

Das chirurgische Trauma: In-vitro Aktivierung intestinaler glatter Muskelzellen und Makrophagen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Anatol Konstantin Rocke
aus Bergisch-Gladbach

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff
2. Gutachter: ~~ÜÖÖ:Ä ^aER: A^||^:~~

Tag der Mündlichen Prüfung: ~~FJÈÈ ÈGÈÈ~~

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hirner

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
EINLEITUNG	8
Postoperative Darmatonie und postoperativer Ileus	8
ZIELSETZUNG	12
MATERIAL UND METHODEN	13
Versuchstiere zur Zellisolation	13
Zellkultur	13
Grundlagen	13
Zellisolation intestinaler Glattmuskelzellen	14
Vaskuläre Glattmuskelzelllinie A7r5	15
Zellisolation von Peritonealmakrophagen	15
Zellisolation muriner dendritischer Zellen	15
Aufreinigung und Anreicherung der Zellkulturen	16
Zellkulturmaterialien, Lösungen und Medien	16
Immunfluoreszenz	18
Zellstretch – mechanisches Trauma in-vitro	20
Grundlagen	20
Indirekte Kokultur von intestinalen Glattmuskelzellen und Makrophagen	21
Probengewinnung	22
Migrationsversuch muriner dendritischer Zellen	22
Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	24
Durchflusszytometrie	25

Statistische Analyse	26
ERGEBNISSE	27
Pilotversuche	27
Aufreinigung der Glattmuskelzellkulturen	29
Reaktion primärer intestinaler Glattmuskelzellen auf ein mechanisches Stretchtrauma	30
Reaktion vaskulärer Glattmuskelzellen auf ein mechanisches Stretchtrauma	32
Reaktion von Makrophagen auf konditionierte Glattmuskelzellüberstände	34
Reaktion von intestinalen Glattmuskelzellen auf konditionierte Makrophagen- Mediumüberstände	36
Reaktion von Gefäßglattmuskelzellen auf konditionierte Makrophagen- Mediumüberstände	38
Migrationsversuch mit murinen dendritischen Zellen	39
DISKUSSION	41
ZUSAMMENFASSUNG	47
LITERATURVERZEICHNIS	49
DANKSAGUNG.....	55
LEBENS LAUF.....	56

Abkürzungsverzeichnis

COX-2	Cyclooxygenase-2
CCL21	Chemokine Ligand 21
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
ICC	Interstitial Cells of Cajal
IL-6	Interleukin-6
IL-1 β	Interleukin-1 β
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare NO-Synthase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hEGF	human Epidermal Growth Factor
hFGF-B	human recombinant Fibroblast Growth Factor
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PgE ₂	Prostaglandin E ₂
POI	Postoperativer Ileus
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SmGM	Smooth Muscle Cell Growth Medium
STAT3	Signal Transducer and Activator 3
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid

Einleitung

Postoperative Darmatonie und postoperativer Ileus

Abdominelle Chirurgie führt fast unweigerlich zu einer temporären Beeinträchtigung der koordinierten propulsiven Darmperistaltik in allen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts (Cannon et al., 1906; Kalff et al., 1998; Livingston und Passaro, 1990). Das Spektrum dieser iatrogenen Störung reicht von der kurzzeitigen Darmatonie bis hin zum schweren paralytischen Ileus (Eckert, 1985). Von Pal bereits 1890 bei Laparotomien an Hunden beschrieben, wird diese Reaktion des Darms auf das Operationstrauma auch heute noch als obligatorische, "physiologische" Reaktion angesehen (Holte und Kehlet, 2000; Pal, 1890). Zahlreiche Studien haben postoperative Darmmotilitätsstörungen hinsichtlich Dauer, Intensität und zeitlichem Ablauf untersucht (Condon et al., 1986; Dubois et al., 1973; Graber et al., 1980; Livingston und Passaro, 1990). Das pathophysiologische Verständnis dieses alltäglichen klinischen Phänomens reichte jedoch bisher nicht aus, um eine über die symptomatische Therapie hinaus gehende Behandlungsstrategie entwickeln zu können (Bauer et al., 2002). Dabei spielt der klinisch-relevante, d.h. über Tage andauernde postoperative Ileus (POI), eine entscheidende Rolle in Morbidität und Mortalität nach Operationen (Livingston und Passaro, 1990; Seenu und Goel, 1995). Der verminderte gastrointestinale Transit führt zu Übelkeit, Erbrechen und distensionsbedingten Schmerzen, einer verlängerten Dauer parenteraler Ernährung und einer erhöhten Aspirations- und Pneumoniegefahr für den Patienten. Der schwere paralytische Ileus kann zu intestinaler Stase mit einer Imbalance im Wasser- und Elektrolythaushalt, einer erhöhten Darmpermeabilität mit bakterieller Überwucherung und schließlich Sepsis und Multiorganversagen führen, der häufigsten Ursache für Mortalität von Schwerkranken (Schwarz et al., 2002). Auch in ökonomischer Hinsicht ist die effiziente Therapie des POI von besonderer Bedeutung: Operationen am Verdauungstrakt rangieren in den USA hinter kardiovaskulären Eingriffen in ihrer Häufigkeit auf dem zweiten Platz – zusammen mit ambulanten Eingriffen geben Studien dort bis zu 10 Millionen Operationen pro Jahr an, ohne die angrenzenden Fächer Urologie, Gynäkologie etc. miteinzubeziehen (Hall und Owings, 2002). Verlängerte

Krankenhausaufenthalte und der intensivierten Therapiebedarf führen zu Mehrkosten von circa einer Milliarde Dollar pro Jahr in den USA (Prasad und Matthews, 1999). Da die genauen pathophysiologischen Hintergründe des POI bisher nicht eindeutig geklärt sind, existieren auch weiterhin widersprüchliche Aussagen über die Beziehung von Operationsausmaß bzw. -dauer und Ausprägung der Darmmotilitätsstörung. Obwohl es nach klinischer Erfahrung plausibel erschien, hatten einige Studien in der Vergangenheit hier keine positive Korrelation feststellen können (Condon et al., 1986).^È Nach der Einführung minimal-invasiver Techniken in der laparoskopischen Chirurgie, die sich in einzelnen Studien durch signifikant kürzere Krankenhausliegezeiten und frühzeitigerer oraler Nahrungsaufnahme im Vergleich zu konventionellen offenen Verfahren ausgezeichnet hatte, wurde die Bedeutung des Traumas durch Laparotomie wieder aktuell (Böhm et al., 1995; Dubois et al., 1990; Garcia-Caballero und Varathornbeck, 1993; Tittel et al., 1996; Uemura et al., 2004). Ergebnisse der Gruppe um Bauer und Kalff haben gezeigt, dass das Ausmaß der Paralyse der zirkulären Darmmuskulatur direkt proportional zum Grad des Traumas ist (Kalff et al., 1998).

Es wurden bisher multiple Ursachen für den POI vorgeschlagen, darunter humorale hemmende Faktoren, Noradrenalin-Freisetzung aus der Darmwand, Anästhesie, neuronale Aktivierung und lokale Inflammation (De Winter et al., 1997; Livingston und Passaro, 1990). Diese verschiedenen Mechanismen sind nicht unabhängig von einander zu betrachten, sondern wirken wahrscheinlich in ihrer jeweiligen Kinetik und diversen Interaktionen kooperativ. Hierbei haben Tierexperimente an Nagetieren gezeigt, dass vor allem drei Hauptelemente an der Entstehung des POI ursächlich beteiligt sind: neuronale, pharmakologische und inflammatorische Mechanismen.

Taché hat ein neuronales Modell über den Einfluss zentraler inhibitorischer Regelkreise mit Freisetzung des Corticotropin Releasing Faktors entwickelt (Taché et al., 1993). De Winter beschreibt die Hemmung der intestinalen Muskelfunktion über inhibierende adrenerge und nitriderge Fasern sowie Freisetzung von Neurotransmittern wie Stickstoffmonoxid (NO) und dem vasoaktiven intestinalen Polypeptid (VIP) (De Winter et al., 1997, 1998). Die neuronalen Effekte betreffen allerdings nur die frühen postoperativen Stunden und es ist unwahrscheinlich, dass sie an der klinisch relevanten

prolongierten Darmmotilitätsstörung, die sich über viele Stunden bis Tage erstreckt, maßgeblich beteiligt sind (Bauer und Boeckxstaens, 2004).

Es existiert bisher noch keine allgemein anerkannte pharmakologische Prävention oder kausale Therapie für die postoperative Darmatonie. Als wirksam zu ihrer Verkürzung bzw. Abmilderung wurde unter anderem die Verwendung kontinuierlicher thorakaler Epiduralblockade mit Lokalanästhetika (Ahn et al., 1988; Liu et al., 1995; Riwar et al., 1992), sowie der frühe orale Kostaufbau bei nur selektivem Einsatz von naso-gastralen Sonden beschrieben (Cheatham et al., 1995; Moss, 1981). In-vivo Studien haben weiterhin gezeigt, dass Opiode rezeptorspezifisch hemmende Wirkung auf die gastrointestinale Motilität haben, was für eine konsequente Opioid-sparende Analgesie zur Prävention des POI spricht (Bauer et al., 1991).

Die dritte vorgeschlagene pathophysiologische Hauptkomponente des POI stellt die Inflammation dar. Erste Erklärungsansätze dazu gaben Livingston, Passaro, sowie Mayer et al., die Entzündungsvorgänge in der Mukosa und in den neuralen Strukturen des Darmes als mögliche auslösende Mechanismen postulierten (Livingston und Passaro, 1990; Mayer et al., 1988). Die Arbeitsgruppe um Bauer und Kalff hat in ihren bisherigen experimentellen in-vivo Studien sowohl an Nagetier- als auch an perioperativen humanen Präparaten ein inflammatorisches POI-Modell entwickeln können, das sich auf Ergebnisse aus Experimenten mit standardisierter chirurgischer Darmmanipulation, Lipopolysaccharidapplikation (LPS) und hämorrhagischem Schock (Ischämie-/Reperfusionsschäden des Darmes) stützt (Eskandari et al., 1997; Kalff et al., 1999a, 1999b, 2003). In der Tunica muscularis externa des Darmes dominiert vor dendritischen Zellen, Neutrophilen, Mastzellen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen ein vom Ösophagus bis zum Kolon reichendes dichtes Netzwerk von ruhenden residenten Makrophagen (Mikkelsen, 1995; Taxi, 1965). Sie liegen in größter Dichte im Dünndarm und stehen in enger Beziehung zu den interstitiellen Zellen von Cajal (ICC), dendritischen Zellen, Glattmuskelzellen und Nerven- und Ganglienzellen des Plexus Myentericus. Gewebsmakrophagen üben eine Wächterfunktion mit umfangreichem Zytokinarsenal aus und stellen die erste Abwehrlinie des Organismus gegen Gewebsverletzungen und bakterielle Translokation dar (Kalff et al., 1998; Mikkelsen, 1995). Es wurde gezeigt, dass neben bakteriellen Toxinen auch chirurgische Manipulation bei Makrophagen zu einer verstärkten Aufregulation von LFA-1, einem

leukozytären Aktivierungsmarker, führt (Hamilton und Adams, 1987; Kalff et al., 1998). Diese aktivierten residenten Gewebsmakrophagen scheinen eine Schlüsselrolle bei der weiteren Entwicklung einer auf ein chirurgisches Trauma folgenden inflammatorischen Kaskade zu spielen: In einer frühen molekularen Phase kommt es von ihnen ausgehend in der Tunica muscularis zur schnellen Aufregulation von iNOS und COX-2, die über ihre Produkte NO und Prostaglandine direkten hemmenden Einfluss auf die Darmmotilität ausüben. Des Weiteren wird die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α , IL-1 β und MCP-1 durch Makrophagen induziert, die zu einer Aufregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und P-Selektin in der Muskularis führen (Kalff et al., 1999b). Hierdurch kommt es zu einer Rekrutierung von leukozytären Zellen (vorwiegend Neutrophile aber auch Monozyten, Mastzellen, T-Zellen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen) aus der Zirkulation. Diese infiltrieren in die Muskularis und lösen dort in einer späten, zellulären inflammatorischen Phase die weitere Freisetzung von NO, Prostaglandinen, Zytokinen, reaktiven Sauerstoffintermediaten und Proteasen aus und bewirken damit den über Tage prolongierten hemmenden Einfluss auf die enterale Darmmotilität (Kalff et al., 1999a). Diese inflammatorische Kaskade spielt sich primär in der Tunica muscularis ab, weshalb sich die weiteren Untersuchungen auf dieses Kompartiment fokussierten (Wehner et al., 2007).

Die bisherigen Erkenntnisse der Gruppe um Bauer, Kalff et al. wiesen auf die residenten Makrophagen als eine entscheidende Zellpopulation in der Pathophysiologie des klinisch relevanten postoperativen Ileus hin. In der Folge wurden weitere in-vivo Experimente durchgeführt, um diese Hypothese durch gezielte Makrophagendepletion bzw. -inhibition zu überprüfen: bei genetisch Makrophagen-defizienten $op^{-/-}$ -Mäusen (Mikkelsen und Thuneberg, 1999), sowie mit Clodronat-Liposomen (D'Souza et al., 1999; Frith et al., 1997; Schmidt-Weber et al., 1996; Van Rooijen et al., 1996) und Gadoliniumchlorid vorbehandelten Ratten zeigte sich nach standardisierter chirurgischer Manipulation eine signifikante Verringerung der Expression proinflammatorischer Mediatoren, Aktivierungsmarker und Adhäsionsmoleküle (IL-6, IL-1 β , MIP-1 α , LFA-1, MCP-1 und ICAM-1), sowie der Phagozyteninfiltration und Inhibition der glatten Muskelfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wehner et al., 2007). Diese Depletionsversuche bestätigten somit eine zentrale Funktion der Makrophagen auf zellulärer Ebene.

