Restaktivität minus tPA-Aktivität. Alle Proben wurden doppelt gemessen und dann die Mittelwerte berechnet.

2.4.2 Konzentration von tPA und PAI

2.4.2.a Konzentration von tPA

Die Konzentration von tPA wurde mit Imubind[®] Gesamt-tPA ELISA gemessen, ein Test, der auf dem Doppel-Antikörper-Prinzip beruht (Produkt # 860, American Diagnostica GmbH, Pfungstadt, Deutschland).

Die wichtigsten Arbeitsschritte: tPAfreies Plasma und tPA-Antigen wurden in jeweils 500 µl Aqua gelöst. Für die Kalibrationskurve wurden dann folgende tPA-Standards hergestellt: 0, 5, 10, 20 und 30 ng/ml tPA.

Auf die Mikrotiterplatte, die mit Ziege anti-tPA IgG beschichtet war und Ziege-Normal IgG sowie Indikatorfarbstoff enthielt, wurden jeweils 20 µl Probe beziehungsweise tPA-Standard und 50 µl PET-Puffer (Puffer-Konzentrat aus Phosphat, NaCl, EDTA und Tween-20 gelöst in 1 l Aqua) pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 600 Umdrehungen pro Minute geschüttelt (Celloshaker Variospeed, Renner GmbH, Darmstadt, Deutschland). Dann wurden jeweils 50 µl Konjugat (Peroxidase-markierte anti-tPA Fab-Fragmente gelöst in 7 ml PET-Puffer) hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 600 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend viermal mit PET-Puffer gewaschen und die Reste ausgeschlagen. Danach wurden jeweils 100 µl Peroxidase-Substrat-Gemisch (1,2 Ortho-Phenylendiamin Dihydrochlorid 30 Minuten vor Verwendung gelöst in 10 ml Aqua und 2ml 0,15prozentigem Hydrogenperoxid) hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 600 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Die Reaktion wurde dann mit jeweils 100 µl 1,5 M Schwefelsäure gestoppt und die Platte 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Färbung wurde innerhalb von 2 Stunden bei 492 nm gegen Luft bestimmt (Reader 530, Organon Teknika N.V., Turnhout, Belgien). Mit der

Kalibrationskurve wurde die tPA-Konzentration ermittelt. Alle Proben wurden doppelt gemessen und dann die Mittelwerte berechnet.

2.4.2.b Konzentration von PAI

Die Konzentration von PAI wurde mit Imubind[®] Plasma PAI-1 ELISA gemessen, ein Test, der auf dem Doppel-Antikörper-Prinzip beruht (Produkt # 822, American Diagnostica GmbH, Pfungstadt, Deutschland).

Die wichtigsten Arbeitsschritte: PAI-freies Plasma und PAI-Standard 50 ng/ml wurden in jeweils 500 µl Aqua gelöst. Für die Kalibrationskurve wurden dann folgende PAI-Standards hergestellt: 0; 6,25; 12,5; 25 und 50 ng/ml PAI.

Auf die Mikrotiterplatte, die mit Maus anti-PAI IgG beschichtet war, wurden jeweils 20 µl Probe beziehungsweise PAI-Standard und 50 µl PET-Puffer (Puffer-Konzentrat aus Phosphat, NaCl, EDTA und Tween-20 gelöst in 1 l Aqua) pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 600 Umdrehungen pro Minute geschüttelt (Celloshaker Variospeed, Renner GmbH, Darmstadt, Deutschland). Dann wurden jeweils 50 µl Konjugat (Peroxidase-markierte Ziege antihuman-PAI IgG gelöst in 7 ml PET-Puffer) hinzugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 600 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend viermal mit PET-Puffer gewaschen und die Reste ausgeschlagen. Danach wurden jeweils 200 µl Peroxidase-Substrat-Gemisch (2 Tabletten Ortho-Phenylendiamin Dihydrochlorid 10 Minuten vor Verwendung gelöst in 48 ml Aqua und 60 µl 30prozentigem Hydrogenperoxid) hinzugegeben und 12 Minuten bei Raumtemperatur mit 600 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Die Reaktion wurde dann mit jeweils 50 µl 4,5 M Schwefelsäure gestoppt und die Platte 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Färbung wurde innerhalb von 15 Minuten bei 492 nm gegen Luft bestimmt (Reader 530, Organon Teknika N.V.,

Turnhout, Belgien). Mit der Kalibrationskurve wurde die PAI-Konzentration ermittelt. Alle Proben wurden doppelt gemessen und dann die Mittelwerte berechnet.

2.5 Messung von Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-alpha)

Der Adhäsionsmediator TNF-alpha wurde im Serum bestimmt. Das Serum wurde mit 3.000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert. Die Messung führte die Grünenthal AG durch (Grünenthal AG, Aachen, Deutschland). Mit einem Elisa-Test (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurden die TNF-alpha Serumspiegel bestimmt.

2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Mit den Programmen SAS 8.2[®] und SPSS 11.0[®] wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Die untersuchten Daten waren ordinal- oder intervallskaliert. Wegen der kleinen Stichprobe konnte keine Normalverteilung unterstellt werden, deshalb wurden nichtparametrische Verfahren angewendet: bei Gruppenvergleichen zweier unabhängiger Stichproben der Mann-Whitney-Test, bei Parametern, die zu verschiedenen Zeiten ermittelt wurden, die zweifaktorielle Analyse für Daten mit Messwiederholung, um Gruppen- und Zeiteffekte sowie Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Zeit aufzudecken. Als signifikant galten P-Werte kleiner als 0,05.

3 ERGEBNISSE

3.1 Monitoring

3.1.1 Allgemeinzustand, Aktivitätsstatus, Fressverhalten, Körpertemperatur und Gewicht

Ein Tier der Gruppe 3 (Kontrollgruppe) starb bei der Operation an einer akuten kardialen Dekompensation. Die anderen Operationen verliefen komplikationslos. Postoperativ traten bei zwei Tieren der Gruppe 3 und bei drei Tieren der Gruppe 2 (Therapiegruppe) subkutane Wundheilungsstörungen mit partieller Hautnahtinsuffizienz auf, die steril mit einer neuen Naht versorgt wurden.

Im Beobachtungszeitraum zeigten sich bei Aktivitätsstatus, Fressverhalten, Körpertemperatur und Gewicht keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Alle Tiere begannen noch am Operationstag wieder zu fressen. Das weitere Fressverhalten, der Aktivitätsstatus und die Körpertemperatur waren unauffällig. Das Gewicht der Tiere reduzierte sich leicht. Das durchschnittliche präoperative Gewicht betrug 1,98 kg (0,18 kg Standardabweichung), postoperativ lagen die Mittelwerte am 3. Tag bei 1,84 kg (0,11 kg) und am 7. Tag bei 1,76 kg (0,21 kg).

3.1.2 Blutbild

3.1.2.a Hämoglobin

Die Hämoglobinwerte der Therapie- und Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 5). Die Mittelwerte beider Gruppen betragen am Operationstag (OP-Tag) 12,6 g/dl (1,0 g/dl) und postoperativ (post-OP) 10,2 g/dl (0,8 g/dl) beziehungsweise 10,7 g/dl (0,8 g/dl).

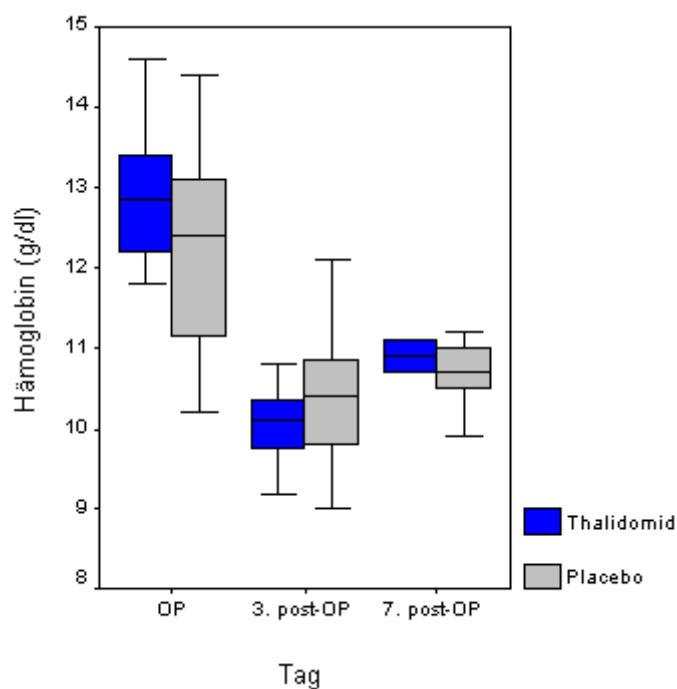


Abb. 5: Entwicklung der Hämoglobinwerte im Serum

3.1.2.b Hämatokrit

Die Hämatokritwerte der Therapie- und Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6). Die Mittelwerte beider Gruppen betragen am Operationstag 39,5 % (3,2 %) und postoperativ 32,1 % (2,6 %) beziehungsweise 34,4 % (2,3 %).

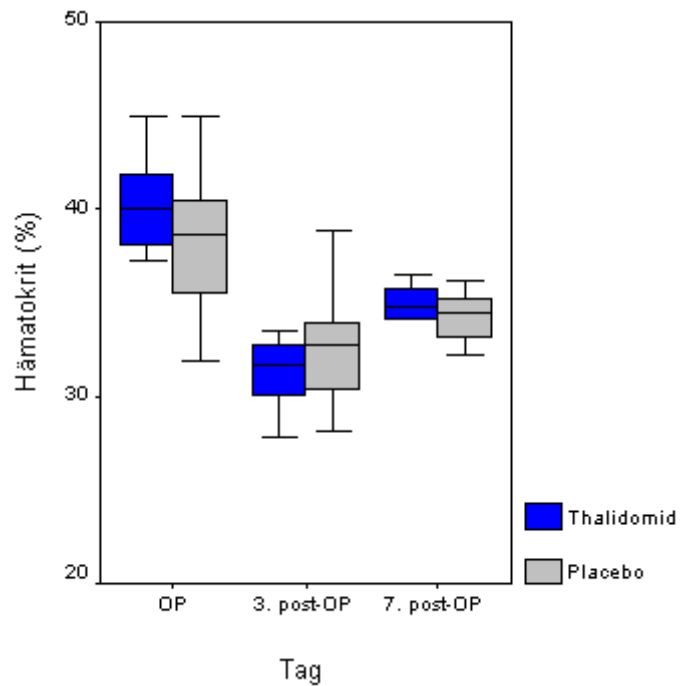


Abb. 6: Entwicklung der Hämatokritwerte im Serum

3.1.2.c Thrombozyten

Die Thrombozytenwerte der Therapie- und Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 7). Die Mittelwerte beider Gruppen betragen am Operationstag 315 /nl (106 /nl) und postoperativ 602 /nl (80 /nl) beziehungsweise 815 /nl (105 /nl).

