

**Makrophagenspezifische Inhibition des  
p38 MAP Kinase-Signalweges als neue Option  
zur Prophylaxe des postoperativen Ileus**

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

Stefan Sträßer  
aus Waldbröl

2011

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff
2. Gutachter: Prof. Dr. Gunther Hartmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.02.2011

Aus: Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie,  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
2.1	DER POSTOPERATIVE ILEUS .....	7
2.2	PATHOPHYSIOLOGIE DES POSTOPERATIVEN ILEUS.....	8
2.2.1	Pharmakologische und neurogene Mechanismen .....	8
2.2.2	Die Rolle der lokalen Inflammation.....	9
2.3	PROINFLAMMATORISCHE SIGNALWEGE.....	12
2.4	SEMAPIMOD .....	14
2.5	ZIELSETZUNG .....	15
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
3.1	TIERE .....	16
3.2	EXPERIMENTELLE GRUPPEN.....	16
3.3	OPERATIVER EINGRIFF .....	16
3.4	ORGANENTNAHME UND PRÄPARATION .....	17
3.5	PHOSPHORYLIERUNG DER P38 MAPK UND JNK/SAPK.....	18
3.6	QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR).....	19
3.8	NITRITBESTIMMUNG.....	22
3.9	MUSKELKONTRAKTILITÄT IN VITRO .....	23
3.10	GASTROINTESTINALER TRANSIT (GIT) .....	24
3.11	VERWENDETE CHEMIKALIEN .....	25
3.12	STATISTISCHE DATENANALYSE.....	25
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
4.1	GENERELLE BEOBACHTUNGEN.....	26
4.2	AKTIVIERUNG DER P38 MAPK .....	26
4.3	PROINFLAMMATORISCHE GENEXPRESSION .....	28
4.4	MUSKULARIS-INFILTRATION NEUTROPHILER GRANULOZYTEN .....	30
4.5	NO-PRODUKTION IN MUSKULARIS-GEWEBEKULTUREN .....	31
4.6	MUSKELKONTRAKTILITÄT IN VITRO .....	32
4.7	GASTROINTESTINALER TRANSIT (GIT) .....	34

<b>5 Diskussion .....</b>	<b>37</b>
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>44</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>46</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

Anova	Analysis of variance
AZ	Allgemeinzustand
BCA	Bicinchoninic acid
cDNA	complementary DNA
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRF	Corticotropin releasing factor
CSF-1	Colony stimulating factor-1
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Geometrisches Zentrum
GIT	Gastrointestinaler Transit
HET	Haus für experimentelle Therapie der Universität Bonn
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
i.c.v.	Intracerebroventrikulär
IL	Interleukin
IM	Intestinale Manipulation
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
JNK/SAPK	c-Jun N-Terminal Kinase/ Stress-Activated Protein Kinase
KHB	Krebs-Henseleit-Bicarbonate
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
ME	Muscularis externa
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$

MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
NANC	Nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Nitrit
OP <sup>-/-</sup>	Homozygote Osteopetrosis-Maus
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
POI	Postoperativer Ileus
p38 MAPK	p38 Mitogen activated kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SEM	Standard error of the mean
SD	Standard deviation
TBS	Tris-buffered saline
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VIP	Vasoaktives Peptid

## 2 Einleitung

### 2.1 Der postoperative Ileus

Der postoperative Ileus (POI) ist eine regelmäßig auftretende iatrogene Komplikation abdominalchirurgischer Eingriffe. Er ist gekennzeichnet durch eine den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffende funktionelle Inhibition des propulsiven Kontraktilitätsmusters nach operativen Eingriffen. Eine möglichst schnelle Rehabilitation der physiologischen Darmmotilität stellt einen entscheidenden Faktor für den erfolgreichen Verlauf einer chirurgischen Therapie dar (Livingston und Passaro, 1990).

Klinische Zeichen des POI sind verzögerte Gas- und Stuhlpassage, abdominelle Schmerzen bis hin zu Tenesmen, Übelkeit und Erbrechen. Als gefährliche Komplikationen können Aspiration gastrointestinaler Flüssigkeiten, akute Magendilatation, Sepsis sowie Durchwanderungsperitonitis auftreten. Neben der verminderten Lebensqualität und Gefährdung des Patienten bewirken diese Symptome auch eine Verspätung der enteralen Nahrungsaufnahme, eine Verlängerung des stationären Aufenthalts und somit eine deutliche Erhöhung der durch Behandlung und Arbeitsausfall entstehenden Kosten. Der dadurch entstehende wirtschaftliche Schaden wurde in den USA auf ca. eine Milliarde Dollar pro Jahr geschätzt (Prasad et al., 1999).

Eine reduzierte Darmmotilität nach abdominellen Eingriffen wurde bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts von Pal (1890) beschrieben. Sie wird bis heute oft als unvermeidbare Konsequenz und physiologische Reaktion des Darmes auf das operative Trauma akzeptiert (Holte et al., 2000). Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl an möglichen Ursachen diskutiert. Auch wenn die Beteiligung verschiedenster Faktoren nachgewiesen wurde, konnten die grundlegenden Pathomechanismen des POI nicht direkt identifiziert werden. Dementsprechend mangelt es bis heute an therapeutischen Alternativen im klinischen Alltag. Prophylaktische Therapieformen, die von besonders großem Wert wären, fehlen bisher vollkommen.

In der Forschung besteht heutzutage Einigkeit darin, dass der POI auf einer multifaktoriellen Genese beruht. Als wichtigste Ursachen werden sich gegenseitig beeinflussende pharmakologische, neurogene und inflammatorische Faktoren angesehen (Bauer et al., 2004).

## 2.2 Pathophysiologie des postoperativen Ileus

### 2.2.1 Pharmakologische und neurogene Mechanismen

Die pharmakologische Beeinflussung der postoperativen Darmmotilität beruht v. a. auf der Analgesie und Anästhesie mit Opioiden sowie dem Eingreifen in den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt (Person und Wexner, 2006).

Der Einsatz von Opioiden in der postoperativen Schmerztherapie abdominalchirurgischer Eingriffe ist aufgrund der ausgeprägten analgetischen Wirkung weit verbreitet. Die gleichzeitig durch Opioide hervorgerufene Obstipation kann jedoch zur Verlängerung eines POI beitragen (Bauer et al., 1991). Gleiches gilt für einen unbalancierten Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt. So scheinen Therapieansätze mit eingeschränkter Flüssigkeitszufuhr der früher üblichen intra- und postoperativen Verabreichung großer Mengen von Elektrolytlösung in Bezug auf die postoperative Darmmotilität überlegen zu sein (Lobo et al., 2002). Eine Optimierung der perioperativen pharmakologischen Therapie kann zu kürzeren Liegezeiten beitragen, hat aber nur geringen Einfluss auf die dem POI zugrunde liegenden körpereigenen Pathomechanismen, was ein prophylaktisches Eingreifen über diesen Weg verhindert.

Eine neurogene Beteiligung in der Genese des POI wurde nach der Beobachtung von Bayliss und Starling (1899), dass die Entfernung splanchnischer Nerven die Darmmotilität nach kutanem Trauma (Laparatomie) verbessert, bereits frühzeitig vermutet. Lange Zeit wurde eine neuronale Missregulierung als wichtigste Ursache postoperativer Störungen der Darmmotilität angesehen. Als wesentlicher Mechanismus gilt die inhibitorisch auf die Darmfunktion wirkende Ausschüttung von Noradrenalin aus sympathischen Fasern. Diese geschieht reflexartig aufgrund einer Aktivierung sympathischer Neurone, die initial durch kutane Afferenzen geschieht und im Verlauf eines abdominalchirurgischen Eingriffes von gastrointestinalen Afferenzen aufrechterhalten wird. Die Wirkung von Noradrenalin beruht hierbei vor allem auf einer Hemmung der Freisetzung von Acetylcholin aus parasympathischen Fasern. Durch gezielte Hemmung dieses Reflexbogens wurde in mehreren Studien eine verbesserte postoperative Motilität nach abdominalchirurgischem Trauma erreicht (Holzer et al., 1992; Zittel et al., 1998). Die durch chirurgischen Stress hervorgerufene Freisetzung von Corticotropin-releasing factor (CRF) aus dem Hypothalamus hat ebenfalls eine erhöhte sympathische Aktivität zur Folge und gilt als zusätzliche zentralnervöse Komponente in der Genese des POI (Luckey et al., 2003).



Als weitere neurogene Faktoren konnten nicht-adrenerge nicht-cholinerge (NANC) Neurotransmitter des enterischen Nervensystems wie Stickstoffmonoxid (NO), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substanz P und vasoaktives Peptid (VIP) identifiziert werden (Bult et al., 1990; Espat et al., 1995; Zittel et al., 2001). NO wird hierbei als der NANC-Neurotransmitter mit dem größten inhibitorischen Einfluss auf die Darmmotilität angesehen (Stark et al., 1991).

Die neurogene Komponente in der Pathogenese eines POI ist unbestritten. Allerdings wurden die oben genannten Mechanismen als passagere, vor allem perioperativ ablaufende Vorgänge beschrieben. Da der POI jedoch einen Verlauf von mehreren Tagen hat, deutet dies darauf hin, dass andere Faktoren über die Dauer und Ausprägung des POI bestimmen und die neuronale Missregulierung vor allem in der Initialphase von Bedeutung ist (Bauer et al., 2004).