Ob sie oder eine andere intestinale Zellpopulation die primären Detektorzellen darstellen, in denen durch mechanischen Stress eine direkte molekulare inflammatorische Antwort induziert wird, konnte präziser nur in isolierten in-vitro Experimenten untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit soll die molekulare Reaktion von primären intestinalen Glattmuskelzellen auf ein mechanisches Trauma analysiert werden. Sie verfügen bekanntermaßen über Stretch-aktivierte Ionenkanäle, die durch äußere mechanische Kräfte aktiviert werden können (Farrugia et al., 1999). Darüber hinaus sollen mögliche traumatisch induzierte zelluläre Interaktionen zwischen Makrophagen und Glattmuskelzellen untersucht werden. Im Zusammenhang mit dem Phänomen des gastrointestinalen "field-effects", also der globalen Funktionsminderung des Gastrointestinaltrakts nach streng lokalem chirurgischen Trauma, gibt es Hinweise auf die besondere Bedeutung dendritischer Zellen, die als immunologische Mediatorzellen an der Ausbreitung der lokalen Entzündungsreaktion beteiligt sein könnten (Koscielny et al, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit soll infolgedessen auch der mögliche Einfluss mechanisch stimulierter Makrophagen auf dendritische Zellen untersucht werden.

Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in einem in-vitro Modell zu überprüfen, ob ein mechanisches Trauma bei intestinalen Glattmuskelzellen eine proinflammatorische Reaktion induziert. Darüber hinaus soll eine molekulare Interaktion zwischen Glattmuskelzellen und Makrophagen nach Trauma untersucht werden. Zudem soll das mechanische Trauma als möglicher Stimulus zur Migration dendritischer Zellen analysiert werden.

Material und Methoden

Versuchstiere zur Zellisolation

Für die Zellisolation von Peritonealmakrophagen sowie zur Verpaarung und Generierung neonataler Tiere wurden Sprague-Dawley-Ratten (200g mittleres Körpergewicht) benutzt. Die erzeugten neonatalen Tiere wurden zur Zellisolation der primären intestinalen Glattmuskelzellen verwendet. Die dendritischen Zellen wurden aus C57BL/6J Mäuse (25g mittleres Körpergewicht) isoliert. Alle Versuchstiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann¹ bezogen. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20°C (+/-2°C), einer relativen Luftfeuchte von 55% (+/-5%) und einem 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Ihre Ernährung erfolgte mit kommerziell erhältlichem Trockenfutter² und Wasser ad libitum.

Die für die Versuche verwendeten Tiere wurden vor allen Eingriffen mit Isofluran³ inhalativ anästhesiert. Vor den abdominalen Operationen wurde die Bauchdecke der Ratten rasiert und mit Alkohol desinfiziert.

Zellkultur

Grundlagen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Zentrifugationsschritte der Zellisolation bei 300xg für 5 Minuten bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und das Nährmedium alle 48 Stunden erneuert. Die Zellzahlen wurden durch mikroskopische Zählung mit einer Zählkammer und die Zellvitalität durch Trypanblaufärbung bestimmt. Alle Zellen wurden 24 Stunden vor den Stretchversuchen in serumfreien Medium inkubiert.

¹ Harlan Winkelmann, Borcheln

² Ssniff, Soest

³ Abbot, Wiesbaden

Zellisolation intestinaler Glattmuskelzellen

Die verwendeten neonatalen Ratten hatten ein Alter von 4 bis maximal 10 Tagen. Ältere Tiere zeigten eine deutliche Verschlechterung von Zellzahl und Vitalität nach der Isolation. Nach Laparotomie wurde der komplette Darm entnommen, auf einem Sylgard®-Dish in eiskaltem HBSS-H aufgespannt und unter einem Stereomikroskop unter Schonung des Mesenteriums von Lymph-, Fettgewebe und Verwachsungen freipräpariert. Der duodenale Darmbereich bis zum Treitz'schen Ligament sowie Kolon, Zökum und 2-3 cm des terminalen Ileums wurden entfernt. Vom terminalen Ende beginnend wurde dann das Mesenterium als schmaler Streifen aus den Darmsegmenten herausgezogen und verworfen. Daraufhin wurde die verbliebene Muskularis von der Mukosa getrennt. Die Muskularispräparate wurden in 4°C kaltem oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer gelagert, in ca. 0,5 x 0,5 mm kleine Stücke zerschnitten und gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in steriler Kollagenase-Lösung für 30 Minuten in einem Schüttelbad inkubiert. Danach wurden die dissoziierten Zellen in 2 ml vorgewärmten EDTA-Trypsin (0,5g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA in HBSS) für weitere 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert, in DMEM-K resuspendiert, durch ein 100µm Zellsieb filtriert, zentrifugiert und in 4°C kaltem MACS-Puffer gelagert. Diese Verdauungsschritte wurden vier- bis fünfmal wiederholt, bis das Gewebe komplett dissoziiert war. Die gewonnenen Zellen wurden auf Kollagen-IV-beschichtete Kulturgefäße in einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro 100mm Zellkulturplatte bzw. 150.000 Zellen pro 6-well-Plattenkavität in einem speziellen Glattmuskelzellwachstumsmedium (SmGM-2)⁴ ausgesät und alle 4 Tage im Verhältnis 1:4 gesplittet. Dazu wurden die Zellen mittels EDTA-Trypsin dissoziiert. In der 3. Passage wurden die Glattmuskelzellen von verbliebenen Muskularismakrophagen magnetisch separiert (siehe unten), in einer Dichte von 150.000 Zellen pro 6-well-Plattenkavität ausgesät und in der 4. Passage bei ca. 95% Konfluenz 24 Stunden vor Versuchsbeginn in serumfreiem DMEM inkubiert.

⁴ Lonza, Vervier (Belgien)

Vaskuläre Glattmuskelzelllinie A7r5

Die kommerziell erworbene Zelllinie A7r5 leitet sich ursprünglich von embryonalen Ratten-Glattmuskelzellen aus der Aorta thoracica ab. Die Zellen wurden in DMEM-Kultiviert und bei Konfluenz nach Dissoziation mit EDTA-Trypsin im Verhältnis 1:4 auf neue Zellkulturplatten gesplittet. Für die Versuche wurden die Zellen in einer Dichte von 150.000 Zellen pro 6-well-Plattenkavität ausgesät und 24 Stunden vor Versuchsbeginn in serumfreiem DMEM inkubiert.

Zellisolation von Peritonealmakrophagen

Bei den Versuchstieren wurde eine aseptische Peritonitis durch intraperitoneale Injektion 3% Thioglykollatmediums⁵ induziert. Die Makrophagen wurden 72 Stunden später durch dreimalige Spülung des Peritoneums der narkotisierten Tiere mit eiskaltem RPMI-Nährmedium gewonnen und mittels Dichtegradientenzentrifugation⁶ für 20 Minuten bei 800xg angereichert. Die gewonnenen Peritonealmakrophagen wurden in den jeweiligen Kulturgefäßen mit einer Dichte von 100.000 Zellen/cm² in DMEM-Nährmedium ausgesät und wie beschrieben kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn in serumfreiem DMEM inkubiert.

Zellisolation muriner dendritischer Zellen

Die Zellen wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6J Mäuse durch Präparation und Spülung der Markhöhle von Femur und Tibia und anschließender Zentrifugation und Filtration durch ein 70-100 µm Zellsieb isoliert und in 70% IMDM (mit 10% FCS) und 30% RI-Medium (konditioniertes Medium einer GM-CSF produzierenden Fibroblasten-Zelllinie) auf 100 mm Petrischalen kultiviert. Nach 7-10 Tagen konnten die differenzierten naiven dendritischen Zellen für die weiteren Untersuchungen mit dem im Anschluss beschriebenen Verfahren angereichert, gezählt und für den unten beschriebenen Migrationsversuch verwendet werden.

⁵ Brewer Thioglycollate Medium, Sigma, Taufkirchen

⁶ Histopaque 1077, Sigma, Taufkirchen

Aufreinigung und Anreicherung der Zellkulturen

Vor allen Versuchen mit Glattmuskelzellen wurden vorhandene residente Muskularismakrophagen durch eine Antikörper-vermittelte magnetische Separierung mit dem BD IMag System⁷ nach Herstellerangaben depletiert, um eine möglichst reine Glattmuskelzellkultur zu erreichen. Für eine negative Selektion (Anreicherung) wurden die unerwünschten Zellen mit biotinylierten monoklonalen CD11b-Antikörpern⁸ für 15 Minuten bei 4°C markiert, mit BD IMag Streptavidin-Partikeln⁷ beladen, magnetisch separiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die CD11b-positive Fraktion wurde verworfen, die Negativfraktion enthielt die angereicherten Glattmuskelzellen und wurde zur weiteren Kultivierung wie beschrieben gezählt und ausgesät.

Mit derselben Technik wurde eine positive Selektion der isolierten murinen dendritischen Zellen durchgeführt. Hierbei wurden die erwünschten Zellen mit anti-Maus CD11c-Biotin-Antikörpern⁹ markiert, magnetisch separiert, gezählt und zu weiteren Versuchen kultiviert. Die Negativfraktion wurde verworfen.

Zur Effizienzkontrolle der CD11b-Eliminierung durch die magnetische Separation wurden in Pilotversuchen Aliquots der Negativfraktion und der primären Muskularismischkultur durchflusszytometrisch verglichen (siehe Ergebnisse).

Zellkulturmaterialien, Lösungen und Medien

Alle Zellkulturmedien, Antibiotika, fetales Kälberserum (FCS, bei 57°C hitzeinaktiviert), "phosphate buffered saline" (PBS), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und EDTA-Trypsin stammten von der Firma Lonza¹⁰, die Kollagenase von Worthington¹¹, DNase und Dispase von Roche¹². Bovines Serumalbumin (BSA), Triton X100, Kollagen-IV,

⁷ BD Biosciences, Erembodegem (Belgien)

⁸ Mouse anti-rat CD11b biotinyliert, Serotec, Düsseldorf

⁹ Biotin Hamster Anti-Mouse CD11c, BD Biosciences, Erembodegem (Belgien)

¹⁰ Lonza, Vervier (Belgien)

¹¹ Worthington, Lakewood, NJ (USA)

¹² Roche, Mannheim

Matrigel, Laminin und Poly-D-Lysin stammten von Sigma¹³. Die Plastikware wurde von der Firma Greiner¹⁴ bezogen.

DMEM-K:

Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 2mM L-Glutamin, 10% FCS, 1000 U/ml Penicillin G und 1000µg/ml Streptomycin.

SmGM-2:

Smooth muscle cell growth medium mit 0,5 ml hEGF, 0,5 ml Insulin, 1 ml hFGF-B, 5% FCS, 0,5 ml GA-1000.

RPMI-K:

RMPI-1640 mit 10% FCS, 1000 U/ml Penicillin G und 1000 µg/ml Streptomycin.

IMDM:

Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 10% FCS.

MACS/IMag-Puffer:

Phosphate buffered saline (PBS) mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA.

Kollagenaselösung, in 50 ml HBSS gelöst:

25 mg Kollagenase Typ II 200 U/mg, 5 mg DNAse I, 120 mg Dispase II, 50 mg BSA.

EDTA-Trypsin:

0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA in HBSS.

¹³ Sigma, Taufkirchen

¹⁴ Greiner, Frickenhausen

*Konzentrationen der Zellkulturgefäßbeschichtungen:*Kollagen IV: 2,5 µg/cm²Laminin 5: 10 µg/cm²Poly-D-Lysin: 5 µg/cm²Matrigel: 6-10 µg/cm²***Immunfluoreszenz***

Die verwendeten intestinalen Glattmuskelzellen und Makrophagen wurden anhand ihrer Expression der zytoskelettalen Glattmuskelzellmarker α -Aktin und Calponin bzw. der spezifischen Makrophagen-Antigene CD163 (ED2) und CD11b (MAC-1) durch Immunfluoreszenz identifiziert. Die auf sterilen Deckgläsern ausgesäten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd (PFA) 30 Minuten lang fixiert, mit 0,1% Triton X100 permeabilisiert und mit einem Blockierungsmedium, bestehend aus PBS und 1% BSA, geblockt. Nach Inkubation im Kühlschrank bei 4°C über 24 Stunden mit dem entsprechenden primären Antikörper wurde die zweite Inkubation mit dem sekundären Fluochrom-konjugiertem Antikörper vor Licht geschützt über eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie¹⁵ ausgewertet. Die Antikörper wurden entsprechend der vom Hersteller angegebenen Konzentrationen verdünnt (**Tabelle 1**). Die Verdünnungslösung bestand aus 0,05M PBS, 0,2% BSA, 1000 U/ml Penicillin G und 1000 µg/ml Streptomycin.

¹⁵ TE-2000, Nikon, Düsseldorf

Antikörper	Konzentration	Spezifität
ED2 mouse-anti-rat IgG ₁ ¹⁶	Stock: 0,5 mg/ml Verdünnung: 1:100	Ratte: residente Makrophagen
CD11b (MAC-1) mouse-anti-rat IgG _{2α} biotinyliert ¹⁷	Stock: 0,1 mg/ml Verdünnung: 1:100	Ratte: residente Makrophagen
α-Aktin mouse anti-rat IgG _{2α} ¹⁸	Stock: 0,2 mg/ml Verdünnung: 1:200	Ratte: Glattmuskelzellen
Anti-Calponin IgG ₁ Klon hCP ¹⁹	Stock: 0,2 mg/ml Verdünnung: 1:50	Ratte: Glattmuskelzellen
Goat-anti-mouse IgG _{2α} ²⁰ Fluochrom: Alexa 488	Stock: 2 mg/ml Verdünnung: 1:200	sek. Antikörper gegen Maus-IgG
Goat-anti-mouse IgG ₁ ²⁰ Fluochrom: Alexa 568	Stock: 2mg/ml Verdünnung: 1:200	sek. Antikörper gegen Maus-IgG
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) ²¹	Stammlösung: 1–5 mg/ml Arbeitslösung: 1 µg/ml	DNA

Tabelle 1: Aufstellung der zur Immunfluoreszenz verwendeten primären und sekundären Antikörper und Fluochromen mit Angabe der verwendeten Konzentrationen und Spezifitäten.

