

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ulf Peter Neumann)

Klinische und immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung  
inflammatorischer Mediatoren für die Anastomosenheilung nach elektiver  
laparoskopischer Resektion der Sigmadivertikulitis

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen  
Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Tim Schuler

aus Recklinghausen

Berichter: Privatdozent Dr. med. Marcel Binnebösel

Privatdozent Dr. med. Philipp Kobbe

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Januar 2015

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online  
verfügbar.**



Teile dieser Arbeit wurden im Juni 2014 im International Journal of Colorectal Disease als Originalarbeit veröffentlicht.

**Influence of CD68<sup>+</sup> macrophages and neutrophils on anastomotic healing following laparoscopic sigmoid resection due to diverticulitis**

M. Binnebösel; T. Schuler; C. D. Klink; D. Busch; D. S. Schöb; K. T. von Trotha; U. P. Neumann; K. Junge

(International Journal of Colorectal Disease, Juni 2014, Band 29, Ausgabe 6, Springer)

(International Journal of Colorectal Disease, June 2014, Volume 29, Issue 6, Springer)



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Definitionen	2
1.1.1 Anastomose	2
1.1.2 Anastomoseninsuffizienz	3
1.1.3 Pathophysiologie der Anastomosenheilung	3
1.1.4 Operationsverfahren der Sigmadivertikulitis	4
1.2 Risikofaktoren	6
1.2.1 Allgemeine Risikofaktoren	6
1.2.2 Übersicht der Risikofaktoren	7
1.2.3 Lokale Risikofaktoren	9
1.2.4 Immunologisch assoziierte Risikofaktoren	9
<b>2. Zielsetzung</b>	14
<b>3. Material und Methoden</b>	15
3.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben	15
3.2 Immunhistochemische Aufarbeitung	16
3.3 Verwendete Antikörper	18
3.3.1 Makrophagen und Monozyten (CD 68)	18
3.3.2 Neutrophile Granulozyten (MPO)	19
3.3.3 T-Lymphozyten (CD3)	20
3.3.4 Professionell Antigen-präsentierende Zellen (MHC II)	21
3.3.5 Immunzellen (TNFR1)	22
3.3.6 dendritische Zellen (CD11c)	23
3.3.7 Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB)	24
3.4 Mikroskopische Auswertung	25
3.5 Quantitative Auswertung	25
3.6 Patientenbezogene Daten	27
3.7 Statistische Auswertung	28
<b>4. Ergebnisse</b>	30
4.1 Patientenkollektiv	30
4.2 Aufteilung der Gruppen	31

4.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	34
4.3.1 Makrophagen und Monozyten (CD 68)	34
4.3.2 Neutrophile Granulozyten (MPO)	35
4.3.3 T-Lymphozyten (CD3)	36
4.3.4 Professionell Antigen-präsentierende Zellen (MHC II)	37
4.3.5 Immunzellen (TNFR1)	38
4.3.6 dendritische Zellen (CD11c)	39
4.3.7 Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB)	40
4.4 Matched pair Analyse	41
4.5 Korrelation nach Pearson	45
4.5.1 Makrophagen und Monozyten (CD 68)	45
4.5.2 Neutrophile Granulozyten (MPO)	47
4.5.3 T-Lymphozyten (CD3)	47
4.5.4 Professionell Antigen-präsentierende Zellen (MHC II)	47
4.5.5 Immunzellen (TNFR1)	48
4.5.6 dendritische Zellen (CD11c)	48
4.5.7 Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB)	48
4.5.8 Korrelation der klinischen Parameter	49
<b>5. Diskussion</b>	<b>50</b>
5.1 Geschlechtsverteilung	50
5.2 Alter	50
5.3 Verweildauer	51
5.4 Insuffizienzrate	51
5.5 Immunhistochemie	54
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>Anhang</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AI</b>	Anastomoseninsuffizienz(en)
<b>AK</b>	Antikörper
<b>APC</b>	Antigen presenting cells
<b>ASA</b>	American Society of Anesthesiologists
<b>BMI</b>	Body mass index
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DSS</b>	Dextran sulfat sodium
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IFN</b>	Interferon
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>MMP</b>	Matrixmetalloprotease
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase
<b>NFκB</b>	Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
<b>NK-Zelle</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NSAR</b>	Nicht steroidale anti-Rheumatika
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>TCGF</b>	T-cell growth factor
<b>TCR</b>	T-cell receptor
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>TNFR1</b>	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1
<b>WHO</b>	World Health Organisation



### 1. Einleitung

Ein Drittel der 50- bis 60-Jährigen und die Hälfte der über 80-jährigen Menschen in Europa weisen eine Divertikulose auf, die im Colon sigmoideum oder im Colon descendens lokalisiert ist (Parks 1975). Allerdings entwickeln nur 10-20 % dieser Menschen eine Entzündung der Divertikel des Kolon und somit eine symptomatische Divertikulitis (Stoss & Meyer-Ruge 1991). Die Hälfte dieser Patienten bekommt nach medikamentös-konservativer Therapie beim ersten Auftreten der Erkrankung keinen weiteren Schub. Eine chirurgische Intervention ist nur in 10 % der Fälle erforderlich (Raguse et al. 1983, Tudor et al. 1994).

Bis zum Beginn dieses Jahrzehntes wurde die Indikation der chirurgischen Sanierung einer Divertikulitis bei Komplikationen im Sinne einer gedeckten Perforation, freien Perforation, Fistel oder Blutung durchgeführt (Ritz et al. 2008). Des Weiteren erfolgte der operative Eingriff auch bei chronisch rezidivierender Divertikulitis mit mindestens 2 Schüben der Erkrankung (Ritz et al. 2008). Aktuell wird leitliniengerecht die Sigmaresektion nur noch bei der mit Komplikationen auftretenden Sigmadivertikulitis empfohlen (Tursi et al. 2010). Darunter versteht man eine Divertikulitis begleitet von einem Abszess, einer Blutung oder einer strukturellen Darmwandveränderung wie eine Perforation, Fistel oder Stenose (Tursi et al. 2010).

Ist eine chirurgische Sanierung der Divertikulitis angezeigt, so ist diese mit Risiken und Komplikationen behaftet. Die Suffizienz der intraoperativ angelegten Kolon-Anastomose entscheidet in großem Maße über Erfolg oder Misserfolg der Operation. Eine der relevantesten Komplikationen nach kolorektalen Eingriffen in der Viszeralchirurgie ist das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz (im folgenden „AI“). Die Inzidenz der AI wird in der aktuellen Literatur zwischen 1,4 % (Abete et al. 2003) und 13,6 % (Karliczek et al. 2009) angegeben. Trotz immer weiter fortschreitender Technik und immer besser werdenden intensivmedizinischen Behandlungsmöglichkeiten, ist die AI assoziiert mit einer signifikant erhöhten Morbidität und Letalität sowie einem erheblich verlängerten Krankenhausaufenthalt (Boccola et al. 2011, Jones et al. 2007).

Assoziierte Komplikationen wie eine generalisierte Peritonitis oder eine Sepsis nach Auftreten einer AI können immer noch nicht vollständig abgewendet werden. Zwar ist der Einfluss einer AI auf die Lang-Zeit-Überlebensrate bisher nur wenig erforscht, jedoch belegen die 5-Jahresüberlebensraten bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom die Relevanz für das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz.

Die 5-Jahresüberlebensrate ist nämlich bei diesen Patienten um ein Drittel geringer (42 % im Gegensatz zu 66,9 %) und unterstreicht damit die Relevanz dieses deletären Geschehens (McArdle et al. 2005).

## **1.1 Definitionen**

### **1.1.1 Anastomose**

Anastomose stammt von griechisch *anastomô* ab und bedeutet Einmündung oder Öffnung. Einerseits sind Anastomosen physiologische Verbindungen zwischen Blut- oder Lymphgefäßen, andererseits können sie auch chirurgisch (operativ) angelegte Verbindungen von Hohlorganen sowie Blut- oder Lymphgefäßen sein. Es sind je nach Rekonstruktionstechnik End-zu-End-Anastomosen von End-zu-Seit-Anastomosen und Seit-zu-Seit-Anastomosen zu unterscheiden (Pschyrembel: klinisches Wörterbuch (2002), de Gruyter Verlag).

Jeder operative Eingriff in der kolorektalen Chirurgie, der mit einer Darmresektion einhergeht, bedarf einer Anastomose, um die Kontinuität des Darms wieder herzustellen. Eine Darmanastomose kann durch eine Handnaht, als fortlaufende- oder Einzelknopfnaht oder durch den Einsatz von speziellen Klammernahtgeräten realisiert werden. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt in der Betrachtung von End-zu-End-Anastomosen, die sämtlich durch die Verwendung eines zirkulären Klammernahtgerätes angelegt wurden.

### **1.1.2 Anastomoseninsuffizienz**

Unter einer Anastomoseninsuffizienz versteht man die unvollständige, inadäquate Abheilung der chirurgisch angelegten Darmnaht (Wolf & Henne-Bruns 2002). Dies kann partiell und nur einen kleinen Teil der Integrität der Anastomose betreffen bis hin zum vollständigen Defekt der Darmwand in der chirurgischen Naht (Wolf & Henne-Bruns 2002). Das Resultat ist die Kommunikation der intra- und extraluminären Räume, welches den Austritt von Darmkeimen oder gar Darminhalt ermöglicht (Wolf & Henne-Bruns 2002).

### **1.1.3 Pathophysiologie der Anastomosenheilung**

Die Pathophysiologie der Wundheilung in der Darmwand weist darauf hin, dass Kollagene und Matrix Metalloproteasen (MMPs) eine wichtige Rolle in der Wundheilung der Darmwand spielen (Stumpf et al. 2006). Kollagene sind die am häufigsten vorkommenden Proteine in der Extrazellulärmatrix, welche für die mechanische Belastbarkeit der Anastomose verantwortlich sind (Stumpf 2006). Kollagen Typ I und Typ III werden erst nach dem operativen Trauma durch sessile Fibroblasten synthetisiert und tragen maßgeblich zur Integrität der neu angelegten Anastomose bei (Brasken et al. 1989). In den frühen Phasen der Wundheilung wird vorwiegend Kollagen Typ III gebildet, welches nur wenig belastbar ist. Dieses wird im Verlauf der Wundheilung größtenteils in hoch quervernetztes und damit mechanisch stabileres Kollagen Typ I umgebaut, so dass bei normal verlaufender Wundheilung eine mechanisch belastbare Anastomose resultiert (Brasken et al. 1989; Fleischmajer et al. 1990). Das Verhältnis von Kollagen Typ III zu Typ I spiegelt die Reißfestigkeit und Stabilität von Narben- und Bindegewebe wieder und wird somit als qualitativer Marker der Wundheilung angesehen (Klinge et al. 2000). Insbesondere für die Heilung intestinaler Anastomosen ist ein Verhältnis der beiden genannten Kollagene zu Gunsten des stabileren Kollagen Typ I von hoher Bedeutung, denn Störungen der Extrazellulärmatrix im Sinne eines herabgesetzten Verhältnisses von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III sind ein nachgewiesener patienteneigener Risikofaktor für das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz (Stumpf et al. 2006).

MMPs sind eine Gruppe von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die für diverse Interaktionen in der Extrazellulärmatrix verantwortlich sind und somit auch am Kollagenstoffwechsel maßgeblich beteiligt sind (Sommerville et al 2003). Eine signifikant höhere Expression der MMP-1 und -2 in der Mukosa der Darmwand sowie eine signifikant höhere Expression von MMP-2 und -9 in der Submukosa der Darmwand konnte mit dem vermehrten Auftreten von Anastomoseninsuffizienzen in Verbindung gebracht werden (Sommerville et al. 2003).

### **1.1.4 Operationsverfahren der Sigmadivertikulitis**

Besteht die Indikation zur chirurgischen Sanierung einer Sigmadivertikulitis, stehen grundsätzlich die konventionellen Operationstechniken wie auch minimal-invasive, laparoskopische Techniken zur Verfügung.

Das konventionelle, offene Verfahren ist vorwiegend der Notfallchirurgie z. B. bei freier Perforation, bei der Versorgung von Hochrisikopatienten (vgl. Tabellen S. 7 und 8) oder der Versorgung von hämodynamisch instabilen Patienten vorbehalten (Trenti et al. 2011). Gerade in Notfallsituationen bietet die Hartmann-Operation (Diskontinuität des Kolons mit Blindverschluss des Rektums nach oral und Anlage eines endständigen Descendostomas) eine sichere Technik zur operativen Versorgung (Zingg et al. 2010). Diese zweizeitige Versorgung mit sekundärer Auflösung der Hartmannsituation und operativer Kontinuitätswiederherstellung durch Anlage einer Descendorektostomie ist in schweren Fällen der einzeitigen Versorgung mit primärer Anlage der Anastomose überlegen (Zingg et al. 2010). Dennoch ist die Notfallindikation grundsätzlich keine Kontraindikation zum laparoskopischen Vorgehen (Ritz et al. 2008). Die Vorteile des minimal-invasiven Vorgehens gelten auch für die komplizierte Sigmadivertikulitis, sodass die laparoskopisch-assistierte Sigmaresektion auch zunehmend in diesen Fällen empfohlen wird (Ritz et al. 2008). Bei komplizierter Divertikulitis mit offener oder gedeckter Perforation oder einer Entzündung im perikolischen Fettgewebe ist der laparoskopische Zugangsweg allerdings umstritten. Die Gesamtmorbidität zeigt sich im Vergleich zwischen beiden Verfahren zwar unverändert, allerdings ist die Anzahl von Minor-Komplikationen wie Bauchdeckenabszesse, Harnwegsinfekte,

verlängerte Darmatonie und eine vermehrte Konversionsrate auf ein offenes chirurgisches Verfahren erhöht (Ritz et al. 2008). Trenti et al. zeigen 2011 jedoch, dass die einzeitige Versorgung der komplizierten Sigmadivertikulitis auch mit folgender Peritonitis ohne Erhöhung von Morbidität und Mortalität erfolgen kann.

Der laparoskopische Zugang hat sich in den letzten 10 Jahren als Standardzugang für die elektive Versorgung einer unkomplizierten Sigmadivertikulitis im Sinne einer lokalen Entzündung, die auf die Darmwand beschränkt ist, etabliert und ist somit in diesen Fällen das Verfahren der Wahl (Ritz et al. 2008). Dabei erfolgt die Versorgung einzeitig mit primärer End-zu-End-Anastomosierung im Sinne einer Descendorektostomie durch ein transanal eingeführtes zirkuläres Klammernahtgerät (Zirkularstapler).

Verglichen mit dem konventionell offenen Zugang zeigt die laparoskopisch assistierte Versorgung der Sigmadivertikulitis einige Vorteile: geringere Komplikationsrate wie z.B. Bauchwandhernien, frühere Wiederkehr der Darmperistaltik, niedrigere Morbidität und schnellere Rekonvaleszenz (Kwak et al. 2011, Wind et al. 2007). Außerdem zeigen sich keine Unterschiede im Auftreten von AI zwischen dem konventionell offenen und dem minimal-invasiven Verfahren (Goriainov & Miles 2008).

Die Anlage der Naht mit Hilfe eines Zirkularstaplers, die standardmäßig bei den laparoskopisch-assistierten Sigmaresektionen angelegt wird, zeigt nach Ergebnissen großer Meta-Analysen keinen Vor- oder Nachteil gegenüber einer Anastomose, die mit der Hand genäht wurde (Neutzling et al. 2012). Im Gegenteil, Lehmann et al. beschreiben 2011 sogar die Handnaht als einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten von AI (Lehmann et al. 2011).

## **1.2 Risikofaktoren**

### **1.2.1 Allgemeine Risikofaktoren**

Ursachen für das Auftreten einer AI sind vielfältig, lassen sich aber in technisch-chirurgische Faktoren einerseits sowie biologisch-individuelle Risikofaktoren des Patienten auf der anderen Seite unterteilen.

Aus technischer Sicht stellt die atraumatische Operationstechnik die oberste Maxime zur Sicherstellung einer erfolgreichen Heilung dar. Als Grundsatz jeder intestinalen Anastomose muss daher Spannungsfreiheit und eine gute Perfusion erzielt werden, um Gewebnekrosen zu vermeiden (Stumpf et al. 2004, 2009). Vignali et al. konnten in diesem Zusammenhang mit Hilfe intraoperativer Laser-Doppler Messung zeigen, dass ein reduzierter Blutfluss am rektalen Resektionsrand mit einem erhöhten Risiko für eine AI assoziiert ist (Vignali et al. 2000).

Zahlreiche weitere Studien belegen aber die Komplexität des Geschehens der intestinalen Anastomosenheilung und verdeutlichen, dass die insuffiziente Heilung einer Darmanastomose multifaktoriell bedingt ist (Kube et al. 2009; Stumpf et al. 2009; Mäkelä et al. 2003 ; Alves et al. 2002). Die folgende Tabelle ermöglicht einen Überblick über die in der aktuellen Literatur angegebenen Risikofaktoren.

## 1.2.2 Übersicht der Risikofaktoren

Tabelle 1.2.2.1: Patientenbezogene Risikofaktoren

Risikofaktor	Autor(en) und Publikationsjahr
Männliches Geschlecht	Kube et al. 2009
Body-Mass-Index > 30 kg/m <sup>2</sup>	Kube et al. 2009 Komen et al. 2009
Alkoholabusus	Kube et al. 2009 Stumpf et al. 2009 Mäkelä et al. 2003 Sørensen et al. 1999
Nikotinabusus	Sørensen et al. 1999
Hypoalbuminämie	Telem et al. 2010 Mäkelä et al. 2003
Leukozytose	Alves et al. 2002
Kardiovaskuläre Begleiterkrankungen	Kube et al. 2009
Renale Begleiterkrankungen	Kube et al. 2009 Alves et al. 2002
Hepatogene Begleiterkrankungen	Kube et al. 2009
ASA-Score III und IV	Kube et al. 2009 Mäkelä et al. 2003 Alves et al. 2002
NSAR Gabe	Rushfeldt et al. 2011 Klein et al. 2010 Klein et al. 2009 Holte et al. 2009
Kortikosteroid Behandlung	Stumpf et al. 2009 Alves et al. 2002
Intraoperative Bestrahlung	Stumpf et al. 2009
Vorhergegangene Bestrahlung (abdominal oder pelvin)	Alves et al. 2002
Intraoperative septische Bedingungen	Alves et al. 2002
Arteriosklerose	Komen et al. 2011

Tabelle 1.2.2.2: Eingriffsbezogene Risikofaktoren

<b>Risikofaktor</b>	<b>Autor(en) und Publikationsjahr</b>
Distale Anastomosenlokalisierung	Boccola et al. 2011 Komen et al. 2009 Erdas et al. 2009 Mäkelä et al. 2003
Intraoperative, transfusionspflichtige Blutung bzw. Transfusionsgabe postoperativ	Boccola et al. 2011 Telem et al. 2010 Kube et al. 2009 Stumpf et al. 2009 Mäkelä et al. 2003 Alves et al. 2002
Eingriffsdauer	Telem et al. 2010 Kube et al. 2009 Mäkelä et al. 2003 Alves et al. 2002
Intraoperative Kontamination des OP-Gebietes	Mäkelä et al. 2003
Fortgeschrittenes Tumor-Stadium	Boccola et al. 2011
Multiviszerale Resektion	Kube et al. 2009
Intraoperative Komplikation	Kube et al. 2009
Notfalleingriff	Kube et al. 2009
Ileus	Kube et al. 2009
Palliative Tumorresektion	Kube et al. 2009
Einreihige Handanastomose	Kube et al. 2009
Manuell angelegte Anastomose	Lehmann et al. 2011

### 1.2.3 Lokale Risikofaktoren

Des Weiteren kommt die Gruppe der lokalen Risikofaktoren hinzu: Ist der resezierte Kolon-Abschnitt nicht inklusive der gesamten Entzündung reseziert worden, ergibt sich durch die mit Entzündungszellen durchsetzten Resektionsränder ein erhöhtes Risiko für eine AI (Telem et al. 2010). Eine genauere Differenzierung dieser Entzündungszellen, weder qualitativ noch quantitativ, wurde bisher noch nicht vorgenommen und wird unter anderem Gegenstand dieser Arbeit sein.