### 2.2.2 Die Rolle der lokalen Inflammation

Die pathophysiologische Bedeutung der lokalen Entzündungsreaktion nach operativem Trauma wurde vergleichsweise spät erkannt. Eine Population von residenten Makrophagen, die ein dichtes Netzwerk in der Tunica muscularis der Darmwand bilden, spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der inflammatorischen Vorgänge. Diese zunächst von Taxi (1965) beschriebenen und von Mikkelsen (1995) näher charakterisierten Immunozyten bilden den mit Abstand größten Anteil ortständiger Leukozyten und befinden sich im Normalfall in einem inaktivierten Ruhezustand (Kalff et al., 1998 a). Die Aktivierung von Makrophagen bewirkt neben einer verstärkten Phagozytoseaktivität und Antigenpräsentation auch eine Rekrutierung immunkompetenter Leukozyten aus dem Blutkreislauf durch die Produktion von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Zytokinen, sowie die Freisetzung verschiedener kinetisch aktiver Substanzen wie NO oder Prostaglandinen, die eine inhibitorische Wirkung auf glatte Muskelzellen haben (Gamble et al., 1985).

In Studien, die sich mit der Entstehung des septischen Ileus beschäftigten, welcher bezüglich seiner Pathogenese vom postoperativen Ileus abzugrenzen ist, konnten Bauer et al. (1996) zeigen, dass die Aktivierung der Muskularis-Makrophagen durch ein bakterielles Exotoxin zu einer verminderten jejunalen Muskelkontraktilität führt. Eskandari et al. (1997) bestätigten diese Beobachtung nach Aktivierung der Makrophagen mit dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS). Zusätzlich konnten sie anhand der Einwanderung von Leukozyten aus dem Blutkreislauf in die Tunica muscularis eine ausgeprägte Entzündungsreaktion nachweisen. Weitere Studien ergaben, dass die reduzierte Muskelkontraktilität nach LPS-Applikation zu großen Teilen auf der

Produktion von NO durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) beruht, deren größte Konzentration sich in den Muskularis-Makrophagen fand (Eskandari et al., 1999).

Kalff et al. (1998 b) untersuchten im Tiermodell, ob sich vergleichbare Reaktionen auch durch eine chirurgische Manipulation des Darmes erreichen lassen. Sie wiesen nach, dass auch der mechanische Stress eines operativen Eingriffs zu einer durch Aktivierung der Muskularis-Makrophagen initiierten Entzündungsreaktion mit Verschlechterung der Darmmotilität führt. Darüber hinaus gelang ihnen durch den Vergleich verschiedener Traumagrade der Nachweis eines direkten Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der intraoperativen Traumatisierung und der Schwere der anschließenden Entzündung, die durch die Infiltration immunkompetenter Leukozyten wie neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Mastzellen gekennzeichnet ist. Den größten Anteil der infiltrierten Zellen, die auch sieben Tage nach der Operation noch in der Tunica muscularis nachweisbar waren, bildeten neutrophile Granulozyten und Monozyten (Kalff et al., 1998 b).

Das Ausmaß der Entzündungsreaktion ist von entscheidender Bedeutung für das Entstehen und Persistieren postoperativer Störungen der Darmmotilität. Verdeutlicht wird dies durch den biphasischen Verlauf der muskulären Dysfunktion nach operativen Eingriffen. Einer Phase mit deutlich eingeschränkter Motilität unmittelbar nach chirurgischem Trauma folgt ca. 3 h später eine Phase der Erholung mit weitgehend normalisierter Muskelfunktion. Anschließend kommt es zu einer zeitlich mit der massiven Einwanderung von immunkompetenten Leukozyten korrelierten erneuten Verschlechterung der Darmmotilität nach 12-24 h (Kalff et al., 1999).

Eine Beteiligung an dieser Reaktion konnte für verschiedene, von residenten Makrophagen und eingewanderten Leukozyten synthetisierte, proinflammatorische Moleküle wie die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), das Adhäsionsmolekül Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und durch iNOS produziertes NO sowie durch COX-2 produzierte Prostaglandine nachgewiesen werden (Kalff et al., 2000; Schwarz et al., 2001; The et al., 2005; Türler et al., 2002; Wehner et al., 2005). Diese Beobachtungen ließen sich auch an menschlichem Probenmaterial nachvollziehen (Kalff et al., 2003).

Eine weitere an der Pathogenese des POI beteiligte Leukozytenpopulation sind ortständige Mastzellen. De Jonge et al. (2004) entwickelten die Hypothese einer primären Aktivierung dieser Mastzellen durch neurogene Stimulation in der Akutphase nach chirurgischem Trauma. Die aktivierten Mastzellen seien evtl. für die Aktivierung der Muskularis-Makrophagen und somit für

die Initiierung der postoperativen Entzündung in der Darmwand verantwortlich. Sie wiesen tierexperimentell nach, dass eine pharmakologische Stabilisierung von Mastzellen die postoperative Entzündungsreaktion signifikant vermindert (De Jonge et al., 2004).

Bisher konnte die chronologische Reihenfolge, in der Aktivierung der einzelnen Zellpopulationen abläuft nicht abschließend geklärt werden. Unabhängig davon sind die residenten Muskularis-Makrophagen von zentraler Bedeutung für die inflammatorische Reaktion der Darmwand.

Bei der Entstehung eines POI existieren zahlreiche Schnittstellen zwischen neurogenen und inflammatorischen Mechanismen. So kann eine inflammatorische Reaktion durch neuronale Impulse vermindert oder verstärkt werden. Parasympathische Signale aus dem N. vagus wirken direkt hemmend auf intestinale Makrophagen, was als cholinerg, antiinflammatorischer Signalweg bezeichnet wird (Tracey, 2002).

Gleichzeitig wirken die während der Entzündungsreaktion ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokine modulierend auf die Freisetzung von Neurotransmittern aus enterischen Neuronen, zu denen die Muskularis-Makrophagen in enger räumlicher Beziehung stehen (Collins et al., 1992; Kalff et al., 1998 a). Dies kann eine reflektorische Aktivierung sympathischer Neurone mit der bereits beschriebenen Auswirkung auf die Darmmotilität nach sich ziehen (De Jonge et al., 2003). Somit nehmen die intestinalen Makrophagen auch in der Kommunikation mit verschiedenen pro- und antiinflammatorischen neurogenen Mechanismen eine zentrale Rolle ein.

Wehner et al. (2007) zeigten erstmals, dass eine Inaktivierung der Muskularis-Makrophagen als Ansatz für eine prophylaktische Therapie des POI geeignet ist. In einem pharmakologischen Depletionsmodell wurden Ratten intravenös über mehrere Tage vor einer intestinalen Manipulation mit in Liposomen eingekapseltem Dichloromethyldiphosphat (Clodronat-Liposomen) und Gadoliniumchlorid behandelt. Die Gabe von Clodronat-Liposomen bewirkt selektiv die Apoptose ausgereifter Makrophagen, da nur diese in der Lage sind die Liposomen in toxischer Menge zu phagozytieren. Übrig gebliebene, funktionstüchtige Makrophagen wurden durch Gadoliniumchlorid inaktiviert (Adding et al., 2001; van Rooijen et al., 1996). In einem genetischen Depletionsmodell wurden homozygote Osteopetrosis-Mäuse untersucht, bei denen aufgrund einer Mutation im Colony stimulating factor-1-Gen (CSF-1) Makrophagen im gesamten Organismus verringert vorliegen und in der Tunica muscularis vollständig fehlen (Mikkelsen et al., 1999).

Es zeigte sich in beiden Modellen, dass die Inaktivierung der Muskularis-Makrophagen die proinflammatorische Genexpression und die anschließende Entzündungsreaktion signifikant verringert. Dies spiegelte sich in einer im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich verbesserten *in vitro*- und *in vivo*-Motilität des Darmes nach operativem Trauma wider. Besonders deutlich waren diese Effekte bei den Osteopetrosis-Mäusen. Zusätzlich deutete eine sehr frühe starke Aufregulierung des Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), einem Marker der Makrophagenaktivierung, bei unbehandelten manipulierten Ratten darauf hin, dass die Aktivierung der Muskularis-Makrophagen einen initialen Schritt in der postoperativen Entzündungskaskade darstellt (Wehner et al., 2007).

Unabhängig von den positiven Resultaten dieser Studie ist die in ihr durchgeführte Methode der pharmakologischen Makrophageninaktivierung nicht für den klinischen Einsatz geeignet. Erstens ist die Herstellung der Clodronat-Liposomen aufwendig und teuer, zweitens müsste die medikamentöse Therapie bereits mehrere Tage vor einem operativen Eingriff beginnen und drittens ist ein über die Therapie hinausgehender, potentiell mit ausgeprägten Nebenwirkungen verbundener immunsupprimierender Effekt aufgrund der Depletion der Makrophagen bis zur Repopulation nach einigen Tagen nicht auszuschließen.

Für einen in der Klinik anwendbaren prophylaktischen Therapieansatz wäre eine Methode wünschenswert, bei der mit einer möglichst einmaligen Applikation eines Wirkstoffs eine perioperative, temporäre Inhibition der Makrophagen erreicht werden kann, ohne eine andauernde Schwächung des Immunsystems zu bewirken. Das gezielte Eingreifen in proinflammatorische Signalwege in den Makrophagen könnte hierfür einen möglichen Ansatz darstellen.