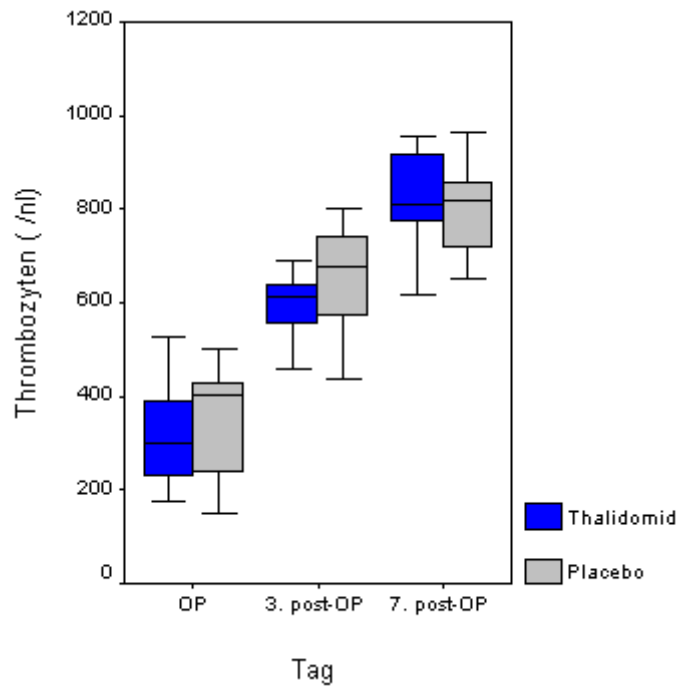


Abb. 7: Entwicklung der Thrombozytenwerte im Serum

3.1.2.d Leukozyten

Die Entwicklung der Leukozytenwerte zeigt Abbildung 8. Am Operationstag betragen die Mittelwerte in der Therapiegruppe 5,67 /nl (1,79 /nl) und in der Kontrollgruppe 4,17 /nl (1,17 /nl). Postoperativ fielen die Leukozytenwerte am 3. Tag in der Therapiegruppe auf durchschnittlich 4,43 /nl (1,51 /nl), in der Kontrollgruppe stiegen sie dagegen auf durchschnittlich 5,72 /nl (1,87 /nl) (Unterschied statistisch nicht signifikant, $p > 0,05$). Bis zum 7. Tag erhöhten sich die Leukozytenwerte in der Therapiegruppe auf durchschnittlich 4,81 /nl (0,88 /nl) und in der Kontrollgruppe auf 6,37 /nl (1,49 /nl) (Unterschied statistisch nicht signifikant, $p > 0,05$).

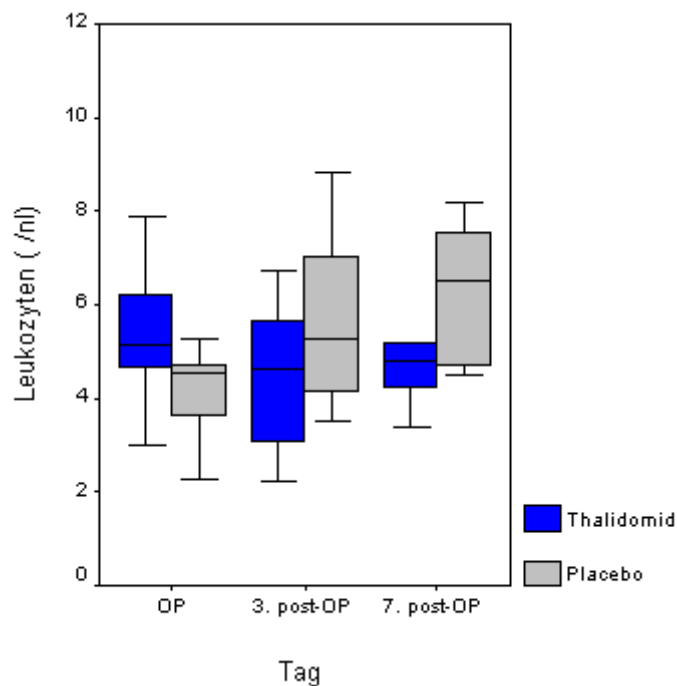


Abb. 8: Entwicklung der Leukozytenwerte im Serum

3.2 Untersuchung

3.2.1 Adhäsionsbildung

Alle Kaninchen hatten bei der initialen Laparotomie einen verwachsungs- und verklebungsfreien Bauchraum. Bei der Relaparotomie am 3. beziehungsweise 7. postoperativen Tag beurteilten zwei Untersucher unabhängig voneinander die Adhäsionsbildung nach dem von Tyrell et al. beschriebenen Score [49]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

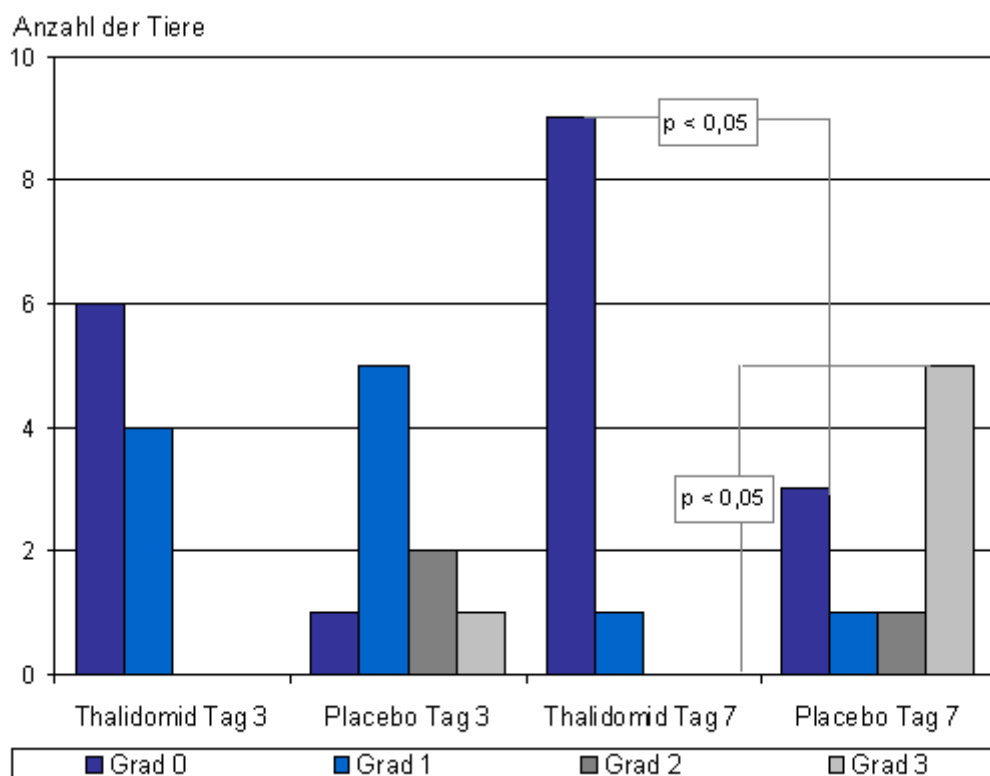


Abb. 9: Adhäsionsbildung

In der Therapiegruppe, die am 3. postoperativen Tag relaparotomiert wurde, hatten sechs Tiere inspektorisch keine Adhäsionen (Grad 0) und vier Tiere minimale (Grad 1). Im Vergleich dazu hatte(n) in der Kontrollgruppe nur ein Tier keine Adhäsionen, fünf Tiere minimale, zwei Tiere mäßige (Grad 2) und ein Tier bereits dichte Adhäsionen (Grad 3). Es konnten in dieser Gruppe nur neun Tiere beurteilt werden, weil ein

Kaninchen bei der ersten Operation verstorben war und nur als Intention to treat-Tier statistisch ausgewertet wurde.

In der Therapiegruppe, die am 7. postoperativen Tag relaparotomiert wurde, hatte(n) neun Tiere inspektorisch keine Adhäsionen und ein Tier minimale. Im Vergleich dazu hatte(n) in der Kontrollgruppe nur drei Tiere keine Adhäsionen, ein Tier minimale, ein Tier mäßige und fünf Tiere bereits dichte Adhäsionen.

3.2.2 Entzündungszeichen im Resektionsgebiet

Bei der Relaparotomie am 3. beziehungsweise 7. postoperativen Tag wies kein Tier Entzündungszeichen im Resektionsgebiet auf.

3.2.3 Ischämie und Insuffizienz der Darmnaht

Bei der Relaparotomie am 3. beziehungsweise 7. postoperativen Tag waren bei allen Tieren die Anastomosen gut verheilt. Es gab inspektorisch keine Anzeichen für Ischämie und/oder Insuffizienz.

3.2.4 Berstungsdruck der Anastomosenpräparate

Die Berstungsdruckmessungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe (Abbildung 10). Bei den Tieren, die am 3. postoperativen Tag relaparotomiert wurden, betrugen die durchschnittlichen Berstungsdrücke 83 mmHg (15 mmHg). Bei den Tieren, die am 7. postoperativen Tag relaparotomiert wurden, lagen die Mittelwerte beider Gruppen bei 103 mmHg (22 mmHg).