Weiterhin konnten Millan et al. 2006 zeigen, dass der intramuköse pH-Wert ein wichtiger Faktor für das Auftreten einer AI ist. Sinkt der pH-Wert wegen einer Hypoxie bedingten Azidose in den ersten 24 Stunden postoperativ unter 7,28, zeigte sich das Risiko für eine AI um den Faktor 22 erhöht (Millan et al. 2006).

### 1.2.4 Immunologisch assoziierte Risikofaktoren

#### *Kortison-Gabe*

Die systemische Kortisongabe ist von Stumpf et al. 2009 als Risikofaktor für das gesteigerte Auftreten einer AI beschrieben worden und soll hier wegen seiner immunmodulatorischen Wirkung näher betrachtet werden (Stumpf et al. 2009). Kortikosteroide sind stark antiphlogistische, antiallergische und immunsuppressive Medikamente, die zur Unterdrückung der Immunreaktion beispielsweise bei Autoimmunkrankheiten, Allergien oder Gewebeabstoßungsreaktionen eingesetzt werden (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Die Wirkung geschieht über intrazelluläre Rezeptoren, die in nahezu jeder Körperzelle exprimiert werden. Dort wird über Transkriptionsfaktoren die Transkription von ca. 1 % aller im Genom vorhandenen Gene gesteigert, in einigen Fällen aber auch reduziert (Janeway, Immunologie 5. Auflage).

NFκB ist einer dieser Transkriptionsfaktoren und hat als solcher eine große Bedeutung für die Regulation und Modulation der Immunantwort, der Zellproliferation auf der einen Seite und der Apoptose auf der anderen Seite (Janeway, Immunologie 5. Auflage). NFκB aktiviert Gene der Infektionsabwehr

sowie solche, die an der adaptiven Immunantwort beteiligt sind (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Vor allem die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen, die eine bedeutende Relevanz für die Entzündungsreaktion besitzen, werden durch NFκB beeinflusst (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Zusammenfassend kann NFκB als ein wichtiger Modulator von Immunreaktionen angesehen werden (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Über die indirekte Hemmung von NFκB und die Regulation anderer Transkriptionsfaktoren durch Kortikosteroide kommt es zu einer verringerten Produktion von Entzündungsmediatoren. Zytokine wie IL-1, TNF-α, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8 vermitteln die physiologische Entzündungsreaktion (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Diese wird durch die Gabe von Kortikosteroiden vermindert. Prostaglandine, Leukotriene und Stickstoffmonoxid (NO) werden durch die Kortikosteroidtherapie ebenfalls vermindert ausgeschüttet (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Außerdem wird auf zellulärer Ebene die vasale Leukozytenauswanderung durch Verhinderung der Expression von Adhäsionsmolekülen blockiert. Folgend kommt es zu einer verminderten Migration von Leukozyten an den Ort der Entzündung. Ein weiterer Einfluss auf Leukozyten und Lymphozyten besteht in einer gesteigerten Apoptose dieser Zellarten (Janeway, Immunologie 5. Auflage).

Das Resultat dieser immunmodulatorischen Effekte ist eine Suppression der Immunantwort und eine Unterdrückung der Entzündungsreaktion (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Die Verwendung von Kortikosteroiden geht aber auch mit einer toxischen Wirkung einher. So sind Nebenwirkungen wie Flüssigkeitsstau im Gewebe, Gewichtszunahme, Diabetes mellitus, Mineralverluste im Knochen und Hautverdünnung in diesem Zusammenhang zu nennen (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Für die Heilung von Gewebe im Allgemeinen hat dies folgende Konsequenzen: Neben dieser direkt toxischen Wirkung auf das Gewebe führt vor allem der anti-inflammatorische Effekt der Kortikosteroide zu einer Beeinträchtigung der Wundheilung von Darmanastomosen, da die Entzündungsreaktion ein essentieller Bestandteil der frühen Phase der Wundheilung ist (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Eine tierexperimentelle Studie an Ratten zeigte, dass Anastomosen von mit Steroiden behandelten Ratten

geringere Hydroxyprolinkonzentrationen aufwiesen, was einen Rückschluss auf geringe Kollagenanteile im Gewebe zulässt (Soykan et al. 2002). Des Weiteren zeigten sich ausgeweitete Nekroseareale, ein nur minimales mononukleäres Zellinfiltrat und eine geringe Dichte von Granulationsgewebe (Soykan et al. 2002). Die verheerenden Effekte von Steroiden auf die Wundheilung sind durch die verminderte Zell-vermittelte Entzündungsreaktion, die inhibierte Fibroblastenaktivität, die verringerte Neovaskularisierung und die verminderte Kollagensynthese zu erklären (Ehrlich et al. 1973).

### *Gabe von Nicht steroidalen Anti-Rheumatika (NSAR)*

Tierexperimentelle Studien sowie klinische humane Studien weisen auf ein vermehrtes Auftreten von AI hin, wenn in der postoperativen Schmerztherapie NSAR verabreicht werden (Rushfeldt et al. 2011). NSAR stören indirekt den Heilungsprozess der Anastomose, da sie durch Suppression der Cyclooxygenase-1 und -2 die Synthese von Eicosanoiden aus der Arachidonsäure hemmen (Rushfeldt et al. 2011). Prostaglandin, Prostacyclin und Thromboxan gehören zu den Eicosanoiden und vermitteln die Entzündungsreaktion (Janeway, Immunologie 5. Auflage). Genau diese stellt einen wichtigen Baustein der frühen Wundheilung im Heilungsprozess der Anastomose dar (Brasken et al. 1989, 1990). Tierexperimentell zeigt sich eine verminderte Festigkeit der Anastomose sowie eine reduzierte Ablagerung von Hydroxyprolin, wenn die Cyclooxygenase-1 oder -2 gehemmt wird (Klein et al. 2010). Retrospektive humane Studien beschreiben ein erhöhtes AI Risiko nach postoperativer Schmerztherapie mit Verabreichung von Diclofenac und Celecoxib (Klein et al. 2010). Beide oben genannten Autoren (Klein et al. 2010 sowie Rushfeldt et al. 2011) empfehlen, auf diese Medikamente in der postoperativen Schmerztherapie bei Anlage einer kolorektalen Anastomose zu verzichten (Klein et al. 2009, 2010, Rushfeldt et al. 2011). Die Inzidenz der AI während der Therapie mit Celecoxib steigt auf 15,1 % im Gegensatz zur Inzidenz vor (3,3 %) und nach (1,5 %) dem Einsatz von Celecoxib, was einem um den Faktor 5 erhöhten Risiko entspricht (Holte et al. 2009).

### *Gabe von Erythrozytenkonzentraten*

Die peri- oder postoperative Gabe von Erythrozytenkonzentraten wird in der Literatur als ein Risikofaktor für das vermehrte Auftreten von AI angegeben (Boccola et al. 2011; Telem et al. 2010). Außerdem muss ein immunologischer Aspekt betrachtet werden: Als Ursache für das vermehrte Auftreten von AI wird angenommen, dass es durch die Transfusion eine induzierte Immunsupprimierung mit Dysfunktion von Makrophagen und T-Lymphozyten gibt (Tartter et al. 1998).

### *Die Rolle der Immunantwort des Körpers bei der Anastomosenheilung*

Neben den chirurgisch-technischen Faktoren der Anastomosenheilung (Kube et al. 2009, Lehmann et al. 2011), sind die biologischen Faktoren zunehmend in den Vordergrund getreten. Zahlreiche Publikationen haben sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten diesem Thema gewidmet (Kube et al. 2009, Komen et al. 2009, Mäkelä et al. 2003, Sørensen et al. 1999, Telem et al. 2010).

Gegenstand aktueller Forschungsbestrebungen ist vor allem die Untersuchung der individuellen immunologischen Reaktion des Körpers auf das operative Trauma sowie die Wiederherstellung der Integrität des Darmes, insbesondere den Makrophagen scheint eine besondere Bedeutung zuzukommen (Pantelis et al. 2010, 2011). Erste Hinweise darauf, dass die Immunantwort des menschlichen Körpers für die Anastomosenheilung eine essentielle Bedeutung zugesprochen werden muss, zeigten Arbeiten, bei denen die Makrophagenaktivität durch beispielsweise Glucan gesteigert wurde und es dadurch zu einer verbesserten Wundheilung im Bereich der Anastomose kam (Compton et al. 1996). Analog dazu zeigte sich im Falle einer Makrophagen Depletion mit einem Zytostatikum eine signifikant verschlechterte Wundheilung mit dem vermehrten Auftreten von Anastomoseninsuffizienzen (Cetinkaya et al. 2005). Pantelis et al. konnten 2011 an Mäusen zeigen, dass eine langanhaltende pharmakologisch induzierte Makrophagen-Depletion die Heilung von Kolonanastomosen verzögert und somit ein Risikofaktor für das Auftreten einer AI sein kann (Pantelis et al. 2011). Eine perioperative kurzzeitige Makrophagen-Depletion und Inaktivierung hatte allerdings keinen Einfluss auf die Anastomosenheilung (Pantelis et al. 2011).

Der inflammatorische Prozess im Bereich der Anastomose und speziell die Rolle der Makrophagen treten zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Hinweise, dass diese Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Anastomosenheilung nehmen, finden sich in vielen aktuellen Arbeiten. Eine genaue qualitative und quantitative Differenzierung der Entzündungszellen im Bereich der Anastomose erfolgte jedoch bisher nicht und soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

## **2. Zielsetzung**

Aktuelle Publikationen weisen auf die besondere Bedeutung der individuellen immunologischen Reaktion des Körpers auf das operative Trauma bei der Heilung intestinaler Anastomosen hin. Der negative Effekt einer klinisch-makroskopisch vorliegenden Entzündungsreaktion in den Absetzungsändern der Darmwand ist hinlänglich bekannt.

Gegenstand der Arbeit ist es zu prüfen, ob der makroskopisch gewählte, subjektiv empfunden entzündungsfreie Resektionsrand auf mikroskopischer Ebene ebenso frei von Zeichen der Inflammation ist und ob sich im Falle einer mikroskopisch nachgewiesenen Entzündungsreaktion an den Resektionsrändern im Verlauf die Konsequenz eines vermehrten Auftretens von Anastomoseninsuffizienzen ergibt.

Da speziell der inflammatorische Prozess im Bereich der Anastomose im Bezug auf das Auftreten von AI zunehmend in den Fokus der Wissenschaft geraten ist, die dort vorkommenden Entzündungszellen aber nicht qualitativ oder quantitativ erfasst wurden, soll der Fokus dieser Arbeit genau in der differenzierten Betrachtung der lokalen Entzündungsreaktion der Darmwand liegen. Es soll eine immunhistochemische Analyse der an den Resektionsrändern vorkommenden Immunzell-Populationen stattfinden, um ein differenzierteres Bild bezüglich ihrer Rolle im Heilungsprozess der Anastomose zu erhalten. Wenn eine bestimmte Zellart dieser Immunzellen vermehrt oder vermindert mit dem Auftreten von AI in Verbindung gebracht werden kann, so wäre dies als ein Risikoprofilmarker oder ein protektiver Marker für das Auftreten für AI nach Sigmaresektionen bei Sigmadivertikulitis zu werten.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Es wurden 86 Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen im Zeitraum von Januar 2009 bis Dezember 2011 eine Sigmaresektion auf Grund einer Sigmadivertikulitis in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsklinik Aachen vorgenommen wurde. Bei allen Patienten erfolgte eine laparoskopisch assistierte Sigmaresektion mit primärer Anastomosierung durch ein transanal eingebrachtes Klammernahtgerät. Bei jedem Patienten erfolgte ein sogenanntes *double-stapling*, bei dem Anastomosenringe als zirkuläre Vollwandresektate des oralen und aboralen Resektionsrandes anfallen, welche zur histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung asserviert wurden. Neben den Gewebeproben erfolgte bei allen Patienten die prospektive Evaluation klinischer Daten, welche auf Seite 27 zusammengefasst dargestellt sind.

Als primärer klinischer Endpunkt wurde das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz gewählt. Die Beurteilung des Auftretens einer Anastomoseninsuffizienz erfolgte primär klinisch. Nur bei einem Anhalt für eine Insuffizienz auf Grund einer Veränderung der Qualität der einliegenden Zieldrainage, einem postoperativen Anstieg der laborchemischen Infektparameter oder einer klinischen, abdominellen Beschwerdesymptomatik erfolgte zum Beweis der Insuffizienz der Anastomose eine weiterführende Diagnostik durch eine Computertomographie des Abdomens mit rektaler Kontrastmittelapplikation. Beschwerdefreie, klinisch inapparente Patienten wurden keiner weiteren Diagnostik zugeführt.

Die vorliegenden Daten sind Bestandteil der *Biobank* der Universitätsklinik Aachen und sind durch ein Votum der lokalen Ethikkommission genehmigt (*BIOBANK, EK 206 09*).

Name, Vorname und Geburtsdatum des Patienten wurden verschlüsselt, um für die spätere Kombination von klinischen Daten mit den Ergebnissen der

immunhistochemischen Auswertung unvoreingenommen zu sein. Beispielsweise würde aus „Max Mustermann, geboren am 01.02.1934“, „MM34“ werden.

Die intraoperativ gewonnenen Gewebeproben wurden unmittelbar in 4%igem Formaldehyd (Firma Fischer, Saarbrücken, Deutschland) fixiert, der Gewebering wurde zurechtgeschnitten, im Gewebeentwässerungsautomaten (V.I.P. E 150, Firma Vogel, Gießen, Deutschland) dehydriert und im Anschluss in Paraffin (Histosec, Firma Merck Millipore, Darmstadt Deutschland) eingebettet. Die Einbettung sowie die weitere histologische Aufarbeitung erfolgten zur Vermeidung von internen Variationen zu einem Zeitpunkt.

Bei allen Proben erfolgte routinemäßig eine Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Beurteilung morphologischer Auffälligkeiten und Besonderheiten der einzelnen Präparate.

### **3.2 Immunhistochemische Aufarbeitung**

Bei den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen kamen käuflich erworbene Antikörper unterschiedlicher Firmen zum Einsatz. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Firma Jung, Heidelberg, Deutschland) wurden Gewebeschnitte mit einer Stärke von ca. 3 µm angefertigt und anschließend bei 37°C im Brutschrank entparaffinisiert. Danach erfolgten die unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen. Das Prinzip, nach dem gearbeitet wurde, war die Avidin-Biotin Methode. Nach einer Inkubation von 60 Minuten mit einem in 2%igem Milchpulver verdünnten Normalserum wurde der jeweilige Primärantikörper hinzu pipettiert, der jeweils gegen das zu detektierende Antigen gerichtet war. Dieser wurde mit Milchpulver in verschiedenen Konzentrationen verdünnt.

Über Nacht wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben der Raumtemperatur angepasst, mit PBS („phosphate buffered saline“ = Phosphatgepufferte Salzlösung) gespült und dann mit dem biotinylierten Sekundärantikörper versehen. Dieser diente dazu, die bereits gebundenen Primärantikörper zu markieren.

Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde nach erneuter Spülung der Avidin-Biotin Enzymkomplex (ABC-Komplex, ABC Kit Vectstain Elite Standard, Firma Vector, California, USA) hinzugefügt, welcher mit dem biotinylierten Sekundärantikörper reagiert. Auch der ABC-Komplex wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Spülung mit PBS wurde aktiviertes DAB (3,3-Diaminobenzidin Tabletten, Firma Sigma, Steinheim) hinzugegeben, welches als Substrat zur Farbentwicklung diente. Eine mehrfache Waschung mit Wasser entfernte die Reste der Lösung. Abschließend wurden die Schnitte für 18 Sekunden in Hämalaulösung (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben, erneut gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen.

### 3.3 Verwendete Primärantikörper

#### 3.3.1 Makrophagen und Monozyten – Cluster of differentiation 68 (CD68)

CD68 befindet sich an intrazytoplasmatischen Granula von Makrophagen und deren Abkömmlingen. Dementsprechend wurden Zellen als positiv gewertet, wenn intrazytoplasmatisch der sekundäre Antikörper i. S. einer Braunfärbung zu erkennen war.

Tabelle 3.3.1.1: Verwendete Antikörper für CD68

<b>Primär-AK</b>	Monoklonaler Maus-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) – Verdünnung 1:50
<b>Vorbehandlung</b>	In der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6 für 3 mal 5 Minuten
<b>Sekundär-AK</b>	Biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) – Verdünnung 1:300

Abbildung 3.3.1.1 zeigt ein Gesichtsfeld der Mukosa in den gewonnenen Gewebeproben. Entsprechend dem zur Färbung verwendeten Substrat (DAB) weisen CD68<sup>+</sup> Makrophagen und Monozyten eine intrazytoplasmatische Braunfärbung auf.

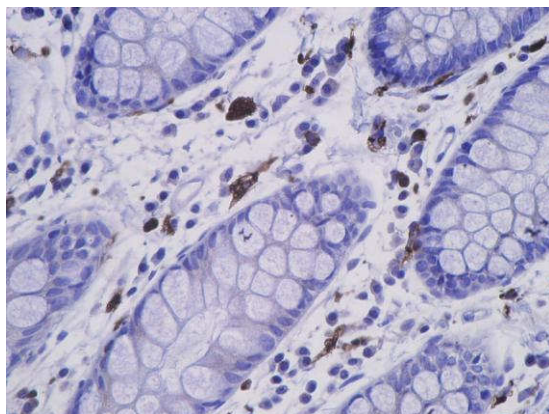


Abbildung 3.3.1.1: Beispielpräparat CD 68, Mukosa (eigene Abb.)

