

Martin Chmelnik
Dr. med.

Proteomische und immunhistologische Analysen an Dünndarmanastomosen

Promotionsfach: Chirurgie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. S. Holland-Cunz

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zur experimentellen Beobachtung der intestinalen Anastomosenheilung v.a. die konventionelle Wundhistologie und funktionelle Parameter (Reißfestigkeit, Insuffizienz) eingesetzt. Für die vorliegende Studie wurde ein Verfahren gewählt, welches die Veränderungen des Proteinexpressionsmusters prozentual darstellen und Kandidatenproteine der intestinalen Wundheilung identifizieren kann. Die aus der Proteomforschung stammende Kombination von zweidimensionaler, differentieller Gelelektrophorese und Massenspektrometrie mit anschließender Immunhistologie wurde zur Untersuchung der Wundheilungsdynamik am Darm bisher nicht angewendet. Für die Beobachtung der postoperativen Wundheilung wurde das Modell einer handgenähten Darmanastomose am terminalen Ileum der Ratte gewählt.

Zunächst wurde der postoperative Verlauf von Proteomveränderungen der intestinalen Muskularis an ileo-ilealen Anastomosen untersucht. Es wurde mittels 2D-DIGE der prozentuale Anteil der um den Faktor 2,5 und 5 differentiell regulierten Proteine zwischen Referenz- und Kontrollproben (Tag 1, 2, 7 und 14 nach Darmanastomosierung) bestimmt. Dabei zeigte sich ein dynamischer, monophasischer Verlauf mit kontinuierlicher Abnahme der differentiell regulierten Proteinspots von einem Maximum 24 Stunden postoperativ auf ein Minimum nach 14 Tagen. Die Abnahme der im Vergleich zur Referenzprobe differentiell regulierten Spots im Verlauf der Wundheilung kann als globales Maß für das Fortschreiten der Wundheilung und einer Geweberestitution interpretiert werden - das Anastomosenproteom gleicht sich demzufolge im Wundheilungsverlauf wieder an das Proteom von unverletztem Referenzdarm an.

Im nächsten Schritt wurden massenspektrometrisch insgesamt acht Proteine identifiziert, welche im Verlauf der Anastomosenheilung um mehr als den Faktor 2 differentiell exprimiert waren:

Gel 1 (Muskulatur Referenz – Tag 14):

- +8,7-fach Fibroblast Growth Factor 16
- 5,1-fach Thyroid Receptor-Interacting Protein 13

Gel 2 (Muskulatur Referenz – Tag 2):

- +3,2-fach ERC Protein 2
- +2,3-fach Keratin, type I cytoskeletal 10
- 2,2-fach Vesicle-fusing ATPase

Gel 3 (Schleimhaut Referenz – Tag 1):

- +7,9-fach Actin-related protein 3
- +6,1-fach Keratin, type I cytoskeletal 19
- + 7,3 / +6,9-fach Serotransferrin

Im Anschluss an die Proteinbestimmungen fand die immunhistologische Darstellung eines als Biomarker der intestinalen Wundheilung in Frage kommenden Kandidatenproteins statt. Hierfür wurde FGF16 gewählt. FGF16 wies von allen identifizierten Proteinen die ausgeprägteste differentielle Regulation auf (+8,7-fach), welche auf eine Aktivierung des Proteins im Rahmen der Wundheilung schließen lässt. Es gehört zu einer Wachstumsfaktorenfamilie, deren Mitglieder an der Regulation von Embryogenese, Wundheilung, Angiogenese, neuronaler Regeneration und Zytoprotektion beteiligt sind. Bisher bestanden keine Untersuchungen zur Bedeutung von FGF16 bei der Wundheilung am Darm.

Die semiquantitative, histomorphologische Auswertung von Referenz- und Anastomosenproben (Tag 2, 7, 10, 14) der FGF16-FITC-Färbungen zeigte, dass die Proteinexpression von FGF16 im Dünndarm der Ratte nicht homogen verteilt, sondern im periganglionären Gewebe des Plexus myentericus signifikant am höchsten war. Dies weist auf eine regulatorische Wirkung auf enterische Ganglienzellen hin - für andere Mitglieder der FGF-Familie wurden bereits regulatorische und protektive Funktionen bei retinalen Ganglienzellen nachgewiesen.

Die exemplarisch durchgeführte FGF16-FITC-Färbung an einem kompletten Mausembryo-Sagittalschnitt (Stadium 22, Tag 14 p.c.) zeigte das stärkste Signal in der embryonalen Darmmuskulatur. Zwar wurden bei FGF16-Nullmutanten bisher keine intestinalen Auffälligkeiten beschrieben, die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen jedoch die potentielle Bedeutung von FGF16 für adulten und embryonalen Darm.

Weitere quantifizierende Untersuchungen (u.a. ELISA) zur Bestimmung der FGF16-Gewebekonzentration während der Anastomosenheilung sind notwendig, um die Eignung von FGF16 als Biomarker des Wundheilungsverlaufes zu beleuchten.