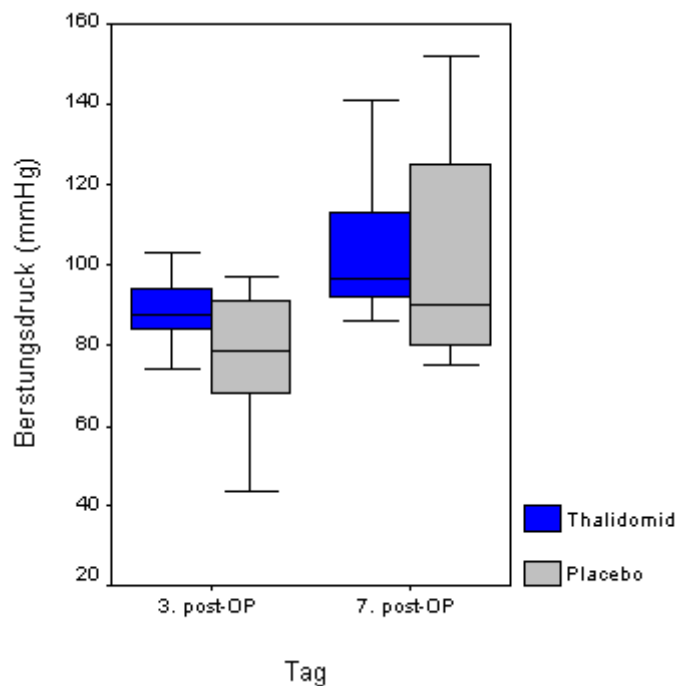


Abb. 10: Berstungsdrücke der Anastomosenpräparate

3.2.5 Berstungsstelle der Anastomosenpräparate

Die Auswertung der Berstungsstellen zeigt Abbildung 11. Bei den Tieren, die am 3. postoperativen Tag relaparotomiert wurden, lagen sie in der Therapiegruppe bei acht Tieren anastomosenfern, in der Kontrollgruppe bei sechs. Bei den Tieren, die am 7. postoperativen Tag relaparotomiert wurden, lagen die Berstungsstellen in der Therapiegruppe bei allen Tieren anastomosenfern, in der Kontrollgruppe nur bei sieben.

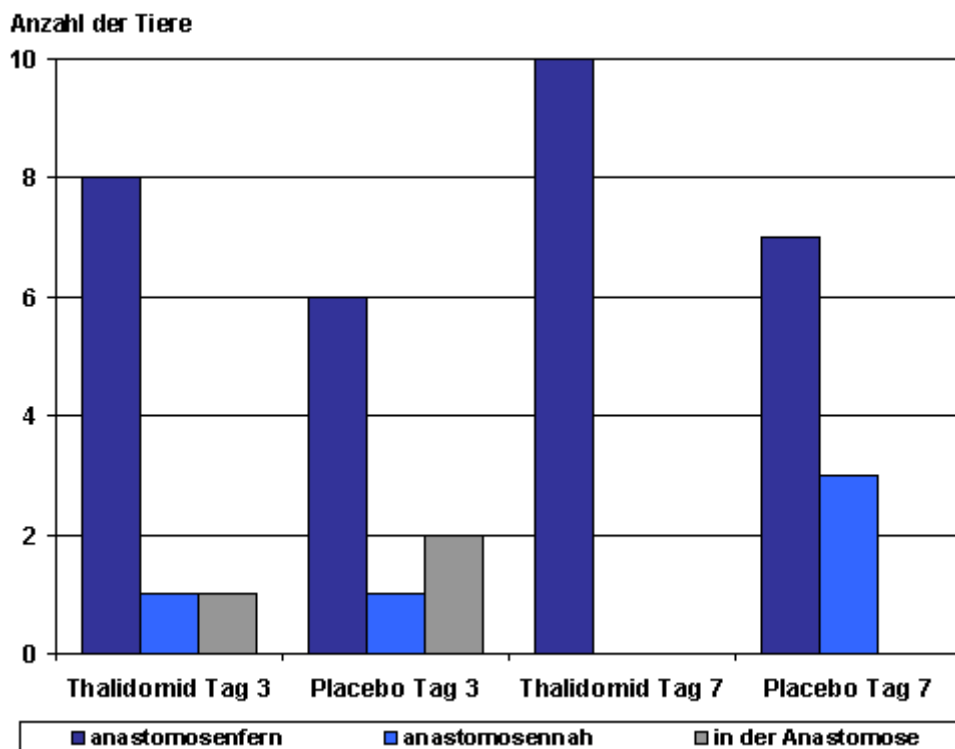


Abb. 11: Berstungsstellen der Anastomosenpräparate

3.2.6 Angiogenese der Anastomosenpräparate

Die Gefäßdichte der Anastomosenpräparate ist in Abbildung 12 dargestellt. Bei den Tieren, die am 3. postoperativen Tag relaparotomiert wurden, zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). In der Therapiegruppe wurden durchschnittlich 28,2 Gefäße/cm² (1,5 Gefäße/cm²) gezählt, in der Kontrollgruppe dagegen 31,0 Gefäße/cm² (1,6 Gefäße/cm²). Bei den Tieren, die am 7. postoperativen Tag relaparotomiert wurden, waren die Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$). In der Therapiegruppe wurden durchschnittlich 37,2 Gefäße/cm² (0,9 Gefäße/cm²) gezählt und in der Kontrollgruppe 37,4 Gefäße/cm² (0,7 Gefäße/cm²).

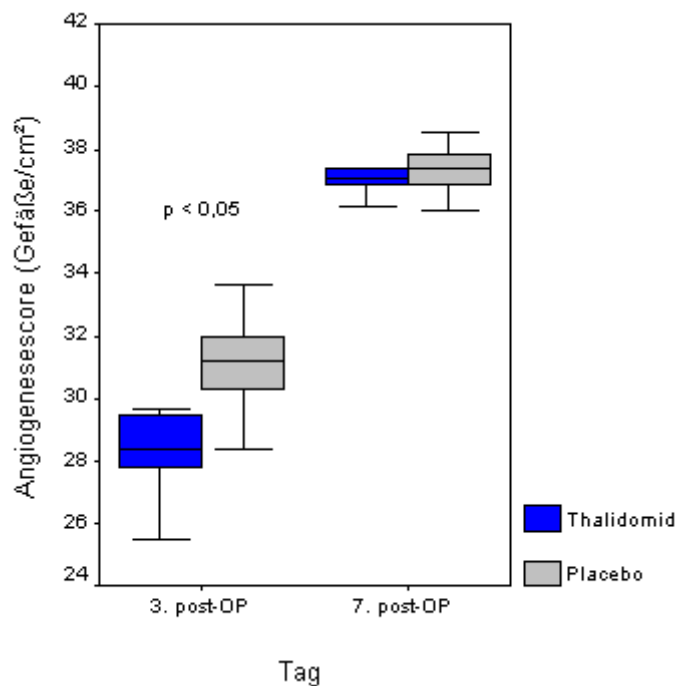


Abb. 12: Gefäßdichte der Anastomosenpräparate

Eine immunhistochemische Darstellung der Gefäße zeigt Abbildung 13. Das Präparat stammt von einem Kaninchen der Gruppe 2 (Therapiegruppe, Relaparotomie am 7. postoperativen Tag).

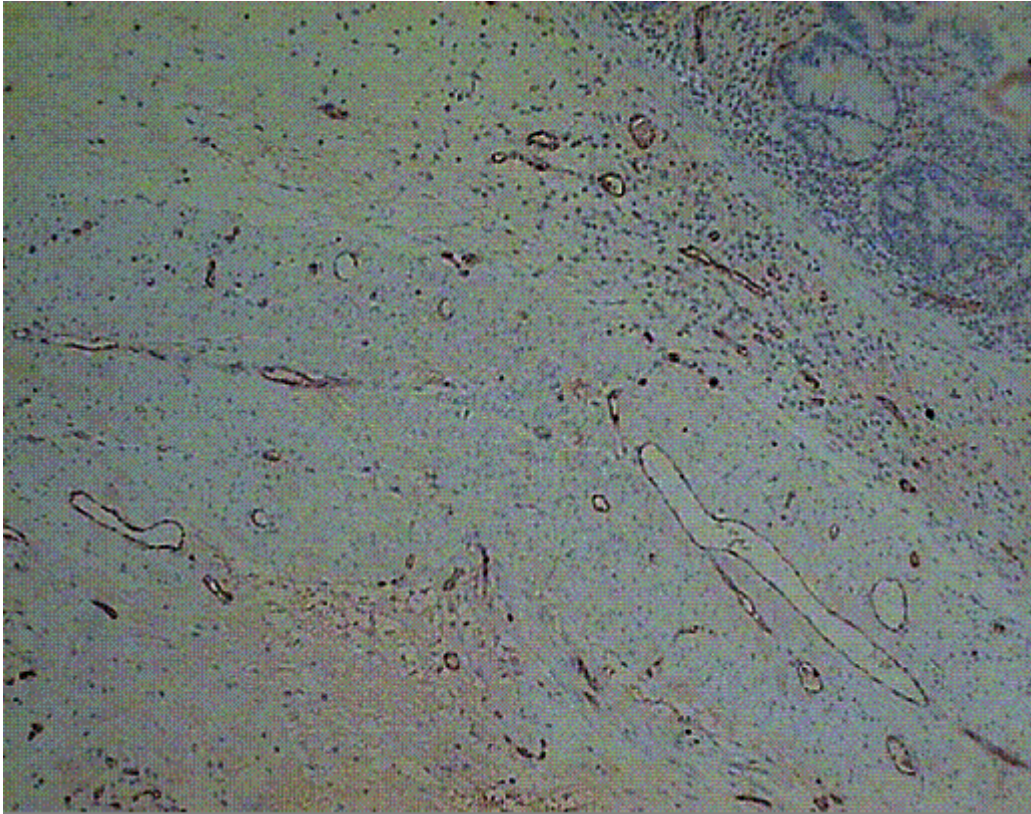


Abb. 13: Immunhistochemische Darstellung der Gefäße in der Mukosa und Submukosa des Anastomosenpräparates (200fache Vergrößerung, Lichtmikroskopie)

3.2.7 Gewebsplasmin Aktivator (tPA) und Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) in Peritonealbiopsien

3.2.7.a Aktivität von tPA und PAI

Die Messungen mit dem chromogenen Test Spectrolyse[®] (fibrin) lieferten keine verwertbaren Ergebnisse. Das Produkt, für humane Proben bestimmt, wurde eingesetzt, weil es spezielle Tests für Kaninchen nicht gab und weil Versuche mit Referenzbiopsien erfolgreich verlaufen waren. Bei den eigentlichen Messungen reagierten die Proben nicht mit Desafib[®]-X (Fibrin I) oder die ermittelten Doppelwerte wichen erheblich voneinander ab.

3.2.7.b Konzentration von tPA

Die tPA-Konzentrationswerte der Therapie- und Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 14). Die Mittelwerte beider Gruppen lagen am Operationstag in der Biopsie, die nach Dissektion des Mesenteriums entnommen wurde (Probe 1), bei 0,62 ng/ml x mg (0,47 ng/ml x mg) und in der Biopsie, die nach Zökumresektion und vor Thalidomid-/Placebo-Gabe entnommen wurde (Probe 2), bei 1,29 ng/ml x mg (1,37 ng/ml x mg). In den Biopsien, die bei der Relaparotomie entnommen wurden, betrug die tPA-Konzentration durchschnittlich 0,50 ng/ml x mg (0,43 ng/ml x mg) beziehungsweise 0,54 ng/ml x mg (0,47 ng/ml x mg).