### 2.3 Proinflammatorische Signalwege

Die intrazelluläre Verarbeitung von extrazellulären Signalen unterschiedlichster Art geschieht über ein komplexes Interagieren von Rezeptoren, second messengern, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren. Das in den letzten Jahren immer konkreter werdende Verständnis dieser Vorgänge eröffnet die Möglichkeit durch gezieltes Eingreifen in zelluläre Signalwege das Verhalten und die Genexpression von Zellen beeinflussen zu können.

Wichtiger Bestandteil innerhalb der intrazellulären Kommunikation sind Signalkaskaden, in denen mehrere Proteinkinasen in Serie durch Phosphorylierung aktiviert werden. Verschiedene

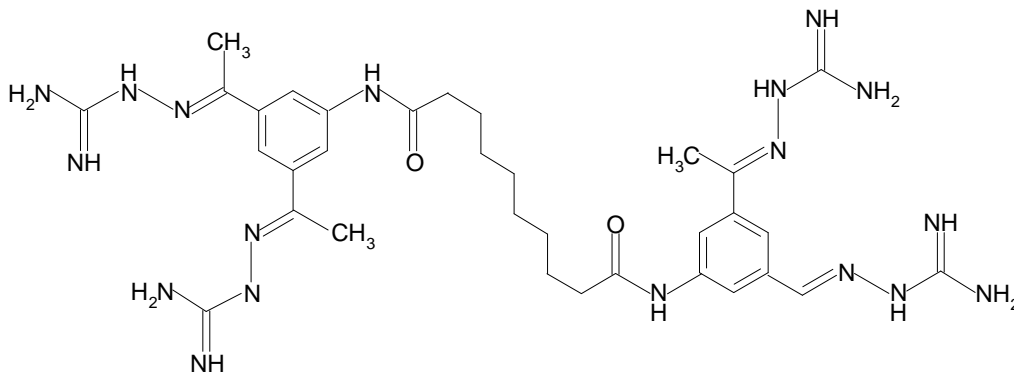
dieser Signalwege münden in der Aktivierung von MAPKs (Mitogen-activated protein kinases). Durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren können diese direkten Einfluss auf die Genexpression einer Zelle nehmen. Neben einer Beteiligung an der Embryogenese sowie der Kontrolle der Differenzierung, Proliferation und Apoptose einer Zelle nehmen die MAPKs auch bei der Vermittlung von entzündlichen Reaktionen eine Schlüsselrolle ein. Sie beeinflussen die Genexpression einer Vielzahl an Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die für die Initiierung und Aufrechterhaltung einer Entzündung durch Rekrutierung immunkompetenter Leukozyten aus dem Blutkreislauf notwendig sind (Hommes et al., 2003; Pearson et al., 2001). Ein wichtiger Vertreter ist die p38 MAPK, deren Aktivierung auf verschiedenen Ursachen beruhen kann. Neben einer Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen (z.B.  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1) können auch bakterielle und virale Pathogene sowie Umgebungsfaktoren wie Hypoxie oder freie Sauerstoffradikale eine Phosphorylierung der Kinase bewirken (Ono et al., 2000). Zu den wesentlichen Konsequenzen einer Aktivierung der p38 MAPK-Signalkaskade zählt die Aufregulierung proinflammatorischer Mediatoren und Adhäsionsmoleküle, was in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte (Hannigan et al., 1998; Nick et al., 1999). Dies lässt eine zentrale Rolle der p38 MAPK in der Regulation verschiedener inflammatorischer Reaktionen vermuten. Es bleibt allerdings zu beachten, dass auch andere MAPKs wie die c-Jun N-Terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase (JNK/SAPK) an der Vermittlung entzündlicher Vorgänge beteiligt sind (Hommes et al., 2003).

Moore et al. (2004) konnten eine generelle Beteiligung der Phosphorylierung von Proteinkinasen an der Pathogenese des POI nachweisen. Ihre Ergebnisse ließen jedoch keine Rückschlüsse darauf zu, welche Enzyme explizit an den zellulären Signalkaskaden in Makrophagen beteiligt sind. Allerdings ist bekannt, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit einer verstärkten Aktivierung der p38 MAPK in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten einhergehen (Wätzig et al., 2002).

Dementsprechend könnte die p38 MAPK auch bei der Initiierung der postoperativen Entzündung in der Tunica muscularis von Bedeutung sein und einen potentiellen Ansatz für eine prophylaktische Therapie des POI darstellen.

## 2.4 Semapimod

Das tetravalente Guanylhydrazon Semapimod (ehemals CNI 1493, Figure 1) wurde von Bianchi et al. (1995) entwickelt, um die durch Zytokine induzierte Aufnahme von L-Arginin, welches zur Synthese von NO benötigt wird, in Makrophagen zu inhibieren. Sie konnten im Mausmodell nachweisen, dass Semapimod die NO-Produktion von Makrophagen in systemischen entzündlichen Reaktionen gezielt vermindert. Eine Hemmung der für die Regulation der Organperfusion unverzichtbaren Produktion von NO in Blutgefäßen, die bei unselektiven NOS-Inhibitoren zu beobachten war, blieb hierbei aus. Darüber hinaus beobachteten sie eine deutliche Verminderung der LPS-induzierten Zytokinproduktion von Makrophagen nach Behandlung mit Semapimod, die nicht auf eine verminderte NO-Synthese zurückzuführen war. Ohne den genauen Mechanismus dieses antiinflammatorischen Effektes identifizieren zu können, vermuteten sie eine Wirkung auf intrazelluläre Signalwege, die in einer herabgesetzten Aktivierung der Makrophagen resultiert (Bianchi et al., 1995; 1996).



**Figure 1.** Das tetravalente Guanylhydrazon Semapimod (CNI 1493) ermöglicht die makrophagenspezifische Inhibition proinflammatorischer Signalwege.

Der direkte Einfluss von Semapimod auf den p38 MAPK-Signalweg wurde erstmals von Cohen et al. (1996) erkannt. Löwenberg et al. (2005) bestätigten dies und beschrieben darüber hinaus eine verminderte Phosphorylierung der JNK/SAPK als zusätzlichen antiinflammatorischen Effekt. Weiterhin ergaben verschiedene Studien, dass die Hemmung proinflammatorischer Signalwege auf Makrophagen beschränkt ist und daher andere Leukozyten wie T-Lymphozyten oder dendritische Zellen nicht in ihrer Funktion eingeschränkt sind. (Bjork et al., 1997;

Löwenberg et al., 2005). Der Mechanismus dieser Makrophagenspezifität ist allerdings bislang nicht vollständig geklärt.

Die antiinflammatorische Wirksamkeit von Semapimod wurde an einer großen Bandbreite von entzündlichen Krankheitsbildern wie z. B. Morbus Crohn, Pankreatitis und Sepsis sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien wiederholt nachgewiesen (Löwenberg et al., 2005; van Westerloo et al., 2008; Villa et al.; 1997).

## 2.5 Zielsetzung

Die residenten Makrophagen in der Tunica muscularis des Gastrointestinaltraktes sind für die postoperative Entzündung, die die Grundlage des POI bildet, von zentraler Bedeutung (Wehner et al., 2007). Verschiedene proinflammatorische MAPK-Signalwege sind an der Aktivierung von Makrophagen in verschiedenen entzündlichen Reaktionen unmittelbar beteiligt, wobei die p38 MAPK den größten Einfluss zu haben scheint (Hommes et al., 2003). Die Verabreichung von Semapimod hat eine makrophagenspezifische Hemmung der p38 MAPK und der JNK/SAPK-Signalkaskade zur Folge (Löwenberg et al., 2005).

Zielsetzung dieser Arbeit war festzustellen, ob Semapimod als Option für einen Ansatz zur prophylaktischen Therapie des POI geeignet ist. Um dies beantworten zu können wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- § Führt eine intestinale Manipulation zur frühzeitigen Aktivierung der p38 MAPK sowie der JNK/SAPK und lässt sich diese durch Semapimod verhindern?
- § Vermindert Semapimod die gesteigerte proinflammatorische Genexpression sowie die Einwanderung von Leukozyten in die Muskularis nach intestinaler Manipulation?
- § Verbessert Semapimod die postoperative Darmmotilität und den gastrointestinalen Transit?
- § Bestehen von der Applikationsart oder dem Applikationszeitpunkt abhängige Unterschiede in der Wirksamkeit von Semapimod?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche C57BL/6J-Mäuse mit einem Körpergewicht von ca. 25 g sowie einem Alter von 6-8 Wochen. Diese wurden bei Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) erworben und im Haus für experimentelle Therapie (HET) der Universität Bonn gehalten. Die Unterbringung erfolgte in einem vollklimatisierten Raum mit 12-stündigem Hell-Dunkel-Zyklus. Zur Fütterung wurde handelsübliches Mausefutter sowie Wasser ad libitum eingesetzt.

Die Tierversuche wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt und der Tierversuchsantrag (AZ: 50.203.2-BN 21,19/06) von der Bezirksregierung Köln genehmigt.

#### 3.2 Experimentelle Gruppen

Die Versuchstiere wurden in eine Semapimod-Gruppe sowie eine Placebo-Gruppe unterteilt. 90 min vor dem operativen Eingriff erhielt die Semapimod-Gruppe 5 mg/kg Körpergewicht Semapimod-HCl gelöst in 2,5%iger Mannitollösung, während der Placebo-Gruppe ausschließlich die Mannitollösung verabreicht wurde. Je nach Experiment erfolgte die Applikation intravenös (i.v.) in die Schwanzvene und/oder intraperitoneal (i.p.).