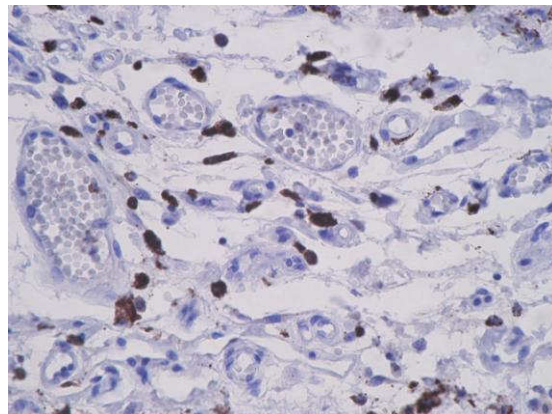


Abbildung 3.3.1.2: Beispielpräparat CD 68, Submukosa (eigene Abb.)

### 3.3.2 Neutrophile Granulozyten – Myeloperoxidase (MPO)

Die Myeloperoxidase (MPO) ist Bestandteil von Phagosomen neutrophiler Granulozyten, Monozyten sowie diversen Gewebsmakrophagen. Eine Zelle wurde als positiv gewertet, wenn ein intrazytoplasmatischer Nachweis des Sekundärantikörpers zu erkennen war.

Tabelle 3.3.2.1: Verwendete Antikörper für MPO

<b>Primär-AK</b>	Polyklonaler Kaninchen-AK (Firma Abcam, Cambridge, UK) – Verdünnung 1:50
<b>Vorbehandlung</b>	In der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6 für 3 mal 5 Minuten
<b>Sekundär-AK</b>	Biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) – Verdünnung 1:500

Abbildung 3.3.2.1 zeigt einen Ausschnitt der Mukosa in den gewonnenen Gewebeproben. Entsprechend dem zur Färbung verwendeten Substrat (DAB), weisen MPO<sup>+</sup>-Zellen die typische Braunfärbung des Sekundärantikörpers auf.

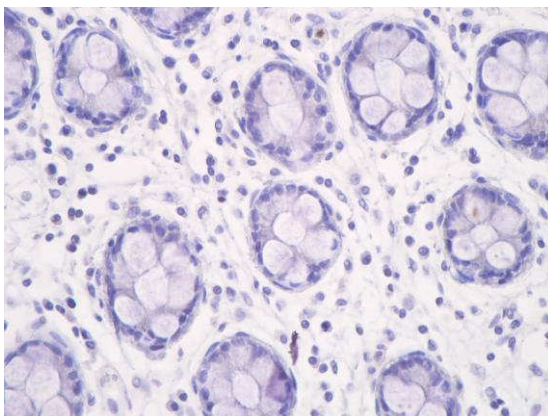


Abbildung 3.3.2.1: Beispielpräparat  
MPO, Mukosa (eigene Abb.)

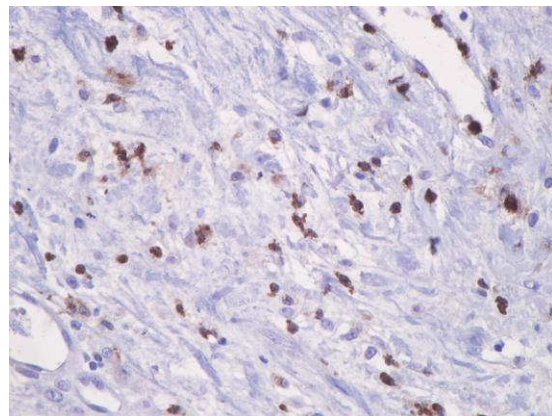


Abbildung 3.3.2.2: Beispielpräparat  
MPO, Submukosa (eigene Abb.)

### 3.3.3 T-Lymphozyten – CD-3 Rezeptor (CD3)

Der CD3-Rezeptor ist ein Transmembranprotein, das ausschließlich in der Membran von T-Zellen und NK-Zellen vorkommt. Eine Zelle wurde als positiv gewertet, wenn in der Zellmembran der Sekundärantikörper nachzuweisen war.

Tabelle 3.3.3.1: Verwendete Antikörper für CD3

<b>Primär-AK</b>	Monoklonaler Maus-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) – Verdünnung 1:25
<b>Vorbehandlung</b>	In der Mikrowelle mit Tris-Puffer pH 10 für 20 Minuten
<b>Sekundär-AK</b>	Biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-Sekundär-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) - Verdünnung 1:300

Abbildung 3.3.3.1 zeigt einen repräsentativen Teil der Mukosa in den gewonnenen Gewebeproben. Entsprechend dem zur Färbung verwendeten Substrat (DAB), weisen CD3<sup>+</sup>-Zellen die typische Braunfärbung des Sekundärantikörpers auf.

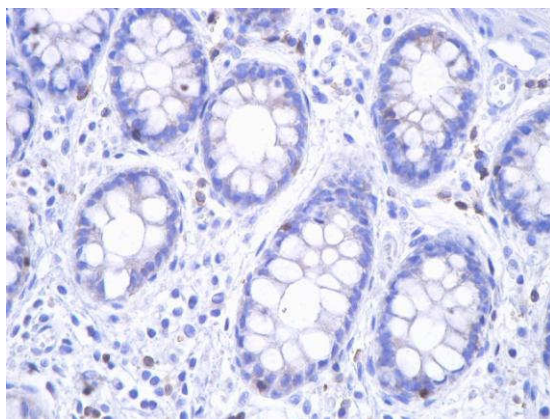


Abbildung 3.3.3.1: Beispielpräparat CD3, Mukosa (eigene Abb.)

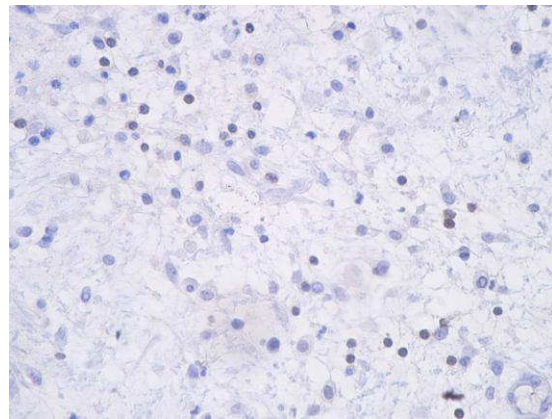


Abbildung 3.3.3.2: Beispielpräparat CD3, Submukosa (eigene Abb.)

**3.3.4 Professionell Antigen-präsentierende Zellen - Major Histocompatibility Complex-Klasse II (MHC II)**

MHC II-Komplexe befinden sich membranständig an den professionell AG-präsentierenden Zellen. Dazu gehören unter anderem Monozyten, Makrophagen, interdigitierende dendritische Zellen, dendritische Zellen in Blut und Lymphe, phagozytoseaktive Zellen des Gefäßendothels und B-Lymphozyten. Zellen wurden positiv gewertet, sobald zytoplasmatisch der Sekundärantikörper zu erkennen war.

Tabelle 3.3.4.1: Verwendete Antikörper für MHC II

<b>Primär-AK</b>	Monoklonaler Maus-AK (Firma Abcam, Cambridge, UK) - Verdünnung 1:50
<b>Vorbehandlung</b>	In der Mikrowelle mit Proteinase K für 20 Minuten
<b>Sekundär-AK</b>	Biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-Sekundär-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) - Verdünnung 1:300

Abbildung 3.3.4.1 zeigt eine Vergrößerung der Mukosa in den gewonnenen Gewebeproben. Entsprechend dem zur Färbung verwendeten Substrat (DAB), weisen MHC II<sup>+</sup>-Zellen die typische Braunfärbung des Sekundärantikörpers auf.

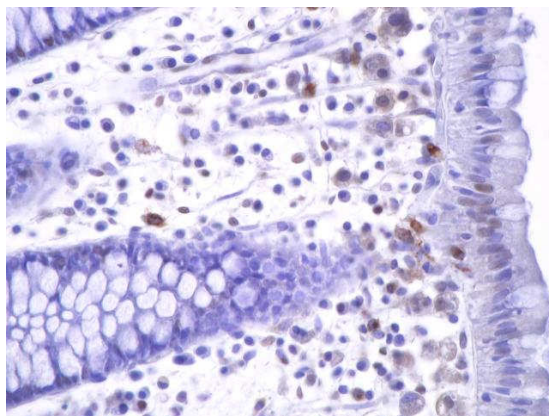


Abbildung 3.3.4.1: Beispielpräparat MHCII, Mukosa (eigene Abb.)

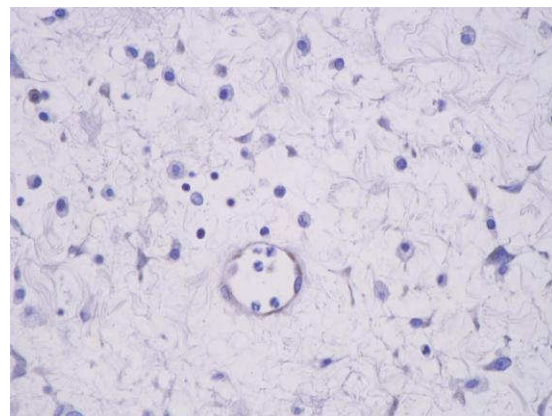


Abbildung 3.3.4.2: Beispielpräparat MHCII, Submukosa (eigene Abb.)

### 3.3.5 Immunzellen - Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1)

TNFR1 ist auch bekannt als CD120a. Es ist ein Transmembranprotein an Zellen des Immunsystems und an Epithelzellen. Zellen wurden als positiv gewertet, wenn der Sekundärantikörper an der Zellmembran sichtbar gemacht werden konnte.

Tabelle 3.3.5.1: Verwendete Antikörper für TNFR1

<b>Primär-AK</b>	Polyklonaler Kaninchen-AK (Firma Abcam, Cambridge, UK) - Verdünnung 1:1000
<b>Vorbehandlung</b>	In der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6 für 7 Minuten
<b>Sekundär-AK</b>	Biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) - Verdünnung 1:500

Abbildung 3.3.5.1 zeigt ein histologisch aufgearbeitetes Präparat der Mukosa in den gewonnenen Gewebeproben. Entsprechend dem zur Färbung verwendeten Substrat (DAB), weisen die TNFR1<sup>+</sup>-Zellen die typische Braunfärbung des Sekundärantikörpers auf.

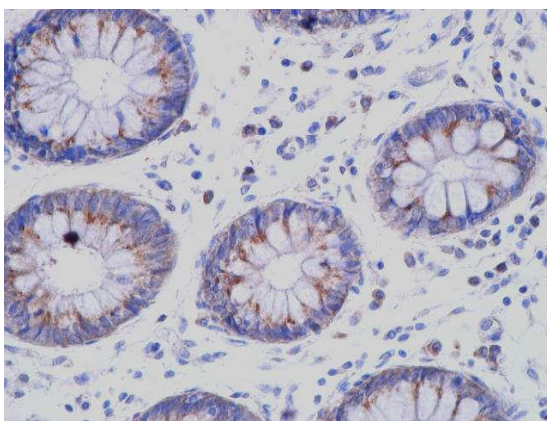


Abbildung 3.3.5.1: Beispielpräparat TNFR1, Mukosa (eigene Abb.)

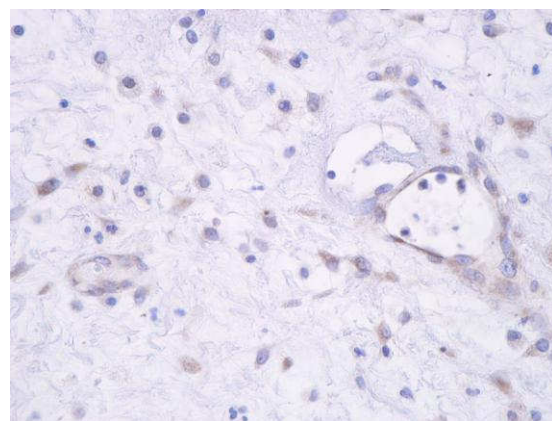


Abbildung 3.3.5.2: Beispielpräparat TNFR1, Submukosa (eigene Abb.)

**3.3.6 Dendritische Zellen – Cluster of differentiation 11c (CD11c)**

CD11c ist ein Transmembranprotein, das sich auf humanen dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und einigen B-Zellen befindet. Zellen wurden als positiv gewertet, sobald zytoplasmatisch der Sekundärantikörper nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 3.3.6.1: Verwendete Antikörper für CD11c

<b>Primär-AK</b>	Polyklonaler Kaninchen-AK (Firma Abcam, Cambridge, UK) - Verdünnung 1:400
<b>Vorbehandlung</b>	In der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6 bei 600 Watt für 20 Minuten
<b>Sekundär-AK</b>	Biotinylierte Ziege-Anti-Kaninchen-Sekundär-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) - Verdünnung 1:500

Abbildung 3.3.6.1 zeigt einen vergrößerten Querschnitt der Mukosa in den gewonnenen Gewebeproben. Entsprechend dem zur Färbung verwendeten Substrat (DAB), weisen CD11c<sup>+</sup>-Zellen die typische Braunfärbung des Sekundärantikörpers auf.

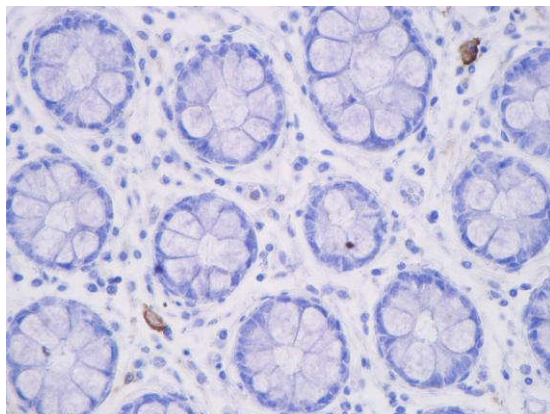


Abbildung 3.3.6.1: Beispielpräparat CD11c, Mukosa (eigene Abb.)

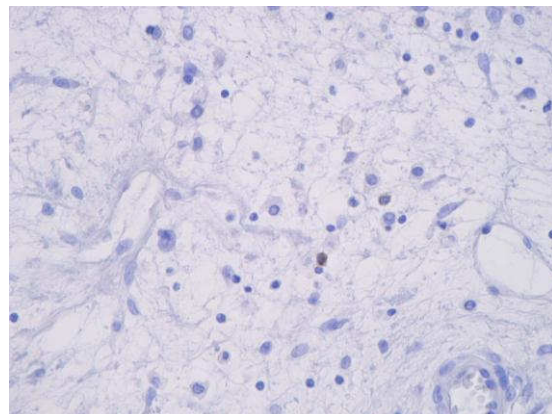


Abbildung 3.3.6.2: Beispielpräparat CD11c, Submukosa (eigene Abb.)

### 3.3.7 Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB)

NFκB ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor, der in allen Geweben vorkommt. Er kommt sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vor. Zellen wurden als positiv gewertet, wenn entweder zytoplasmatisch oder nukleär der Sekundärantikörper nachzuweisen war.

Tabelle 3.3.7.1: Verwendete Antikörper für NFκB

<b>Primär-AK</b>	Polyklonaler Kaninchen-AK (Firma SantaCruz, California, USA) - Verdünnung 1:500
<b>Vorbehandlung</b>	keine
<b>Sekundär-AK</b>	Biotinylierte Ziege-Anti-Kaninchen-Sekundär-AK (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) - Verdünnung 1:500

Abbildung 3.3.7.1 zeigt ein Gesichtsfeld der Mukosa in den gewonnenen Gewebeproben. Entsprechend dem zur Färbung verwendeten Substrat (DAB), weisen NFκB<sup>+</sup>-Zellen die typische Braunfärbung des Sekundärantikörpers auf.

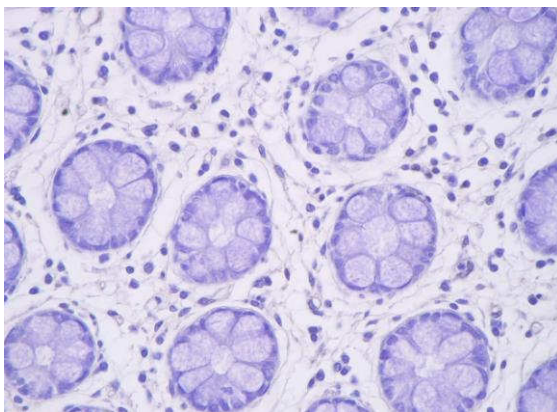


Abbildung 3.3.7.1: Beispielpräparat  
NFκB, Mukosa (eigene Abb.)

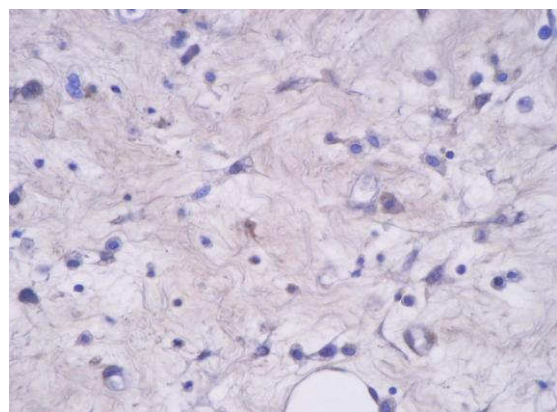


Abbildung 3.3.7.2: Beispielpräparat  
NFκB, Submukosa (eigene Abb.)

### 3.4 Mikroskopische Auswertung

Für die gesamte Arbeit ist ein Lichtmikroskop (BX 51 ©, Olympus, Hamburg, Deutschland) mit integrierter Digitalkamera (Camedia C4040, Olympus, Hamburg, Deutschland) benutzt worden. Jeder angefertigte histologische Schnitt wurde zunächst makroskopisch im Überblick betrachtet und dann in den Vergrößerungen 40-fach, 100-fach, 200-fach und 400-fach nach Auffälligkeiten und Besonderheiten analysiert, welche gegebenenfalls dokumentiert wurden und mit der H&E Färbung abgeglichen werden konnten. Daraufhin wurde an einem repräsentativen Bildausschnitt im mikroskopischen Präparat in 40-facher Vergrößerung ein Übersichtsbild in der Anastomose aufgenommen. Im Folgenden wurden jeweils 5 Gesichtsfelder der Mukosa und Submukosa in 400-facher Vergrößerung fotografiert. Dabei wurde auf eine Verteilung der Gesichtsfelder im gesamten mikroskopischen Präparat geachtet, um einen guten Mittelwert repräsentativ für das jeweilige Präparat zu gewinnen. Die Bilder wurden archiviert und anschließend ausgewertet.

### 3.5 Quantitative Auswertung

In jedem aufgenommenem Gesichtsfeld wurde eine quantitative Bestimmung der Zellen durchgeführt. In der Mukosa des Kolons wurden Zotten und Krypten in den Gesichtsfeldern nicht mitberücksichtigt, da sie ubiquitär vorkommen und nicht von den zu untersuchenden Entzündungszellen migriert werden. Eine Zelle wurde als positiv gewertet, sobald dieser Zelle im Zytoplasma oder membranständig (je nach Antikörper) eine dem Substrat (DAB) entsprechende Braunfärbung des Sekundärantikörpers zugeordnet werden konnte.