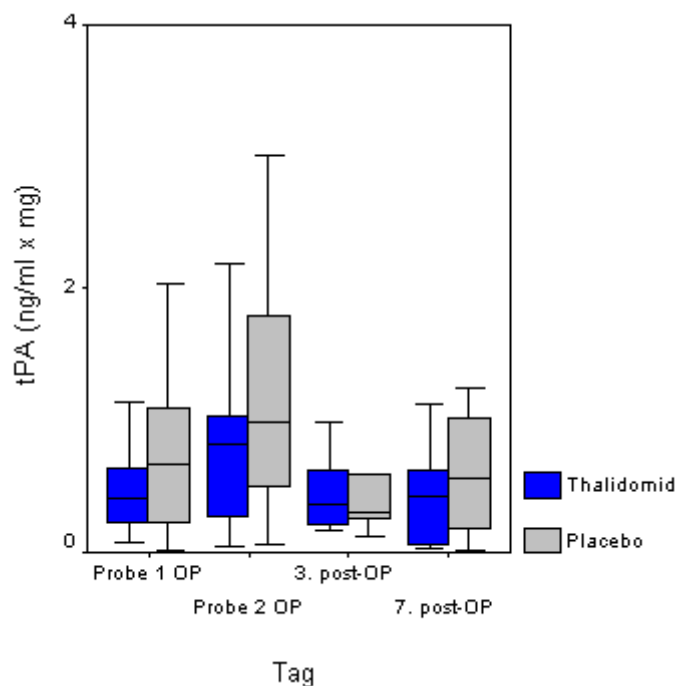


Abb. 14: Entwicklung der tPA-Konzentration in Peritonealbiopsien

3.2.7.c Konzentration von PAI

Die PAI-Konzentrationswerte der Therapie- und Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15). Die Mittelwerte beider Gruppen lagen am Operationstag in der ersten Biopsie bei 0,21 ng/ml x mg (0,33 ng/ml x mg) und in der zweiten bei 0,29 ng/ml x mg (0,28 ng/ml x mg). In den Biopsien, die bei der Relaparotomie entnommen wurden, betrug die PAI-Konzentration durchschnittlich 0,20 ng/ml x mg (0,21 ng/ml x mg) beziehungsweise 0,17 ng/ml x mg (0,13 ng/ml x mg).

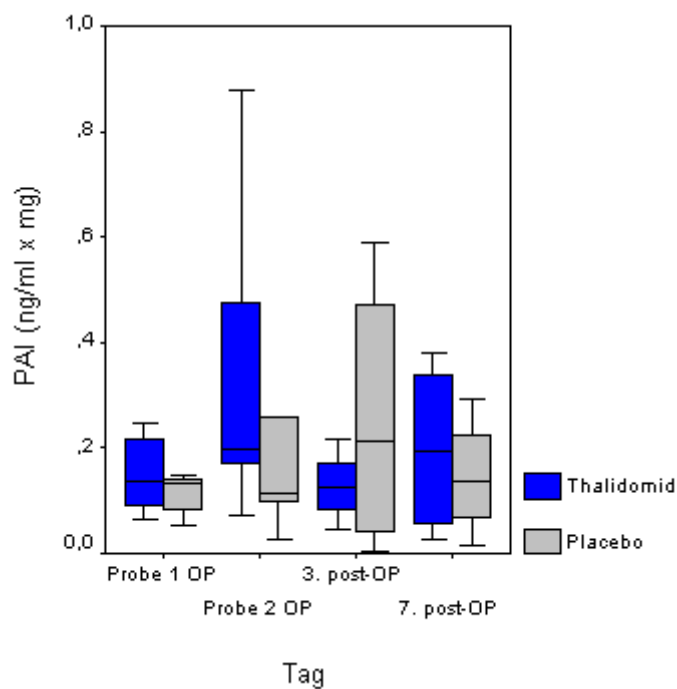


Abb. 15: Entwicklung der PAI-Konzentration in Peritonealbiopsien

3.2.8 TNF-alpha im Serum

Die Entwicklung der TNF-alpha Werte ist in Abbildung 16 dargestellt. Am Operationstag zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Der Mittelwert beider Gruppen lag bei 47 ng/ml (9 ng/ml). Postoperativ dagegen waren die Werte in der Therapiegruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Am 3. Tag betragen sie in der Therapiegruppe durchschnittlich 157 ng/ml (30 ng/ml), in der Kontrollgruppe 425 ng/ml (153 ng/ml) und am 7. Tag in der Therapiegruppe 117 ng/ml (37 ng/ml), in der Kontrollgruppe 219 ng/ml (49 ng/ml).

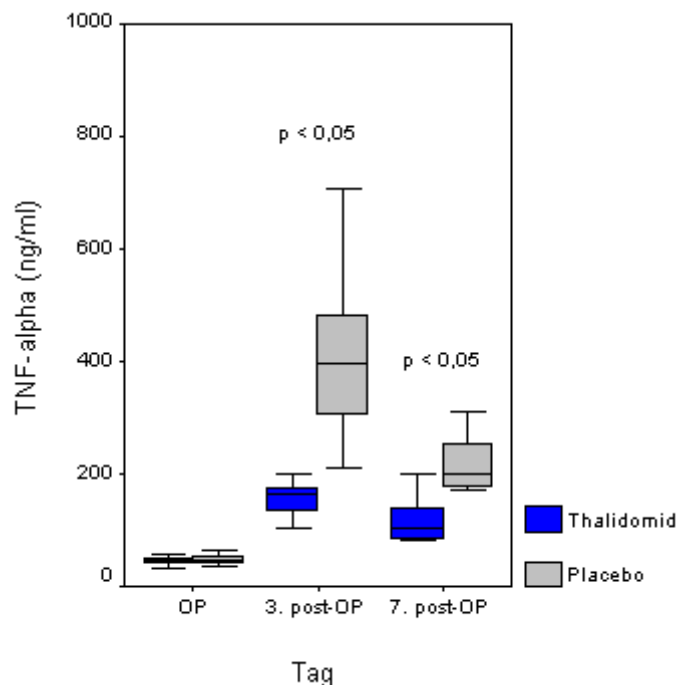


Abb. 16: Entwicklung der TNF-alpha Werte im Serum

4 DISKUSSION

4.1 Einführung

„Hinkende Boten der schönen Erfolge auf dem Gebiet der Abdominalchirurgie“ nannte Payr sie 1924, und noch heute zählen Adhäsionen zu den gefürchteten Folgen von bauchchirurgischen Eingriffen [3]. Zwar lösen sie gewöhnlich allenfalls leichte Beschwerden aus, können aber auch ernste Probleme verursachen, wie Dünndarmileus, Infertilität und chronische Schmerzen [10].

Eine erfolgreiche Behandlung gibt es nach wie vor nicht. Die Adhäsioleuse, als Therapie der Wahl, wird wegen der Gefahr neuer Verwachsungen und der extrem hohen Rezidivraten meist nur bei Komplikationen angewendet. Die Forschung hat sich deshalb früh auf die Adhäsionsprophylaxe konzentriert. Die wichtigsten Ansätze sind, folgend der Pathophysiologie, in Abbildung 17 dargestellt.

Keine Methode konnte sich bisher als allgemein anerkannte Prophylaxe etablieren. Grund hierfür sind vor allem die unerwünschten Nebenwirkungen. So sind bei Hyaluronsäurederivaten vermehrt postoperative Entzündungen und zudem Fremdkörperreaktionen aufgefallen [19, 20]. Ein weiteres Beispiel sind Kortikosteroide: Sie hemmen einerseits die Adhäsionsbildung, führen jedoch andererseits zu Immunsuppression und Wundheilungsstörungen [23]. Darüber hinaus können Vorgehensweisen, wie Einsatz von puderfreien Handschuhen oder Schutz vor Austrocknung, „nur“ adjuvante Maßnahmen sein. Sie helfen zwar Verwachsungen zu vermindern, reichen aber allein nicht aus [9].

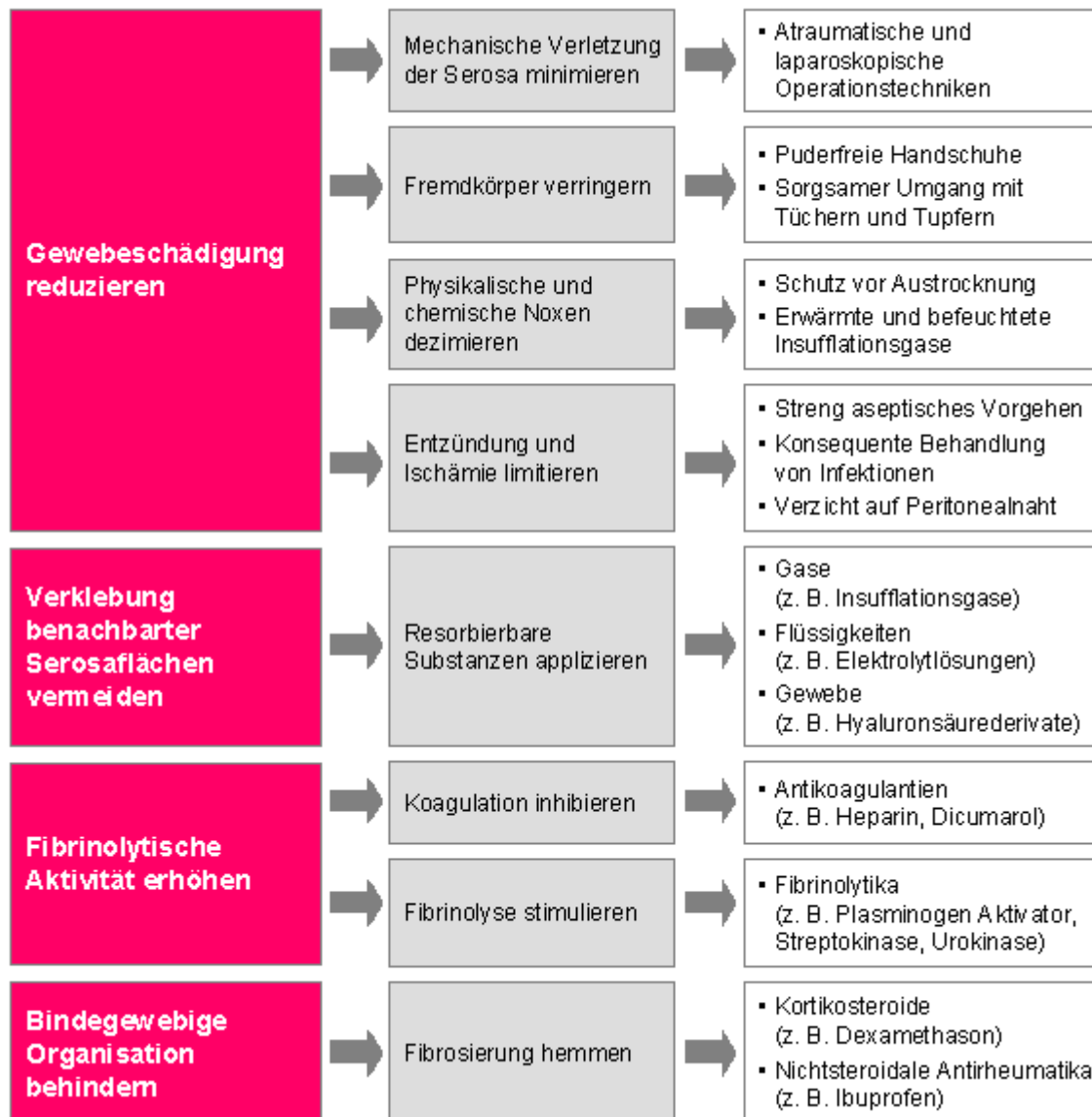


Abb. 17: Adhäsionsprophylaxe

Ein bisher wenig beachteter Ansatz der Adhäsionsprophylaxe ist die Hemmung der Angiogenese. Damit könnte der pathophysiologische Ablauf unterbrochen und die Bildung irreversibler Adhäsionen verhindert werden.