¹⁶ Serotec, Düsseldorf

¹⁷ BD Biosciences, Heidelberg

¹⁸ Dianova, Hamburg

¹⁹ Sigma, Taufkirchen

²⁰ Invitrogen, Karlsruhe

²¹ Roche, Mannheim

Zellstretch – mechanisches Trauma in-vitro

Grundlagen

Um das chirurgische Trauma in-vitro zu simulieren, wurden die Zellen in den oben angegebenen Zelldichten auf 6-well-Kulturgefäße mit flexiblen Kollagen-I-beschichteten Bioflex-Membranen²² ausgesät, im Inkubator auf BioFlex® Loading Stations™²³ aufgesetzt, wie beschrieben kultiviert und jeweils 24 Stunden vor dem Stretchversuch in FCS-freiem Nährmedium inkubiert. Vor Stretchbeginn wurde bei den Glattmuskelzellen eine hundertprozentige Konfluenz erreicht. Als Kontrollen dienten Zellen, die auf Kollagen-IV-beschichteten 6-well-Kulturgefäßen ausgesät wurden. Mittels der im System integrierten, computerkontrollierten Vakuumeinheit FX-4000²⁴ wurde auf die flexiblen Membranen über die Zylinder der Loading Stations ein equi-biaxialer Stretch ausgeübt (**Abb.1**). Das verwendete Stretchmuster bei allen Versuchen entsprach graphisch dargestellt einer Halbsinuskurve mit 0,5 Hz Frequenz und einem Elongationsmaximum der Membranen von bis zu 20%. Die Stretchdauer betrug insgesamt 65 Minuten, bestehend aus zwei Stretchepisoden über 30 Minuten und einem dazwischenliegenden stretchfreien Intervall von 5 Minuten. Die Zellen wurden im Anschluss wie beschrieben gewonnen, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

²² Flexcell BioFlex culture plates, Dunn Labortechnik, Asbach

²³ Flexcell LS-3000B, Dunn Labortechnik, Asbach

²⁴ FX-4000 Flexcell Tension System, Dunn Labortechnik, Asbach

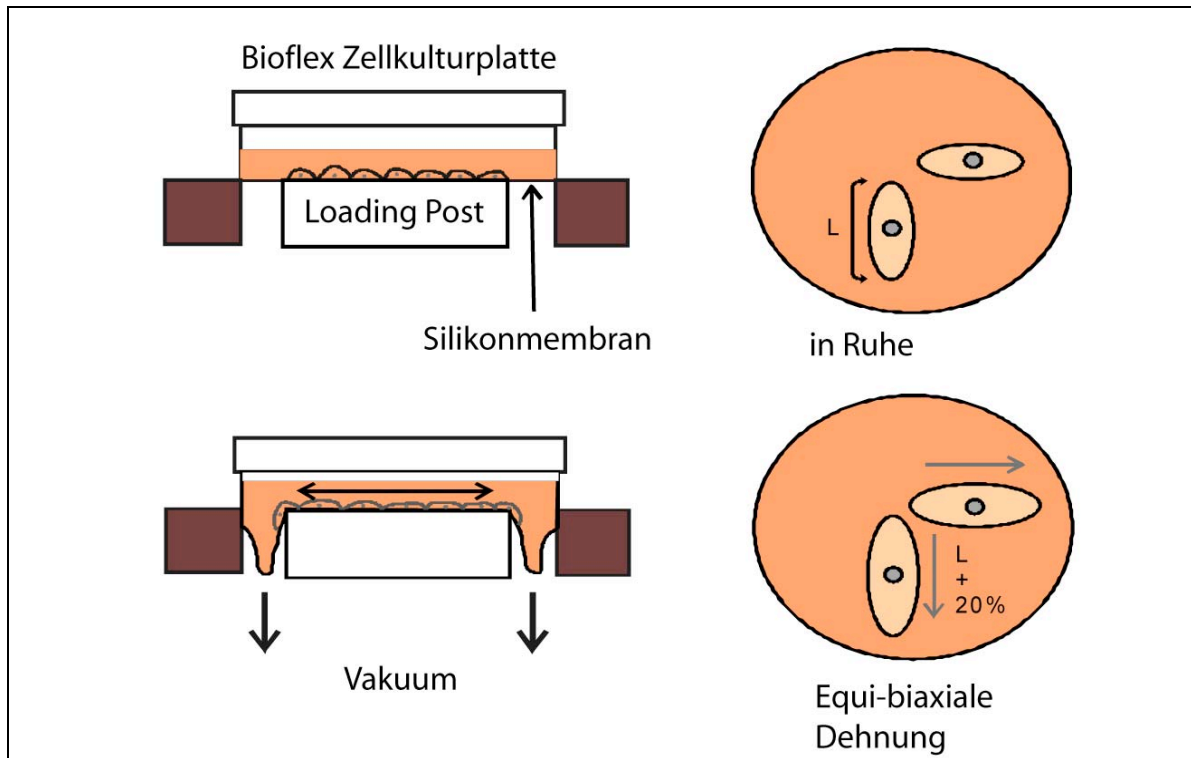


Abb. 1: Die Bioflexzellkulturplatten mit ausgesäten Zellen schematisch in Seitansicht und in Aufsicht, in Ruhe und in Dehnung. Durch den angelegten Unterdruck werden die flexiblen Membranen über die in der Grundplatte fixierten Plastikstutzen (loading posts) gezogen und equi-biaxial um bis zu 20% gedehnt.

Indirekte Kokultur von intestinalen Glattmuskelzellen und Makrophagen

Um eine zelluläre Interaktion zwischen Glattmuskelzellen und Makrophagen nach mechanischem Trauma zu untersuchen, wurde ein indirektes Kokulturmodell entwickelt. Da residente Makrophagen der Tunica muscularis nicht in ausreichender Menge isoliert werden konnten, wurden für die Versuche in dieser Arbeit Peritonealmakrophagen verwendet (**Abb.2**). Für das Kokulturmodell wurde der eine Zelltyp jeweils in dem durch Stretchtrauma konditionierten Mediumüberstand des anderen inkubiert und durch quantitative PCR auf molekulare Aktivierungs- und Entzündungsmarker analysiert. Die Glattmuskelzellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet und dem standardisierten Stretchtrauma ausgesetzt. Die Mediumüberstände wurden 6 Stunden danach gewonnen, schockgefroren und bei -80°C gelagert. In einem zweiten Schritt wurde eine Makrophagenkultur mit den konditionierten Überständen der Glattmuskelzellen zunächst entsprechend der Dauer eines Stretchversuchs (65 Minuten) inkubiert und die Zellen

danach zu den festgelegten Zeitpunkten gewonnen, schockgefroren und gelagert. Als Kontrollen dienten Makrophagen, die parallel in Mediumüberständen ungestretchter Glattmuskelzellen inkubiert wurden. Um die Wirkung von konditionierten Makrophagenüberständen auf Glattmuskelzellen zu untersuchen, wurde in umgekehrter Richtung verfahren.

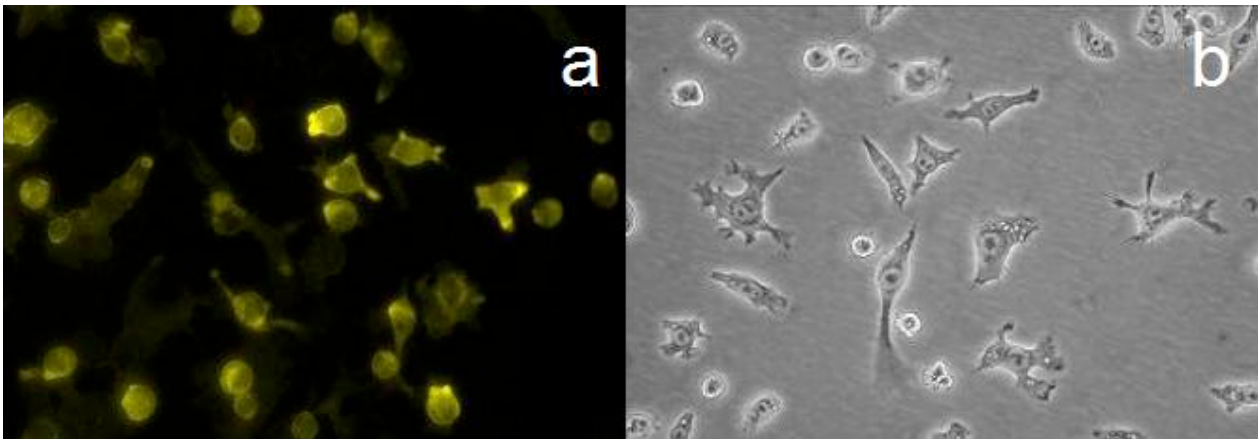


Abb.2: a) Fluoreszenzmikroskopische (400x Vergrößerung, F4/80-positiv) und b) lichtmikroskopische Zellkulturbilder (400x Vergrößerung, Phasenkontrastaufnahme) isolierter Peritonealmakrophagen.

Probengewinnung

Alle Stretchversuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Zu den festgelegten Zeitpunkten nach Stretchtrauma bzw. Inkubation mit den konditionierten Überständen wurden die Zellproben mit PBS gewaschen, von den Kulturgefäßen mit einem Zellschaber abgelöst, erneut gewaschen, durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 300xg pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zellmediumüberstände wurden 6 Stunden nach Stretchtrauma abpipettiert, für 5 Minuten bei 300xg zentrifugiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Migrationsversuch muriner dendritischer Zellen

Es sollte im Mausmodell untersucht werden, ob konditionierte Überstände von mechanisch gestreckten Peritonealmakrophagen einen aktivierenden Einfluss auf

dendritische Zellen ausüben. Hierzu wurde ein Transwell-Assay durchgeführt²⁵ (**Abb.3**). In das untere Kompartiment wurden 600 µl IMDM Medium (mit 0,5% BSA) pipettiert. Dann wurden 250.000 murine dendritische Zellen in 100 µl IMDM Medium in das obere Kompartiment ausgesät und für eine Stunde bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurde das Medium im unteren Kompartiment durch folgende Ansätze ersetzt:

- 1) Das chemotaktische Chemokin CCL21²⁶ in einer finalen Konzentration von 200 ng/ml (Stock: 20 µg/ml) in IMDM als Positivkontrolle (CCL21+).
- 2) IMDM ohne Supplemente als Negativkontrolle (CCL21-).
- 3) Konditioniertes Kulturmedium von Peritonealmakrophagen, die dem oben beschriebenen Dehnungstrauma ausgesetzt und danach für weitere 24 Stunden kultiviert worden waren (Stretch).
- 4) Unkonditionierter Überstand von Peritonealmakrophagen, die als Kontrolle 24 Stunden auf den flexiblen Membranen kultiviert worden waren (CTL).
- 5) Je eine Fraktion von beiden Überständen (Stretch und CTL), die jeweils durch ein Zentrifugationsröhrchen (Amplicon) mit einem cut-off von 5kD zweifach aufkonzentriert wurden (Stretch konz. und CTL konz.)

Durch die Aufkonzentrierung sollten Messfehler durch zu geringe Mengen liberierter Mediatoren verhindert werden. Das Experiment wurde jeweils im Triplikat durchgeführt. Nach 5 Stunden Inkubation wurde die Anzahl der in das untere Kompartiment gewanderten dendritischen Zellen mittels durchflusszytometrischer Messung bestimmt. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurden analytische Testpartikel einer einheitlichen Größe in determinierter Zahl der zu messenden Probe zugefügt. Die Größenunterschiede zwischen Zellen und Testpartikel erlaubte eine genaue Auszählung und somit eine absolute Zellzahlbestimmung.

²⁵ Transwell, Corning, 5µm Porengröße, Polycarbonat

²⁶ R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

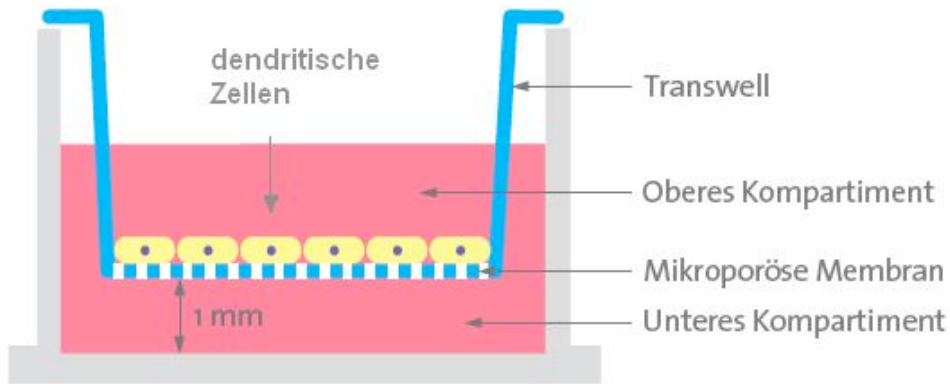


Abb.3: Schematische Darstellung des Transwell-Assays zur Untersuchung der Wirkung von konditionierten Makrophagenüberständen auf die Migration dendritischer Zellen. Die mikroporöse Membran zwischen oberem und unterem Kompartiment mit einer Porengröße von 5 μm erlaubt eine optimale Adhäsion der im oberen Kompartiment ausgesäten dendritischen Zellen, eine natürliche Aufnahme und Sekretion von Molekülen sowohl auf basaler als auch auf apikaler Seite und die Migration der Zellen in das untere Kompartiment.

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Gesamt-RNA wurde aus zu den festgelegten Zeitpunkten entnommenen Proben extrahiert. Zur Extraktion der RNA wurde das RNeasy Mini Extraction Kit von Qiagen verwendet²⁷, gefolgt von einer Behandlung mit DNase-I von Ambion²⁸. Die RNA-Konzentration und -reinheit wurden spektrophotometrisch bestimmt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Omniscript RT kit von Qiagen. Die mRNA-Expression wurde in Triplikaten durch eine quantitative PCR bestimmt. Die Primersequenzen sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Der PCR-Reaktionsmix wurde mit dem SYBR Green PCR Mastermix von Applied Biosystems²⁹ zubereitet und die cDNA-Amplifikation (mit 10 μg cDNA pro Ansatz) mit dem AbiPrism 7900 HT Cyclyer über 40 Zyklen (95°C x 15 Sekunden, 60°C x 1 Minute) durchgeführt. Zur relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta C_T$ – Methode verwendet, wie vom Hersteller beschrieben³⁰.