Die quantitative Erfassung positiv angefarbter Zellen erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes ImageJ® 1.44p von Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. Ein vorinstalliertes Plugin „CellCounter“ ermöglichte durch Markierung eine zuverlässige Erfassung aller Zellen von Interesse. Weiterhin war mit der Software eine differenzierte und nach Zellart diversifizierte Auswertung möglich. Die erfassten, immunhistochemisch positiv gefärbten Zellen wurden in

Relation zur Gesamtzellzahl des Gesichtsfeldes gestellt und in Prozent positiv gefärbter Zellen angegeben.

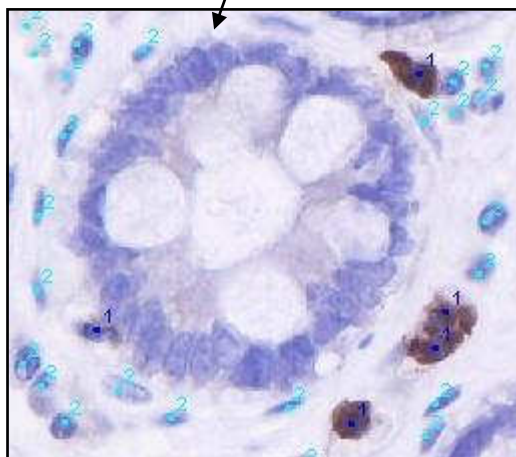
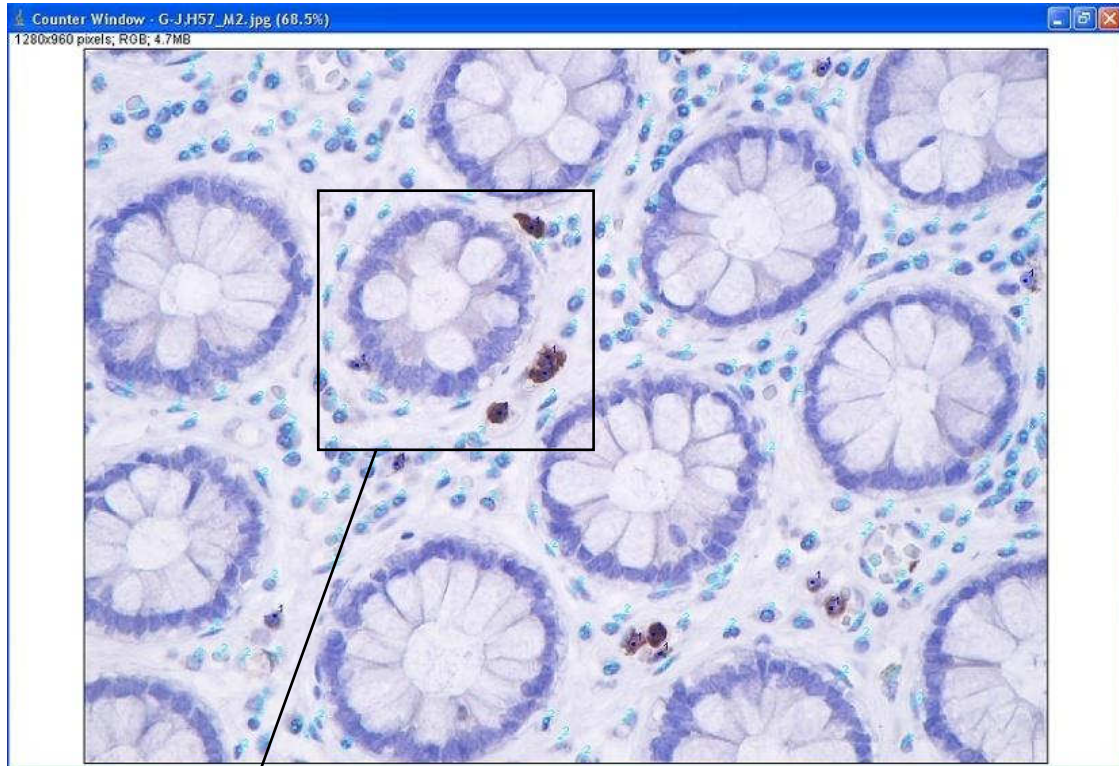


Abbildung 3.5.1: Markieren und Zählen der Zellen mit Hilfe von ImageJ®. Die hellblauen Punkte markieren Zellart 1 (Antikörper negativ), die dunkelblauen Punkte markieren Zellart 2 (Antikörper positiv).

Abbildung 3.5.2: Vergrößerter Bildausschnitt

### 3.6 Patientenbezogene Daten

Die Erfassung sämtlicher klinischer, patientenbezogener Daten erfolgte prospektiv. Zur Ausarbeitung und Erfassung wurde neben der Krankenakte des Patienten die medizinische Basisdokumentation des digitalen Krankenhaus-Informationssystems der Universitätsklinik Aachen (Medico, Siemens) zur Hilfe gezogen. Im Detail wurden die folgenden Parameter für jeden Patienten erfasst:

- Name, Vorname
- Geburtsdatum, Alter
- Geschlecht
- Größe
- Gewicht
- BMI: Body-Mass-Index: Gewicht (kg) / Körpergröße (m<sup>2</sup>)
- ASA-Klassifikation
- Nikotinabusus (tägliches Rauchen unabhängig von Art und Menge zum Zeitpunkt der OP)
- Vorliegen einer pulmonalen Erkrankung
- Vorliegen einer arteriellen Hypertonie
- Vorliegen einer KHK bzw. Arteriosklerose
- Vorliegen eines Diabetes mellitus
- Vorliegen einer (gedeckten) Perforation
- Nahttechnik
- Jahr des operativen Eingriffes
- Indikation zur Operation
- Histopathologische Beurteilung der Absetzungsränder
- Vorliegen einer Insuffizienz
- Krankenhausverweildauer in Tagen

Die Daten wurden mit Hilfe der Software Excel® (Office, Microsoft) erfasst und archiviert.

### 3.7 Statistische Auswertung

Zunächst wurde der arithmetische Mittelwert der relativen Häufigkeiten der Antikörper-positiven und -negativen Zellen aus jeweils 5 gezählten Gesichtsfeldern in Mukosa und Submukosa mit Hilfe der Software Excel® (Office, Microsoft) ermittelt. Diese Mittelwerte sowie alle klinischen Daten wurden in ein Datenblatt der Statistiksoftware „Statistical Package for Social Science“ (SPSS, Version 20, Illinois, USA) übertragen.

Für alle Variablen des entstandenen Datensatzes wurde nun eine deskriptive Datenanalyse angefertigt. Das heißt, dass absolute und relative Häufigkeiten sowie der arithmetische Mittelwert, der median range und die dazugehörige Standardabweichung für das gesamte Patientenkollektiv berechnet wurden. Des Weiteren wurden Minima und Maxima für jede Variable berechnet und angegeben.

Als primärer klinischer Endpunkt wurde das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz gewählt. Die Patientenpopulation wurde dahingehend gruppiert und vergleichend ausgewertet. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests mit einem Signifikanzniveau von 0,05 wurde getestet, ob signifikante Übereinstimmungen oder Unterschiede in der Ausprägung der einzelnen Merkmale vorlagen. Bei dem Mann-Whitney-U-Test handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test. Als Nullhypothese wurde dabei angenommen, dass es zwischen den beiden Gruppen im Auftreten von Immunzellen keinen Unterschied gibt. Auf Grund der inhomogenen Verteilung der Patienten im Vergleich der gewählten Gruppen wurde zwischen den Gruppen eine Matched-pair Analyse mit dem McNemar-Test wie folgt durchgeführt. Zunächst erfolgte die Aufteilung des Patientenkollektivs in zwei Gruppen entsprechend der suffizienten oder insuffizienten Heilung der Anastomose (AI vs. Kontrollgruppe). Als Kriterien der Gegenüberstellung wurden Geschlecht, Alter und BMI der Patienten, das Operationsjahr sowie die Nahttechnik gewählt. Sofern bei Alter und BMI keine exakten Übereinstimmungen gefunden werden konnten, wurden kategorisierte Einstufungen wie folgt vorgenommen: Beim Alter wurde nach Jahrzehnten unterteilt (z. B. 30-39 oder 40-49 Jahre) und beim BMI wurde in Normalgewichtige

(19-24,9), Übergewichtige (25-29,9), Adipositas Grad I (30-34,9), Grad II (35-39,9) und Grad III (BMI >40) unterteilt.

Als weiteres statistisches Verfahren wurde die Korrelation nach Pearson verwendet. Um Zusammenhänge im Auftreten der einzelnen Immunzell- Populationen zu untersuchen, wurden Korrelationen für alle Zellarten untereinander in den Lokalisationen Mukosa und Submukosa berechnet. Dabei galten Korrelationen für  $p = 0,001$  als hochsignifikant. Der Korrelationskoeffizient  $r$  gibt dabei den linearen Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen an.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

Zwischen Januar 2009 und Dezember 2011 konnten insgesamt 86 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, bei denen auf Grund einer Sigmadivertikulitis eine elektive Sigmaresektion in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsklinik Aachen vorgenommen wurde. Bei drei dieser Patienten zeigten sich in den immunhistochemischen Untersuchungen auffallende artifizielle Gewebeveränderungen der Anastomosenringe, so dass diese Patienten ausgeschlossen wurden und in der folgenden statistischen Betrachtung nicht weiter berücksichtigt werden.

Von den übrigen 83 Patienten waren 34 Männer und 49 Frauen. Das entspricht einer relativen Häufigkeit für Männer von 41 % und für Frauen von 59 %. Im Patientenkollektiv befanden sich Menschen zwischen 16 und 86 Jahren. Das mediane Alter aller Patienten war 61 Jahre (Range 16 – 86 Jahre). Die operativen Eingriffe verteilten sich wie folgt auf die Jahre 2009-2011:

Tabelle 4.1.1: Verteilung der Anzahl der Operationen auf die Jahre 2009-2011

Operationsjahr	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit (%)
2009	43	51,8
2010	23	27,7
2011	17	20,5
<b>Gesamt</b>	<b>83</b>	<b>100</b>

Postoperativ entwickelten 7 der Patienten eine Anastomoseninsuffizienz, was einer relativen Häufigkeit von 8,4 % entspricht.

## 4.2 Aufteilung der Gruppen

Das Patientenkollektiv wurde für die folgende differenzierte statistische Betrachtung entsprechend des primären klinischen Outcome-Parameters, dem Auftreten oder Nichtauftreten einer Anastomoseninsuffizienz, in zwei Gruppen geteilt:

Gruppe 1: Patienten ohne Anastomoseninsuffizienz (Kontrollgruppe) (n = 76)

Gruppe 2: Patienten mit Anastomoseninsuffizienz (Insuffizienzgruppe) (n = 7)

Das mediane Alter der Patienten ohne eine Anastomoseninsuffizienz lag bei 61,5 Jahren (Range 16-86 Jahre), während in der Insuffizienzgruppe das mediane Alter bei 50 Jahren (Range 35-73 Jahre) lag. Der statistische Vergleich der beiden Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,131$ ).

Von den 83 intraoperativ angelegten Anastomosen wurden alle mit einem Zirkularstapler erstellt und keine Anastomose wurde von Hand genäht. Die resezierten Kolon-Abschnitte zeigten in der pathologischen Untersuchung bei zwei Präparaten eine histologisch nachweisbare Entzündung in den Absetzungsrändern, während sich in den übrigen 81 Präparaten histologisch keine Zeichen der Entzündung evident waren.

Insgesamt ist keiner der Patienten im Krankenhausaufenthalt verstorben. Die mittlere Krankenhausverweildauer lag insgesamt bei  $16 \pm 8$  Tagen, wobei die minimale Aufenthaltsdauer bei 6 Tagen und die maximale Aufenthaltsdauer bei 50 Tagen lag. Im Gruppenvergleich zeigt sich in der Insuffizienz-Gruppe eine durchschnittliche Verweildauer von  $26,3 \pm 16,4$  Tagen. In der Gruppe ohne Insuffizienz zeigt sich eine durchschnittliche Verweildauer von  $14,8 \pm 6,4$  Tagen. Im statistischen Vergleich zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,107$ ) zwischen den beiden Gruppen.

Die Patienten hatten insgesamt eine durchschnittliche Größe von  $169 \pm 9$  cm sowie ein durchschnittliches Gewicht von  $77,9 \pm 18$  kg. Daraus konnte für das gesamte Patientenkollektiv ein mittlerer BMI (Body-Mass-Index) von  $27 \pm 6$  kg/m<sup>2</sup>

ermittelt werden. Die differenzierte Betrachtung der beiden Gruppen erbrachte für die Insuffizienzgruppe eine durchschnittliche Größe von  $174,1 \pm 7,9$  cm, ein durchschnittliches Gewicht von  $87, \pm 15$  kg und einen durchschnittlichen BMI von  $28,9 \pm 6,3$  kg/m<sup>2</sup>. Für die Gruppe, in der keine Anastomoseninsuffizienzen auftraten, ergab sich eine durchschnittliche Körpergröße von  $168,7 \pm 9,7$  cm, ein durchschnittliches Gewicht von  $77, \pm 18$  kg und ein durchschnittlicher BMI von  $8 \pm 6$  kg/m<sup>2</sup>. Im statistischen Vergleich zeigten sich für die Parameter Größe, Gewicht und BMI keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,094$ ,  $p=0,071$  und  $p=0,502$ ).

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung von Nebendiagnosen im Patientenkollektiv, die als mögliche Risikofaktoren für die Entstehung einer Anastomoseninsuffizienz zu betrachten sind.

Tabelle 4.2.1: Detaillierte Patienteninformationen: Altersangabe mit Median und Range, Angabe der Verweildauer mit Mittelwert und SD

	<b>Alle Patienten</b> (n=83)	<b>Insuffizienz</b> (n=7)	<b>Keine Insuffizienz</b> (n=76)
<b>Alter</b> (Jahre)	61 (18 - 86)	50 (35 - 73)	61,5 (18 - 86)
<b>Geschlecht</b> (m/w)	34 / 49	5 / 2	29 / 47
<b>Größe</b> (cm)	169 ± 9	174 ± 7,9	168 ± 9,6
<b>Gewicht</b> (kg)	78 ± 18	87 ± 15	77 ± 18
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	27 ± 6	28 ± 6	27 ± 6
<b>ASA</b>			
<b>I</b>	6	0	6
<b>II</b>	46	5	41
<b>III</b>	27	1	26
<b>IV</b>	4	1	3
<b>Pulmonale Vorerkrankung</b> (ja/nein)	8 / 75	1 / 6	7 / 69
<b>Arterielle Hypertonie</b> (ja/nein)	40 / 43	3 / 4	37 / 39
<b>Koronare Herzkrankheit</b> (ja/nein)	18 / 65	1 / 6	17 / 59
<b>Diabetes mellitus</b> (ja/nein)	7 / 76	1 / 6	6 / 70
<b>Nikotinabusus</b> (ja/nein)	14 / 69	2 / 5	12 / 64
<b>Verweildauer</b> (Tage)	16 ± 8	26 ± 16	14 ± 6

### 4.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen im Vergleich der Kontroll- zur Insuffizienzgruppe beschrieben.

#### 4.3.1 Makrophagen und Monozyten – Cluster of differentiation 68 (CD 68)

##### *Mukosa*

In der Mukosa der Kontrollgruppe lagen im Mittel  $24,3 \pm 9,7$  % CD68<sup>+</sup>-Zellen vor. Minimal 2,8 % und maximal 50,1 % der Zellen wiesen in diesem Bereich eine positive Färbung auf. Die Insuffizienzgruppe zeigte einen durchschnittlichen Anteil von  $23,5 \pm 9,8$  % CD68<sup>+</sup>-Zellen. Minimal 9,5 % und maximal 35,5 % der Zellen in dieser Region waren positiv gefärbt. Der prozentuale Anteil an CD68<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa der Kontrollgruppe, verglichen zur Insuffizienzgruppe, zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,909$ ).

##### *Submukosa*

Die Submukosa der Kontrollgruppe zeigte durchschnittlich  $17,1 \pm 10,2$  % CD68<sup>+</sup>-Zellen. Maximal 54,6 % der Zellen waren in diesem Bereich positiv gefärbt, wobei es auch Präparate ohne jegliche positiv gefärbte Zelle gab. Die Insuffizienzgruppe wies einen mittleren Anteil von  $15,4 \pm 6,3$  % CD68<sup>+</sup>-Zellen auf. Minimal 4,6 % und maximal 24,2 % der Zellen in der Submukosa waren positiv gefärbt. Der statistische Vergleich der beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Ergebnisse ( $p = 0,896$ ).

### **4.3.2 Neutrophile Granulozyten – Myeloperoxidase (MPO)**

#### *Mukosa*

In der Mukosa der Kontrollgruppe waren  $6,7 \pm 5,8$  % Myeloperoxidase<sup>+</sup> (MPO<sup>+</sup>)-Zellen vorhanden. Minimal 0,5 % und maximal 32,5 % der Zellen waren hier positiv gefärbt. Die Insuffizienzgruppe zeigte einen gemittelten Anteil an MPO<sup>+</sup>-Zellen von  $10,9 \pm 6,2$  %. Minimal 0,6 % und maximal 17,4 % der Zellen zeigten hier eine positive Färbung. Aus der Gegenüberstellung der beiden Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests resultierte keine Signifikanz ( $p = 0,069$ ).

#### *Submukosa*

In der Submukosa der Kontrollgruppe befanden sich durchschnittlich  $7,2 \pm 6,8$  % MPO<sup>+</sup>-Zellen. Maximal 43,1 % der Zellen waren hier positiv gefärbt, wobei auch Präparate ohne positive Zellen bei der Untersuchung auffielen. In der Insuffizienzgruppe lag der mittlere Anteil an MPO<sup>+</sup>-Zellen bei  $6,7 \pm 2,8$  %. Minimal 1,5 % und maximal 9,8 % der Zellen wiesen in der Submukosa dieser Gruppe eine positive Färbung auf. Die genauere Untersuchung der beiden Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ergab keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,491$ ).

### **4.3.3 T-Lymphozyten – CD-3 Rezeptor (CD3)**

#### *Mukosa*

Die Mukosa der Kontrollgruppe zeigte einen mittleren Anteil an CD3<sup>+</sup>-Zellen von  $10,0 \pm 8,2$  %. Maximal 30,7 % der Zellen zeigten in dieser Region eine positive Färbung, wobei auch Präparate ohne positiv gefärbte Zellen in der Mukosa vorlagen. In der Insuffizienzgruppe lagen durchschnittlich  $9,6 \pm 9,1$  % CD3<sup>+</sup>-Zellen vor. Minimal 0,1 % und maximal 21,1 % der Zellen waren hier positiv gefärbt. Im statistischen Vergleich zeigte sich kein signifikanter Unterschied für den Anteil von CD3<sup>+</sup>-Zellen ( $p = 0,961$ ) in der Mukosa.