Beide Versuchsgruppen wurden zusätzlich in 2 Untergruppen geteilt, die entweder einer intestinalen Manipulation oder einer Sham-OP unterzogen wurden. Zusätzlich wurden bei einzelnen Experimenten unbehandelte und/oder unoperierte Tiere als Kontrolle verwendet.

Die Organentnahmen erfolgten je nach Experiment 15, 30 und 60 min, sowie 3, 6 und 24 h nach dem operativen Eingriff.

#### 3.3 Operativer Eingriff

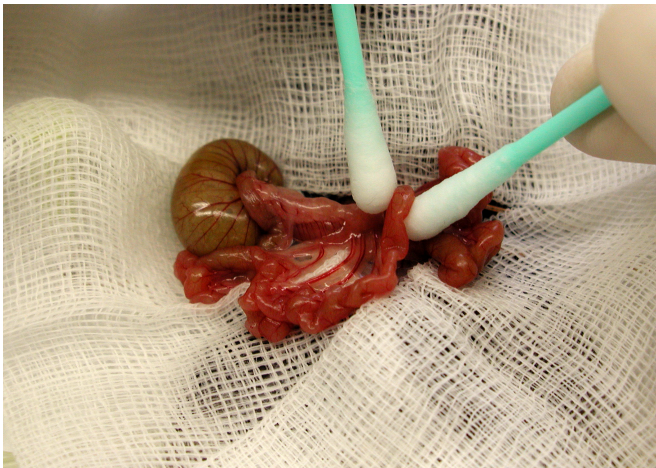
Die intestinale Manipulation (IM, Figure 2) ist eine bewährte und unter standardisierten Bedingungen ablaufende Methode zur Provokation einer postoperativen Darmatonie (de Jonge et al., 2004; Kalff et al., 1998 b; Wehner et al., 2007).

Hierzu wurden die Mäuse durch Inhalationsnarkose mit Isofluran bei einem O<sub>2</sub>-Fluss von 2 l/min sowie einem Isofluran-Anteil von 2-2,5 Vol% (Iso Flo Eickemeyer, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) anästhesiert. Im Anschluss an die Rasur und Hautdesinfektion des Abdomens



erfolgte eine mediane Laparatomie. Die Wunde wurde mit feuchten Kompressen umlegt, das Darmkonvolut vorsichtig eventriert und die Dünndarmschlingen auf den Kompressen aufgereiht. Daraufhin wurde der Dünndarm in einer aboral gerichteten Rollbewegung vom Magen bis zum Zökum mittels zweier feuchter Wattestäbchen kontinuierlich mit leichtem Druck komprimiert, was eine Evakuierung des Dünndarminhaltes in das Zökum bewirkte. Anschließend erfolgten die Rückverlagerung des Darmes in die Bauchhöhle sowie der einschichtige Verschluss des Abdomens mit einer fortlaufenden Naht (Seide 4-0, Ethicon GmbH). Nach dem Eingriff erholten sich die Tiere unter einer Wärmelampe.

Als Kontrolle dienten Tiere, bei denen lediglich eine Laparatomie ohne Eventration und Manipulation des Darmes durchgeführt wurde (Sham-OP).



**Figure 2.** Darstellung einer intestinalen Manipulation (IM). Diese unter standardisierten Bedingungen durchgeführte mechanische Reizung des gesamten Dünndarms ist der Auslöser der entzündlichen Reaktion in der Tunica muscularis, die postoperativ in einer deutlichen Abnahme der Darmmotilität resultiert.

### 3.4 Organentnahme und Präparation

Zum jeweiligen Zeitpunkt der Organentnahme wurden die Mäuse dem Ablauf vor dem operativen Eingriff entsprechend narkotisiert und median laparotomiert. Anschließend wurde das gesamte Darmkonvolut erneut eventriert und nach Durchtrennung des gastroösophagealen Übergangs, des Colon descendens, der Mesenteriumswurzel sowie des Treitz'schen Bandes zur weiteren Präparation in gekühlten, präoxygenierten Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) überführt. Nach der Entnahme wurde der Dünndarm in einer mit KHB gefüllten Sylgard®-Schale vollständig entfaltet, von Magen und Colon getrennt und in 3-5 cm lange Teilstücke zerschnitten.

Diese wurden an beiden Enden mit Nadeln fixiert und das Mesenterium ohne Eröffnung des Darmlumens entfernt.

Zur Auftrennung der Darmwandschichten in Muskularis und Mukosa wurden die Darmstücke auf einen der Lumenweite entsprechenden Glasstab gezogen. Nach vorsichtigem longitudinalen Durchtrennen der Muskularis mit einer Pinzette erfolgte die zirkuläre Abtrennung der Muskularis von der Mukosa mittels eines angefeuchteten Watteträgers. Dieses standardisierte Verfahren wird als Stripping bezeichnet. Nach Bearbeitung aller Darmstücke eines Tieres wurden die gesammelten Muskularis- und Mukosaprobe jeweils vermischt, zerkleinert, in sterile Kryotubes überführt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung des Gewebes bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 Phosphorylierung der p38 MAPK und JNK/SAPK

Die p38 MAPK und die JNK/SAPK werden durch Phosphorylierung aktiviert (Hommes et al. 2003). Die Menge an phosphorylierten Enzymen nach IM sowie die Auswirkungen von Semapimod auf die Enzymphosphorylierung wurden per Immunoblot ermittelt.

Um das Ausmaß der Aktivierung bei unbehandelten Tieren zu bestimmen wurden die Mengen von phosphorylierten Enzymen in der Muskularis von manipulierten Tieren 15, 30 und 60 min nach der Operation mit denen von unoperierten Kontrolltieren verglichen. Zum Nachweis der Auswirkungen von Semapimod auf die Aktivierung der p38 MAPK sowie der JNK/SAPK diente der Vergleich von Tieren, die vor dem operativen Eingriff intravenös entweder mit Semapimod oder Placebo vorbehandelt wurden. Als Zeitpunkt der Organentnahme wurde hierbei 30 min nach IM gewählt. Die Gruppenstärke betrug jeweils  $n = 5$ .

Zur Durchführung des Proteinnachweises wurden tiefgefrorene, durch Stripping gewonnene Muskularisproben in  $100\ \mu\text{l}$  pro 10 mg Gewebe PBS (Phosphate-buffered saline; Lonza, Verviers, Belgien), welches 2 mmol/l EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) enthielt, mechanisch homogenisiert (Polytron<sup>®</sup>; Kinematica AG, Littau/Luzern, Schweiz). Der Menge an PBS entsprechende Volumina von 2fach RIPA Lysepuffer (100 mmol/l Tris HCl pH 8, 300 mmol/l NaCl, 2% NP 40, 1% Natriumdeoxycholat, 0,2% Natriumdodecylsulfat) mit 2 mmol/l Natriumorthovanadat, 2 mmol/l  $\beta$ -Glycerolphosphat und Proteaseinhibitor-Cocktail (# P8340) wurden mit dem Homogenat vermischt. Anschließend wurden die Proben je zweimal 10 s sonifiziert und mit  $13.000 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert.

Mit dem abgenommenen Überstand wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben ein Pierce BCA-Assay (Perbio, Bonn, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Trennung der Proteine wurden jeweils 30 µg Protein einer Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) unterzogen. Diese erfolgte für 45 min bei 200 V in MES Laufpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einem 4%- 12% Bis-Tris-Gel (Nu-PAGE; Invitrogen).

Im Anschluss wurden die Proteine für eine Stunde bei 2,5 mA/cm<sup>2</sup> auf Immobilon-P Membranen (0,2 µmol/l PVDF; Millipore, Schwalbach, Deutschland) übertragen. Die Membranen wurden in TBS (Tris-buffered saline; Lonza) mit 0,1% Tween 20 (TBST) gewaschen und mit 5%iger Milchpulver/TBST-Lösung für eine Stunde geblockt.

Über Nacht erfolgte bei 4°C die Inkubation der Membranen mit Primärantikörpern gegen die p38 MAPK, die phospho-p38 MAPK<sup>Thr180/Tyr182</sup>, sowie die JNK/SAPK<sup>Thr183/Tyr182</sup> und die phospho-JNK/SAPK in einer Konzentration von 1:1000. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x 5 min mit TBST gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (Anti-rabbit-HRP, 1:2000) inkubiert. Sämtliche Antikörper wurden von NEB (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) bezogen.

Nach dem Auswaschen des Sekundärantikörpers erfolgte eine 5minütige Inkubation der Membranen in SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Substrat (Perbio). Abschließend konnten die Chemilumineszenzsignale mit dem LAS 4000 System (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) erfasst und ausgewertet werden.

### 3.6 Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Die 1985 von Karl Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) erlaubt die spezifische Darstellung von quantitativ geringen DNA-Mengen. Hierzu wird DNA in 25-50 Zyklen amplifiziert, wobei die Spezifität für ein bestimmtes Zielgen auf Primern beruht. Diese bestehen aus Ketten von 15-30 Basen, die komplementär zum Beginn bzw. Ende der gesuchten Gensequenz sind und als Ausgangspunkte der Amplifizierung durch die DNA-Polymerase dienen. Bei der quantitativen RT-PCR geht der DNA-Vervielfältigung die reverse Transkription von vorher aus Probenmaterial isolierter messenger RNA (mRNA) zu complementary DNA (cDNA) voraus.