²⁷ Qiagen, Hilden

²⁸ Ambion, Austin, Texas (USA)

²⁹ Applied Biosystems, Darmstadt

³⁰ User Bulletin 2, Applied Biosystems, Branchburg, NJ (USA)

mRNA	Primer-Sequenz
IL-6	5'-CCACTGCCTTCCCTACTTCA-3' (vorwärts) 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3' (rückwärts)
iNOS	5'-CCATGCATAATTTGGACTTGCA -3' (vorwärts) 5'-GGAGAGATTTTTTACGACACCC -3' (rückwärts)
GAPDH	5'- CGCTCCTGGAAGATGGTGAT -3' (vorwärts) 5'- ACGGCACAGTCAAGGCTGAGA -3' (rückwärts)
COX-2	5'-TCAGACCTTCCTTGTACGTCAGATT-3' (vorwärts) 5'-CCATCGTTTAGGACAGAACATCAC-3' (rückwärts)

Tabelle 2: Sequenzen der in der quantitativen PCR verwendeten Primer.

Durchflusszytometrie

Mittels der Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) lassen sich Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen erfassen. Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht eine Färbung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Die gefärbten Zellen werden über einen laminaren Flüssigkeitsstrom im Gerät vereinzelt und der Farbstoff mittels eines Lasersignals angeregt. Intensität und Streuung des Signals lassen Rückschlüsse auf Markierungsstärke, Zellgröße und –granularität zu. Die Analyse wurde an einem LSRII³¹ und einem BD FACS Canto³¹ durchgeführt. Die Daten wurden mittels FlowJo™ 6.3.4 ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die durchflusszytometrische Messung für die Auswertung des Migrationsversuchs muriner dendritischer Zellen verwendet. Um die durch die mikroporöse Membran migrierten murinen dendritischen Zellen zu zählen, wurden diese nach 5 Stunden Inkubationszeit aus dem unteren Kompartiment

³¹ Becton Dickinson, Heidelberg

entnommen, zentrifugiert und mittels CD11c-FITC nach Herstellerangaben gefärbt. Danach wurden die Zellen in 200µl IMag Puffer aufgenommen, 50µl verdünnte FACS Kalibrationsbeads (24.000 Beads/ml) zugegeben und im FACS eingemessen. Das Verfahren ermöglicht die Zählung sowohl der durch die Kapillare fließenden CD11c-FITC markierten Zellen, als auch der fluoreszierenden Beads. Da die Konzentration der Beads und das Volumen des durchflossenen Zellmediums bekannt ist, kann die Gesamtzellzahl in jeder Probe errechnet werden.

Statistische Analyse

Berechnet und analysiert wurden die Mittelwerte (Standardabweichungen (+/-)). Zur Auswertung der Signifikanz kam eine two-way ANOVA (analysis of variance) mit Bonferroni-Post-Test oder ein ungepaarter Student T-Test zur Anwendung. Unterschiede bei einem p-Wert <0,05 wurden als signifikant angesehen, Unterschiede bei einem p-Wert von <0,001 als hochsignifikant.

Ergebnisse

Bisherige Studien haben gezeigt, dass im Rahmen abdomineller Eingriffe eine chirurgische Manipulation zu einer Aktivierung des dichten intestinalen Makrophagennetzwerks, zu einer Aufregulation von Adhäsionsmolekülen und Extravasation von Leukozyten innerhalb der Tunica muscularis führt (Kalff et al., 1998, 1999). Damit wurde den residenten Makrophagen eine Schlüsselrolle in der inflammatorischen Pathogenese der postoperativen Darmatonie zugewiesen. Welche intestinalen Zellen die primären Detektoren eines mechanischen Traumas darstellen oder inwiefern hierdurch eine Interaktion von Makrophagen mit anderen intestinalen Zellpopulationen besteht, wurde im Rahmen dieser Arbeit an intestinalen Glattmuskelzellen und dendritischen Zellen untersucht. Als Vergleichsgruppe zu den intestinalen Glattmuskelzellen wurde der mechanische Stretchreiz auch an Kulturen der Aortenglattmuskelzelllinie A7r5 appliziert, deren Aktivierbarkeit in der Literatur bereits eingehend beschrieben wurde (Zampetaki et al., 2005). Dies ermöglicht die Differenzierung zwischen einer möglichen generellen und einer organspezifischen Reaktion glatter Muskelzellen auf ein mechanisches Trauma.

Pilotversuche

Um ausreichend primäre Glattmuskelzellen kultivieren zu können, wurde eine neue Isolationsmethode etabliert. Durch Verwendung neonataler Ratten konnte eine signifikante Verbesserung von Zellzahl, Vitalität und Proliferationskompetenz im Vergleich mit Zellen adulter Tiere erreicht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen IV im Vergleich zu Matrigel, Laminin 5, Poly-D-Lysin oder unbeschichteten Kulturgefäßen zu einer schnelleren Differenzierung mit früherem Ausspreiten der Zellen und stärkerer Adhärenz führte (**Abb.4**).

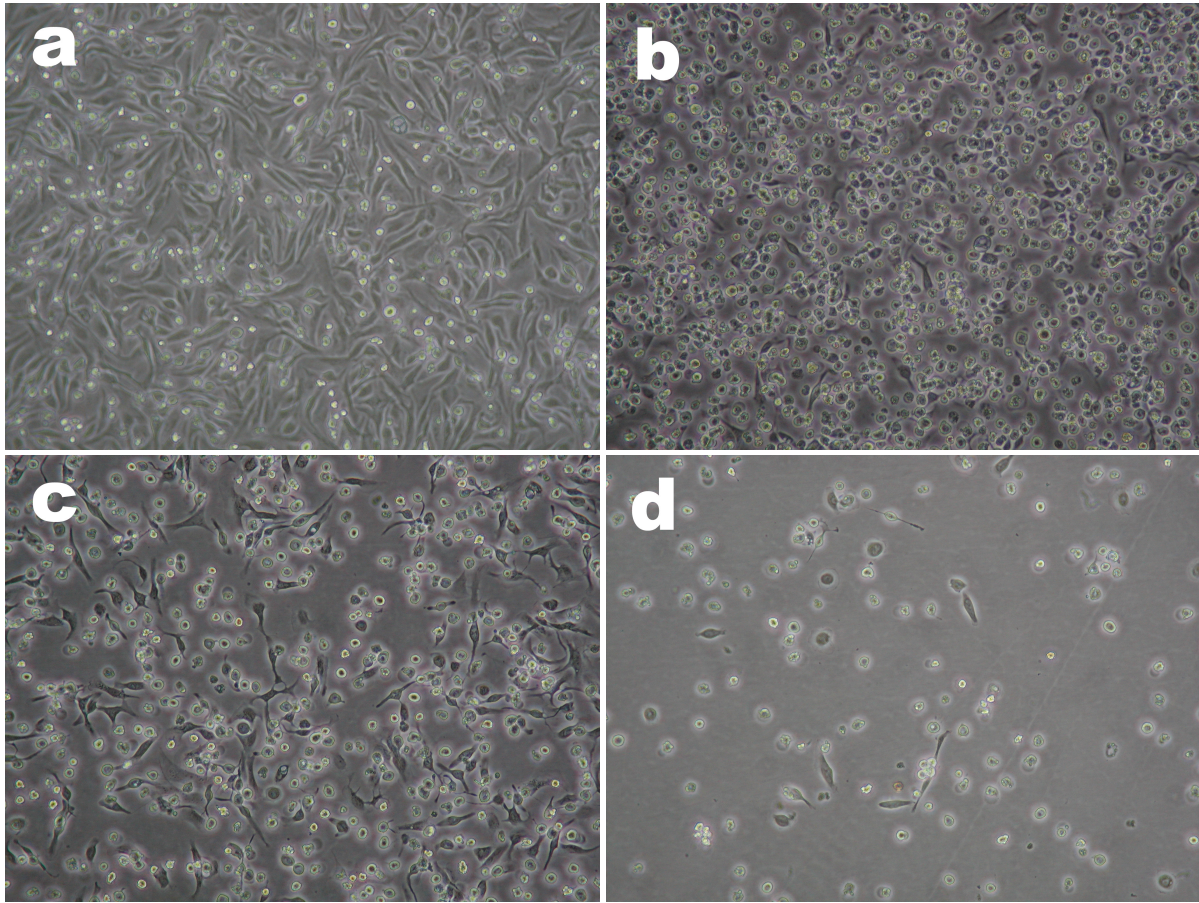


Abb.4: Lichtmikroskopische Zellkulturbilder (100x Vergrößerung, Phasenkontrastaufnahme) primärer intestinaler Rattenglattmuskulzellen 18 Stunden nach Isolation. Beschichtungen: a) Kollagen IV, b) Matrigel, c) Laminin 5 und d) Poly-D-Lysin. Dargestellt ist die deutlich erhöhte Zelldichte und vorangeschrittene Zelldifferenzierung in (a) im Vergleich zu (b) - (d).

Aufreinigung der Glattmuskelzellkulturen

Immunfluoreszenzfärbungen isolierter intestinaler Glattmuskelzellen zeigten nach 2 Wochen eine Mischkultur mit CD11b-positiven Muskularismakrophagen (Ergebnisse nicht gezeigt). Ihr möglicher kontaminierender Einfluss auf die molekulare Reaktion der isolierten Glattmuskelzellen auf ein Stretchtrauma sollte minimiert werden. Die Makrophagen wurden durch eine negative Selektion mittels Antikörper-vermittelter magnetischer Separierung nahezu gänzlich entfernt, ohne die Vitalität und Proliferationskompetenz der Glattmuskelzellen zu beeinflussen. Durchflusszytometrisch konnte in Pilotversuchen eine Reduktion des Gehalts von CD11b-positiven Zellen in der Mischkultur von ca. 0,5% auf unter 0,01% in der Glattmuskelzellpopulation (Negativfraktion) gemessen werden (**Abb.5**).

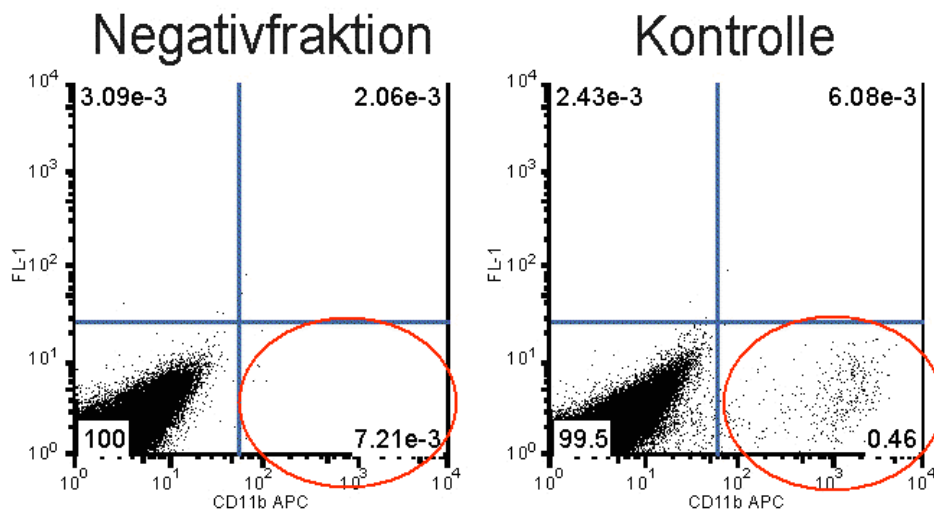


Abb. 5: Durchflusszytometrische Messung der Anreicherung von Glattmuskelzellen durch negative Selektion: CD11b-positive Makrophagen wurden mit einer Antikörper-vermittelten magnetischen Separierung (BD IMag System) entfernt. Die Muskularismischkultur (Kontrolle) enthielt etwa 0,5% CD11b-positive Zellen, deren Anteil in der aufgereinigten Glattmuskelzellkultur (Negativfraktion) auf unter 0,01% reduziert wurde.

Reaktion primärer intestinaler Glattmuskelzellen auf ein mechanisches Stretchtrauma

Es wurde mittels quantitativer PCR untersucht, welche Auswirkung das standardisierte Stretchtrauma bei intestinalen Glattmuskelzellen auf die mRNA-Expression der Aktivierungs- und Entzündungsmarker IL-6, COX-2 und iNOS hat. Die Probenentnahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0,5; 1; 3; 6 und 24 Stunden nach Stretch. Wie in den **Abb.6 und 7** dargestellt, zeigte sich über den gesamten analysierten Zeitraum keine signifikant erhöhte Expression der untersuchten Zytokine im Vergleich zu ungestreckten Zellen. Die Expression von iNOS lag unter der Nachweisgrenze der verwendeten Messmethode.

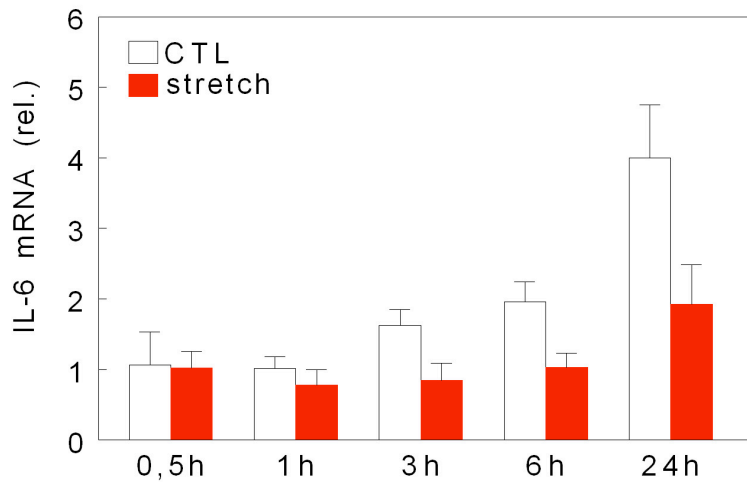
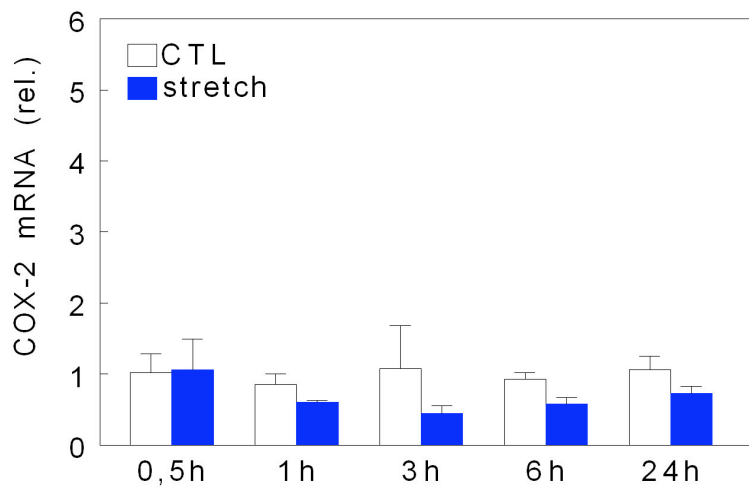
**Abb.6****Abb.7**

Abb. 6 und 7: Reaktion primärer intestinaler Glattmuskelzellen auf das Stretchtrauma (stretch). Es zeigte sich über 24 Stunden in der qPCR kein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und COX-2 im Vergleich zu ungestreckten Zellen (CTL).