Chiang et al. beispielsweise wiesen im Mausmodell nach, dass TNP-470, ein Fumagillin-Analogon, postoperative Verwachsungen erheblich reduziert. Die Tiere wurden 6 Tage vor und 10 Tage nach einem chirurgischen Eingriff (Laparotomie und Patchimplantation) mit TNP-470 oder einem Placebo behandelt (tägliche subkutane

Injektion). Am 10., 15., 35. oder 55. postoperativen Tag wurden die Tiere relaparotomiert und untersucht. Abgesehen von den Tieren, die am 15. Tag erneut operiert wurden, zeigte sich in der Therapiegruppe eine signifikant reduzierte Adhäsionsbildung. Die Angiogenese war in der Therapiegruppe zunächst (10. und 15. postoperativer Tag) deutlich vermindert, später (ab 35. postoperativen Tag) war zwischen beiden Gruppen kein Unterschied mehr nachweisbar [51].

Diese Arbeit untersuchte die Wirkung von Thalidomid, ebenfalls ein Angiogeneseinhibitor, auf die Adhäsionsbildung im Kaninchenmodell.

Thalidomid, erstmals 1954 synthetisiert, wurde in Deutschland seit Oktober 1957 als Schlaf- und Beruhigungsmittel unter dem Handelsnamen Contergan[®] verkauft und im November 1961 wegen seiner teratogenen Effekte vom Markt genommen [26, 52].

4.2 Wirkung von Thalidomid auf die Adhäsionsbildung

Trotz intensiver (Weiter-)Forschung sind die vielfältigen immunmodulatorischen, antiangiogenetischen und antiinflammatorischen Wirkungen von Thalidomid immer noch nicht ganz geklärt. Die wichtigsten bisher bekannten Eigenschaften, die bei der Adhäsionsprophylaxe eine Rolle spielen könnten, zeigt Abbildung 18 [26, 37].

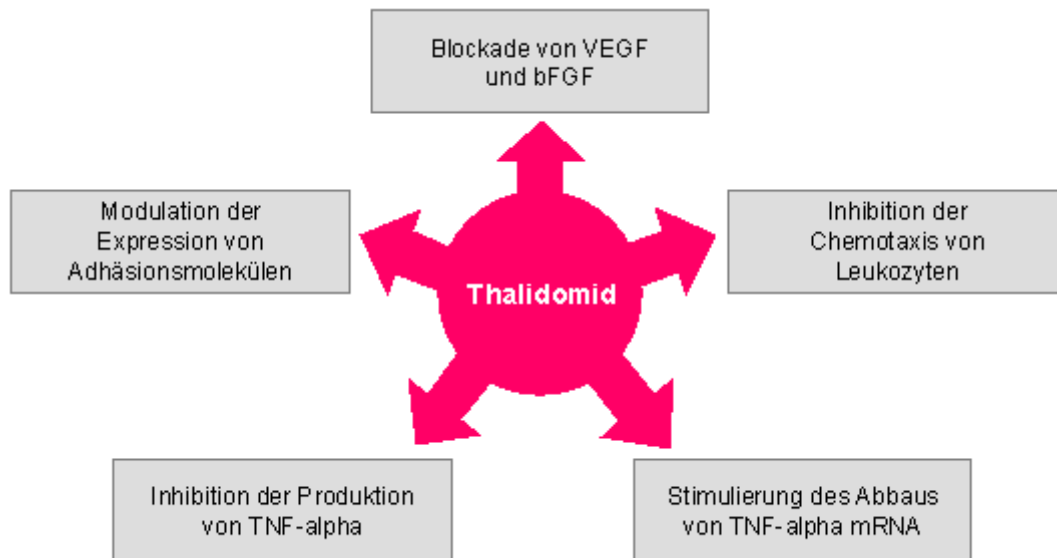


Abb. 18: Thalidomidwirkungen und Adhäsionsprophylaxe

Die Ergebnisse der Studie belegen, dass einmalig i. p. appliziertes Thalidomid postoperative Verwachsungen deutlich vermindert. Zwei geblindete Untersucher beurteilten bei der Relaparotomie der Kaninchen unabhängig voneinander inspektorisch die Adhäsionsbildung nach dem von Tyrell et al. beschriebenen Score [49]. In der Therapiegruppe hatten 75 Prozent der Tiere keine Adhäsionen (Grad 0) und 25 Prozent minimale Adhäsionen, die sich stumpf leicht von der Serosa trennen ließen (Grad 1). In der Kontrollgruppe dagegen fanden die Untersucher bei knapp 50 Prozent der Tiere mäßige Adhäsionen, die sich stumpf schwer von der Serosa trennen ließen (Grad 2), oder dichte Adhäsionen, die sich nur scharf von der Serosa trennen ließen (Grad 3).

Diese Resultate dürften vor allem darauf beruhen, dass Thalidomid antiangiogenetisch wirkt sowie TNF-alpha und Leukozyten hemmt.

Die Angiogenesecores der Kaninchen, die am 3. postoperativen Tag relaparotomiert wurden, waren in der Therapiegruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die am 7. postoperativen Tag relaparotomiert wurden, waren sie nahezu identisch. Die antiangiogenetischen Effekte von Thalidomid treten also in der frühen postoperativen Phase auf. Für die Adhäsionsprophylaxe ist dies von entscheidender Bedeutung, weil sich Verwachsungen unmittelbar postoperativ entwickeln und in dieser Zeit sozusagen ein „vulnerables“ Stadium durchlaufen. Hier muss eine erfolgreiche Prophylaxe ansetzen [3, 9, 10]. In der späteren postoperativen Phase kommt es nach Thalidomidtherapie dann reaktiv offensichtlich zu einer beschleunigten Angiogenese.

Ein elementarer Mediator für Adhäsionen ist das immunmodulatorische, proangiogenetische und inflammatorische Zytokin TNF-alpha. Posttraumatisch vermehrt ausgeschüttet stimuliert es u. a. die Synthese von PAI und sorgt so mit für das Ungleichgewicht zwischen tPA und PAI. Die resultierende verminderte Fibrinolyse ist der wichtigste pathophysiologische Schritt bei der Adhäsionsbildung [7, 9, 10]. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass Thalidomid TNF-alpha deutlich inhibiert – vor allem in der frühen posttraumatischen Phase. Am 3. postoperativen Tag waren die TNF-alpha Werte in der Kontrollgruppe fast dreimal höher als in der Therapiegruppe, am 7. Tag nur noch knapp doppelt so hoch.

Neben TNF-alpha hemmt Thalidomid auch die Leukozyten, wie die Befunde dieser Untersuchung bestätigen. In der Kontrollgruppe stiegen postoperativ erwartungsgemäß die Leukozytenwerte. In der Therapiegruppe dagegen fielen sie in der frühen postoperativen Zeit stark und erhöhten sich später nur leicht. Die daraus folgende

reduzierte inflammatorische Reaktion könnte ebenfalls einen prophylaktischen Effekt auf Adhäsionen haben.

Drei Wege scheinen also für die adhäsionsinibierende Wirkung von Thalidomid verantwortlich zu sein. Erstens: Hemmung der Angiogenese. Thalidomid blockiert die wichtigsten angiogenetischen Stimulatoren VEGF und bFGF und inhibiert das proangiogenetische Zytokin TNF-alpha [31, 32, 33, 34, 37]. Zweitens: Modulation der Fibrinolyse. Über die Hemmung von TNF-alpha vermindert Thalidomid die Synthese von PAI, die posttraumatisch u. a. von TNF-alpha gesteuert wird [7, 9, 10]. Drittens: Reduzierung der Entzündungsreaktion. Thalidomid inhibiert das Zytokin TNF-alpha und die Leukozyten, beides inflammatorische Mediatoren [35, 36]. In Abbildung 19 sind die Mechanismen schematisch zusammengefasst.