#### *Submukosa*

In der Submukosa der Kontrollgruppe lagen durchschnittlich  $3,7 \pm 3,1$  % CD3<sup>+</sup>-Zellen vor. Maximal 15,0 % der Zellen zeigten hier eine positive Färbung. Einige Präparate wiesen keine positiv gefärbte Zelle in diesem Bereich auf. Die Insuffizienzgruppe wies im Mittel einen Anteil von  $4,00 \pm 2,00$  % auf. Minimal 1,7 % und maximal 7,8 % der Zellen färbten sich in dieser Region positiv. Im statistischen Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,507$ ).

#### 4.3.4 Professionell Antigen-präsentierende Zellen - Major Histocompatibility Complex-Klasse II (MHCII)

##### *Mukosa*

In der Mukosa der Kontrollgruppe lagen gemittelt  $4,3 \pm 6,1$  % MHCII<sup>+</sup>-Zellen vor. Maximal 37,6 % der Zellen zeigten hier eine positive Färbung. In einigen Präparaten stellte sich keine positiv gefärbte Zelle dar. Die Insuffizienzgruppe zeigte einen mittleren Anteil von  $3,2 \pm 3,3$  % MHCII<sup>+</sup>-Zellen. Maximal 10,1 % der Zellen wiesen in diesem Bereich eine positive Färbung auf. Auch hier zeigte sich in einigen Präparaten keine positiv gefärbte Zelle.

Der Vergleich des prozentualen Anteils an MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa der Kontrollgruppe mit der Mukosa der Insuffizienzgruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,863$ ).

##### *Submukosa*

Der Anteil von MHCII<sup>+</sup>- Zellen in der Submukosa in der Kontrollgruppe lag im Mittel bei  $7,2 \pm 7,1$  %. Maximal 31,8 % der Zellen waren positiv gefärbt, wobei auch Präparate ohne positiv gefärbte Zellen in dieser Region vorlagen. In der Submukosa der Insuffizienzgruppe befanden sich durchschnittlich  $5,7 \pm 5,1$  % MHCII<sup>+</sup>-Zellen. Minimal 0,8 % und maximal 14,5 % der Zellen in diesem Bereich färbten sich positiv. Der statistische Vergleich der beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,762$ ).

#### **4.3.5 Immunzellen - Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1)**

##### *Mukosa*

In der Mukosa der Kontrollgruppe zeigten sich durchschnittlich  $21,1 \pm 12,1$  % TNFR1<sup>+</sup>-Zellen. Minimal 0,3 % und maximal 58,5 % der Zellen wiesen eine positive Färbung in diesem Bereich auf. In der Insuffizienzgruppe befanden sich im Mittel  $18,3 \pm 13,5$  % TNFR1<sup>+</sup>-Zellen. Minimal 2,9 % und maximal 37,4 % der Zellen stellten sich hier positiv gefärbt dar. Die statistische Gegenüberstellung der beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede für den Anteil von TNFR1<sup>+</sup>-Zellen ( $p = 0,589$ ) in der Mukosa.

##### *Submukosa*

Die Submukosa der Kontrollgruppe wies einen mittleren Anteil von  $13,8 \pm 11,7$  % TNFR1<sup>+</sup>-Zellen vor. Minimal 0,7 % und maximal 53,9 % der Zellen waren in dieser Region positiv gefärbt. In der Insuffizienzgruppe lag der durchschnittliche Anteil an TNFR1<sup>+</sup>-Zellen bei  $9,0 \pm 7,2$  %. Hier waren minimal 1,8 % und maximal 23,0 % der Zellen positiv gefärbt, ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,325$ ).

#### **4.3.6 Dendritische Zellen – Cluster of differentiation 11c (CD11c)**

##### *Mukosa*

In der Mukosa der Kontrollgruppe befanden sich  $3,7 \pm 3,5$  % CD11c<sup>+</sup>-Zellen. Maximal waren hier 17,2 % der Zellen positiv gefärbt, wobei einige Präparate keine positiv gefärbte Zelle aufwiesen. Die Insuffizienzgruppe zeigte einen durchschnittlichen Anteil an CD11c<sup>+</sup>-Zellen von  $2,4 \pm 1,8$  %. In diesem Bereich stellten sich minimal 0,3 % und maximal 5,3 % der Zellen positiv gefärbt dar. Der statistische Vergleich beider Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,417$ ).

##### *Submukosa*

Durchschnittlich lagen in der Submukosa der Kontrollgruppe  $0,7 \pm 1,7$  % CD11c<sup>+</sup>-Zellen vor. Maximal waren hier 10,7 % der Zellen positiv gefärbt, wobei in vielen Präparaten keine positiv gefärbten Zellen nachzuweisen waren. Die Insuffizienzgruppe zeigte einen mittleren Anteil von  $0,2 \pm 0,4$  % CD11c<sup>+</sup>-Zellen. Hier stellten sich maximal 0,9 % der Zellen positiv dar, wobei auch hier in vielen Präparaten keine positiv gefärbten Zellen zu finden waren.

Die genauere Untersuchung der beiden Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ergab keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,345$ ).

**4.3.7 Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB)***Mukosa*

Im Mittel lagen in der Mukosa der Kontrollgruppe  $10,7 \pm 16,5$  % NFκB<sup>+</sup>-Zellen vor. Maximal 72,6 % der Zellen färbten sich in diesem Bereich positiv. Einige Präparate wiesen keinerlei positiv gefärbte Zellen vor. Die Insuffizienzgruppe zeigte einen durchschnittlichen Anteil an NFκB<sup>+</sup>-Zellen von  $11,7 \pm 15,3$  %. Minimal 0,2 % und maximal 41,7 % der Zellen waren hier positiv gefärbt. Im statistischen Vergleich beider Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,589$ ).

*Submukosa*

In der Submukosa der Kontrollgruppe waren  $17,9 \pm 19,7$  % NFκB<sup>+</sup>-Zellen nachweisbar. Maximal 73,9 % der Zellen färben sich hier positiv. Einige Präparate zeigten keine positiv gefärbten Zellen. Die Insuffizienzgruppe wies einen durchschnittlichen Anteil von  $19,8 \pm 19,3$  % NFκB<sup>+</sup>-Zellen auf. Minimal 0,8 % und maximal 52,7 % der Zellen färbten sich in dieser Region positiv. Auch in dieser Region und bei diesem Antikörper zeigte sich im statistischen Vergleich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,600$ ).

#### 4.4 Matched-Pair Analyse

Da die Insuffizienzgruppe und die Nicht-Insuffizienzgruppe hinsichtlich der Gruppengröße sehr inhomogen sind, wurde eine *matched-pair* Analyse durchgeführt. Dazu wurden alle Patienten der Insuffizienzgruppe (n = 7) entsprechend der festgelegten Kriterien (Geschlecht, Alter, BMI, ASA-Score) zu korrespondierenden Patienten (n = 7) der Nicht-Insuffizienzgruppe verglichen.

Im statistischen Vergleich beider Gruppen zeigte sich eine signifikant stärkere Infiltration der Mukosa mit CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Insuffizienzgruppe (p = 0,001) und ebenfalls ein signifikant erhöhter Nachweis von Makrophagen in der Submukosa (p = 0,007) der Insuffizienzgruppe (siehe Abb. 4.4.1).

Ebenso für neutrophile Granulozyten zeigte sich sowohl in der Mukosa (p = 0,004) als auch in der Submukosa (p = 0,011) eine signifikant stärkere Infiltration mit MPO<sup>+</sup>-Zellen in der Insuffizienzgruppe (siehe Abb. 4.4.2). Für die übrigen ausgewerteten Parameter zeigten sich im Vergleich der beiden konstruierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede, weder in der Mukosa noch in der Submukosa (vgl. Abb 4.4.3).

Tabelle 4.4.1: Matched-pair-Analyse – klinische Daten

	<b>Insuffizienz</b> (n=7)	<b>Keine Insuffizienz</b> (n=7)	<b>p-Wert</b>
<b>Alter</b> (Jahre)	50 (35 - 73)	50 (31 - 72)	0,805
<b>Geschlecht</b> (m/w)	5 / 2	5 / 2	1
<b>Größe</b> (cm)	174 ± 7,9	181 ± 12	0,318
<b>Gewicht</b> (kg)	87 ± 15	98 ± 27	0,535
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	28 ± 6	29 ± 6	0,949

Tabelle 4.4.2: Matched-pair-Analyse – immunhistochemische Daten

	<b>Insuffizienz (n=7)</b>	<b>Keine Insuffizienz (n=7)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>CD68<sup>+</sup>-Makrophagen</b>			
<i>Mukosa</i>	26,4 ± 3,3	9,6 ± 3,3	0,001
<i>Submukosa</i>	15,4 ± 5	6,4 ± 3,4	0,007
<b>Neutrophile Granulozyten</b>			
<i>Mukosa</i>	12,7 ± 4,1	4,4 ± 2,3	0,004
<i>Submukosa</i>	6,6 ± 2,7	2 ± 0,9	0,011
<b>CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten</b>			
<i>Mukosa</i>	9,6 ± 9,1	11,2 ± 8,5	0,902
<i>Submukosa</i>	3,9 ± 1,9	4 ± 3,4	0,710
<b>MHCII<sup>+</sup>-Zellen</b>			
<i>Mukosa</i>	3,2 ± 3,3	1,4 ± 1,8	0,209
<i>Submukosa</i>	5,7 ± 5,1	5 ± 9,3	0,318
<b>TNFR1<sup>+</sup>-Zellen</b>			
<i>Mukosa</i>	18,3 ± 13,5	15,3 ± 7,5	0,535
<i>Submukosa</i>	9 ± 7,2	10 ± 9,6	0,902
<b>CD11c<sup>+</sup>-dendritische Zellen</b>			
<i>Mukosa</i>	2,4 ± 1,8	2,8 ± 2,7	0,805
<i>Submukosa</i>	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,4	0,805
<b>NFκB<sup>+</sup>-Zellen</b>			
<i>Mukosa</i>	11,7 ± 15,2	6,2 ± 9,5	0,456
<i>Submukosa</i>	19,7 ± 19,2	13,8 ± 12,5	0,456

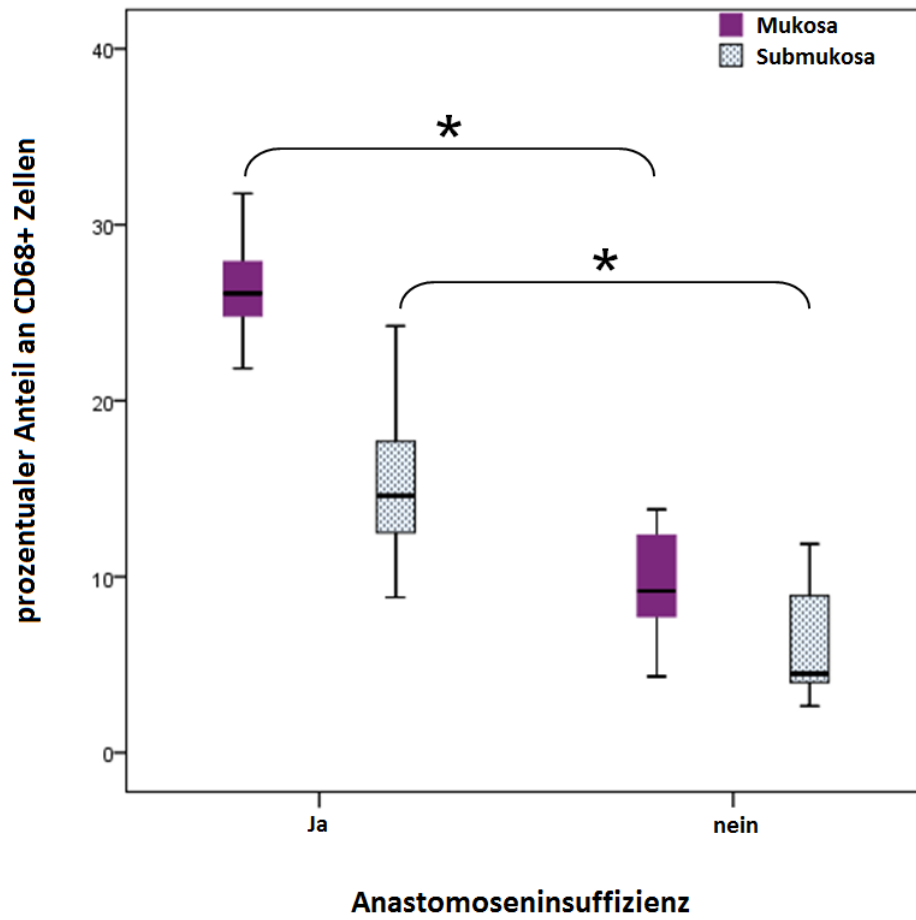


Abbildung 4.4.1: Box plots für die Insuffizienzgruppe und die Nicht-Insuffizienzgruppe, die den prozentualen Anteil an CD68<sup>+</sup>-Makrophagen im Bereich der Anastomose in der Mukosa und Submukosa darstellen.

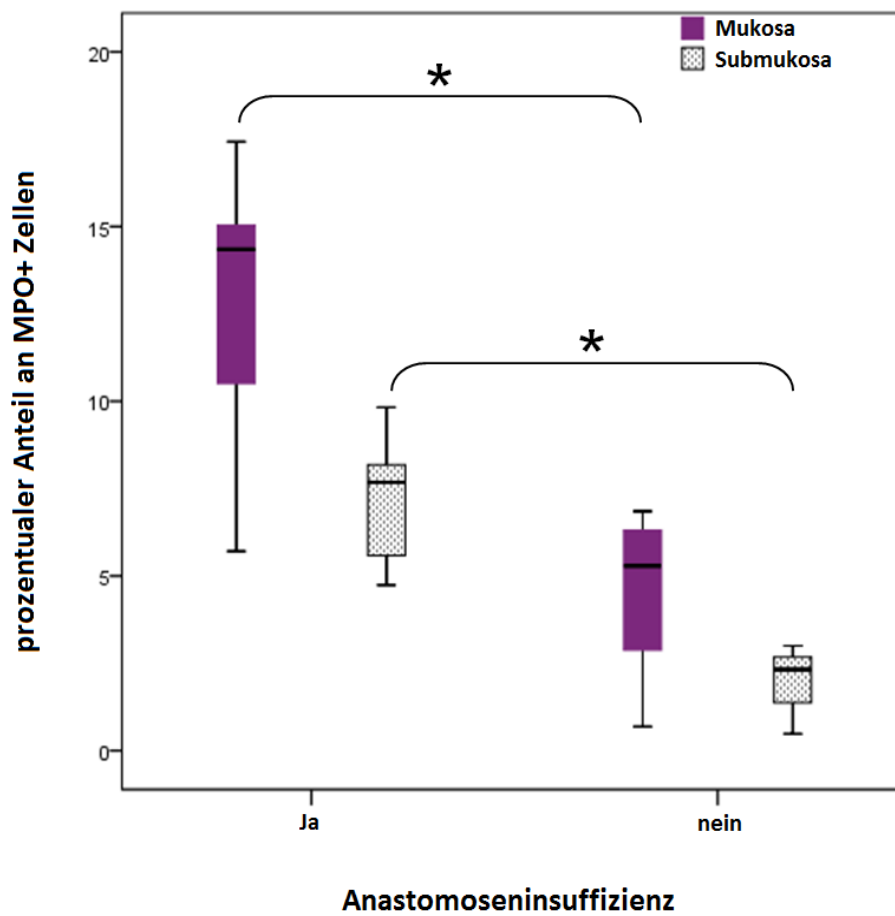


Abbildung 4.4.2: Box plots für die Insuffizienzgruppe und die Nicht-Insuffizienzgruppe, die den prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten im Bereich der Anastomose in der Mukosa und Submukosa darstellen.

## 4.5 Korrelationen nach Pearson

### 4.5.1 Makrophagen und Monozyten – Cluster of differentiation 68 (CD 68)

Der Anteil von CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Mukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,671$ ) sowie neutrophilen Granulozyten in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,422$ ). Außerdem zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation mit dem Anteil an CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,290$ ) sowie dem Anteil an MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,585$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,542$ ). Des Weiteren korrelierte der Anteil von CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Mukosa hochsignifikant mit dem Anteil der TNFR1<sup>+</sup>-Zellen der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,414$ ) und den CD11c<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,321$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,329$ ). Ebenfalls gab es eine hochsignifikante Korrelation mit dem Anteil an NFκB<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,638$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,546$ ).

Der Anteil von CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Submukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der MPO<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,446$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,396$ ) sowie dem Anteil der MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,413$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,390$ ). Des Weiteren korrelierte der Anteil von CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Submukosa hochsignifikant mit dem Anteil der TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,426$ ) und dem Anteil der CD11c<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,376$ ). Ebenfalls konnte eine hochsignifikante Korrelation mit dem Anteil der NFκB<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,516$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,453$ ) gezeigt werden.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der histologischen Schnitte fiel gehäuft auf, dass die CD68<sup>+</sup>-Makrophagen bandförmig an der apikalen bzw. luminalen Mukosa angeordnet vorlagen oder ein Großteil der Makrophagen im apikalen Drittel der Mukosa angeordnet waren. Die Korrelation nach Pearson ergab für diesen Sachverhalt eine zweiseitige Korrelation für das Vorliegen der im apikalen Drittel vorliegenden CD68<sup>+</sup>-Makrophagen mit dem Anteil an TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,305$ ).

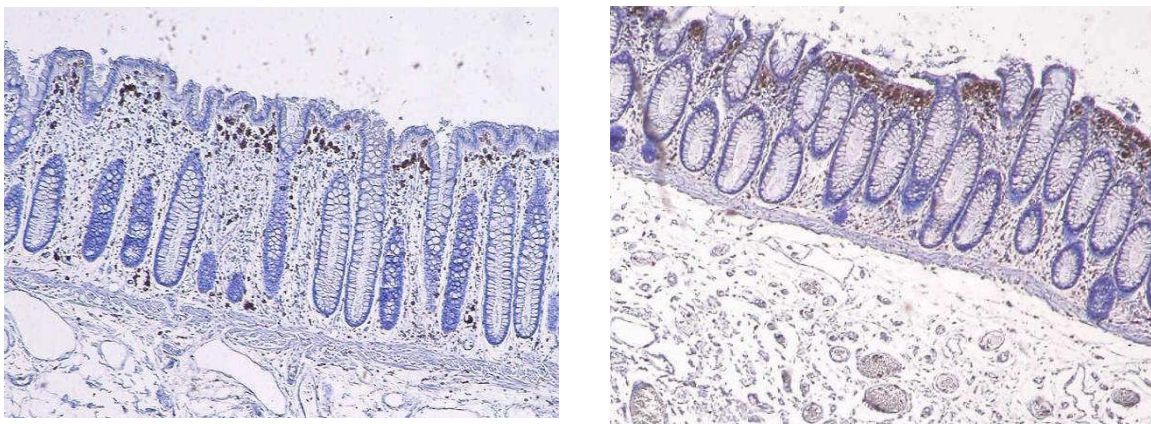


Abb. 4.5.1.1 und 2: bandförmige Anlagerung von CD68<sup>+</sup>-Makrophagen an der apikalen Mukosa (eigene Abb.)