Reaktion vaskulärer Glattmuskelzellen auf ein mechanisches Stretchtrauma

Als Vergleichsgruppe wurde die Auswirkung des Stretchtraumas auf die Gefäßglattmuskellinie A7r5 ermittelt (**Abb.8-10**). IL-6 wurde in gestreckten Zellen im Vergleich zu den ungestreckten Kontrollzellen signifikant vermehrt exprimiert (10,66 +/-2,81 vs. 0,74 +/-0,02 nach einer Stunde bzw. 3,30 +/-1,11 vs. 0,68 +/-0,08 nach 3 Stunden). Es zeigte sich ein Maximum bei einer Stunde. Die Expression lag nach 24 Stunden wieder auf dem Niveau der Kontrollen. Bei COX-2 konnte ein früher signifikanter Anstieg nach 30 Minuten (8,18 +/-1,27 vs. 1,0 +/-0,03) gemessen werden, der eine Spitze bei einer Stunde (19,70 +/-7,32 vs. 0,74 +/-0,08) zeigte und nach 24 Stunden wieder auf das Niveau der basalen Expression der Kontrollzellen abgesunken war. Es konnte im Vergleich zu den Kontrollen kein signifikanter Einfluss des Stretchtraumas auf die Expression von iNOS beobachtet werden.

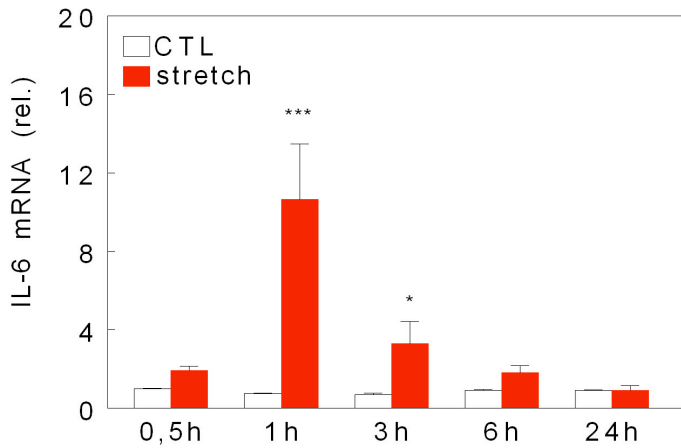


Abb.8

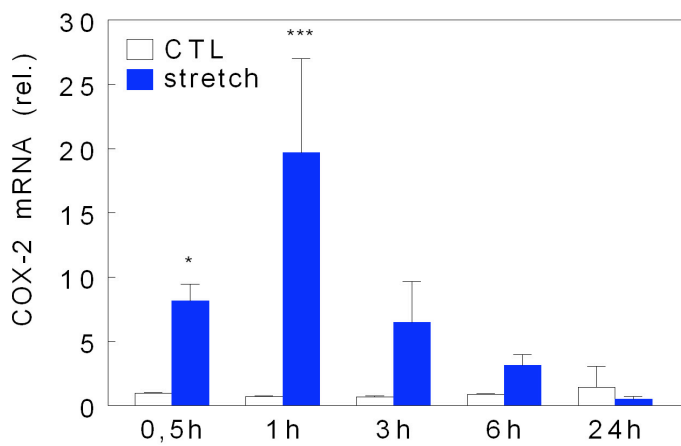


Abb.9

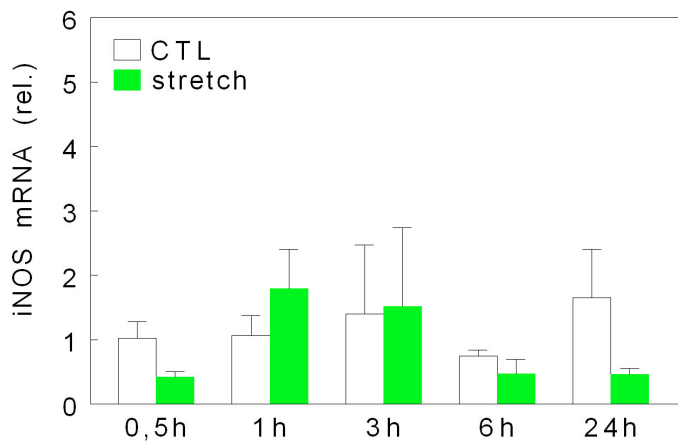


Abb.10

Abb. 8-10: Reaktion vaskulärer Glattmuskelzellen der Zelllinie A7r5 auf das Stretchtrauma (stretch) im Vergleich zu ungestreckten Zellen (CTL): In der qPCR zeigte sich eine signifikante Zunahme von IL-6 nach einer und 3 Stunden sowie bei COX-2 nach 30 Minuten und einer Stunde. Beide Zytokine wiesen ein Maximum bei einer Stunde auf. Es konnte keine signifikant erhöhte Induktion von iNOS nachgewiesen werden.

Reaktion von Makrophagen auf konditionierte Glattmuskelzellüberstände

Das direkte Stretchtrauma führte bei intestinalen Glattmuskelzellen nicht zur vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine und kinetisch aktiver Substanzen. Im Weiteren wurde daher untersucht, ob sie als Reaktion auf ein Stretchtrauma durch die Freisetzung bisher unbekannter Mediatoren eine Aktivierung von Makrophagen bewirken. Letztere wurden hierfür in zellfreiem Medium von gestreckten Glattmuskelzellen inkubiert und ihre Zytokin-Expression zu den Zeitpunkten 1, 3, 6, 9 und 24 Stunden nach Inkubation mittels qPCR untersucht.

Hierbei ergab sich im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit Mediumüberständen ungestreckter Glattmuskelzellen kultiviert wurden, eine signifikante Aufregulation von COX-2 nach 3 Stunden (2,46 +/-0,31 vs. 1,02 +/-0,27) und 6 Stunden (1,98 +/- 0,27 vs. 0,63 +/-0,1). Das Maximum lag bei 3 Stunden und näherte sich bereits ab 9 Stunden dem Niveau der Kontrollen. Ebenso konnte eine signifikante Zunahme von iNOS (2,47 +/-0,89 vs. 1,03 +/-0,32) und IL-6 (2,05 +/-0,29 vs. 1,01 +/-0,13) nach 3 Stunden festgestellt werden, die nach 12 Stunden wieder auf Höhe der Kontrollen lag (**Abb.11-13**).

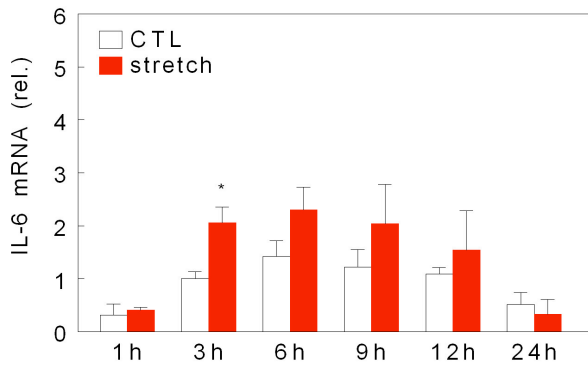


Abb.11: Peritonealmakrophagen zeigten nach Inkubation in konditionierten Überständen primärer Glattmuskelzellen (stretch) in der qPCR eine signifikante Zunahme der Expression von IL-6 nach 3 Stunden im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit Mediumüberständen ungestreckter Glattmuskelzellen kultiviert wurden (CTL).

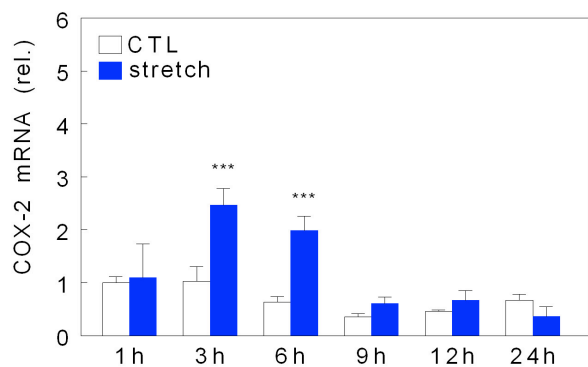


Abb.12: Nach Inkubation in konditionierten Überständen primärer Glattmuskelzellen (stretch) reagierten Peritonealmakrophagen mit einer signifikanten Zunahme der Expression von COX-2 nach 3 und 6 Stunden mit einem Maximum nach 3 Stunden im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit unconditionierten Glattmuskelzellmediumüberständen kultiviert wurden (CTL).

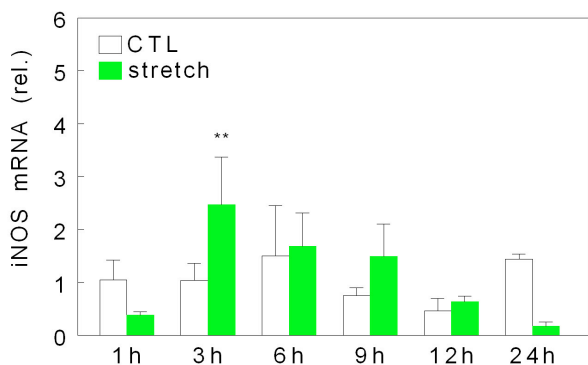


Abb.13: Peritonealmakrophagen zeigten nach Inkubation in konditionierten Überständen primärer Glattmuskelzellen (stretch) eine signifikant erhöhte Expression von iNOS nach 3 Stunden auf im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit Mediumüberständen ungestreckter Glattmuskelzellen kultiviert wurden (CTL).

Reaktion von intestinalen Glattmuskelzellen auf konditionierte Makrophagen-Mediumüberstände

Die Inkubation der primären Glattmuskelzellen in konditioniertem Mediumüberstand von Peritonealmakrophagen resultierte im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit Mediumüberständen ungestretchter Peritonealmakrophagen kultiviert wurden, in einer Zunahme der iNOS Expression. Sie erreichte nach 3 Stunden (3,35 +/-0,85 vs. 1,01 +/- 0,19), 6 Stunden (4,0 +/-0,45 vs. 0.62 +/-0,24) und 9 Stunden (2.61 +/-0.4 vs. 0.76 +/- 0.53) signifikante Werte und wies nach 6 Stunden ein Maximum auf. Nach 24 Stunden war sie wieder auf das Expressionslevel der Kontrollzellen abgesunken. Es fand keine Induktion der Zytokine COX-2 und IL-6 statt (**Abb.14-16**).

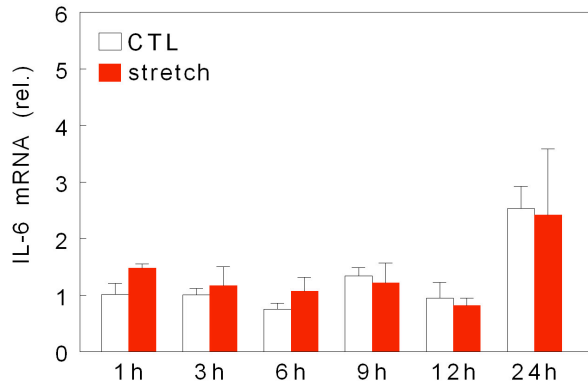


Abb.14: Primäre intestinale Glattmuskelzellen zeigten nach Inkubation in konditionierten Überständen von Peritonealmakrophagen (stretch) im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit Mediumüberständen ungestreckter Peritonealmakrophagen kultiviert wurden (CTL), keine signifikant erhöhte Expression von IL-6.

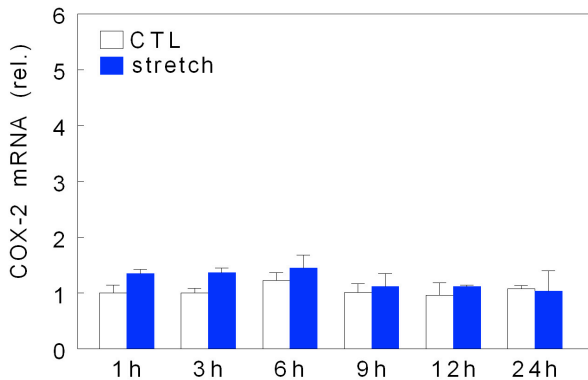


Abb.15: Nach Inkubation in konditionierten Mediumüberständen von Peritonealmakrophagen zeigte sich bei primären intestinalen Glattmuskelzellen keine signifikante Zunahme der Expression von COX-2 gegenüber den Kontrollzellen.

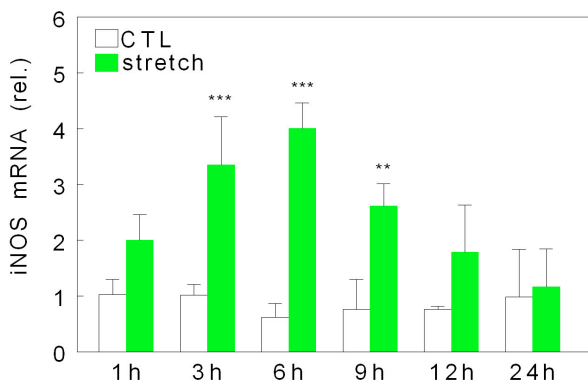


Abb. 16: Primäre intestinale Glattmuskelzellen reagierten auf die Inkubation in konditionierten Überständen von Peritonealmakrophagen (stretch) im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit Mediumüberständen ungestreckter Peritonealmakrophagen kultiviert wurden (CTL), mit einer signifikant erhöhten Expression von iNOS nach 3, 6 und 9 Stunden mit einem Maximum bei 6 Stunden.