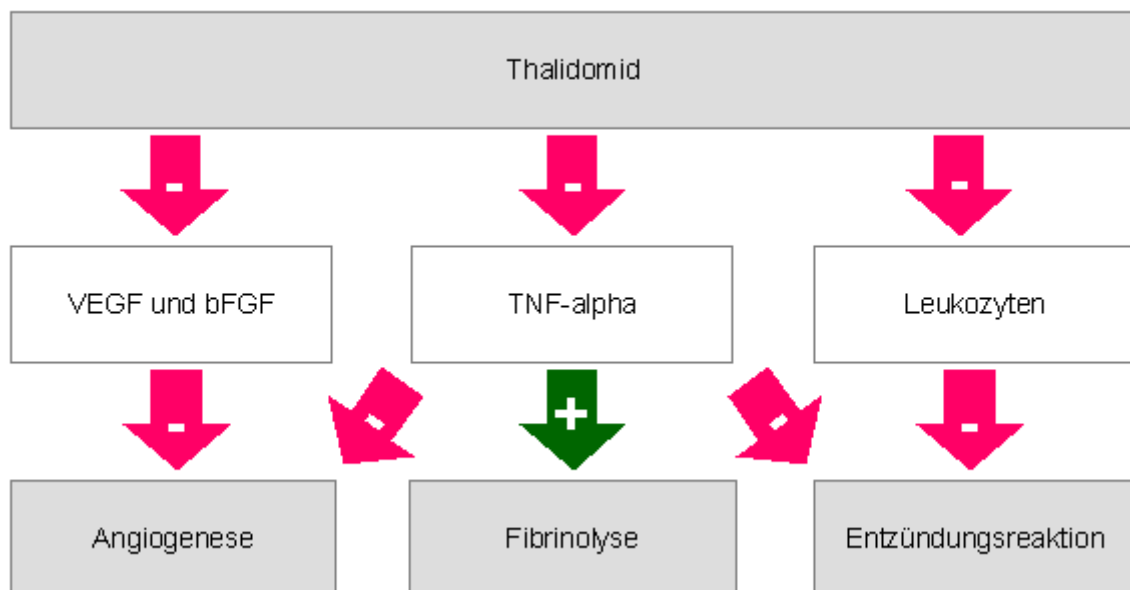


Abb. 19: Adhäsionsprophylaxe mit Thalidomid

4.3 Wirkung von Thalidomid auf die Wundheilung und Blutgerinnung

Bisher existiert keine allgemein anerkannte Adhäsionsprophylaxe. Zwar gibt es Substanzen und Maßnahmen, die Verwachsungen vorbeugen, aber entweder sie allein reichen nicht aus oder sind verbunden mit nicht tolerierbaren Nebenwirkungen.

Diese Studie untersuchte deshalb, wie der Angiogenesehemmer Thalidomid die Adhäsionsbildung beeinflusst und ob weitere (unerwünschte) Effekte auftreten. Weil die Angiogenese entscheidend für die Anastomosenheilung ist, mussten vor einem klinischen Einsatz Wirkung und Nebenwirkungen des Medikamentes im Tierversuch überprüft werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Thalidomid, einmalig nach Anlage der Kolonanastomose i. p. appliziert, das Operationsergebnis nicht gefährdet.

Bei der Inspektion des Resektionsgebietes am 3. beziehungsweise 7. postoperativen Tag lagen bei allen Kaninchen regelgerechte Wundverhältnisse vor. Die Anastomosen waren gut verheilt. Es gab keine Anzeichen für Ischämie, Insuffizienz und/oder Entzündung. Die „mechanische“ Prüfung bestätigte die inspektorischen Resultate. Bei den Berstungsdrücken zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Die gemessenen Drücke waren in der Therapiegruppe tendenziell sogar höher. Darüber hinaus sprechen die Berstungsstellen dagegen, dass Thalidomid die Anastomosenheilung negativ beeinflusst. In der Therapiegruppe trat die Berstung vielmehr bei 18 von 20 Tieren anastomosenfern auf, in der Kontrollgruppe nur bei 13 von 19. Die Angiogenescores waren am 3. postoperativen Tag in der Therapiegruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Bei den später (7. Tag) relaparotomierten Tieren war die Gefäßdichte nahezu gleich. Die antiangiogenetische Wirkung von Thalidomid scheint sich also auf die frühe posttraumatische Phase zu beschränken, danach verläuft die Angiogenese offenbar progredient. Die zunächst

reduzierte Gefäßbildung behindert jedoch nicht die Wundheilung. Das belegen die erhobenen Inspektionsbefunde ebenso wie die ermittelten Berstungsdrücke und -stellen. Darüber hinaus ergab auch das begleitende Monitoring bei Aktivitätsstatus, Fressverhalten, Körpertemperatur und Gewicht keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Die mehrmaligen Blutbildkontrollen zeigten die erwarteten Resultate: In der Therapiegruppe waren TNF-alpha und Leukozyten nach Thalidomidgabe niedriger als in der Kontrollgruppe. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt in der frühen posttraumatischen Phase. Bei allen anderen Blutwerten fielen keine wesentlichen Diskrepanzen zwischen beiden Gruppen auf.

Die beschriebenen Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu Erkenntnissen anderer Forscher. So fanden Hendriks et al. im Rattenmodell eine schlechtere Anastomosenheilung nach einmaliger i. p. Gabe des Angiogenesehemmers Suramin. Untersucht wurden u. a. der Berstungsdruck der Anastomosenpräparate und die Berstungsstelle sowie die Gefäßdichte am 4. oder 7. postoperativen Tag. In der Therapiegruppe waren die Berstungsdrücke am 4. Tag deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, zudem lagen die Berstungsstellen in der Therapiegruppe mehrheitlich in der Anastomose. Später (7. Tag) waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen statistisch nicht mehr signifikant. Die Angiogenese war in der Therapiegruppe sowohl am 4. als auch am 7. postoperativen Tag signifikant vermindert [53].

Die Auswirkungen der i. p. Anwendung von Thalidomid nach einer chirurgischen Therapie sind bisher nicht untersucht worden. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass Thalidomid, einmalig nach Anlage einer Kolonanastomose i. p. appliziert, die Morbidität und Mortalität im Kaninchenmodell nicht erhöht.

Die Effekte von Thalidomid auf die Blutgerinnung, sollte die laborchemische Bestimmung der Aktivität und Konzentration von tPA und PAI in Peritonealbiopsien

zeigen. Die Parameter wurden gewählt, weil der posttraumatische Mangel an tPA und Überschuss an PAI der wichtigste pathophysiologische Schritt der Adhäsionsbildung ist. Ein direkter Eingriff in dieses System liefert jedoch keine adäquate Prophylaxe, das haben Studien bewiesen. Antikoagulantien, wie Heparin, oder Fibrinolytika, wie Plasminogen Aktivator, reduzieren zwar Adhäsionen, rufen aber vermehrt postoperative Blutungen und Heilungsstörungen hervor [9, 21, 22]. Deshalb ging es in dieser Untersuchung auch um die Frage, ob Thalidomid die Gerinnung beeinflusst beziehungsweise ob die „adhäsionssensiblen“ Faktoren tPA und PAI betroffen sind.

Die Aktivität von tPA und PAI konnte nicht ermittelt werden, weil der verwendete Test Spectrolyse[®] (fibrin) bei den Messungen überraschend versagte, nachdem vorherige Versuche mit Referenzbiopsien erfolgreich verlaufen waren. Grund hierfür könnte gewesen sein, dass das Produkt an sich für humane Proben bestimmt war (Tests für Kaninchen gab es nicht) und vor allem tPA eine sehr speziesspezifische Verbindung ist. Bei der Konzentration von tPA und PAI zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Allerdings war die PAI-Konzentration bei den am 3. postoperativen Tag entnommenen Biopsien in der Therapiegruppe tendenziell niedriger als in der Kontrollgruppe. Verantwortlich dafür dürfte die hemmende Wirkung von Thalidomid auf das Zytokin TNF-alpha sein, das posttraumatisch u. a. die PAI-Synthese inhibiert. Bei den Biopsien vom 7. postoperativen Tag war diese Diskrepanz nicht mehr nachweisbar. Das spricht wiederum dafür, dass die Effekte von Thalidomid vor allem in der frühen posttraumatischen Phase auftreten. Die niedrigere PAI-Konzentration in der Therapiegruppe am 3. postoperativen Tag ging nicht einher mit einer erhöhten tPA-Konzentration. Die durchschnittlichen tPA-Werte beider Gruppen lagen nahe beieinander.

Die dargestellten Ergebnisse sind jedoch kritisch zu bewerten. Die Messungen mit den eingesetzten Imubind[®] ELISA-Tests ergaben zum Teil erheblich abweichende Werte, wie auch die extremen Standardabweichungen zeigen. Vielleicht ist es für künftige Untersuchungen an Kaninchen besser, zumindest zusätzlich zu den lokalen Parametern systemische zu prüfen. Für die Gerinnung (Fibrinbildung) bieten sich die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) sowie die Thromboplastinzeit (TPZ, Quick-Wert) an und für die Fibrinolyse (Fibrinauflösung) der thrombinaktivierbare Fibrinolyse Inhibitor (TAFI), der Plasmin-alpha2-Antiplasmin Komplex (PAP) sowie die Fibrin- und Fibrinogenspaltprodukte [54, 55]. Dabei ist zu beachten, dass Gerinnung und Fibrinolyse bei Kaninchen im Vergleich zum Menschen deutlich verstärkt sind [56]. Die Frage, ob Thalidomid die Blutgerinnung negativ beeinflusst, kann also nicht völlig vorbehaltlos mit Nein beantwortet werden. Doch selbst wenn die ermittelten tPA- und PAI-Werte unsicher sein sollten, sprechen andere Befunde, wie regelgerechte Wundheilung (u. a. keine Hämatome) und unauffällige Blutbilder (u. a. kein Hämoglobinabfall), gegen eine gestörte Gerinnung (erhöhte Blutungsneigung) bei den Tieren der Therapiegruppe.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Adhäsionen sind meist Folge von bauchchirurgischen Eingriffen und/oder intraabdominellen Infektionen, selten sind sie angeboren. Überwiegend bleiben sie symptomlos, etwa 15 Prozent verursachen ernste Beschwerden [10]. Am meisten gefürchtet ist der Dünndarmileus. Eine erfolgreiche Adhäsionsprophylaxe und/oder -therapie existiert trotz intensiver Forschung nicht. Steigende Lebenserwartung und erweiterte Operationsindikationen verschärfen das Problem.

Ein bisher wenig beachteter Ansatz ist die Prophylaxe mit Angiogenesehemmern. Damit würde der pathophysiologische Ablauf unterbrochen und die Bildung irreversibler Verwachsungen verhindert. Diese Arbeit untersuchte, wie die antiangiogenetische Substanz Thalidomid die Adhäsionsbildung beeinflusst. Weil die Angiogenese auch entscheidend für die Wundheilung ist, musste vor einem klinischen Einsatz die Wirkung von Thalidomid im Tierversuch überprüft werden.

Die These dieser Studie lautete:

Thalidomid hemmt nach Zökumresektion und Reanastomosierung i. p. appliziert postoperative Adhäsionen im Kaninchenmodell.

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen die These. In der Therapiegruppe traten bis zum 7. postoperativen Tag überwiegend keine und sonst allenfalls minimale Adhäsionen auf. Dagegen entwickelten knapp die Hälfte der Tiere der Kontrollgruppe mäßige oder bereits dichte Verwachsungen.

Drei Mechanismen scheinen für die adhäsionsinhibierende Wirkung von Thalidomid verantwortlich zu sein: Hemmung der Angiogenese, Modulation der Fibrinolyse und Reduzierung der Entzündungsreaktion (vergleiche auch Abbildung 19, Kapitel 4).