#### **4.5.2 Neutrophile Granulozyten – Myeloperoxidase (MPO)**

Der Anteil von MPO<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der MPO<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,430$ ) sowie dem Anteil der MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,419$ ). Ebenfalls zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation der MPO<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa mit dem Anteil der CD11c<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,417$ ) sowie dem Anteil der NFκB<sup>+</sup>-Zellen der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,450$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,414$ ).

#### **4.5.3 T-Lymphozyten – CD-3 Rezeptor (CD3)**

Der Anteil von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Mukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,477$ ). Außerdem zeigte sich sowohl eine hochsignifikante Korrelation mit dem Anteil der MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,353$ ) als auch mit dem Anteil der NFκB<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,312$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,285$ ).

Der Anteil von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Submukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,359$ ) und dem Anteil der NFκB<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,283$ ).

#### **4.5.4 Professionell Antigen-präsentierende Zellen - Major Histocompatibility Complex-Klasse II (MHCII)**

Der Anteil von MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,658$ ). Außerdem ergab sich eine hochsignifikante Korrelation von MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa, sowohl mit dem Anteil der TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,393$ ) als auch mit dem Anteil der NFκB<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,729$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$  ;  $r = 0,657$ ).

Der Anteil von MHCII<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,311$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,542$ ) sowie dem Anteil der NF $\kappa$ B<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,575$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,564$ ).

### **4.5.5 Immunzellen - Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1)**

Der Anteil von TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der der TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,497$ ) und dem Anteil der CD11c<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,312$ ).

Der Anteil von TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,497$ ). Des Weiteren korrelierte der Anteil von TNFR1<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa mit dem Anteil der NF $\kappa$ B<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,560$ ) und Submukosa hochsignifikant ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,560$ ).

### **4.5.6 Dendritische Zellen – Cluster of differentiation 11c (CD11c)**

Der Anteil von CD11c<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der NF $\kappa$ B<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,465$ ) und Submukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,453$ ).

### **4.5.7 Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF $\kappa$ B)**

Der Anteil von NF $\kappa$ B<sup>+</sup>-Zellen in der Mukosa korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil der NF $\kappa$ B<sup>+</sup>-Zellen in der Submukosa ( $p = 0,001$ ;  $r = 0,891$ ).

#### **4.5.8 Korrelation der klinischen Parameter**

Das Alter der Patienten korrelierte hochsignifikant mit dem Vorliegen einer Hypertonie ( $p = 0,01$  ;  $r = 0,425$ ) sowie mit der Anzahl an CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Submukosa ( $p = 0,01$  ;  $r = 0,284$ ). Der BMI korrelierte hochsignifikant mit dem Vorliegen einer Hypertonie ( $p = 0,01$  ;  $r = 0,314$ ). Das Vorliegen einer pulmonalen Vorerkrankung korrelierte hochsignifikant mit einer positiven Raucheranamnese ( $p = 0,01$  ;  $r = 0,473$ ), einer vorliegenden KHK ( $p = 0,01$  ;  $r = 0,304$ ) sowie dem Vorliegen eines Diabetes mellitus ( $p = 0,01$  ;  $r = 0,518$ ). Für alle weiteren erhobenen klinischen Parameter ergaben sich keine hochsignifikanten Korrelationen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Geschlechtsverteilung

Für diese Arbeit wurden Geweberinge aus Zirkularstaplern von 34 Männern und 49 Frauen, die in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie im Universitätsklinikum Aachen operiert wurden, untersucht. Die Geschlechtsverteilung des Patientenkollektives liegt somit bei m : w 1 : 1,44. Das entspricht einem prozentualen Anteil von 41 % männlichen Patienten und 59 % weiblichen Patientinnen. Hier überwiegt der Anteil von Frauen, wie auch in den Arbeiten von Goriainov & Miles 2008 (84 Patienten, 49 weibliche und 35 männliche) und 2010 (69 Patienten, 43 weibliche und 26 männliche Patienten). In der Studie von Abete et al. 2003 überwiegt geringfügig das männliche Geschlecht mit n = 153 (55 %) im Gegensatz zu n = 125 für das weibliche Geschlecht (45 %). Auch Erdas et al. gaben bei ihrer Arbeit 2009 eine Geschlechtsverteilung von m : w 1,2 : 1 an.

### 5.2 Alter

Das durchschnittliche Alter des Patientenkollektives dieser Arbeit lag bei  $59 \pm 15$  Jahren. Im Vergleich zu anderen aktuellen Studien fällt auf, dass das untersuchte Patientenkollektiv um 5-10 Jahre im Durchschnitt jünger ist (Goriainov & Miles 2010, 2008; Erdas et al. 2009; Platell et al. 2007; Abete et al. 2003). Bezüglich des Alters der Patienten zeigte sich auch eine interessante Korrelation: Es korrelierte hochsignifikant mit der Anzahl an CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Submukosa. Das könnte bedeuten, dass das Alter gerade wegen der erhöhten Infiltration von Makrophagen zu diesem Zeitpunkt als ein Risikofaktor für das Auftreten von Anastomoseninsuffizienzen angesehen werden kann.

### 5.3 Verweildauer

Die durchschnittliche stationäre Verweildauer spiegelt die Qualität der Operation wieder, ist Anhalt für die Komplikationsträchtigkeit eines Eingriffs, Anhalt für eine fachübergreifende Behandlung des Patienten und spiegelt das Spektrum der Begleiterkrankungen der Patienten wider. In dieser Arbeit lag die mittlere Verweildauer bei  $16 \pm 8$  Tagen, wobei die minimale Aufenthaltsdauer bei 6 Tagen und die maximale Aufenthaltsdauer bei 50 Tagen lag. Im Vergleich zu anderen Studien fällt auf, dass die Verweildauer der Patienten dieser Studie länger ist als in anderen Studien, die die Heilung von kolorektalen Anastomosen untersuchen. Die durchschnittliche Verweildauer lag bei Abete et al. 2003 bei 12 Tagen, bei Goriainov & Miles 2010 bei 7 Tagen im Durchschnitt. Auch diese Daten sollten kritisch betrachtet werden, da teilweise nicht der gesamte stationäre Aufenthalt, beispielsweise bei Verlegung in andere Fachabteilungen, berücksichtigt wurde. Des Weiteren sollte der Schwierigkeitsgrad der Operationen sowie die Komorbiditäten der Patienten berücksichtigt werden. In Universitätskliniken und Kliniken der Maximalversorgung werden in der Regel kompliziertere Eingriffe an durchschnittlich kränkeren Patienten vorgenommen als in kleineren peripheren Häusern. Das könnte zumindest eine Erklärung für die längere mittlere Verweildauer in dieser Arbeit sein. Des Weiteren sind hier länderspezifische Unterschiede zu nennen. Die Arbeiten stammen aus dem europäischen Ausland (Italien und Großbritannien) - hier liegen die durchschnittlichen Verweildauern grundsätzlich unter den der deutschen Kliniken.

### 5.4 Insuffizienzrate

Von den 83 untersuchten Patienten entwickelten postoperativ 7 Patienten eine AI. Das entspricht einem Anteil von 8,4 %. Durchschnittlich liegt die Insuffizienzrate bei ca. 11 %, wobei diese mit Abnahme der Entfernung zum Darmausgang zunimmt (Shogan et al. 2013). Die nachfolgende Tabelle (siehe Tabelle 5.4.1) zeigt Insuffizienzraten aus anderen Studien der letzten 11 Jahre.

Diese Insuffizienzraten sollte man kritisch betrachten, da durch unterschiedliche Definitionen der Insuffizienzen teilweise sehr niedrige Raten entstehen. Ein Beispiel dafür ist die Studie von Jones et al. 2007. Hier wurde das Auftreten einer Insuffizienz definiert als „Versagen der Anastomose wobei als Folge der Tod eintritt, oder eine operative Reintervention nötig ist“ (Jones et al. 2007). Durch diese Definition fallen alle klinisch relevanten Insuffizienzen aus der Statistik, die konservativ zu therapieren sind. Eine daraus resultierende Insuffizienzrate von 0,8 % muss also kritisch betrachtet werden und ist schlecht mit anderen Studien vergleichbar.

Ursachen für das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz sind vielfältig bekannt. Dazu zählen zahlreiche chirurgisch technische und patientenbezogene Risikofaktoren (Choi et al. 2006, Karliczek et al 2009, Stumpf et al 2005). Die Entscheidung, bei Vorliegen von relevanten Risikofaktoren eine protektive chirurgische Maßnahme zu veranlassen, obliegt dem Ermessen des Chirurgen. Eine klare Evidenz, für welchen Patienten die Durchführung einer protektiven Maßnahme erforderlich ist und welche protektive chirurgische Technik einer anderen überlegen ist, gibt es bisher nicht (Boccola et al 2010, Pasic et al. 2013). In vorhergegangenen Arbeiten publizierte, vorhersagende „Scoring-Systeme“ basieren auf klinischen und intraoperativen Parametern und sollen diese Entscheidung erleichtern. Bis heute sind allerdings keine patientenspezifischen gewebebezogenen Risikofaktoren bekannt, die als „Risiko-Marker“ verwendet werden könnten (Pasic et al. 2013).

Das Ziel dieser Studie war es, die potenzielle Vorhersagekraft wichtiger Entzündungsmediatoren im Bezug auf die Anastomosenheilung bei der elektiv durchgeführten Sigmaresektion bei Sigmadivertikulitis zu prüfen und somit das Vorliegen dieser Mediatoren als einen oben beschriebenen Risikoprofilmarker zu verwenden.

Generell ist bekannt, dass Störungen der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Entstehens von intestinalen Anastomoseninsuffizienzen spielen. Während vorhergegangene Studien den Kollagenmetabolismus und die Interaktionen verschiedener Matrix

Metalloproteasen in der Extrazellulärmatrix untereinander in der Anastomosenheilung verantwortlich machten, vermuten aktuellste Studien akute oder chronische Entzündungsreaktionen in der Pathogenese unzureichender intestinaler Anastomosenheilung (Pantelis et al 2010, Pantelis et al. 2011, Stumpf et al. 2005).

Dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit näher untersucht und aufgeschlüsselt.

Tabelle 5.4.1: Überblick über aktuelle Insuffizienzraten

<b>Autor(en)</b>	<b>Publikationsjahr</b>	<b>Insuffizienzrate</b>	<b>Anzahl der Anastomosen</b>
Lehmann et al.	2011	5,4 %	130
van't Sant et al.	2011	4,3 %	1433
Rickert et al.	2010	3,5 %	1731
Telem et al.	2010	2,6 %	180
Woeste et al.	2010	7,6 %	342
Ricciardi et al.	2009	4,8 %	998
Stumpf et al.	2009	5,8 %	400
Komen et al.	2009	8,7 %	739
Holte et al.	2009	5,6 %	502
Karliczek et al.	2009	13,6 %	191
Goriainoc & Miles	2008	2,9 %	84
Branagan et al.	2005	3,9 %	1834
Abete et al.	2003	1,4 %	278
Alves et al.	2002	6,0 %	707
Schmedt et al.	2000	0,9 %	445

## **5.5 Immunhistochemie**

Sigmaresektionen mit der daraus folgenden Anlage einer Kolon-Anastomose gehören in den großen Kliniken Deutschlands zu den täglich durchgeführten Eingriffen. Das Auftreten einer AI zählt zu den häufigeren und vor allem relevantesten Komplikationen. Tritt eine AI bei einem Patienten auf, so steigen Mortalität und Morbidität an. Vielfältige Risikofaktoren sind nachgewiesen, die zu einer AI führen (vgl. Tabellen S. 7 und 8), darunter auch speziell-immunologisch assoziierte Risikofaktoren. Dass immunologische Vorgänge im Bereich der Anastomose mit dem Auftreten einer AI in Verbindung gebracht werden können, kann man aus speziell-immunologisch assoziierten Risikofaktoren, wie die post- oder perioperative Gabe von Kortison, NSAR sowie die Gabe von Erythrozytenkonzentraten ableiten (Stumpf et al. 2009; Rushfeldt et al. 2011, Klein et al. 2010). Gegenstand dieser Arbeit ist es zu prüfen, ob das Auftreten einer gewissen Immunzellen-Population, vor allem Makrophagen, zum Zeitpunkt der Anlage einer Anastomose in Zusammenhang mit dem Auftreten einer AI gebracht werden kann. Dazu ist es notwendig, die Immunzellen differenziert zu betrachten.

Die Bedeutung von Makrophagen im Wundheilungsprozess von intestinalen Anastomosen wird kontrovers diskutiert. Die Depletion von Makrophagen im Bereich der Anastomose wird von einer Autorengruppe als einer der wichtigsten Gründe für gestörte Wundheilung angegeben (Shirafuji et al. 2001). Makrophagen setzen eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren frei, welche die Proliferation von Fibroblasten stimulieren und dadurch die Kollagensynthese und Vaskularisierung anregen (Crowther et al. 2001). Es wurde weiterhin publiziert, dass eine gesteigerte Makrophagenaktivität förderliche Effekte auf die frühe Stärke von intestinalen Anastomosen hat (Cetinkaya et al. 2005; Compton et al. 1996). Im Kontrast dazu zeigen die Resultate dieser Arbeit einen negativen Effekt einer Makrophageninfiltration bezüglich der Anastomosenheilung. Diese Kontroverse zeigt, dass die Makrophagen im Wundheilungsprozess von intestinalen Anastomosen sowohl positive als auch negative Auswirkungen haben. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein Mangel oder ein Überfluss von Makrophagen zu einem bestimmten Zeitpunkt im Wundheilungsprozess positive oder negative Eigenschaften besitzen kann.

Progenitor Zellen von Makrophagen und dendritischen Zellen sind zirkulierende Monozyten. Dysregulationen von humanen Monozyten-Subpopulationen sind detailliert in zahlreichen Krankheiten wie peritonealen Adhäsionen, Leberzirrhose oder beim Leber-Karzinom beschrieben (Binnebösel et al 2008, Binnebösel et al 2011, Bock et al. 2003, Karlark et al. 2009, Tacke et al. 2012). Sowohl beim Menschen als auch tierexperimentell bei Mäusen ist es möglich, Subpopulationen der Monozyten zu identifizieren, welche sowohl einen pro-inflammatorischen als auch einen anti-inflammatorischen Einfluss auf die Anastomosenheilung haben können. Beispielsweise werden Gr-1<sup>high</sup> Monozyten in Mäusen, welche sich mit humanen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten gleichen, vor allem bei Entzündungsreaktionen rekrutiert (Cirocchi et al. 2012, Pasic et al. 2013). Obwohl eine wichtige Rolle bezüglich der Makrophagen im Wundheilungsprozess der Anastomosen zu vermuten ist, ist bisher wenig bezüglich der monozytären Subpopulationen und deren Differenzierung in Makrophagen erforscht. Ebenso der Mechanismus der Rekrutierung und deren funktionelle Auswirkung inklusive der komplexen Abläufe in der Pathogenese ist wenig bekannt.

Dass das vermehrte Vorkommen von Makrophagen bei Anlage der Anastomose die Wundheilung in diesem Bereich verbessert und folglich weniger Insuffizienzen entstehen müssten, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil – eine Infiltration mit Makrophagen konnte als Risikofaktor identifiziert werden. Im Gegensatz dazu stellten Compton et al. 1996 fest, dass beispielsweise Glucan, welches eine Makrophagen stimulierende Substanz ist, die Wundheilung im Bereich der Anastomose signifikant verbessert.

In einigen tierexperimentellen Studien zum Thema AI wurde die Rolle der Makrophagen bei der Heilung der frisch angelegten Anastomose näher betrachtet, indem man in den meisten Fällen mit verschiedenen Pharmaka die Makrophagen depletiert hat und danach mit GM-CSF versucht hat, den schädlichen Effekt wieder auszugleichen (Pantelis et al. 2011, Cetinkaya et al. 2005). Dazu wurde zum Beispiel an Mäusen eine perioperative, also kurzfristige, pharmakologisch induzierte Makrophagen Depletion sowie deren Inaktivierung kurzfristig (bis 24h postoperativ) herbeigeführt (Pantelis et al. 2011). Dadurch verminderte sich die

Anzahl der Makrophagen, wobei allerdings kein Effekt auf die Heilung intestinaler Anastomosen nachgewiesen werden konnte (Pantelis et al. 2011). Erst eine langandauernde Abwesenheit von Makrophagen oder eine Makrophagen-Dysfunktion verschlechtert hingegen die Heilung von Anastomosen und kann ein Risikofaktor für das Auftreten einer postoperativen AI sein (Pantelis et al. 2011). Eine lang anhaltende Abwesenheit war kein Bestandteil der Untersuchung dieser Arbeit, jedoch konnte in keinem der Präparate eine komplette Abwesenheit von Makrophagen nachgewiesen werden. Somit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit damit überein, dass eine verminderte Anzahl von Makrophagen an der Anastomose nicht als Risikofaktor für eine AI beschrieben werden kann (vgl. Pantelis et al. 2011).

Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ist ein wichtiger Mechanismus in der Wundheilung, in der diese Zellen Detritus entfernen, einer Infektion vorbeugen und wichtige Wachstumsfaktoren und Interleukine freisetzen (Bamann et al 1994). Besonders in der akuten und chronischen Entzündungsreaktion spielt die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten eine Schlüsselrolle. Selektive Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle werden durch diese Zellen intermittierend freigesetzt (Grommes et al 2012, 2013).

Bei Patienten die sich einer laparoskopischen „Sleeve-Gastrektomie“ unterzogen, konnten neutrophile Granulozyten als Marker für postoperative Komplikationen herangezogen werden. Besonders in der frühen postoperativen Phase waren neutrophile Granulozyten bei Patienten, die eine Insuffizienz durch einen Abszess entwickelten, erhöht (Albanopoulos et al 2013). Im Fall von Kolonanastomosen wurden bisher kontroverse Resultate veröffentlicht. Einerseits konnte am Tiermodell gezeigt werden, dass die Gewebeinfiltration mit neutrophilen Granulozyten keinen Nachteil in der normalen intestinalen Wundheilung mit sich bringt, woraus zu folgern ist, dass diese Zellen keinen Effekt auf die Integrität der Anastomose hat, während andererseits andere Veröffentlichungen zeigen, dass neutrophile Granulozyten die Anastomosenheilung herabsetzt (Jonsson & Hogstrom 1991, Mansson et al. 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine vorexistierende Infiltration mit neutrophilen Granulozyten ein Risikofaktor für das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz sein kann. Wegen der sehr schnellen Gewebsinfiltration mit neutrophilen Granulozyten als eine Reaktion auf den chirurgischen Stimulus kann nicht sicher nachgewiesen werden, ob diese Zellen wirklich sessile neutrophile Granulozyten waren und damit Konsequenz der ablaufenden oder abgelaufenen Divertikulitis oder ob diese durch die chirurgische Mobilisation und Präparation des Colon sigmoideum während der Operation zu erklären sind.