Reaktion von Gefäßglattmuskelzellen auf konditionierte Makrophagen-Mediumüberstände

Die Inkubation der Gefäßmuskelzelllinie A7r5 in konditionierten Peritonealmakrophagenüberständen im Vergleich zu Mediumüberständen ungestretchter Peritonealmakrophagen bewirkte eine signifikant erhöhte Expression von iNOS nach 3 Stunden (54,11 +/-2,88 vs. 0,84 +/-0,28), 6 Stunden (49,17 +/-5,11 vs. 0,48 +/-0,26) und 12 Stunden (9,03 +/- 4,62 vs. 0,52 +/-0,22). Sie erreichte ihr Maximum nach 3 Stunden und lag nach 24 Stunden auf dem Niveau der Kontrollen. Die mRNA von COX-2 und IL-6 zeigte keine erhöhte Expression (**Abb.17**).

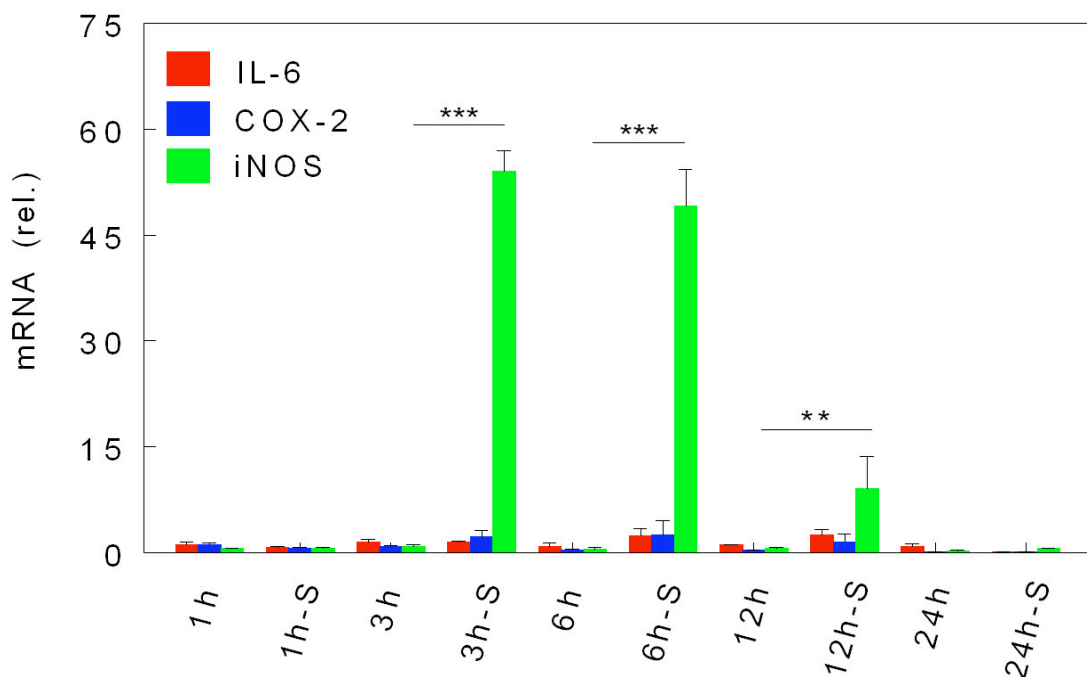


Abb. 17: Gefäßglattmuskelzellen (A7r5) zeigten in der qPCR nach Inkubation in konditionierten Überständen von Peritonealmakrophagen (-S) im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit Mediumüberständen ungestretchter Peritonealmakrophagen kultiviert wurden, eine signifikant erhöhte Expression von iNOS bei 3, 6 und 12 Stunden. Sie wies ein Maximum bei 3 Stunden auf. IL-6 und COX-2 zeigten keine signifikanten Reaktionen.

Migrationsversuch mit murinen dendritischen Zellen

Dendritische Zellen sind immunologisch potente antigenpräsentierende Zellen, die eine bedeutende Wächterrolle im spezialisierten Immunsystem des Darmes spielen. Sie können nach Aktivierung durch Zytokine oder mikrobielle Produkte in lokale Lymphknoten wandern, dort zu hochimmunstimulativen Zellen reifen und eine immunologische Reaktion u.a. durch die Stimulation naiver T-Lymphozyten initiieren. Es gibt Hinweise darauf, dass sie an der globalen Funktionsminderung der Darmfunktion nach lokalem Trauma im Sinne des kürzlich beschriebenen gastrointestinalen "field-effects" beteiligt sind (Koscielny et al., 2006). Um zu überprüfen, ob Makrophagen nach Stretchtrauma Mediatoren liberieren, die eine aktivierende Wirkung auf dendritischer Zellen ausüben, wurde ein Migrationsversuch mit murinen dendritischen Zellen mit einem Transwell-Assay durchgeführt (**Abb.18**). Zur Anreicherung der liberierten Mediatoren wurde eine Fraktion der konditionierten Makrophagenüberstände mittels Zentrifugation aufkonzentriert (Stretch konz.). Nach Inkubation konnte neben der Positivkontrolle, die durch das chemotaktische Zytokin CCL21 stimuliert wurde (CCL21+), auch im konzentrierten Mediumüberstand gestretchter Makrophagen (Stretch konz.) eine signifikante Steigerung migrierter Zellen im Vergleich zum Überstand ungestretchter Makrophagen (CTL konz.) gemessen werden (5827 Zellen +/-891 vs. 3304 Zellen +/-168). Es zeigte sich jedoch keine erhöhte Anzahl migrierter dendritischer Zellen im nicht aufkonzentrierten konditionierten Mediumüberstand (Stretch) oder den Negativkontrollen (unkonditionierte Überstände (CTL) und unsupplementiertes IMDM-Medium (CCL21-)).

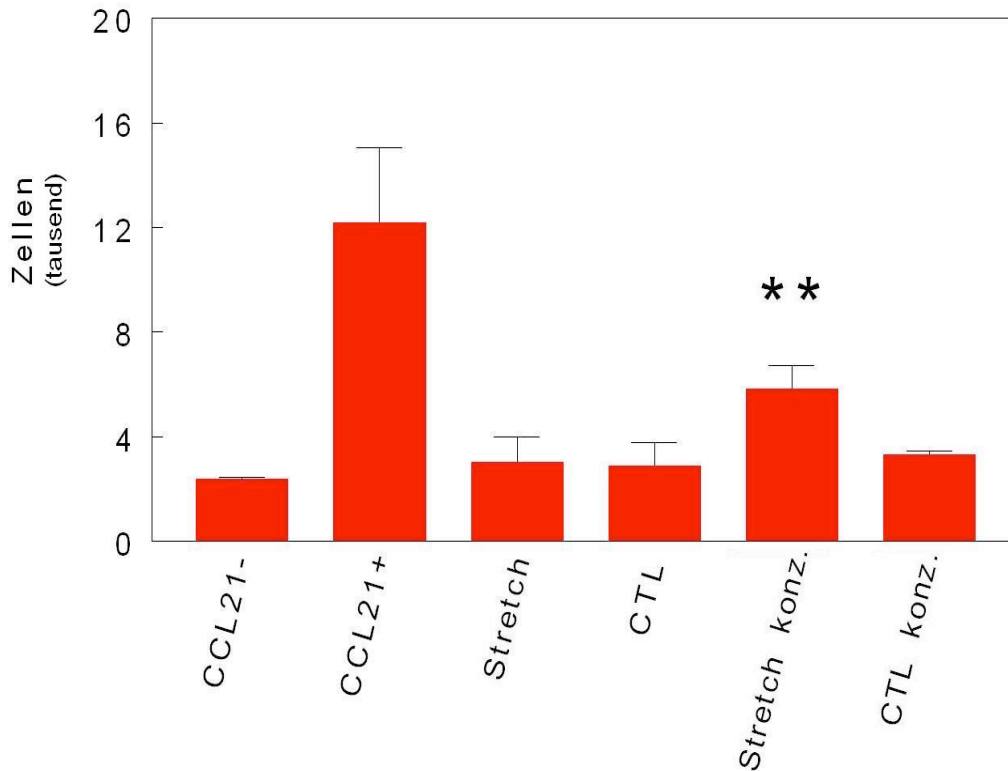


Abb. 18: Migrationsversuch mit murinen dendritischen Zellen mit einem Transwell-Assay: Dargestellt sind die Zellzahlen der durch eine mikroporöse Membran migrierten Zellen. Es zeigte sich eine erhöhte Zahl von migrierten dendritischen Zellen bei konzentriertem Mediumüberstand mechanisch stimulierter Peritonealmakrophagen (Stretch konz.) gegenüber der nicht gestreckten Kontrolle (CTL konz.). Es waren keine erhöhten Zahlen bei unkonzentriertem Medium gestreckter Peritonealmakrophagen zu beobachten (Stretch). Ebenso wenig bei den Kontrollen mit unkonditionierten Mediumüberständen (CTL und CTL konz.). Die Zugabe des chemotaktischen Chemokins CCL21 in IMDM-Medium (CCL21+) führte als Positivkontrolle zu einer deutlich erhöhten Transmigration gegenüber der Negativkontrolle mit un-supplementiertem IMDM-Medium (CCL21-).

Diskussion

Eine der häufigsten Komplikationen nach abdominalchirurgischen Eingriffen stellt die funktionelle Einschränkung der glatten Darmmuskulatur dar, die den gesamten Gastrointestinaltrakt betrifft. Diese bis heute unvermeidbare Reaktion spielt eine entscheidende Rolle im Genesungsprozess und damit für die Morbidität und Mortalität nach Operationen. Die zu Grunde liegenden Mechanismen wurden bisher nicht eindeutig geklärt. Insgesamt ist jedoch von einer multifaktoriellen Pathogenese auszugehen. Kalff et al. konnten in Versuchen an Nagetieren und an humanen Präparaten darlegen, dass eine massive lokale Entzündungsreaktion innerhalb der Tunica muscularis die Hauptursache der prolongierten postoperativen Muskelfunktionsstörung darstellt. Residente Makrophagen übernehmen dabei eine entscheidende Rolle auf zellulärer und molekularer Ebene (Kalff et al., 1997, 1999, 2000, 2003; Schwartz et al., 2001).

Inwiefern das mechanische Trauma eine zelluläre Aktivierung bewirkt, die schließlich in der Initiierung einer inflammatorischen Kaskade resultiert, konnte bisher nicht gezeigt werden. Es blieb außerdem ungeklärt, welche intestinale Zellpopulation die Detektorzellen des mechanischen Traumas darstellen. Für die intestinalen Glattmuskelzellen sprechen das Vorhandensein von stretch-aktivierten Ionenkanälen, über die sie durch äußere mechanische Kräfte aktiviert werden können (Farrugia et al., 1999), sowie der enge räumliche Kontakt mit den residenten Makrophagen innerhalb der Tunica muscularis (Kalff et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher in einem ersten Ansatz primäre intestinale Glattmuskelzellen einem standardisierten in-vitro-Stretchtrauma ausgesetzt und auf eine vermehrte Genexpression von IL-6, COX-2 und iNOS untersucht. Diesen Mediatoren wurden in den vorangegangenen Untersuchungen Schlüsselfunktionen in der inflammatorischen Kaskade des postoperativen Ileus zugewiesen. Die mechanische Aktivierbarkeit von Glattmuskelzellen konnte bisher in Stretchversuchen mit Zellkulturen aus Hohlorganen wie Gefäßen, Blase und Uterus gezeigt werden (Park et al., 1999; Sooranna et al., 2004; Zampetaki et al., 2005). Besonders intensiv wurde die Bedeutung von mechanischem Stress bei der inflammatorischen Pathogenese der Arteriosklerose

an vaskulären Glattmuskelzellen untersucht. Um zwischen einer möglichen generellen und einer organspezifischen Reaktion glatter Muskelzellen auf ein mechanisches Trauma zu unterscheiden, wurde in der vorliegenden Arbeit als Vergleichsgruppe zu den intestinalen Glattmuskelzellen die Wirkung des applizierten Stretchtraumas auch an der vaskulären Zelllinie A7r5 verifiziert.

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 hat einen bekannten hemmenden Einfluss auf die enterische Neurotransmission. Es wurde im Rahmen des POI zudem als wichtiger Regulator der bereits nach 3 bis 6 Stunden einsetzenden Leukozytenrekrutierung identifiziert (Castell et al., 1998; Hierholzer et al., 1997, 2001; Kalff et al., 1998; Romano et al., 1997). In in-vivo Versuchen an Nagetieren konnte ein frühzeitiger signifikanter Anstieg der IL-6-Expression residenter Zellen der Tunica muscularis externa (Makrophagen und Glattmuskelzellen) nach intestinaler Manipulation gemessen werden (Wehner et al., 2007). Eine derartige Reaktion zeigte sich jedoch bei den intestinalen Glattmuskelzellen in der vorliegenden Arbeit nach direktem in-vivo Stretchtrauma nicht. Im Unterschied dazu stellte sich jedoch eine frühe signifikant erhöhte Expression von IL-6 bei den vaskulären Glattmuskelzellen dar. Dieses Phänomen konnte bereits von Zampetaki et al. (2005) bei primären vaskulären Glattmuskelzellen am Mausmodell beschrieben werden, allerdings unter Verwendung eines anderen Stretchregimes mit einer höheren Stimulationsfrequenz.

COX-2 und die von ihr generierten Prostaglandine sind als hochpotente Modulatoren der Darmmotilität bekannt (Eberhart et al., 1995; Sanders, 1978; Thor et al., 1985). Daher untersuchten wir, ob eine vermehrte COX-2 Expression in Glattmuskelzellen durch ein mechanisches Trauma induziert werden konnte. Nach Stretchtrauma verblieb jedoch auch die COX-2 Expression der intestinalen Glattmuskelzellen auf dem Niveau der ungestreckten Kontrollen. Interessanterweise reagierte die vaskuläre Zelllinie A7r5 wiederum mit einer frühen signifikanten Aufregulation.

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) trägt in entzündlichen Prozessen maßgeblich zur Bildung des im Gastrointestinaltrakt dominierenden inhibitorischen Neurotransmitter NO bei. Als relevante zelluläre iNOS-Quellen in den ersten Stunden nach Trauma wurden bisher primär aktivierte residente Makrophagen identifiziert (Kalff et al., 2000; Türler et al., 2006). In der vorliegenden in-vitro Untersuchung konnte als

Reaktion auf ein direktes Stretchtrauma weder bei den primären intestinalen, noch bei den vaskulären Glattmuskelzellen eine gesteigerte iNOS-Expression gemessen werden.