Zudem wurde geprüft, ob Thalidomid die Wundheilung und/oder die Blutgerinnung stört.

Nach den Resultaten dieser Untersuchung gefährdet Thalidomid das Operationsergebnis nicht. Bei der Inspektion des Resektionsgebietes wiesen alle Kaninchen regelgerechte Wundverhältnisse auf. Die ermittelten Berstungsdrücke und –stellen der Anastomosenpräparate zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Die regelmäßigen Blutkontrollen und das begleitende Monitoring ergaben in beiden Gruppen unauffällige Befunde.

Ob Thalidomid die Blutgerinnung beeinträchtigt, konnte nicht eindeutig beurteilt werden, weil die Tests teilweise versagten (Aktivität von tPA und PAI) und/oder mitunter stark von einander abweichende Werte lieferten (Aktivität und Konzentration von tPA und PAI). Das lag möglicherweise daran, dass die ausgewählten Produkte für humane Proben bestimmt waren (spezielle Tests für Kaninchen gab es nicht). Vorherige Versuche mit Referenzproben waren allerdings erfolgreich verlaufen.

Soweit beurteilbar, traten bei der Konzentration von tPA und PAI zwischen Therapie- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede auf. Darüber hinaus erhobene Befunde, wie regelgerechte Wundheilung und unauffällige Blutbilder, sprechen ebenfalls gegen einen negativen Einfluss von Thalidomid auf die Blutgerinnung. Trotzdem sollten bei künftigen Studien an Kaninchen zumindest zusätzlich zu lokalen Parametern systemische kontrolliert werden.

Wegen der entscheidenden Rolle der Angiogenese für die Wundheilung, aber auch wegen der teratogenen Effekte von Thalidomid, muss die adhäsionsinhibierende Wirkung des Medikaments vor einem klinischen Einsatz in weiteren Tierversuchen verifiziert werden. Als nächst höhere Tiere kämen dafür beispielsweise das Schwein und der Affe in Frage. Überprüft werden sollte dabei, ob neben den drei diskutierten Mechanismen, weitere vor allem immunmodulatorische Prozesse die Adhäsionshemmung bewirken.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Pathophysiologie von Adhäsionsbildung	S.9
Abbildung 2: Wirkungen von Thalidomid	S. 13
Abbildung 3: Adhäsionscore nach Tyrell et al.	S. 20
Abbildung 4: Versuchsablauf	S. 21
Abbildung 5: Entwicklung der Hämoglobinwerte im Serum	S. 32
Abbildung 6: Entwicklung der Hämatokritwerte im Serum	S. 33
Abbildung 7: Entwicklung der Thrombozytenwerte im Serum	S. 34
Abbildung 8: Entwicklung der Leukozytenwerte im Serum	S. 35
Abbildung 9: Adhäsionsbildung	S. 36
Abbildung 10: Berstungsdrücke der Anastomosenpräparate	S. 38
Abbildung 11: Berstungsstellen der Anastomosenpräparate	S. 39
Abbildung 12: Gefäßdichte der Anastomosenpräparate	S. 41
Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung der Gefäße in der Mukosa und Submukosa des Anastomosenpräparates (200fache Vergrößerung, Lichtmikroskopie)	S. 40
Abbildung 14: Entwicklung der tPA-Konzentration in Peritonealbiopsien	S. 43
Abbildung 15: Entwicklung der PAI-Konzentration in Peritonealbiopsien	S. 44
Abbildung 16: Entwicklung der TNF-alpha Werte im Serum	S. 45
Abbildung 17: Adhäsionsprophylaxe	S. 47
Abbildung 18: Thalidomidwirkungen und Adhäsionsprophylaxe	S. 49
Abbildung 19: Adhäsionsprophylaxe mit Thalidomid	S. 51

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Bryant, T. (1872): Clinical Lectures on intestinal obstruction, Med Times Gaz (Band 1), Seite 363.
- [2] von Dembowski, T. (1889): Über die Ursachen der peritonealen Adhäsionen nach chirurgischen Eingriffen mit Rücksicht auf die Frage des Ileus nach Laparotomien, Langenbecks Arch.Chir (Band 37), Seite 745.
- [3] Payr E. (1924): Biologisches zur Entstehung, Rückbildung und Vorbeugung von Bauchfellverwachsungen, Zentralbl Gynäkol (Band 14), Seite 745.
- [4] Weibel, M. A. und Majno, G. (1973): Peritoneal adhesions and their relation to abdominal surgery. A postmortem study, Am J Surg. (Band 126), Nr. 3, Seite 345-353. URL: PM:4580750
- [5] Menzies, D. und Ellis, H. (1990): Intestinal obstruction from adhesions--how big is the problem?, Ann.R.Coll.Surg.Engl. (Band 72), Nr. 1, Seite 60-63. URL: PM:2301905
- [6] Menzies, D. (1992): Peritoneal adhesions. Incidence, cause, and prevention, Surg.Annu. (Band 24 Pt 1), Seite 27-45. URL: PM:1727325
- [7] Dijkstra, F. R.; Nieuwenhuijzen, M.; Reijnen, M. M. und van Goor, H. (2000): Recent clinical developments in pathophysiology, epidemiology, diagnosis and treatment of intra-abdominal adhesions, Scand.J Gastroenterol.Suppl, Nr. 232, Seite 52-59. URL: PM:11232493
- [8] Ray, N. F.; Denton, W. G.; Thamer, M.; Henderson, S. C. und Perry, S. (1998): Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994, J Am Coll.Surg. (Band 186), Nr. 1, Seite 1-9. URL: PM:9449594

- [9] Treutner, K. H. und Schumpelick, V. (2000): [Prevention of adhesions. Wish and reality] , Chirurg (Band 71), Nr. 5, Seite 510-517. URL: PM:10875006
- [10] Zuhlke, H. V.; Lorenz, E. M.; Straub, E. M. und Savvas, V. (1990): [Pathophysiology and classification of adhesions], Langenbecks Arch.Chir Suppl II Verh.Dtsch.Ges.Chir, Seite 1009-1016. URL: PM:1983476
- [11] Hellebrekers, Bart W. J.; Trimbos-Kemper, Trudy C. M.; Trimbos, J. Baptist; Emeis, Jef J. und Kooistra, Teake (2000): Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation, Fertility and Sterility (Band 74), Nr. 2, Seite 203-212. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6K-40VT1JH-1/2/53593456adc76bf9d517144eaa31f907>
- [12] Liakakos, T.; Thomakos, N.; Fine, P. M.; Dervenis, C. und Young, R. L. (2001): Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent advances in prevention and management, Dig.Surg. (Band 18), Nr. 4, Seite 260-273. URL: PM:11528133
- [13] Diamond, M. P.; Daniell, J. F.; Feste, J.; Surrey, M. W.; McLaughlin, D. S.; Friedman, S.; Vaughn, W. K. und Martin, D. C. (1987): Adhesion reformation and de novo adhesion formation after reproductive pelvic surgery, Fertil.Steril. (Band 47), Nr. 5, Seite 864-866. URL: PM:2952528
- [14] Tittel, A.; Treutner, K. H.; Titkova, S.; Ottinger, A. und Schumpelick, V. (2001): New adhesion formation after laparoscopic and conventional adhesiolysis: a comparative study in the rabbit, Surg.Endosc. (Band 15), Nr. 1, Seite 44-46. URL: PM:11178761
- [15] O'Leary, D. P. und Coakley, J. B. (1992): The influence of suturing and sepsis on the development of postoperative peritoneal adhesions, Ann.R.Coll.Surg.Engl. (Band 74), Nr. 2, Seite 134-137. URL: PM:1567133

- [16] Johns, A. (2001): Evidence-based prevention of post-operative adhesions, Hum.Reprod.Update. (Band 7), Nr. 6, Seite 577-579. URL: PM:11727866
- [17] Diamond, M. P. (1996): Reduction of adhesions after uterine myomectomy by Seprafilm membrane (HAL-F): a blinded, prospective, randomized, multicenter clinical study. Seprafilm Adhesion Study Group, Fertil.Steril. (Band 66), Nr. 6, Seite 904-910. URL: PM:8941053
- [18] (2005): WWW. URL:
http://www.genzyme.de/thera/adh/de_p_pt_sepraproinfo.asp
- [19] Brundell, S. und Hewett, P. (2000): Can adhesions be prevented?, Aust.N.Z.J Surg. (Band 70), Nr. 12 , Seite 900-901. URL: PM:11167581
- [20] (2005): WWW. URL: <http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2003/intergel.htm>
- [21] Evans, D. M.; McAree, K.; Guyton, D. P.; Hawkins, N. und Stakleff, K. (1993): Dose dependency and wound healing aspects of the use of tissue plasminogen activator in the prevention of intra-abdominal adhesions, Am J Surg. (Band 165), Nr. 2, Seite 229-232. URL: PM:8427402
- [22] Yagmurlu, A.; Barlas, M.; Gursel, I. und Gokcora, I. H. (2003): Reduction of surgery-induced peritoneal adhesions by continuous release of streptokinase from a drug delivery system, Eur.Surg.Res. (Band 35), Nr. 1, Seite 46-49. URL: PM:12566787
- [23] diZerega, G. S. (1994): Contemporary adhesion prevention, Fertil.Steril. (Band 61), Nr. 2, Seite 219-235. URL: PM:8299773
- [24] Folkman, J. und Shing, Y. (1992): Angiogenesis, J Biol.Chem. (Band 267), Nr. 16, Seite 10931-10934. URL: PM:1375931
- [25] (2005): WWW. URL: <http://www.cancerprotocol.com/angiogenesis.html>

- [26] Zwingenberger, K. und Wnendt, S. (1995): Immunomodulation by thalidomide: systematic review of the literature and of unpublished observations, *J Inflamm.* (Band 46), Nr. 4, Seite 177-211. URL: PM:8878794
- [27] Eriksson, T.; Bjorkman, S.; Roth, B.; Fyge, A. und Hoglund, P. (1995): Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide, *Chirality* (Band 7), Nr. 1, Seite 44-52. URL: PM:7702998
- [28] KORANSKY, W. und ULLBERG, S. (1964): AUTORADIOGRAPHIC INVESTIGATIONS OF 14-C-LABELLED THALIDOMIDE AND GLUTETHIMIDE IN PREGNANT MICE, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* (Band 116), Seite 512-516. URL: PM:14193389
- [29] Stephens, T. D.; Bunde, C. J. und Fillmore, B. J. (2000): Mechanism of action in thalidomide teratogenesis, *Biochem.Pharmacol.* (Band 59), Nr. 12, Seite 1489-1499. URL: PM:10799645
- [30] Paulitschke, M.; Mall, J. W.; Büttemeyer, R. und et al. (2002): Vascular PTFE grafts endothelialised under defined flow: from in vitro data to clinical use, *Int J Art Organs* (Band 25), Seite 632-634.
- [31] Tavares, J. L.; Wangoo, A.; Dilworth, P.; Marshall, B.; Kotecha, S. und Shaw, R. J. (1997): Thalidomide reduces tumour necrosis factor-alpha production by human alveolar macrophages, *Respir.Med.* (Band 91), Nr. 1, Seite 31-39. URL: PM:9068814
- [32] Sampaio, E. P.; Sarno, E. N.; Galilly, R.; Cohn, Z. A. und Kaplan, G. (1991): Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes, *J Exp.Med.* (Band 173), Nr. 3, Seite 699-703. URL: PM:1997652