Um Aussagen über die Ausprägung der Entzündungsreaktion zu verschiedenen Zeitpunkten treffen zu können wurden Zielgene benötigt, die auf unterschiedlichen Stufen der Entzündung von Bedeutung sind. Ausgewählt wurden Genexpressions-Sondenassays für Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ; CCL 3, #Mm00441258\_m1) und Interleukin-6 (IL-6; #Mm00446190\_m1) als klassische Marker der frühen Makrophagenaktivierung, sowie Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; CCL 2 #Mm00441242\_m1) und Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; #Mm00516023\_m1), die vor allem als Chemoattraktantien für Leukozyten dienen. Als Haushaltsgen, gegen welches die Expression der untersuchten Zielgene normalisiert wurde, diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH; #Mm4352339E). Sämtliche Assays wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Die RT-PCR wurde bei intravenös behandelten Tieren durchgeführt. Um eine Verlaufsbeobachtung bei der Expression der Zielgene zu ermöglichen wurden Organentnahmen 1, 3, 6 und 24 h nach dem operativen Eingriff durchgeführt. Die Gruppenstärke betrug  $n = 5-8$ . Als Vergleich dienten Kontrolltiere ( $n = 3$ ), die weder medikamentös behandelt noch operiert wurden.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte die Auftrennung von Muskularis und Mukosa durch Stripping mit anschließender Asservierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . 15-20 mg der tiefgefrorenen Muskularisproben wurden für eine RNA-Extraktion mit anschließendem DNA-Verdau zur Beseitigung eventueller Verunreinigungen durch genomische DNA verwendet. Hierzu wurde das Gewebe zunächst mechanisch homogenisiert (Polytron<sup>®</sup>; Kinematica AG, Littau/Luzern, Schweiz) und anschließend der NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Methode (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) unterzogen. Die weitere Lagerung der isolierten mRNA erfolgte erneut bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Um gewährleisten zu können, dass bei jeder Probe die gleiche Menge an mRNA zur cDNA-Synthese eingesetzt wird, erfolgte die Bestimmung der RNA-Quantität mittels eines Spektrophotometers (Nano-Drop ND-1000; PEQ LAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durch die Messung der Absorption bei Wellenlängen von 260 und 280 nm. Anhand der gemessenen RNA-Konzentration ließ sich bestimmen, welches Probenvolumen für die im Anschluss durchgeführte Synthese einheitlicher cDNA-Mengen benötigt wurde. Die Qualität der Probe ergab sich durch die Berechnung des 260/280- Quotienten, der bei reiner RNA Werte von 1,8-2,1 aufweist.

Zur anschließenden Synthese der cDNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Um einen gleichmäßigen Zusatz zu allen Proben zu gewährleisten wurde ein Master Mix aus definierten Volumina von 10× RT Buffer, 25× dNTP Mix (100 mM), 10× RT Random Primer, MultiScribe Reverse Transcriptase und RNase Inhibitor hergestellt. Dieser wurde mit den mRNA-Proben in einem UNO-Thermoblock (Biotron, Göttingen, Deutschland) für 10 min bei 25°C, 120 min bei 37°C und 5 s bei 85°C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde im Verhältnis 1:5 verdünnt und bei -20°C gelagert.

Zur Durchführung der PCR wurden 4 µl der verdünnten cDNA mit 6 µl eines frisch angesetzten Master Mix aus dem jeweiligen Genexpressions-Assay, TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und H<sub>2</sub>O auf eine PCR-Platte aufgebracht. Die Messung der amplifizierten cDNA erfolgte im Abi Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Hierbei folgten auf eine initiale Denaturierung von 10 min bei 95°C 40 Zyklen aus jeweils 15 s Denaturierung bei 95°C sowie 1 min Abkühlung und Elongation bei 60°C. Die erhaltenen Daten wurden nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet.

### 3.7 Myeloperoxidase-Färbung (MPO)

Die MPO-Färbung von isolierten Muskularis-Präparaten (Whole mounts) dient dem histochemischen Nachweis der Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Dünndarmmuskularis.

Die Färbung wurde bei einer Gruppenstärke von n = 5-7 bei intravenös und intraperitoneal behandelten Tieren 24 h nach intestinaler Manipulation oder Sham-OP durchgeführt.

Hierfür wurde in einer Sylgard®-Schale ein ca. 3 cm langes Teilstück des Jejunum aus dem restlichen Dünndarm herausgetrennt. Um zu gewährleisten, dass es sich bei allen Versuchstieren um einen vergleichbaren Darmabschnitt handelt, wurde das Teilstück bei allen Tieren aus dem gleichen Darmareal entnommen.

Nach mesenteriumsnaher Eröffnung des Darmlumens auf der gesamten Länge des Teilstückes folgte das Aufspannen des Präparates, wobei dieses sowohl in der Länge als auch in der Breite leicht gedehnt und mit Nadeln befestigt wurde.

Im Anschluss daran wurde für 10 min die chemische Fixierung des Präparates mit 100%igem Ethanol durchgeführt. Nach zweimaligem Ausspülen der Schale mit KHB erfolgte die Herstellung eines Muskularis-Whole mounts durch vollständige Entfernung der Mukosa unter dem Präparationsmikroskop (Leica MZ8; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland).

Zur Färbung des Whole mounts wurden jeweils frisch 10 mg Hanker-Yates-Reagenz (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) in 10 ml KHB gelöst. Diese Lösung wurde mit 100 µl 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und für 10 min auf das Präparat gegeben.

Nach gründlichem Auswaschen der Färbelösung mit KHB wurde das Präparat auf einen Objektträger aufgebracht, in Eindeckmedium (Microscopy Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und nach dem Trocknen unter dem Lichtmikroskop (TE-2000; Nikon, Düsseldorf, Deutschland) ausgewertet. Hierzu wurden an jeweils drei repräsentativen Stellen des Präparates vier Gesichtsfelder bei 100facher Vergrößerung zu einem Bild verbunden und fotografiert. Anschließend wurden die MPO<sup>+</sup> Zellen ausgezählt und als Zellen/mm<sup>2</sup> ausgewertet.

### 3.8 Nitritbestimmung

Die nach intestinalem Trauma gesteigerte NO-Produktion in der Darmwand bewirkt eine verringerte Darmmotilität und hat somit einen verlangsamten gastrointestinalen Transit zur Folge (Kalff et al., 2000).

Die von Green et al. 1982 entwickelte Griess-Reaktion ermöglicht die Bestimmung des Nitritgehalts einer Probe. Da Nitrit (NO<sub>2</sub>) ein stabiles NO-Oxidationsprodukt ist, lässt dies direkte Rückschlüsse auf den NO-Gehalt der Probe zu.

Die Griess-Reaktion wurde bei intravenös mit Semapimod oder Placebo behandelten, intestinal manipulierten Versuchstieren durchgeführt. Als Vergleich dienten behandelte, aber nicht operierte Tiere. Die Gruppenstärke betrug jeweils n = 4-5.

Die Organentnahme erfolgte 24 h nach dem operativen Eingriff, wobei die weitere Präparation in gekühltem PBS, welches 1% Amphotericin und 1% Penicillin/Streptomycin-Mixtur (P/S; Lonza) enthielt stattfand um ein späteres mikrobielles Wachstum zu inhibieren. Nach Isolierung der gesamten Muskularis durch Stripping wurde diese in Stücke von ca. 3 mm Länge geschnitten und in sterile Waschlösung, bestehend aus Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM; Lonza) mit 2% P/S überführt. Anschließend wurden die Proben 3x 5 min mit jeweils frischer Waschlösung gewaschen, und für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf 2 ml Waschlösung inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Gewebekultur makroskopisch und mikroskopisch auf bakteriellen Befall geprüft. Im Anschluss wurde der Überstand der Gewebekultur abgenommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das genaue Gewicht der Gewebeproben wurde mit der Feinwaage (AT 261 DeltaRange<sup>®</sup>, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) gemessen und notiert.

Zur Erstellung einer Nitrit-Eichkurve wurde zunächst eine  $\text{NaNO}_2$ -Standardreihe (160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 und  $0\ \mu\text{M}$  auf DMEM mit 2% P/S) angefertigt. Im Anschluss wurden die Standardreihe und die Probenüberstände als 100  $\mu\text{l}$ -Triplet auf eine 96-well-TC-Platte aufgetragen.

Zur Einleitung der Reaktion wurden 50  $\mu\text{l}$  Griess-Reagenz I (1,0% Sulfanilamid in 2,5%iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Lösung) und nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 50  $\mu\text{l}$  Griess-Reagenz II (0,1% Naphthylethylendiamin-HCl in 2,5%iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Lösung) auf die Standardreihe und die Proben pipettiert. Nach 10minütigem Schütteln bei 700 U/min erfolgte die Bestimmung der Nitritmenge im Mikroplatten Reader mit der Magellan Software (Safire; Tecan GmbH, Salzburg, Österreich) bei einer Wellenlänge von 520 nm. Durch das vorher gemessene Probengewicht ließ sich abschließend das innerhalb von 24 h produzierte Nitrit pro 1 g Muskelgewebe errechnen.

### 3.9 Muskelkontraktilität in vitro

Die nach intestinalem Trauma auftretende Entzündung der Darmwand hat eine verringerte Aktivität der glatten Muskelzellen der Tunica muscularis zur Folge.

Die in vitro-Messung der Kontraktilität jejunaler Muskelpräparate ist eine in verschiedenen Tiermodellen bewährte Methode zur Funktionsuntersuchung der Darmmuskulatur. Sie wurde bei intravenös behandelten, manipulierten Tieren ( $n = 8-9$ ) 24 h nach der Operation sowie unbehandelten, unoperierten Kontrolltieren ( $n = 4$ ) durchgeführt.