Somit wurde gezeigt, dass eine direkte mechanische Stimulation intestinaler Glattmuskelzellen in-vitro nicht zu einer vermehrten transkriptionellen Expression von proinflammatorischen Zytokinen und kinetisch aktiven Mediatoren führt. Bei der Ursachenanalyse für diese ausbleibende molekulare Reaktion konnten technische Fehlerquellen wie eine ungenügende Zellqualität und -dichte der untersuchten Kulturen sowie kontaminationsbedingte Einflüsse ausgeschlossen werden. Die verwendeten neonatalen Zellen wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen auf die Expression der zytoskelettalen Glattmuskelzellmarker α -Aktin und Calponin charakterisiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Sie zeichneten sich durch eine hohe Vitalität und Proliferationskompetenz aus und wurden für die Versuche bis zur Konfluenz kultiviert. Durch eine Antikörpervermittelte Separation wurde der Einfluss von Makrophagen auf die gemessene Zytokin-Expression der Glattmuskelzellen minimiert. Da an den gleichartig stimulierten Gefäßglattmuskelzellen gezeigt werden konnte, dass der applizierte Stretchreiz mit den verwendeten Parametern (Dauer, Frequenz und Intensität) eine Aktivierung glatter Muskelzellen auf molekularer Ebene bewirkt, leiten sich folgende Schlussfolgerungen ab:

Hypothese 1:

Intestinale Glattmuskelzellen zeigen entweder eine erhöhte Toleranz gegenüber mechanischem Stress oder sie unterscheiden sich in ihrer molekularen Reaktion grundlegend von Gefäßglattmuskelzellen und von den in der Literatur beschriebenen Glattmuskelzellen anderer Hohlorgane.

Hypothese 2:

Intestinale Glattmuskelzellen zeigen keine Veränderung in der Expression der untersuchten Mediatoren als Reaktion auf ein mechanisches Trauma. Möglicherweise reagieren sie mit der Sekretion bisher nicht identifizierter Substanzen und induzieren auf parakrinem Weg eine entzündliche Aktivierung intestinaler Makrophagen in der Tunica muscularis.

Um diese Hypothesen zu untersuchen, wurde daraufhin in einem zweiten Ansatz ein indirektes Kokulturmodell entwickelt, mit dem eine mögliche gegenseitige molekulare Beeinflussung von Makrophagen und intestinalen Glattmuskelzellen nach einem mechanischen Trauma überprüft werden sollte. Für die Versuche wurden primäre Peritonealmakrophagen verwendet, da die residenten Makrophagen der Tunica muscularis nicht in ausreichender Menge isoliert werden konnten. Diese Makrophagen wurden in konditionierten, serum- und zellfreien Mediumüberständen von Glattmuskelzellen, die zuvor einem standardisierten Stretchtrauma ausgesetzt worden waren, inkubiert und die Genexpression von IL-6, COX-2 und iNOS mittels qPCR analysiert.

Es zeigte sich bei den Makrophagen eine signifikant erhöhte Expression von allen drei untersuchten Mediatoren mit einem Maximum nach 3 Stunden. In einem umgekehrten Ansatz reagierten sowohl intestinale, als auch vaskuläre Glattmuskelzellen auf die Inkubation mit konditionierten Makrophagenüberständen mit einer Induktion von iNOS mit einem Maximum bei 3 bzw. 6 Stunden. Interessanterweise lag die Expression der vaskulären Glattmuskelzellen etwa zehnfach höher als die der intestinalen Zellen, was ebenfalls die erste Hypothese einer abweichenden molekularen Reaktion der intestinalen Zellen auf mechanischen Stress im Vergleich zu den vaskulären Zellen unterstützt.

Diese Ergebnisse belegen somit, dass sowohl Makrophagen, als auch Glattmuskelzellen durch ein mechanisches Stretchtrauma aktiviert werden. Wir konnten in den vorherigen Versuchen darlegen, dass jedoch bei beiden Zellpopulationen das "direkte" mechanische Trauma nicht zu einer unmittelbaren transkriptionellen Aufregulierung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und COX-2 bzw. iNOS führte. Diese Reaktion zeigte sich überraschenderweise erst nach "indirekter" Stimulation durch das konditionierte Medium der jeweils anderen Zellpopulation. Dies unterstützt die zweite Hypothese einer mechanisch induzierten molekularen Interaktion zwischen beiden Zellpopulationen über bisher nicht identifizierte Mediatoren. Die Identifizierung dieser nach Stretchtrauma von beiden Zelltypen ins Medium liberierten Mediatoren konnte durch die bisherigen Analysen mittels qPCR noch nicht erreicht werden.

Die initiale inflammatorische Kaskade, die sich nach einem Stretchtrauma zwischen residenten Muskularismakrophagen und Glattmuskelzellen entwickelt, lässt sich nach

den bisherigen Ergebnissen noch nicht rekonstruieren. Die vorliegenden in-vitro Ergebnisse zeigen allerdings eine auffällige zeitliche Korrelation der erhöhten Zytokin-Expression durch Makrophagen und intestinale Glattmuskelzellen mit dem in-vivo beschriebenen Beginn der zellulären inflammatorischen Reaktion innerhalb der Tunica muscularis nach 3 bis 6 Stunden (Kalff et al., 1997, 1998, 1999). Dies weist darauf hin, dass die gegenseitig induzierte Expression von IL-6, COX-2 und iNOS der beiden untersuchten residenten Zellpopulationen eine molekulare Aktivierungsreaktion für die darauffolgende massive Leukozyteninfiltration darstellt, die als Hauptursache für die prolongierte postoperative Darmfunktionsstörung beschrieben wurde (Kalff et al., 1997, 1998, 1999b, 2000, 2003; Schwartz et al., 2001).

Es ist anzunehmen, dass die frühe Sekretion von Prostaglandinen durch Makrophagen nach einem Stretchtrauma neben einer direkten Hemmung der intestinalen Muskelkontraktilität auch die in-vitro beobachtete frühzeitig erhöhte iNOS-Expression beider Zellpopulationen durch para- und autokrine Stimulation bewirkt (Chen et al., 1999; Galea et al., 1999; Hori et al., 2001). iNOS wiederum übt neben einer direkten muskelfunktionshemmenden Wirkung einen regulierenden Einfluss auf die Induktion des prototypischen proinflammatorischen Zytokins IL-6 aus, das über eine Aktivierung von STAT3 eine Aufregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und in der Folge eine vermehrte Leukozyteninfiltration innerhalb der Tunica muscularis auslöst (Hierholzer et al., 2004). Eine signifikant erhöhte frühzeitige IL-6-Expression konnte in kürzlich durchgeführten in-vivo Untersuchungen an Nagetieren nach intestinaler Manipulation nachgewiesen werden (Wehner et al., 2005). Entsprechend zeigte sich eine erhöhte IL-6-Expression auch in der vorliegenden Arbeit an isolierten Makrophagen nach Stimulation durch konditioniertes Glattmuskelzellmedium.

Es wurde in vorherigen Untersuchungen nachgewiesen, dass dendritische Zellen innerhalb der Tunica muscularis nach Aktivierung durch intestinale Manipulation in regionale Lymphknoten migrieren (Koscielny et al., 2006). Dort induzieren sie eine immunologische Antwort über die Stimulierung naiver T-Lymphozyten. Dies führte zu der Hypothese, dass dendritische Zellen eine Komponente in der immunologisch vermittelten Entwicklung des gastrointestinalen "field-effects" darstellen, der das Phänomen einer Ausweitung der Darmfunktionsminderung auf den gesamten Gastrointestinaltrakt nach streng lokalem chirurgischem Trauma beschreibt (Schwarz et

al., 2002). In einem dritten Ansatz wurde daher untersucht, ob die initiale Stimulierung der unreifen dendritischen Zellen innerhalb der Tunica muscularis durch mechanisch aktivierte residente Makrophagen erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass konditionierte Mediumüberstände mechanisch stimulierter Makrophagen die Migration dendritischer Zellen signifikant erhöht. Dies weist darauf hin, dass von Makrophagen durch ein Stretchtrauma liberierte Faktoren nicht nur in intestinalen Glattmuskelzellen eine proinflammatorische Reaktion induzieren. Hierüber können diese über eine Aktivierung dendritischer Zellen an der Entwicklung eines immunologisch vermittelten "field-effects" beteiligt sein.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit an einem in-vitro Modell des chirurgischen Traumas, dass sowohl intestinale Glattmuskelzellen, als auch Makrophagen in der Lage sind, ein mechanisches Trauma zu detektieren und durch bisher nicht identifizierte Mediatoren eine gegenseitige Aktivierung zu induzieren. Erst die molekulare Interaktion dieser beiden residenten Zellpopulationen führt in der Folge zu einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokinen und kinetisch aktiver Mediatoren. Diese bewirken möglicherweise synergistisch sowohl die frühe Hemmung der intestinalen Darmkontraktilität, als auch die spätere massive leukozytäre Infiltration innerhalb der Tunica muscularis, die schließlich in einer klinisch relevanten prolongierten Darmatonie resultiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass Makrophagen nach einem mechanischen Trauma an der Initiierung der Ausbreitung zu einer panenterischen Darmmotilitätsstörung beteiligt sind. Die Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass das mechanische Trauma im Rahmen abdominal-chirurgischer Eingriffe eine komplexe proinflammatorische zelluläre Interaktion zwischen residenten Makrophagen und intestinalen Glattmuskelzellen induziert. Darüber hinaus liefern sie erste Hinweise auf die Beteiligung weiterer Zelltypen an der Entwicklung des postoperativen Ileus.

Zusammenfassung

Darmfunktionsstörungen zählen zu den häufigsten Komplikationen nach abdominalchirurgischen Eingriffen. Ein klinisch relevantes Krankheitsbild stellt hierbei der postoperative Ileus dar, der sich über eine massive Entzündungsreaktion innerhalb des gesamten Gastrointestinaltrakts entwickelt und klinisch durch Übelkeit, Erbrechen und eine erhöhte Aspirationsgefahr bis hin zur Entwicklung einer Sepsis und Multiorganversagen manifest wird. Die bisherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe weisen auf eine Schlüsselrolle residenter Makrophagen innerhalb der Tunica muscularis bei der Entwicklung dieser initial lokalen Entzündungsreaktion innerhalb der Darmwand hin. Diese lokale Reaktion breitet sich im Rahmen des sogenannten gastrointestinalen "field-effects" auf den gesamten Magen-Darm-Trakt aus. Die Ausbreitung geht mit einer erhöhten Migration aktivierter dendritischer Zellen in die mesenterialen Lymphknoten einher. Während die inflammatorische Kaskade und die beteiligten Zellpopulationen mittlerweile weitestgehend bekannt sind, existieren noch keine Erkenntnisse über die auslösenden Mechanismen. Neben dem mukosalen Barriereverlust und der Translokation luminaler Pathogene, wird das mechanische Trauma als Auslöser diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem in-vitro Modell zu untersuchen, ob intestinale Glattmuskelzellen durch ein mechanisches Trauma eine proinflammatorische Reaktion induzieren können. Vaskuläre Glattmuskelzellen dienten als Vergleichsmodell. Des Weiteren sollte eine mögliche Interaktion zwischen Glattmuskelzellen und Makrophagen in diesem Geschehen untersucht werden. Außerdem wurde das mechanische Trauma als möglicher migrationsfördernder Stimulus bei dendritischen Zellen untersucht. Mittels quantitativer PCR konnte in primären intestinalen Glattmuskelzellen nach einem standardisierten in-vitro Stretchtrauma keine Aufregulation der proinflammatorischen Schlüsselmediatoren iNOS, COX-2 und Interleukin-6 gezeigt werden. Vaskuläre Glattmuskelzellen reagierten jedoch mit einer Aufregulation von COX-2 und IL-6. Interessanterweise konnte in beiden Glattmuskelzellarten eine iNOS Aufregulation durch den konditionierten Kulturüberstand gestretchter Makrophagen induziert werden. Umgekehrt induzierte das konditionierte

Medium gestretchter Glattmuskelzellen eine Aufregulation von iNOS, COX-2 und IL-6 in Makrophagen. Generell wurde bei Verwendung vaskulärer Glattmuskelzellen im Vergleich zu intestinalen Zellen eine deutlich stärkere proinflammatorische Genexpression durch Stretchtrauma induziert. Außerdem konnte durch Kulturüberstände gestretchter Makrophagen die Migration dendritischer Zellen deutlich gesteigert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein mechanisches Trauma eine komplexe proinflammatorische Interaktion zwischen residenten Makrophagen und intestinalen Glattmuskelzellen innerhalb der Darmmuskularis auslöst. Diese stellt den Beginn der Kaskade dar, die letztlich in einer massiven Entzündung der Tunica muscularis und damit einem postoperativen Ileus endet. Das mechanische Trauma induziert dabei ebenfalls die Freisetzung migrationsfördernder Mediatoren, welche die Ausbreitung der Entzündungsreaktion im Rahmen des gastrointestinalen „field effects“ mittels dendritischer Zellen fördern könnte.