- [33] Wnendt, S.; Finkam, M.; Winter, W.; Ossig, J.; Raabe, G. und Zwingenberger, K. (1996): Enantioselective inhibition of TNF-alpha release by thalidomide and thalidomide-analogues, *Chirality* (Band 8), Nr. 5, Seite 390-396. URL: PM:8900028
- [34] Moreira, A. L.; Sampaio, E. P.; Zmuidzinas, A.; Frindt, P.; Smith, K. A. und Kaplan, G. (1993): Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation, *J Exp.Med.* (Band 177), Nr. 6, Seite 1675-1680. URL: PM:8496685
- [35] Geitz, H.; Handt, S. und Zwingenberger, K. (1996): Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade, *Immunopharmacology* (Band 31), Nr. 2-3, Seite 213-221. URL: PM:8861747
- [36] Faure, M.; Thivolet, J. und Gaucherand, M. (1980): Inhibition of PMN leukocytes chemotaxis by thalidomide, *Arch.Dermatol.Res.* (Band 269), Nr. 3, Seite 275-280. URL: PM:7235733
- [37] (2005): WWW. URL: <http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/mm/785-22-dietzfelbinger.pdf>
- [38] Rowland, T. L.; McHugh, S. M.; Deighton, J.; Dearman, R. J.; Ewan, P. W. und Kimber, I. (1998): Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells, *Immunopharmacology* (Band 40), Nr. 1, Seite 11-20. URL: PM:9776474
- [39] Moller, D. R.; Wysocka, M.; Greenlee, B. M.; Ma, X.; Wahl, L.; Flockhart, D. A.; Trinchieri, G. und Karp, C. L. (1997): Inhibition of IL-12 production by thalidomide, *J Immunol* (Band 159), Nr. 10, Seite 5157-5161. URL: PM:9366446
- [40] McHugh, S. M.; Rifkin, I. R.; Deighton, J.; Wilson, A. B.; Lachmann, P. J.; Lockwood, C. M. und Ewan, P. W. (1995): The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1

cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures, Clin.Exp.Immunol (Band 99), Nr. 2, Seite 160-167.

URL: PM:7851006

[41] Barnhill, R. L.; Doll, N. J.; Millikan, L. E. und Hastings, R. C. (1984): Studies on the anti-inflammatory properties of thalidomide: effects on polymorphonuclear leukocytes and monocytes, J Am Acad.Dermatol. (Band 11), Nr. 5 Pt 1, Seite 814-819. URL: PM:6512038

[42] WIEDEMANN, H. R. (1961): [Indications of a current increase of hypoplastic and aplastic deformities of the extremities.], Med.Welt. (Band 37), Seite 1863-1866.

URL: PM:14006768

[43] McBride, W. G. (1961): Thalidomide and congenital abnormalities, Lancet (Band 16), Nr. 12, Seite 1358.

[44] MELLIN, G. W. und KATZENSTEIN, M. (1962): The saga of thalidomide. Neuropathy to embryopathy, with case reports of congenital anomalies, N.Engl.J Med. (Band 267), Seite 1238-1244. URL: PM:13934700

[45] Calabrese, L. und Fleischer, A. B. (2000): Thalidomide: current and potential clinical applications, Am J Med. (Band 108), Nr. 6, Seite 487-495. URL: PM:10781782

[46] Ochonisky, S.; Verroust, J.; Bastuji-Garin, S.; Gherardi, R. und Revuz, J. (1994): Thalidomide neuropathy incidence and clinico-electrophysiologic findings in 42 patients, Arch.Dermatol. (Band 130), Nr. 1, Seite 66-69. URL: PM:8285742

[47] Warren, N. J. (1998):

[48] SPJUT, H. J.; MARGULIS, A. R. und MCALISTER, W. H. (1964):

MICROANGIOGRAPHIC STUDY OF GASTROINTESTINAL LESIONS, Am J

- Roentgenol.Radium.Ther.Nucl.Med. (Band 92), Seite 1173-1187. URL:
PM:14236588
- [49] Tyrell, J.; Silberman, H.; Chandrasoma, P.; Niland, J. und Shull, J. (1989):
Absorbable versus permanent mesh in abdominal operations,
Surg.Gynecol.Obstet. (Band 168), Nr. 3, Seite 227-232. URL: PM:2537535
- [50] Saclarides, T. J.; Speziale, N. J.; Drab, E.; Szeluga, D. J. und Rubin, D. B. (1994):
Tumor angiogenesis and rectal carcinoma, Dis.Colon Rectum (Band 37), Nr. 9,
Seite 921-926. URL: PM:7521279
- [51] Chiang, S. C.; Cheng, C. H.; Moulton, K. S.; Kasznica, J. M. und Moulton, S. L.
(2000): TNP-470 inhibits intraabdominal adhesion formation, J Pediatr.Surg. (Band
35), Nr. 2, Seite 189-196. URL: PM:10693664
- [52] (2005): WWW. URL: [http://www.emergency-
management.net/pdf/contergan_brd.pdf](http://www.emergency-management.net/pdf/contergan_brd.pdf)
- [53] Hendriks, J. M.; Hubens, G.; Wuyts, F. L.; Vermeulen, P.; Hubens, A. und Eyskens,
E. (1999): Experimental study of intraperitoneal suramin on the healing of colonic
anastomoses, Br.J Surg. (Band 86), Nr. 9, Seite 1171-1175. URL: PM:10504372
- [54] Thomas, L. (1998): Labor und Diagnose, Indikationen und Bewertung von
Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 5. Auflage , Frankfurt/Main.
- [55] Nesheim, M. (2003): Thrombin and fibrinolysis, Chest (Band 124), Nr. 3 Suppl,
Seite 33S-39S. URL: PM:12970122
- [56] (2005): WWW. URL: [http://sylvester.bth.rwth-
aachen.de/dissertationen/2000/51/00_51.pdf](http://sylvester.bth.rwth-aachen.de/dissertationen/2000/51/00_51.pdf)

Danksagung

Vielfältige dienstliche (und undienstliche) Hilfe hat mir diese Forschungsarbeit ermöglicht. Alle Personen zu nennen, würde den Rahmen sprengen.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Julian Mall von der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, bei Frau OÄ Dr. Sabine Ziemer und Frau Janett Reiche vom Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Frau Ruth Herrmann von der Klinik für Neonatologie und bei Frau Dr. Brigitte Wegner vom Institut für Medizinische Biometrie.

Herzlichen Dank für die geduldige, kompetente und freundliche Beratung und Unterstützung!

Berlin, Dezember 2004

Lebenslauf

Personalien

Name: Birgit Marion Rabe, geb. Wagenknecht

Geburtstag/-ort: 22. April 1961 in Zittau

Familienstand: verheiratet

Ausbildung

1967 – 1979 Polytechnische Oberschule, Hoyerswerda

Abschluss: Abitur

1980 – 1984 Finanzwirtschaft an der Sektion Betriebswirtschaft der Hochschule für Ökonomie, Berlin

Abschluss: Diplomwirtschaftler (Dipl. oec.)

1984 – 1986 Journalismus an der Betriebsakademie der Berliner Verlage, Berlin (postgradual)

1996 - 2003 Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin; Abschluss: 3. Staatsexamen

Pflegepraktikum: Traumatologie und Orthopädie, Centre Hoŝpitalier de Luxembourg, Luxemburg (09/1998 und 03/1999)

Famulaturen: Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin (04/2000)

Traumatologie und plastische Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin (09/2000)

Urologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin (09/2001)

Allgemeinmedizin, Praxis für Allgemeinmedizin, Berlin (03/2002)

Praktisches Jahr: Urologie, Klinikum im Friedrichshain, Berlin (10/2002 – 02/2003)

Chirurgie, Elisabeth Klinik, Berlin (02 – 06/2003)

Innere Medizin, Elisabeth Klinik, Berlin (06 – 09/2003)

Forschung: Mitarbeit an der Studie „Vergleich einer balancierten Anästhesie mit Desfluran, Sevofluran und einer intravenösen Anästhesie mit Propofol und Remifentanyl bei übergewichtigen Patienten“

Arbeit an der Dissertation „Einfluss der intraperitonealen Applikation von Thalidomid auf die Adhäsionsbildung im Kaninchenmodell – eine tierexperimentelle randomisierte Studie“

beruflicher Werdegang

1979 – 1980	Kostenrechner im Braunkohlenkombinat „Glückauf“, Knappenrode (studiumvorbereitendes praktisches Pflichtjahr)
1984 – 1987	Redakteur bei der Fachzeitschrift „Finanzwirtschaft“ im Verlag Die Wirtschaft, Berlin; verantwortlich für Leichtindustrie, Banken und Versicherungen
1988 – 1989	freier Mitarbeiter bei der ncc-Werbeagentur und Verlagsgesellschaft mbH, Berlin; journalistische und organisatorische Mitarbeit am Bordmagazin der DanAir „take off“
1989 – 1991	Kommission der Europäischen Union (EU), Brüssel Praktikant in der Generaldirektion „Information, Kommunikation und Kultur“ und später wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Generaldirektion „Wettbewerb“; verantwortlich für Beziehungen EU – Zentral- und Osteuropa, Vorbereitung EU-Fusionskontrolle und internationale Preisvergleiche
1991 – 1997	Redakteur und Projektleiter bei der Zeitschrift „FINANZtest“ in der Stiftung Warentest, Berlin; verantwortlich für EU-Binnenmarkt, Banken und Versicherungen
seit 2005	Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Erklärung an Eides Statt

Gemäß Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

keine staatsanwaltlichen Ermittlungen gegen mich anhängig sind,

die vorgelegte Promotionsschrift ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt,

die verwendeten Hilfsmittel und die Literaturquellen vollständig angegeben sind,

mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist.

Ort, Datum Unterschrift