Zur Herstellung der Muskelpräparate wurde nach der Organentnahme wie beschrieben ein zentrales Teilstück des Dünndarmes herausgetrennt und in einer Sylgard<sup>®</sup>-Schale nach longitudinaler Eröffnung mit Nadeln aufgespannt. Anschließend erfolgte unter dem Präparationsmikroskop die Trennung von Muskularis und Mukosa, wobei ein schmaler Streifen Mukosa auf der dem Mesenterium gegenüber liegenden Seite der Muskularis belassen wurde. Nach Unterteilung des Präparates in ca. 2 mm breite Streifen wurden diese an der Seite des Mesenteriums mit einem Faden an der Nadel fixiert, während an der Seite der Mukosa zusätzlich eine Schlaufe angefertigt und die Fixiernadel entfernt wurde. Aus Stabilitätsgründen war es

hierbei wichtig, dass die Knoten nicht nur die Muskularis, sondern auch das Mesenterium bzw. die Mukosa umfassten.

Zur Messung der Kontraktilität wurden pro Tier sechs Muskularis-Streifen in ein Organbad-Setup gespannt. Hierzu wurden die Präparate einzeln mit der Nadel in einer mit KHB (37°C) perfundierten Organkammer fixiert und über die Schlaufe an einen isometrischen Kraftüberträger (ADI, Heidelberg, Deutschland) befestigt. Dieser war zur Verarbeitung der einwirkenden Zugkräfte mit einem Brückenverstärker sowie dem Powerlab System (ADI) verbunden. Die Darstellung und Auswertung der gemessenen Ausschläge erfolgte mit Hilfe der Chart Software (ADI).

Vor der Messung durchliefen die Muskularis-Streifen eine 30minütige Equilibrierungsphase, in der durch mehrmaliges, leichtes Dehnen die Vorspannung der Präparate optimiert wurde.

Um Dosis-Kontraktilitäts-Kurven erstellen zu können wurden die Präparate 10 min dem muskarinergen Agonisten Bethanecol in ansteigenden Konzentrationen von 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 und 300  $\mu\text{mol/l}$  ausgesetzt. Zwischen den einzelnen Konzentrationen erfolgte eine 10minütige Auswaschphase mit KHB.

Nach Abschluss der Kontraktilitätsmessung wurde die Länge sowie, nach Abtrennung der Mukosa und des Mesenteriums, das Reingewicht der Muskularis-Streifen bestimmt. Gemeinsam ermöglichten diese Daten eine abschließende Berechnung der kontraktilen Aktivität in der Einheit Gramm pro Quadratmillimeter pro Sekunde ( $\text{g/mm}^2/\text{s}$ ).

### 3.10 Gastrointestinaler Transit (GIT)

Die Messung des GIT entspricht einer Darstellung der Dünndarmpassage in einem festgelegten Zeitraum, was die in vivo Bewertung der motorischen Darmfunktion erlaubt.

Die Bestimmung des GIT wurde bei intravenös und intraperitoneal behandelten Tieren, die entweder intestinal manipuliert oder sham-operiert wurden, durchgeführt ( $n = 7-10$ ). Zusätzlich zum Standardzeitpunkt der Medikamentenapplikation 90 min vor dem operativen Eingriff, wurden auch Versuchstiere verwendet, die erst unmittelbar vor der Operation mit Semapimod oder Placebo behandelt wurden ( $n = 5$ ).

Zur Bestimmung der Dünndarmpassage wurde den Tieren 24 h nach dem operativen Eingriff nicht resorbierbares, an Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gebundenes Dextran (FITC-Dextran,



70.000 MW; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) oral verabreicht. Nach weiteren 90 min erfolgte die Organentnahme.

Der gesamte Gastrointestinaltrakt wurde entfaltet, gemessen und in 15 Segmente, bestehend aus Magen (1), Dünndarm (2-11), Zökum (12) und Colon (13-15), aufgeteilt. Die Teilsegmente wurden voneinander getrennt und in 2 ml Eppendorf-Caps, die mit 1 ml KHB gefüllt waren, überführt. Nach gründlichem Mischen wurden die Segmente bei 3000 U/min 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Caps bei 12.000 U/min erneut für 5 min zentrifugiert.

Anschließend wurden 100 µl des Überstandes als Duplikat auf eine 96-well-Platte auftragen und die Aktivität des Fluoreszenzmarkers in den einzelnen Segmenten bei einer Anregungswellenlänge von 494 nm sowie einer Emissionswellenlänge von 521 nm im Mikroplatten Reader (Safire, Tecan GmbH) bestimmt. Anhand dieser Werte ließ sich das geometrische Zentrum (GC) der Verteilung des Fluoreszenzmarkers mit folgender Formel bestimmen:

$$GC = \sum (\text{Prozentualer Anteil eines Segments an der Gesamtfluoreszenz} * \text{Segmentnummer}) / 100.$$

### 3.11 Verwendete Chemikalien

Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde eigenständig angesetzt ( $\text{Na}^+$  137,4 µmol/ l,  $\text{K}^+$  5,901 µmol/ l,  $\text{Ca}^{2+}$  2,5 µmol/ l,  $\text{Mg}^{2+}$  1,2 µmol/ l,  $\text{Cl}^-$  134 µmol/ l,  $\text{HCO}_3^-$  15,5 µmol/ l,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  1,13 µmol/ l und Glucose 11,5 µmol/ l) und anschließend zur Oxygenierung und Einstellung eines pH-Wertes von 7,3 bis 7,4 mit einem Gasgemisch von 97%  $\text{O}_2$ / 3%  $\text{CO}_2$  begast.

Semapimod wurde uns von Cytokine Pharmasciences Inc. (King of Prussia, Pennsylvania, USA) zur Verfügung gestellt.

Sämtliche anderen in dieser Studie verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

### 3.12 Statistische Datenanalyse

Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) dargestellt. Zur statistischen Auswertung erfolgte eine 2-way Anova (analysis of variance) gefolgt von einem Bonferroni-Test. Als Signifikanzlevel galten \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 und \*\*\*P < 0,001.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Generelle Beobachtungen

In dem 90minütigen Zeitintervall zwischen der medikamentösen Behandlung und dem operativen Eingriff zeigten die intraperitoneal mit Semapimod behandelten Tiere einen deutlich schlechteren Allgemeinzustand (AZ) als die mit Placebo behandelten Vergleichstiere. Dies äußerte sich in Lethargie, gesträubtem Fell und Zittern. Im Anschluss an die Operation war dieser Unterschied nicht mehr vorhanden. Die Aufwach- und Erholungsphase war nicht verlängert und der AZ sowie das Verhalten entsprachen den Tieren der Placebo-Gruppe.

Bei den intravenös behandelten Versuchstieren war zu keinem Zeitpunkt der Experimente ein Unterschied des AZ oder des Verhaltens zwischen den einzelnen Gruppen zu beobachten.

### 4.2 Aktivierung der p38 MAPK

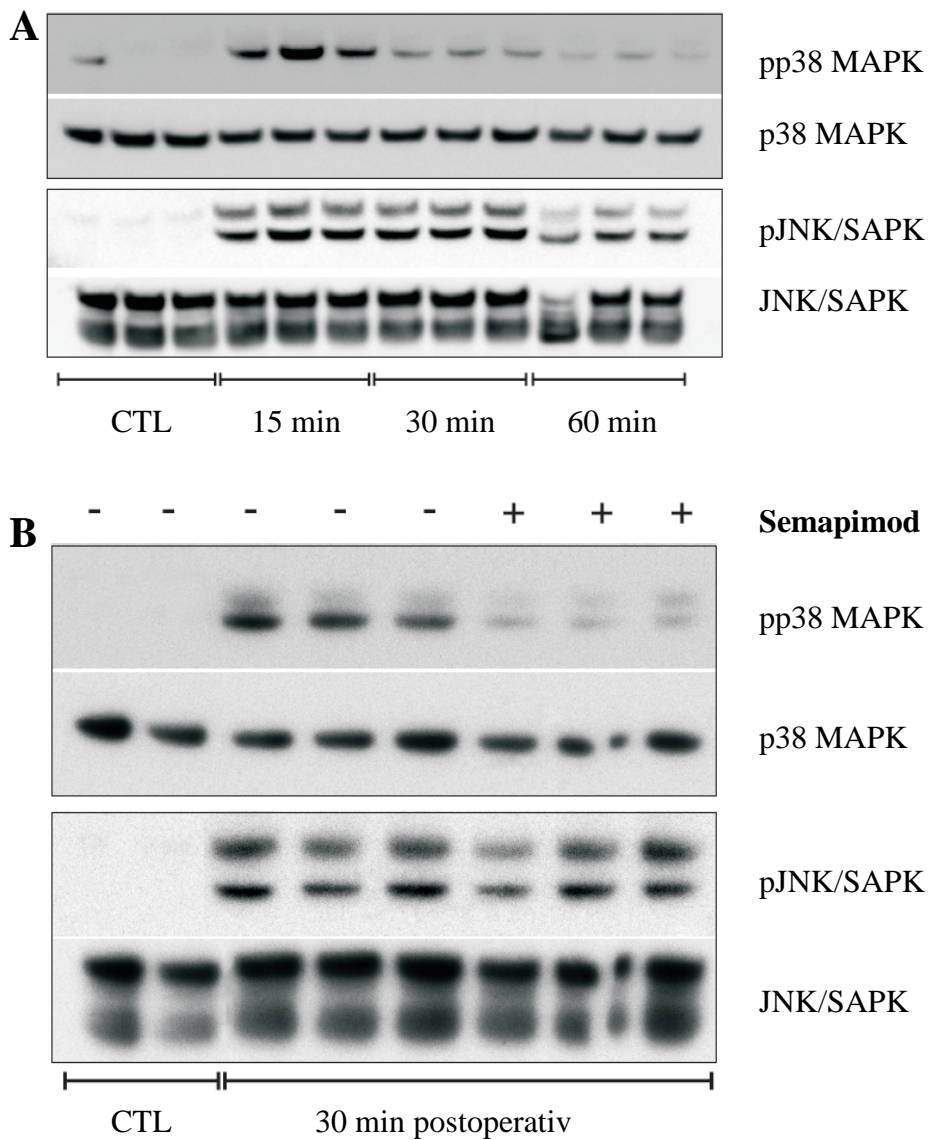
Die p38 MAPK sowie die JNK/SAPK nehmen eine Schlüsselrolle bei der Transmission von proinflammatorischen und mechanischen Stressstimuli ein (Pearson et al., 2001). Um nachzuweisen, dass diese Enzyme während der Entzündungsvorgänge, die im POI resultieren aktiviert sind, überprüften wir deren Phosphorylierung nach IM mittels Immunoblot.