Andere Studien zeigen wiederum andere Aspekte bezüglich der Entzündungsreaktionen im Bereich der Anastomose und damit verbundenen Infiltration von Immunzellen. An Ratten konnte gezeigt werden, dass eine direkt postoperativ intraperitoneale applizierte Mitomycin-C-Gabe (ein Zytostatikum) einen verzögerten Heilungsverlauf der Anastomosen aufwies (Cetinkaya et al. 2005). Bei der histologischen Untersuchung zeigte sich zellarmes Granulationsgewebe mit geringer Vaskularisierung, desweiteren nekrotische Areale und eine akute Entzündungsreaktion, die besonders durch neutrophile Granulozyten gekennzeichnet war (Cetinkaya et al. 2005). Die mechanische Belastbarkeit dieser Anastomosen war sehr gering, wozu passend sich dazu eine dementsprechend geringe Hydroxyprolinkonzentration zeigte (Cetinkaya et al. 2005). Eine lokale Behandlung der Anastomose mit GM-CSF hob diese nachteiligen Effekte auf und hatte sogar einen protektiven Effekt auf die Anastomose in Hinsicht auf die Stabilität (Cetinkaya et al. 2005). Die histologische Untersuchung der Anastomosen zeigte nach der Zugabe von lokalem GM-CSF eine signifikant erhöhte Zellmigration im Bereich der Anastomose (Cetinkaya et al. 2005). Im Detail zeigte sich eine vermehrte mononukleäre Zellpopulation, außerdem eine gesteigerte Fibroblasten-Akkumulation sowie eine vermehrte Neovaskularisierung im Granulationsgewebe (Cetinkaya et al. 2005). Des Weiteren zeigten sich geringer ausgeprägte Nekroseareale sowie eine signifikant mechanisch stärkere Belastbarkeit, was durch die gesteigerte Kollagensynthese und dadurch erhöhte Kollagenkonzentrationen zu erklären ist (Cetinkaya et al. 2005).

Bei der Applikation eines Zytostatikums in den Bereich der Anastomose kommt es zu einer starken Depletion jeglicher immigrierter Zellen in diesem Bereich.

Gerade die immigrierten Zellen sind jedoch von eminenter Bedeutung für die initiale Entzündungsreaktion, welche zur effizienten Heilung der Anastomose notwendig ist. Unter diesen extremen Bedingungen ist es sehr wahrscheinlich, dass es zunächst zu einer verzögerten Heilung kommt. Nach GM-CSF Gabe kommt es dann zu einer überdurchschnittlich starken Einwanderung von mononukleären Zellen, die zu einer besseren Heilung der angelegten Anastomose führen.

Bereits 1990 stellten Brasken et al. in einer tierexperimentellen Studie an Ratten fest, dass die schnelle und suffiziente Heilung der Anastomosen mit einer schnellen Akkumulation von verbindenden Gewebekomponenten wie Kollagenen und Laminin zwischen den Darmenden zusammenhängt. Am ersten postoperativen Tag zeigte sich eine starke Fibronektin Reaktion an den Anastomosen mit einer maximalen Ausprägung am 5. postoperativen Tag (Brasken et al. 1990). Typ III Kollagen und perizelluläres Typ IV Kollagen konnten erst am zweiten Tag postoperativ nachgewiesen werden (Brasken et al. 1990). Ab dem 3. postoperativen Tag konnten alle untersuchten Kollagene sowie Laminin im Anastomosenbereich nachgewiesen werden, wobei Laminin und Kollagen Typ IV in den Kapillarwänden des Granulationsgewebes zu finden waren (Brasken et al. 1990). Im Gegensatz zu Brasken et al. zeigt die vorliegende Arbeit, dass unter physiologischen Bedingungen zum Zeitpunkt der Operation ohne Applikation eines Zytostatikums an die Anastomose weder an den insuffizienten Anastomosen vermehrt neutrophile Granulozyten vorlagen, was für eine Entzündung sprechen würde, noch vermehrt Makrophagen an den später suffizient verheilenden Anastomosen vorlagen.

Auch langzeit-Kortison-behandelte Ratten, bei denen die oben beschriebenen nachteiligen Effekte von Kortikosteroiden auf die Anastomosen festgestellt wurden, wurden lokal mit GM-CSF im Bereich der Anastomose behandelt (Bernasconi et al. 2010). Es zeigte sich, dass die Reißfestigkeit der Anastomose sowie der Hydroxyprolin-Gehalt signifikant anstieg (Bernasconi et al. 2010).

Außerdem konnte eine erheblich höhere Migration von mononukleären Zellen, vor allem Makrophagen, nachgewiesen werden (Bernasconi et al. 2010).

Kortikosteroide wirken über einen intrazellulären Rezeptor, der neben anderen Transkriptionsfaktoren, die Immunreaktionen steuern, auch NFκB reguliert. Kortison hemmt indirekt NFκB, woraus Entzündungsreaktionen, allgemein formuliert, in geringerem Umfang ablaufen. Zytokine wie IL-1, TNF-α, GM-CSF, IL-3, IL-4 und IL-8 sowie Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und NO sind an der initialen Entzündungsreaktion beteiligt, die zur suffizienten Heilung der Anastomose führen. Außerdem folgt unter physiologischen Bedingungen eine Leukozytenauswanderung aus den Gefäßen durch Expression von Adhäsionsmolekülen hinein in das Gewebe im Bereich der Anastomose. Durch Kortison werden diese Vorgänge gehemmt, sodass die Migration von Leukozyten vermindert wird. In dieser Arbeit konnte allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von NFκB<sup>+</sup>-Zellen zum Zeitpunkt der Operation, im Sinne einer stark ablaufenden Entzündungsreaktion und dem Auftreten einer AI oder dem Nichtauftreten einer AI beschrieben werden. Auch ein vermindertes Vorkommen von NFκB<sup>+</sup>-Zellen, im Sinne einer schwach ablaufenden Entzündungsreaktion im Bereich der Anastomose zum Zeitpunkt des operativen Eingriffes, konnte nicht signifikant mit dem Auftreten oder Nichtauftreten einer späteren AI in Zusammenhang gebracht werden.

Bernasconi et al. stellten 2010 die Hypothese auf, dass GM-CSF die intestinale Mukosaheilung beeinflusst. In tierexperimentellen Studien an Mäusen, bei denen mit DSS (Dextran Sulfat Natrium) eine Kolitis induziert wurde, konnte der folgende Sachverhalt nachgewiesen werden: GM-CSF Therapie verminderte die klinischen Zeichen der Kolitis, das Freisetzen von Entzündungs-Mediatoren und verbesserte dadurch die Heilung der Mukosa (Bernasconi et al. 2010). Es zeigte sich eine schnellere Ulkus-Reepithelialisierung, eine gesteigerte hyperproliferative Antwort von Epithel-Zellen und eine geringere Ulcerationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe (Bernasconi et al. 2010). Es wurde herausgefunden, dass die durch GM-CSF geförderte Reparatur der Mukosa zeitlich mit einer Reduktion von neutrophilen Granulozyten und einer gesteigerten Anhäufung von CD11b<sup>+</sup> monozytischen Zellen in Kolon-Gewebe einhergeht (Bernasconi et al. 2010).

Der Transfer von splenischen GM-CSF induzierten CD11b<sup>+</sup> Myeloid-Zellen in Mäuse, in denen durch DSS eine Kolitis induziert wurde, verbesserte die Kolitis (Bernasconi et al. 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zellen die Wundheilung *in vitro* verbessern (Bernasconi et al. 2010). Bezugnehmend auf die Arbeit von Bernasconi et al. 2010 konnte in dieser Arbeit zum Zeitpunkt der Anlage der Anastomose festgestellt werden, dass das Vorliegen von neutrophilen Granulozyten ein Risikofaktor für das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz ist.

Allerdings muss deutlich gesagt werden, dass sämtliches Gewebe, das in dieser Arbeit analysiert wurde, zum Zeitpunkt der Anlage der Anastomose entnommen wurde. Man kann daraus schlussfolgern, dass die Zellen zu einem späteren Zeitpunkt in das Anastomosengebiet einwandern und dann die Heilung begünstigen oder den Heilungsverlauf verzögern. Um genauer auf den Zeitpunkt einzugehen, kann die Arbeit von Matthiessen et al. 2007 herangezogen werden. In dieser Arbeit stellte man fest, dass der intraperitoneale Lactat-Pyruvat-Index sowie die Zytokine IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  bei Patienten, die eine symptomatische AI entwickelten, erhöht sind, bevor klinische Symptome auftreten.

Bei der Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von AI und der Gabe von Erythrozytenkonzentraten müssen mehrere Aspekte betrachtet werden. Zunächst muss davon ausgegangen werden, dass der Allgemeinzustand des Patienten schlecht ist. Bei jüngeren, sonst gesunden Patienten kann eher ein geringer Hämoglobin-Wert toleriert werden, als bei multipel vorerkrankten Patienten. Des Weiteren ist die Gabe von Blutkonserven ein Zeichen für größeren Blutverlust und somit eine verminderte Sauerstoffversorgung im Bereich der Anastomose, was die Wundheilung behindert. Aber auch immunologische Faktoren spielen eine Rolle bei der Gabe von Erythrozytenkonzentraten. Tadros et al. stellten 1992 fest, dass die Gabe von Bluttransfusionen den Heilungsverlauf von intestinalen Anastomosen beeinflusst. In einer tierexperimentellen Studie an Ratten wurde festgestellt, dass durch die herabgesetzte T-Zell-vermittelte Immunantwort und die für die Heilung nötige vermindert ablaufende Entzündungsreaktion, die Anastomosenfestigkeit drei Tage postoperativ signifikant herabgesetzt ist (Tadros et al. 1992). Des Weiteren zeigte sich eine

vermehrte Anfälligkeit für intraabdominelle septische Komplikationen durch die verminderte Entzündungsreaktion (Tadros et al. 1992). Ein Jahr später konnte die gleiche Forschungsgruppe zeigen, dass nach Gabe von Bluttransfusionen die Gabe von IL-2 den negativen Effekt der Bluttransfusionen aufhebt. Eine Gabe dieses Zytokins ohne die Gabe von Bluttransfusionen hatte allerdings einen negativen Effekt auf die Anastomosenheilung (Tadros et al. 1993). IL-2 ist auch bekannt als T-cell growth factor (TCGF). Es wirkt proliferationsfördernd an B- und T-Lymphozyten, aktiviert zytotoxische T-Zellen und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und führt in Makrophagen dazu, dass die Zytotoxizität stimuliert wird. Dieser Sachverhalt spiegelt wieder, dass für eine suffiziente Heilung der Anastomosen ein Gleichgewicht aus pro- und antiinflammatorischen Zellen und Zytokinen vorliegen muss. Eine vermehrte Aktivität von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen sowie NK-Zellen führt ebenso zu einer schlechteren Heilung der Anastomose, wie ein Fehlen dieser Zellen. Verwendet man CD3 als Marker, welcher an der Oberfläche von T-Zellen lokalisiert ist, müsste ein vermehrtes oder vermindertes Vorliegen von T-Zellen zu einer schlechteren oder besseren Heilung der Anastomosen führen. Dies konnte in dieser Arbeit allerdings nicht mit Signifikanz nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden durch die folgenden Sachverhalte eingeschränkt. Wegen der natürlichen Limitierung der immunhistochemischen Untersuchungen ist die Aussagekraft zur Funktionalität sowohl von Makrophagen als auch von neutrophilen Granulozyten im Wundheilungsprozess der untersuchten Anastomosen nicht deutlich zu treffen. Weiterführende Untersuchungen mit z. B. FACS-Analysen könnten weitere Aufklärung liefern. Weiterhin muss bemerkt werden, dass die Gewebeproben nur zum Zeitpunkt der Anlage der Anastomose entnommen wurden. Weitere Gewebeproben, die zu weiteren postoperativen Zeitpunkten entnommen würden, könnten möglicherweise eine bessere Aussage über den Ablauf der Rekrutierung der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten treffen. Allerdings ist eine invasive Gewebeentnahme sowohl vor als auch nach der elektiven Resektion des Colon sigmoideum bei diesen Patienten nicht gerechtfertigt, da sie die Anastomosenheilung gefährdet und dem Patienten somit schaden könnte.

Die dritte und letzte Einschränkung ist bezüglich der verminderten Aussagekraft der matched pair analyse zu sehen. Dieses Verfahren wurde allerdings bewusst aufgrund der inhomogenen Gruppenstärken gewählt. Die Ergebnisse bleiben, wenn auch mit verminderter Aussagekraft, die gleichen.

## 6. Zusammenfassung

Das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz nach der elektiven Sigmaresektion bei Sigmadivertikulitis ist weiterhin eine gefürchtete Komplikation, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht. Das Ziel dieser prospektiven Studie war es, den Einfluss von präexistenten Immunzellen in der Kolonwand auf das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz zu untersuchen.

Zwischen 2010 und 2012 unterzogen sich 83 Patienten mit chronisch rezidivierender Sigmadivertikulitis oder einer sigmoidalen Stenose, die durch eine chronische Sigmadivertikulitis bedingt war, einer elektiven, laparoskopischen Sigmaresektion. Dabei wurde eine End-zu-End-Anastomose mit Hilfe eines Zirkularstaplers angelegt. Detaillierte klinische Parameter (ASA-Score, Komorbiditäten, Verweildauer, Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz) wurden prospektiv ermittelt. Als Marker der Entzündungsreaktion wurden CD68<sup>+</sup>-Makrophagen, neutrophile Granulozyten, CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und CD11c<sup>+</sup>-dendritische Zellen in der Kolonwand quantitativ ermittelt. Des Weiteren wurden Schlüssel-Rezeptoren der Entzündungsreaktion wie MHCII und TNFR1 und der Transkriptionsfaktor NFκB analysiert. Die klinischen und immunhistochemischen Daten wurden in zwei Gruppen (Insuffizienzgruppe, Nicht-Insuffizienzgruppe) miteinander statistisch verglichen. Wegen der quantitativ inhomogenen Gruppen wurde zusätzlich eine matched-pair Analyse durchgeführt. Weder die klinischen Parameter noch die immunhistochemischen Parameter zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die matched-pair Analyse zeigte jedoch einen signifikant höheren prozentualen Anteil an CD68<sup>+</sup>-Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der Insuffizienzgruppe. Diese „low-grade“-Infektion im Sinne einer präexistierenden Infiltration der Mukosa und Submukosa mit CD68<sup>+</sup>-Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Bereich der untersuchten Kolon-Anastomosen kann als Risiko für das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz angesehen werden. In weitergehenden Studien sollte der Einfluss dieser beiden Zellarten in der Pathophysiologie der Wundheilung intestinaler Anastomosen näher aufgeschlüsselt werden, vor allem auf molekularer Ebene und bezüglich ihrer Funktionalität. In dieser Arbeit konnte diesbezüglich keine Aussage getroffen

werden. Lediglich das Vorliegen der Zellen konnte als ein Risiko für das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz bewiesen werden.

### **Summary**

Anastomotic leakage in elective laparoscopic sigmoid resection due to diverticulitis is a rare but undesired complication with a remarkable morbidity and mortality. The aim of the present, prospective study was to evaluate the predictive value of a potential preexisting low grade inflammation regarding the incidence of an anastomotic leakage.

Between 2010 and 2012 83 patients with either chronically recurrent diverticulitis or sigmoid stenosis caused by chronic diverticulitis were included in the study. Detailed patient information, ASA grade, comorbidities, duration of hospital stay and the occurrence of an anastomotic leakage were prospectively recorded. As markers of cellular immune response CD68<sup>+</sup> macrophages, neutrophils, CD3<sup>+</sup> T-lymphocytes and CD11c<sup>+</sup> dendritic cells were evaluated within the colonic bowel wall. Key receptors of inflammatory response such as MHCII and TNFR1 and the transcription factor NF- $\kappa$ B were analyzed. Clinical and immunohistochemical data were compared between groups (leakage vs. no leakage) and due to widely heterogeneous groups concerning the number of patients and to minimize the effect of extraneous variables a matched-pair analysis was performed additionally.

Neither any of the clinical parameters measured nor the immunohistochemically analysed parameters were significantly different comparing the groups. The matched-pair analysis revealed an obvious but not significant longer mean hospital stay in the leakage group. Interestingly the immunohistochemical investigations revealed that the percentage of CD68<sup>+</sup> macrophages and neutrophils in the colonic wall obtained at the index operation was significantly higher in both the mucosal and submucosal layer in the leakage group.

A preexisting low grade inflammation represented by infiltrates of macrophages and neutrophils is a predictor of patients at risk to suffer a colon anastomotic leakage. In further studies the importance of those inflammatory cells has to be illuminated on a molecular level in order to develop potential and specific therapy approaches to avoid an aberrant intestinal wound healing.