Literaturverzeichnis

- (1) Ahn H, Bronge A, Johansson K, Ygge H, Lindhagen J. Effect of continuous postoperative epidural analgesia on intestinal motility. *Br J Surg* 1988; 75: 1176-1178
- (2) Bauer AJ, Boeckxstaens GE. Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 2: 54-60
- (3) Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH. Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum. *Gastroenterology* 1991; 101: 970-976
- (4) Bauer AJ, Schwarz NT, Moore BA, Turler A, Kalff JC. Ileus in critical illness: mechanisms and management. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 152-157
- (5) Böhm B, Milsom JW, Fazio VW. Postoperative intestinal motility following conventional and laparoscopic intestinal surgery. *Arch Surg* 1995; 130: 415-419
- (6) Cannon WB, Murphy FT. The movement of the stomach and intestine in some surgical conditions. *Ann Surg* 1906; 43: 512-536
- (7) Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* 1989; 242: 237-239
- (8) Cheatham ML, Chapman WC, Key SP, Sawyers JL. A meta-analysis of selective versus routine nasogastric decompression after elective laparotomy. *Ann Surg* 1995; 221: 469-476
- (9) Chen CC, Chiu KT, Sun YT, Chen WC. Role of the cyclic AMP-protein kinase A pathway in lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 1999; 274: 31559-31564
- (10) Condon RE, Cowles VE, Schulte WJ, Frantzides CT, Mahoney JL, Sarna SK. Resolution of postoperative ileus in humans. *Annals of Surgery* 1986; 203: 574-581
- (11) D'Souza MJ, Oettinger CW, Shah A, Tipping PG, Huang XR, Milton GV. Macrophage depletion by albumin microencapsulated clodronate: attenuation of cytokine release in macrophage-dependent glomerulonephritis. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25: 591-596

- (12) De Winter BY, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA. Effect of adrenergic and nitrgic blockade on experimental ileus in rats. *Brit J Pharmacol* 1997; 120: 464-468
- (13) De Winter BY, Robberecht P, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA. Role of VIP1/PACAP receptors in postoperative ileus in rats. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 1181-1186
- (14) Dubois A, Weise VK, Kopin IJ. Postoperative ileus in the rat: physiopathology, etiology and treatment. *Annals of Surgery* 1973; 178: 781-786
- (15) Dubois F, Icard P, Berthelot G, Levard H. Coelioscopic cholecystectomy: preliminary report of 36 cases. *Annals of Surgery* 1990; 211: 60-62
- (16) Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995; 109: 285-301
- (17) Eckert P. Pathophysiology and morbidity of paralytic ileus (including peritonitis). *Langenbecks Arch Chir* 1985; 366: 285-289
- (18) Eskandari MK, Kalff JC, Billiar TR, Lee KKW, Bauer AJ. Lipopolysaccharide activates the muscularis macrophage network and suppresses circular smooth muscle activity. *Am J Physiol* 1997; 273: 727-734
- (19) Farrugia G, Holm AN, Rich A, Sarr MG, Szurszewski JH, Rae JL. A mechanosensitive calcium channel in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1999; 117: 900-905
- (20) Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1358-1367
- (21) Galea E, Feinstein DL. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J* 1999; 13: 2125-2137
- (22) Garcia-Caballero M, Vara-Thornbeck C. The evolution of postoperative ileus after laparoscopic cholecystectomy. *Surgical Endoscopy* 1993; 7: 416-419
- (23) Graber JN, Schulte WJ, Condon RE, Cowles VE. Duration of postoperative ileus related to extent and site of operative dissection. *Surgical Forum* 1980: 141-144
- (24) Hall MJ, Owings MF. 2000 National Hospital Discharge Survey. *Adv Data* 2002; 329: 1-18

- (25) Hamilton TA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunology Today* 1987; 8: 151-158
- (26) Hierholzer C, Kalff JC, Bauer AJ, Kelly E, Billiar TR, Tweardy DJ. Produktion von G-CSF und IL-6 und Aktivierung von STAT Proteinen in Mukosa und Muskularis des Jejunums im hämorrhagischen Schock. *Langenbeck Arch Chir* 1997; Suppl.: 579-83
- (27) Hierholzer C, Kalff JC, Billiar TR, Bauer AJ, Tweardy DJ, Harbrecht BG. Induced nitric oxide promotes intestinal inflammation following hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 225-233
- (28) Hierholzer C, Kalff JC, Chakraborty A, Watkins SC, Billiar TR, Bauer AJ, Tweardy DJ. Impaired gut contractility following hemorrhagic shock is accompanied by IL-6 and G-CSF production and neutrophil infiltration. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 230-241
- (29) Holte K, Kehlet H. Postoperative ileus: a preventable event. *Br J Surg* 2000 ; 87: 1480-1493
- (30) Hori M, Kita M, Torihashi S, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, Ozaki H, Karaki H. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 930-938
- (31) Kalff JC, Buchholz B, Eskandari MK, Hierholzer C, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rats. *Surgery* 1999; 126: 498-509
- (32) Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Bauer AJ. Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 1999; 117: 378-387
- (33) Kalff JC, Hierholzer C, Tsukada K, Billiar TR, Bauer AJ. Hemorrhagic shock results in intestinal muscularis intercellular adhesion molecule (ICAM-1) expression, neutrophil infiltration and smooth muscle dysfunction. *Arch Orthop Traum Su* 1999; 119: 89-93
- (34) Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology* 2000; 118: 316-327

- (35) Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg* 1998; 228: 652-663
- (36) Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Hirner A, Schraut WH, Bauer AJ. Phagocyte activation and infiltration of the intestinal muscularis with impairment of small bowel motility after surgical manipulation. *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 1997; Suppl.: 425-428
- (37) Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 683-691
- (38) Kalff JC, Turler A, Schwarz NT, Schraut WH, Lee KK, Tweardy DJ, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Intra-abdominal activation of a local inflammatory response within the human muscularis externa during laparotomy. *Ann Surg* 2003; 237: 301-315
- (39) Koscielny A, Boerner T, Wehner S, Kurts C, Kalff JC. The Role of Dendritic Cells in the Gastrointestinal Field Effect. *Transplant Proc* 2006; 38: 1815-1817
- (40) Liu S, Carpenter RL, Neal JM. Epidural anesthesia and analgesia. Their role in postoperative outcome. *Anesthesiology* 1995; 82: 1474-1506
- (41) Livingston EH, Passaro EP. Postoperative ileus. *Digestive Diseases and Sciences* 1990; 35: 121-132
- (42) Mayer EA, Raybould H, Koelbel C. Neuropeptides, inflammation, and motility. *Digestive Diseases and Sciences* 1988; 33: 71-77
- (43) Mikkelsen HB. Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histology and Histopathology* 1995; 10: 719-736
- (44) Mikkelsen HB, Thuneberg L. Op/op mice defective in production of functional colony-stimulating factor-1 lack macrophages in muscularis externa of the small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 485-493
- (45) Moss G. Maintenance of gastrointestinal function after bowel surgery and immediate enteral full nutrition. II. Clinical experience, with objective demonstration of intestinal absorption and motility. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1981; 5: 215-220
- (46) Pal J. Über den Einfluss des Bauchschnittes auf die Darmbewegung. *Zentralblatt für Physiologie* 1890; 4: 338

- (47) Park JM, Yang T, Arend LJ, Schnermann JB, Peters CA, Freeman MR, Briggs JP. Obstruction stimulates COX-2 expression in bladder smooth muscle cells via increased mechanical stretch. *Am J Physiol* 1999; 276: 129-136
- (48) Plourde V, Wong HC, Walsh JH, Raybould HE, Tache Y. CGRP antagonists and capsaicin on celiac ganglia partly prevent postoperative gastric ileus. *Peptides* 1993; 14: 1225-1229
- (49) Prasad M, Matthews JB. Deflating postoperative ileus. *Gastroenterology* 1999; 117: 489-492
- (50) Riwar A, Schar B, Grotzinger U. [Effect of continuous postoperative analgesia with peridural bupivacaine on intestinal motility following colorectal resection]. *Helv Chir Acta* 1992; 58: 729-733
- (51) Romano M, Sironi M, Toniatti C. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; 6: 315-325
- (52) Sanders KM. Endogenous prostaglandin E and contractile activity of isolated ileal smooth muscle. *Am J Physiol* 1978; 234: 209-212
- (53) Schmidt-Weber CB, Rittig M, Buchner E, Hauser I, Schmidt I, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Kinne RW. Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 230-244
- (54) Schwarz NT, Beer-Stolz D, Simmons RL, Bauer AJ. Pathogenesis of paralytic ileus: intestinal manipulation opens a transient pathway between the intestinal lumen and the leukocytic infiltrate of the jejunal muscularis. *Ann Surg* 2002; 235: 31-40
- (55) Schwarz NT, Kalff JC, Turler A, Engel BM, Watkins SC, Billiar TR, Bauer AJ. Prostanoid Production Via COX-2 as a Causative Mechanism of Rodent Postoperative Ileus. *Gastroenterology* 2001; 121: 1354-1371
- (56) Schwarz NT, Kalff JC, Turler A, Grandis JR, Billiar TR, Bauer AJ. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. *Gastroenterology* 2004; 126: 159-169
- (57) Seenu V, Goel AK. Early oral feeding after elective colorectal surgery: is it safe? *Trop Gastroenterol* 1995; 16: 72-73

- (58) Sooranna SR, Lee Y, Kim LU, Mohan AR, Bennett PR, Johnson MR. Mechanical stretch activates type 2 cyclooxygenase via activator protein-1 transcription factor in human myometrial cells. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 109-113
- (59) Tache Y, Monnikes H, Bonaz B, Rivier J. Role of CRF in stress-related alterations of gastric and colonic motor function. *Ann NY Acad Sci* 1993; 697: 233-243
- (60) Taxi J. Contribution à l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. *Annales des Naturelles-Zoologie et Biologie Animale* 1965; 7: 413-674
- (61) Thor P, Konturek JW, Konturek SJ, Anderson JH. Role of prostaglandins in control of intestinal motility. *Am J Physiol* 1985; 248: 353-359
- (62) Tittel A, Schippers E, Anurov M, Titkova S, Ottinger A, Schumpelick V. Minor abdominal trauma by laparoscopic surgery? Comparison of adhesions and intestinal motility after laparoscopic and conventional operations in dogs. *Zentralblatt für Chirurgie* 1996; 121: 329-334
- (63) Turler A, Kalff JC, Moore BA, Hoffman RA, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Leukocyte-derived inducible nitric oxide synthase mediates murine postoperative ileus. *Ann Surg* 2006; 244: 220-229
- (64) Uemura K, Tatewaki M, Harris MB, Ueno T, Mantyh CR, Pappas TN, Takahashi T. Magnitude of abdominal incision affects the duration of postoperative ileus in rats. *Surg Endosc* 2004; 18: 606-610
- (65) van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 1996; 193: 93-99
- (66) Wehner S, Behrendt FF, Lyutenski BN, Lysson M, Bauer AJ, Hirner A, Kalff JC. Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut* 2007; 56: 176-185
- (67) Wehner S, Schwarz NT, Hundsdoerfer R, Hierholzer C, Tweardy DJ, Billiar TR, Bauer AJ, Kalff JC. Induction of IL-6 within the rodent intestinal muscularis after intestinal surgical stress. *Surgery* 2005; 137: 436-446
- (68) Zampetaki A, Zhang Z, Hu Y, Xu Q. Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 2946-2954

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Jörg C. Kalff für die Überlassung der Arbeit und Herrn Dr. Sven Wehner für die wissenschaftliche Betreuung, die unermüdliche Unterstützung und freundliche Hilfsbereitschaft.

Für die Möglichkeiten, Teile meiner Arbeit auf wissenschaftlichen Kongressen zu präsentieren und zu publizieren, bin ich ebenfalls sehr dankbar. Herrn Prof. Dr. Andreas Hirner danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können. Ich danke weiterhin Frau Mariola Lysson und Herrn Bastian Lüdenbach für ihre tatkräftige Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Allen weiteren Mitarbeitern der klinischen Forschergruppe 115 (KFO 115) danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Ein großer Dank geht an meine Eltern und Geschwister und an Agnes für ihre liebevolle Unterstützung und Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anatol Konstantin Rocke

Geburtsdatum 14.11.1979

Geburtsort: Bergisch-Gladbach

Eltern: Ursula Karola Rocke geb. Müller
Dr. med. Hans-Jürgen Rocke

Schulbildung

1986-1990 Katholische Grundschule Wachtberg-Villip

1990-1999 Aloisiuskolleg Bonn Bad-Godesberg

Wehrdienst

1999-2000 Budel, Niederlande und Taktisches Ausbildungskommando der Luftwaffe in Decimomannu, Italien

Studium

Seit 2001 Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

März 2003 Ärztliche Vorprüfung, Note: 3,0

WS 2005/2006 ERASMUS-Semester an der Università degli Studi - Pavia, Italien

- August 2006-
Juli 2007 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Bonn:
- Klinik und Poliklinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie
Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard Liedtke
- Medizinische Klinik und Poliklinik I – Allgemeine Innere Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. Tilmann Sauerbruch
- Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hirner
- Oktober 2007 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,5
- Januar 2008 Assistenzarzt an der Universitätsklinik des Saarlandes
Klinik für Innere Medizin II
Direktor: Prof. Dr. med. Frank Lammert
- Mai 2008 -
Dezember 2009 Assistenzarzt im Marienhaus-Klinikum-Ahr, Bad Neuenahr-
Ahrweiler, Innere Medizin Chefarzt: PD Dr. med. Jörg Heller
- Seit Februar 2010 Assistenzarzt in der Ahrtalklinik - Fachkrankenhaus für Angiologie
und Kardiologie, Sinzig - Bad Bodendorf

Wissenschaftlicher Werdegang

- Seit Mai 2005 Experimentelle Arbeit im Labor der Klinischen Forschergruppe (KFO) 115 der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG)
Thema: Das chirurgische Trauma: In-vitro Aktivierung intestinaler glatter Muskelzellen und Makrophagen.
Prof. Dr. med J.C. Kalff; Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-
Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Bonn

Publizierte Abstracts

1. Wehner S, Rocke AK, Schuchtrup S, Hirner A, Kalff JC. Postoperative Ileus: Mechanical activation of intestinal macrophages and smooth muscle cells. J Am Coll Surg 2006; 203: 15-16
2. Wehner S, Rocke AK, Schuchtrup S, Hirner A, Kalff JC. Postoperative Ileus: Mechanical Activation of Intestinal Macrophages and Smooth Muscle Cells. European Surgical Research 2006; 38: 17
3. Wehner S, Rocke AK, Schuchtrup S, Hirner A, Kalff JC. Postoperative Ileus: mechanical activation of intestinal macrophages and smooth muscle cells. Langenbecks Arch Surg 2006; 391: 520
4. Wehner S, Rocke AK, Schuchtrup S, Hirner A, Kalff JC. Postoperative Ileus: Mechanical Activation of Intestinal Macrophages and Smooth Muscle Cells. J Am Coll Surg 2006; 203: 15

Originalarbeit

Wehner S, Rocke AK, Schuchtrup S, Hirner A, Kalff JC. Mechanical strain is a molecular trigger and enhancer of proinflammatory mediator production in the development of postoperative ileus (*in preparation*)