Es zeigte sich, dass die p38 MAPK 15 min nach IM vermehrt in der phosphorylierten Form vorliegt. Die Menge an aktivierten Enzymen war nach 30 min vermindert und befand sich nach 60 min fast wieder auf dem Niveau unoperierter Kontrolltiere.

Eine deutliche Phosphorylierung der JNK/SAPK ließ sich nach 15 und 30 min nachweisen. Erst nach 60 min war eine leichte Abschwächung erkennbar (Figure 3A).

Bei der Analyse des Effekts einer intravenösen Semapimod-Applikation zeigte sich 30 min nach IM eine im Vergleich zur Placebo-Gruppe deutlich verminderte Aufregulierung der p38 MAPK-Phosphorylierung, ähnlich dem Kontrollniveau.

Bei der Betrachtung der Phosphorylierung der JNK/SAPK war kein Effekt der Behandlung mit Semapimod erkennbar (Figure 3B).



**Figure 3.** Aktivierung der p38 MAPK und JNK/SAPK nach IM. (A) Die Phosphorylierung (p) der p38 MAPK zeigt 15 min nach IM ein Maximum und nimmt innerhalb von 60 min deutlich ab. Bei der JNK/SAPK ist die Menge an aktivierten Enzymen nach 30 min ebenso hoch wie nach 15. Bis mindestens 60 min nach IM bleibt phosphoryliertes Enzym nachweisbar. (B) Eine präoperative i.v.-Applikation von Semapimod bewirkt eine deutlich verminderte Aktivierung der p38 MAPK, bleibt jedoch ohne Auswirkung auf die Menge an pJNK/SAPK. Unphosphorylierte Proteine dienten als loading controls. Die Kontrollproben stammten von unbehandelten, unoperierten Tieren.

### 4.3 Proinflammatorische Genexpression

Im Anschluss an den Nachweis der hemmenden Wirkung von Semapimod auf die Aktivierung der p38 MAPK, untersuchten wir die Genexpression der proinflammatorischen Proteine MIP-1 $\alpha$ , IL-6, MCP-1 und ICAM-1 1, 3, 6 und 24 h nach IM.

Um die Auswirkungen der intestinalen Manipulation auf die Genexpression zu verdeutlichen, benutzten wir auch Muskularisproben von sham-operierten Tieren der Placebo-Gruppe. Es zeigte sich, dass die Aufregulation bei allen Proteinen zu jedem Zeitpunkt deutlich geringer ausgeprägt war als bei den manipulierten Vergleichstieren (Figure 4A-D).

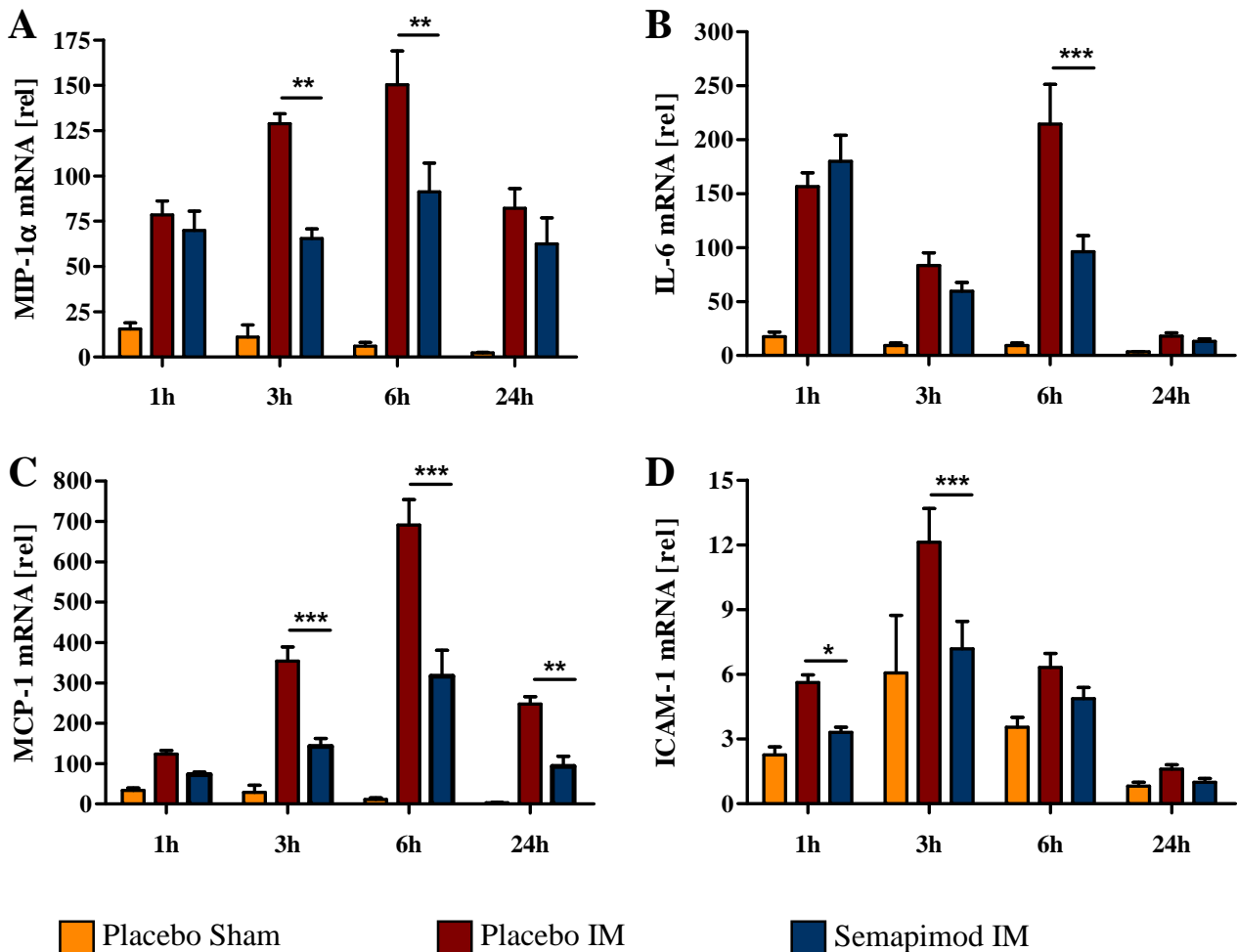
Die Genexpression von MIP-1 $\alpha$ , einem klassischen Marker der frühen Makrophagenaktivierung war nach 1 h bei mit Placebo behandelten Tieren im Vergleich zu unoperierten Kontrolltieren 78  $\pm$  20fach erhöht. Nach 3 h war die Expression auf das 129  $\pm$  12fache angestiegen, um nach 6 h mit einer 150  $\pm$  42fachen Erhöhung das Maximum der Aufregulation zu erreichen. Nach 24 h war ein deutlicher Abfall der Genexpression auf das 82  $\pm$  30fache des Kontrollniveaus erkennbar. Eine intravenöse Applikation von Semapimod bewirkte eine signifikante Reduktion der Aufregulation von 50% (65  $\pm$  12) nach 3 h sowie 39% (91  $\pm$  35) nach 6h (Figure 4A).

Die Expression von IL-6 erreichte ebenfalls 6 h nach IM mit einer 213  $\pm$  82fachen Erhöhung sein Maximum. Nach Gabe von Semapimod ließ sich eine hochsignifikante Verringerung um über 55% dieses Wertes (96  $\pm$  34) nachweisen (Figure 4B).

Die mRNA des Monozytenlockstoffs MCP-1 war in der Placebo-Gruppe nach 1 h 123  $\pm$  25fach sowie nach 3 h 353  $\pm$  78fach aufreguliert und erreichte nach 6 h mit einem Wert von 691  $\pm$  154 das Maximum. Nach 24 h war die Genexpression auf einen 247  $\pm$  51fach erhöhten Wert abgesunken. Mit Semapimod behandelte Tiere zeigten nach 3 (142  $\pm$  45), 6 (317  $\pm$  143) und 24 h (92  $\pm$  44) eine signifikante Verminderung der MCP-1-Expression um 60%, 54% bzw. 63% (Figure 4C).