## 7. Literaturverzeichnis

Abete M, Ronchetti V, Casano A, Pescio G: Anastomotic leakage after traditional surgery of the colon and rectum. *Minerva Chir.* (2003) 58:167-74

Albanopoulos K, Alevizos L, Natoudi M et al. C-reactive protein, white blood cells, and neutrophils as early predictors of postoperative complications in patients undergoing laparoscopic sleeve gastrectomy. *Surg Endosc* (2013); 27:864-871

Alves A, Panis Y, Trancart D, Regimbeau JM, Pocard M, Valleur P: Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World J Surg* (2002) 26:499-502

Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* (1994); 15:74-80

Bernasconi E, Favre L, Maillard MH, Bachmann D, Pythoud C, Bouzourene H, Croze E, Velichko S, Parkinson J, Michetti P, Velin D: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor elicits bone marrow-derived cells that promote efficient colonic mucosal healing. *Inflamm Bowel Dis.* (2010) 16:428-41

Binnebosel M, Rosch R, Junge K et al. Macrophage and T-lymphocyte infiltrates in human peritoneal adhesions indicate a chronic inflammatory disease. *World J Surg* (2008); 32:296-304

Binnebosel M, Klink CD, Serno J et al. Chronological evaluation of inflammatory mediators during peritoneal adhesion formation using a rat model. *Langenbecks Arch Surg* (2011); 396:371-378

Boccola MA, Lin J, Rozen WM et al. Reducing anastomotic leakage in oncologic colorectal surgery: an evidence-based review. *Anticancer Res* (2010); 30:601-607

Boccola MA, Buettner PG, Rozen WM, Siu SK, Stevenson AR, Stitz R, Ho YH: Risk factors and outcomes for anastomotic leakage in colorectal surgery: a single-institution analysis of 1576 patients. *World J Surg.* (2011) 35:186-95

Bock CT, Buerke B, Tillmann HL et al. Relevance of hepatitis B core gene deletions in patients after kidney transplantation. *Gastroenterology* (2003); 124:1809-1820

Branagan G, Finnis D; Wessex Colorectal Cancer Audit Working Group: Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. *Dis Colon Rectum.* (2005) 48:1021-6

Brasken P, Lehto M, Renvall S: Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. An immunohistologic study in rats. *Acta Chir Scand.* (1989) 155(8):413-419

Brasken P, Lehto M, Renvall S: Fibronectin, laminin, and collagen types I, III, IV and V in the healing rat colon anastomosis. *Ann Chir Gynaecol.* (1990) 79:65-71

Cetinkaya K, Dinc S, Gulcelik MA, Renda N, Ustun H, Caydere M, Alagol H: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor improves impaired anastomotic wound healing in rats treated with intraperitoneal mitomycin-C. *Surg Today.* (2005) 35:290-4

Choi HK, Law WL, Ho JW. Leakage after resection and intraperitoneal anastomosis for colorectal malignancy: analysis of risk factors. *Dis Colon Rectum* (2006); 49:1719-1725

Cirocchi R, Farinella E, Trastulli S et al. Elective sigmoid colectomy for diverticular disease. Laparoscopic vs open surgery: a systematic review. *Colorectal Dis* (2012); 14:671-683

Compton R, Williams D, Browder W: The beneficial effect of enhanced macrophage function on the healing of bowel anastomoses. *Am Surg.* (1996) 62:14-8

Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE: Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol.* (2001) 70:478-90

Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK: Effects of vitamin A and glucocorticoids upon inflammation and collagen synthesis. *Ann Surg.* (1973) 177:222-7

Erdas E, Zedda A, Pitzalis A, Scano D, Barbarossa M, Aresu S, Licheri S, Pomata M, Farina G: Anastomotic leak following colorectal surgery: incidence, risk factors and treatment. *Chir Ital.* (2009) 61:407-17

Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R: Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. (1990) *ANN N Y Acad Sci* 580 (1):161-175

Goriainov V, Miles AJ: Anastomotic leak rate and outcome for laparoscopic intracorporeal stapled anastomosis. *J Minim Access Surg.* (2008) 4:39-43

Goriainov V, Miles AJ: Anastomotic leak rate and outcome for laparoscopic intracorporeal stapled anastomosis. *J Minim Access Surg.* (2010) 6:6-10

Grommes J, Vijayan S, Drechsler M et al. Simvastatin reduces endotoxin-induced acute lung injury by decreasing neutrophil recruitment and radical formation. *PLoS One* (2012); 7:e3891

Grommes J, Drechsler M, Soehnlein O. CCR5 and FPR1 Mediate Neutrophil Recruitment in Endotoxin-Induced Lung Injury. *J Innate Immun* (2013)

Holte K, Andersen J, Jakobsen DH, Kehlet H: Cyclooxygenase 2 inhibitors and the risk of anastomotic leakage after fast-track colonic surgery. *Br J Surg.* (2009) 96:650-4

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie* 5. Auflage (2002) Spektrum Akademischer Verlag GmbH

Jones OM, John SK, Horseman N, Lawrance RJ, Fozard JB: Low anastomotic leak rate after colorectal surgery: a single-centre study. *Colorectal Dis.* (2007) 9:740-4

Jonsson T, Hogstrom H. Neutrophil-dependent decrease in early wound margin strength. *Arch Surg* (1991); 126:1423-1426

Karliczek A, Harlaar NJ, Zeebregts CJ, Wiggers T, Baas PC, van Dam GM: Surgeons lack predictive accuracy for anastomotic leakage in gastrointestinal surgery. *Int J Colorectal Dis.* (2009) 24:569-76

Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* (2009); 50:261-274

Klein M, Andersen LP, Harvald T, Rosenberg J, Gogenur I: Increased risk of anastomotic leakage with diclofenac treatment after laparoscopic colorectal surgery. *Dig Surg.* (2009) 26:27-30

Klein M, Gögenur I, Rosenberg J: Risk of anastomotic leakage in postoperative treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ugeskr Laeger.* (2010) 31;172:1660-2

Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardway RS, Klosterhalfen B: Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *Eur Surg Res* (2000) 32(1):43-48

Komen N, Dijk JW, Lalmahomed Z, Klop K, Hop W, Kleinrensink GJ, Jeekel H, Ruud Schouten W, Lange JF: After-hours colorectal surgery: a risk factor for anastomotic leakage. *Int J Colorectal Dis.* (2009) 24:789-95

Komen N, Klitsie P, Dijk JW, Slieker 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

Kube R, Mroczkowski P, Steinert R, Sahn M, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H: Anastomotic leakage following bowel resections for colon cancer: multivariate analysis of risk factors. *Chirurg.* (2009) 80:1153-9

Kwak JM, Kim SH, Son DN, Kim J, Lee SI, Min BW, Um JW, Moon HY: The role of laparoscopic approach for anastomotic leakage after minimally invasive surgery for colorectal cancer. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* (2011) 21(1):29-33

Lehmann RK, Brounts LR, Johnson EK, Rizzo JA, Steele SR: Does sacrifice of the inferior mesenteric artery or superior rectal artery affect anastomotic leak following sigmoidectomy for diverticulitis? a retrospective review. *Am J Surg.* (2011) 201:623-7

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

Mansson P, Zhang XW, Jeppsson B et al. Anastomotic healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. *Int J Colorectal Dis* (2002); 17:420-425

Matthiessen P, Strand I, Jansson K, Törnquist C, Andersson M, Rutegård J, Norgren L: Is early detection of anastomotic leakage possible by intraperitoneal microdialysis and intraperitoneal cytokines after anterior resection of the rectum for cancer? *Dis Colon Rectum.* (2007) 50:1918-27

McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ: Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg.* (2005) 92:1150-4

Millan M, García-Granero E, Flor B, García-Botello S, Lledo S: Early prediction of anastomotic leak in colorectal cancer surgery by intramucosal pH. *Dis Colon Rectum* (2006) 49:595-601

Morks AN, Havenga K, ten Cate Hoedemaker HO, Ploeg RJ: C-seal for prevention of anastomotic leakage following colorectal anastomosis. *Ned Tijdschr Geneesk.* (2011) 155:A2812

Neutzling CB, Lustosa SA, Proenca IM, da Silva EM, Matos D: Stapled versus handsewn methods for colorectal anastomosis surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* (2012) Feb 15;2:CD003144. doi: 10.1002/14651858.CD003144.pub2

Pantelis D, Kabba MS, Kirfel J, Kahl P, Wehner S, Buettner R, Hirner A, Kalff JC: Transient perioperative pharmacologic inhibition of muscularis macrophages as a target for prophylaxis of postoperative ileus does not affect anastomotic healing in mice. *Surgery.* (2010) Jul;148(1):59-70. doi: 10.1016/j.surg.2009.12.010

Pantelis D, Beissel A, Kahl P, Vilz TO, Stoffels B, Wehner S, Kalff JC: Colonic anastomotic healing in the context of altered macrophage function and endotoxemia. *Int J Colorectal Dis.* (2011) 26:737-46

Parks TG: Natural history of diverticular disease of the colon. *Clin Gastroenterol.* (1975) 4:53-69

- Pasic F, Salkic NN. Predictive score for anastomotic leakage after elective colorectal cancer surgery: a decision making tool for choice of protective measures. *Surg Endosc* (2013)
- Platell C, Barwood N, Dorfmann G, Makin G: The incidence of anastomotic leaks in patients undergoing colorectal surgery. *Colorectal Dis.* (2007) 9:71-9
- Pschyrembel: klinisches Wörterbuch (2002), de Gruyter Verlag
- Raguse T, Braun J: Rectal cancer--functional results following sphincter-preserving surgery. *Chirurg.* (1983) 54:33-8
- Ricciardi R, Roberts PL, Marcello PW, Hall JF, Read TE, Schoetz DJ: Anastomotic leak testing after colorectal resection: what are the data? *Arch Surg.* (2009) 144:407-11; discussion 411-2
- Rickert A, Willeke F, Kienle P, Post S: Management and outcome of anastomotic leakage after colonic surgery. *Colorectal Dis.* (2010) 216-23
- Ritz JP, Reissfelder C, Holmer C, Buhr HJ: Results of sigma resection in acute complicated diverticulitis : method and time of surgical intervention. *Chirurg.* (2008) 79(8):753-8. doi: 10.1007/s00104-008-1488-8
- Rushfeldt CF, Sveinbjörnsson B, Søreide K, Vonen B: Risk of anastomotic leakage with use of NSAIDs after gastrointestinal surgery. *Int J Colorectal Dis.* (2011)
- Schmedt CG, Bittner R, Schröter M, Ulrich M, Leibl B: Surgical therapy of colonic diverticulitis - how reliable is primary anastomosis? *Chirurg.* (2000) 71:202-8
- Shirafuji T, Oka T, Sawada T, Tamura K, Kishimoto K, Yamamoto S, Nagayasu T, Takahashi T, Ayabe H: The importance of peripheral blood leukocytes and macrophage infiltration on bronchial wall wound healing in rats treated preoperatively with anticancer agents. *Surg Today.* (2001) 31:308-16
- Shogan BD, Carlisle EM, Alverdy JC, Umanskiy K: Do we really know why colorectal anastomoses leak? *J Gastrointest Surg* (2013) Sep;17(9):1698-707
- Sommerville RP, Oberlander SA, Apte SS: Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. (2003) *Genome Biol* 4(6):216-222
- 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
- Soykan I, Toruner M, Sarioglu M, Idilman R: Is pain experienced during liver biopsy an important factor? *J Clin Gastroenterol.* (2002) 35:102-3

- Stoss F, Meier-Ruge W: Neuronal colon dysplasia in adulthood. Diagnosis, clinical aspects and therapy. *Fortschr Med.* (1991) 20;109:424-8
- Stumpf M, Klinge U, Mertens PR: Anastomotic leakage in the gastrointestinal tract-repair and prognosis. *Chirurg.* (2004) 75:1056-62
- Stumpf M, Klinge U, Wilms A et al. Changes of the extracellular matrix as a risk factor for anastomotic leakage after large bowel surgery. *Surgery* (2005); 137:229-234
- Stumpf M, Krones CJ, Klinge U, Rosch R, Junge K, Schumpelick V: Collagen in colon disease. *Hernia* (2006) 10:498-501
- Stumpf M, Junge K, Wendlandt M, Krones C, Ulmer F, Klinge U, Schumpelick V: Risk factors for anastomotic leakage after colorectal surgery. *Zentralbl Chir.* (2009) 134:242-8
- Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis Tissue Repair* (2012); 5 Suppl 1:S27.:S27
- Tadros T, Wobbes T, Hendriks T: Blood transfusion impairs the healing of experimental intestinal anastomoses. *Ann Surg.* (1992) 215:276-81
- Tadros T, Wobbes T, Hendriks T: Opposite effects of interleukin-2 on normal and transfusion-suppressed healing of experimental intestinal anastomoses. *Ann Surg.* (1993) 218:800-8
- Tartter PI, Mohandas K, Azar P, Endres J, Kaplan J, Spivack M: Randomized trial comparing packed red cell blood transfusion with and without leukocyte depletion for gastrointestinal surgery. *Am J Surg.* (1998) Nov;176:462-6
- Telem DA, Chin EH, Nguyen SQ, Divino CM: Risk factors for anastomotic leak following colorectal surgery: a case-control study. *Arch Surg* (2010) 145:371-6; discussion 376
- Tudor RG, Farmakis N, Keighley MR: National audit of complicated diverticular disease: analysis of index cases. *Br J Surg.* (1994) 81:730-2
- Tursi A: Diverticular disease: A therapeutic overview. *World J Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* (2010) 1(1):27-35
- van't Sant HP, Weidema WF, Hop WC, Lange JF, Contant CM: Evaluation of morbidity and mortality after anastomotic leakage following elective colorectal surgery in patients treated with or without mechanical bowel preparation. *Am J Surg.* (2011) 202:321-4

Vignali A, Gianotti L, Braga M, Radaelli G, Malvezzi L, Di Carlo V: Altered microperfusion at the rectal stump is predictive for rectal anastomotic leak. *Dis Colon Rectum*. (2000) 43:76-82

Wind J, Koopman AG, van Berge Henegouwen MI, Slors JF, Gouma DJ, Bemelman WA: Laparoscopic reintervention for anastomotic leakage after primary laparoscopic colorectal surgery. *Br J Surg*. (2007) Dec;94(12):1562-6

Woeste G, Müller C, Bechstein WO, Wullstein C: Increased serum levels of C-reactive protein precede anastomotic leakage in colorectal surgery. *World J Surg*. (2010) 34:140-6

Wolf AM, Henne-Bruns D: Anastomosis dehiscence in the gastrointestinal tract. *Chirurg*. (2002) 73:M118-9

Zingg U, Pasternak I, Dietrich M, Seifert B, Oertli D, Metzger U: Primary anastomosis vs Hartmann's procedure in patients undergoing emergency left colectomy for perforated diverticulitis. *Colorectal Dis*. (2010) Jan;12(1):54-60

## Anhang

Tabelle 1: Übersicht – Vergleich des Mittelwertes, SD, Minima und Maxima der Kontrollgruppe mit der Insuffizienzgruppe

		<b>Gruppe 1</b> (n=76)	<b>Gruppe 2</b> (n=7)	<b>Statistischer Vergleich</b>
<b>Antikörper</b>	<b>Region</b>	<b>Mittelwert und SD (%)</b>	<b>Mittelwert und SD (%)</b>	
<b>CD68</b>	<i>Mukosa</i>	24,39 (± 9,78)	23,45 (± 9,79)	p=0,909
	<i>Submukosa</i>	17,06 (± 10,16)	15,42 (± 6,27)	p=0,896
<b>MPO</b>	<i>Mukosa</i>	6,69 (± 5,79)	10,94 (± 6,16)	p=0,069
	<i>Submukosa</i>	7,15 (± 6,80)	6,65 (± 2,78)	p=0,491
<b>CD3</b>	<i>Mukosa</i>	10,03 (± 8,17)	9,61 (± 9,11)	p=0,961
	<i>Submukosa</i>	3,67 (± 3,09)	3,95 (± 1,99)	p=0,507
<b>MHCII</b>	<i>Mukosa</i>	4,33 (± 6,14)	3,20 (± 3,31)	p=0,863
	<i>Submukosa</i>	7,21 (± 7,14)	5,73 (± 5,10)	p=0,762
<b>TNFR1</b>	<i>Mukosa</i>	21,08 (± 12,13)	18,32 (± 13,47)	p=0,589
	<i>Submukosa</i>	13,78 (± 11,72)	9,01 (± 7,18)	p=0,325
<b>CD11c</b>	<i>Mukosa</i>	3,65 (± 3,48)	2,40 (± 1,75)	p=0,417
	<i>Submukosa</i>	0,72 (± 1,68)	0,20 (± 0,36)	p=0,345
<b>NFκB</b>	<i>Mukosa</i>	10,67 (± 16,54)	11,70 (± 15,25)	p=0,589
	<i>Submukosa</i>	17,89 (± 19,72)	19,77 (± 19,26)	p=0,600

Tabelle 2: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des Patientenkollektivs, differenziert nach Antikörper, Lokalisation der Auswertung in der Darmwand und prozentuale Angabe der positiv gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl

<b>Antikörper</b>	<b>Region</b>	<b>Mittelwert und SD (%)</b>	<b>Minimum (%)</b>	<b>Maximum (%)</b>
<b>CD68</b>	<i>Mukosa</i>	24,31 ± 9,73	2,80	50,09
	<i>Submukosa</i>	16,92 ± 9,87	0	54,64
<b>MPO</b>	<i>Mukosa</i>	7,05 ± 5,90	0,46	32,45
	<i>Submukosa</i>	7,10 ± 6,55	0	43,06
<b>CD3</b>	<i>Mukosa</i>	10,00 ± 8,19	0	30,67
	<i>Submukosa</i>	3,69 ± 3,00	0	15,01
<b>MHCII</b>	<i>Mukosa</i>	4,23 ± 5,95	0	37,55
	<i>Submukosa</i>	7,09 ± 6,98	0	31,81
<b>TNFR1</b>	<i>Mukosa</i>	20,85 ± 12,18	0,28	58,47
	<i>Submukosa</i>	13,38 ± 11,45	0,66	53,94
<b>CD11c</b>	<i>Mukosa</i>	3,55 ± 3,38	0	17,20
	<i>Submukosa</i>	0,68 ± 1,62	0	10,70
<b>NFκB</b>	<i>Mukosa</i>	10,76 ± 16,35	0	72,57
	<i>Submukosa</i>	18,05 ± 19,57	0	73,86

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Dr. med. Marcel Binnebösel, der diese Arbeit durch sein Fachwissen, seine Ideen und Anregungen sowie seine konstruktive Kritik bereichert hat. Des Weiteren bedanke ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. Ulf Peter Neumann. Durch ihn hatte ich die Möglichkeit, in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Aachen, die für diese Arbeit notwendige Forschung zu betreiben. Ein großer Dank gilt auch Ellen Krott und Jolanta Tupiec, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat.

**Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung**

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

**Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung**

Hiermit erkläre ich, **Herr Tim Schuler** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation *„Klinische und immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung inflammatorischer Mediatoren für die Anastomosenheilung nach elektiver laparoskopischer Resektion der Sigmadivertikulitis“* dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Durchführung sämtlicher dargestellter Experimente sowie deren statistische Auswertung.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

A.: Frau Ellen Krott und Frau Jolanta Tupiec (MTAs der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie): Unterstützung bei der Gewebeaufbereitung und den immunhistochemischen Färbungen.

B.: PD Dr. med. Marcel Binnebösel: Studiendesign und -überwachung, Unterstützung bei der Asservierung der Gewebeproben, der statistischen Auswertung und Korrektur der Dissertation.

Tim Schuler

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Herrn Tim Schuler.

Privatdozent Dr. med. Marcel Binnebösel

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Tim Schuler  
Tannenstr. 20  
41517 Grevenbroich  
geboren am 10.06.1986 in Recklinghausen  
verheiratet

### Schulbildung

08/1992 bis 06/1996 | Gustav-Adolf-Grundschule Datteln  
08/1996 bis 06/2005 | Comenius-Gymnasium Datteln, Abschluss mit  
Allgemeiner Hochschulreife

### Zivildienst

08/2005 bis 04/2006 | St. Vincenz-Krankenhaus Datteln

### Hochschulausbildung

10/2006 | Aufnahme des Studiums Humanmedizin an der  
RWTH Aachen  
08/2011 bis 07/2012 | Praktisches Jahr  
11/2012 | 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
(Hammerexamen)

### Berufliche Tätigkeit

04/2013 bis 04/2014 | Assistenzarzt im Zentrum für Orthopädie und  
Unfallchirurgie, Medizinisches Zentrum der  
Städte Region Aachen – Betriebsteil Marienhöhe  
Seit 05/2014 | Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-,  
Viszeral-, Unfall- und Gefäßchirurgie im  
Kreiskrankenhaus Grevenbroich St. Elisabeth