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 war im Vergleich zu den anderen Proteinen nur gering und in erster Linie während der Frühphase aufreguliert. Der Maximalwert wurde nach 3 h mit 12,1  $\pm$  3,5 erreicht. 24 h nach IM entsprach das Expressionsniveau praktisch dem der Kontrolltiere (1,6  $\pm$  0,6). Dennoch ließen sich nach Behandlung mit Semapimod signifikante Verringerungen von ca. 40% nach 1 h (5,6  $\pm$  0,97fach vs. 3,3  $\pm$  0,7fach) und 3 h (12,1  $\pm$  3,5fach vs. 7,2  $\pm$  2,8fach) nachweisen (Figure 4D).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Genexpression typischer proinflammatorischer Proteine in der Muskularis 3-6 h nach intestinaler Manipulation ein Maximum erreicht und nach 24 h bereits wieder deutlich abgenommen hat. Die einmalige, präoperative Gabe von Semapimod führte sowohl in der initialen als auch in der Effektorphase der Entzündung zu einer signifikanten Verminderung der proinflammatorischen Genexpression.



**Figure 4.** mRNA-Expression von MIP-1 $\alpha$  (A), IL-6 (B), MCP-1 (C) und ICAM-1 (D) in der Muskularis nach IM. Untersucht wurden sham-operierte und intestinal manipulierte Mäuse der Placebo-Gruppe sowie manipulierte Mäuse der Semapimod-Gruppe (n = 5-8). Sämtliche Gene waren 1 h nach IM signifikant aufreguliert und erreichten den Maximalwert nach 6 h bzw. 3 h (ICAM-1). Eine einzelne intravenöse Gabe von Semapimod resultierte in einer signifikant verringerten Genexpression von MIP-1 $\alpha$  (3 und 6 h), IL-6 (6 h), MCP-1 (3, 6 und 24 h) sowie ICAM-1 (1 und 3 h) im Vergleich zu manipulierten Placebo-Tieren. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01 und \*\*\*P < 0,001).

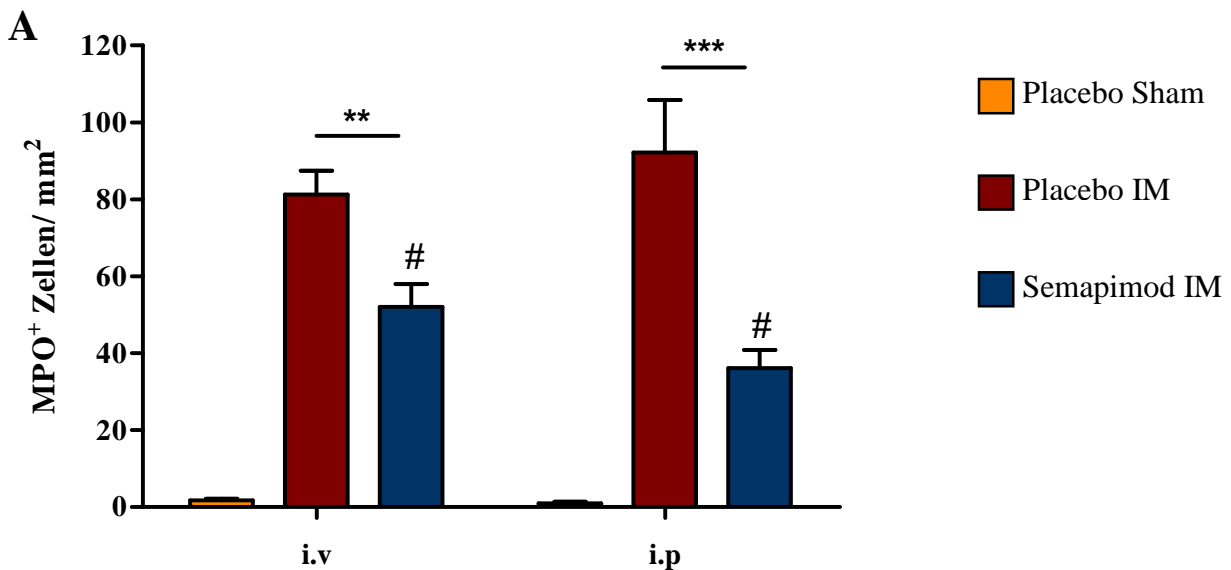
#### 4.4 Muskularis-Infiltration neutrophiler Granulozyten

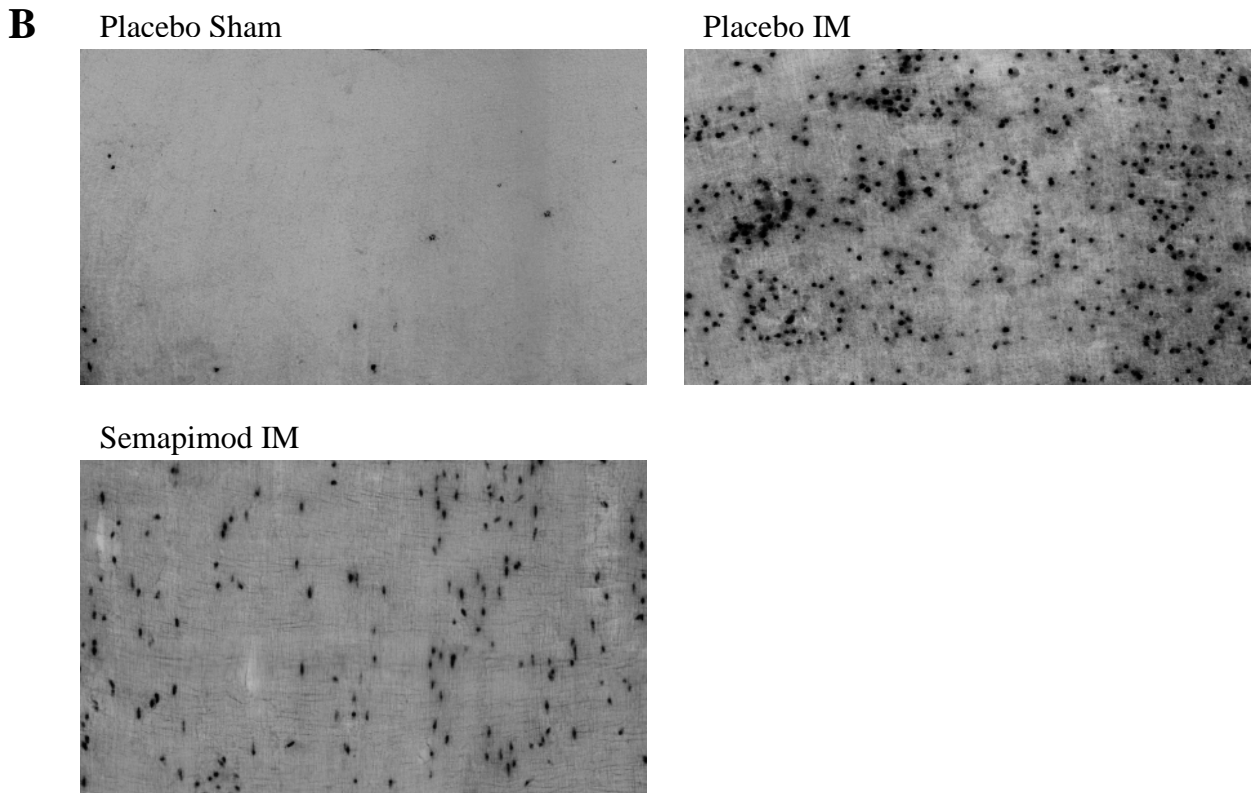
Um festzustellen, ob die verminderte proinflammatorische Genexpression auch in einer insgesamt abgeschwächten Entzündungsreaktion resultiert, untersuchten wir die Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Muskularis 24 h nach IM oder Sham-OP bei intravenös und intraperitoneal behandelten Tieren mittels Myeloperoxidase (MPO)-Färbungen (Figure 5).

Bei beiden Applikationsformen war die Muskularis der sham-operierten Placebo-Tiere signifikant weniger infiltriert als die der manipulierten Semapimod-Gruppe.

Intravenös mit Placebo behandelte Versuchstiere wiesen nach IM mit  $81,3 \pm 15,1$  MPO<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> eine signifikant höhere Infiltration als sham-operierte Tiere der Placebo-Gruppe ( $1,7 \pm 1,0$ ) auf. Die Behandlung mit Semapimod vor IM hatte eine um 36 % signifikant verringerte Zellzahl von  $52,1 \pm 15,5$  zur Folge.

Bei den intraperitoneal behandelten Placebo-Tieren war die signifikante Erhöhung der Infiltration der manipulierten Versuchstiere ( $92,2 \pm 30,5$ ) im Vergleich zur Sham-OP ( $1,0 \pm 0,7$ ) ebenfalls deutlich erkennbar. Hier ließ sich durch Semapimod eine signifikante Abnahme der Infiltration von über 60% ( $36,1 \pm 10,7$ ) erreichen. Trotz dieser prozentual stärkeren Verringerung der Infiltration ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten der intraperitoneal und intravenös behandelten Tiere (Figure 5A).





**Figure 5.** (A) Histochemische Bestimmung der Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Muskularis mittels MPO-Färbungen 24 h nach IM oder Sham-OP bei intravenös und intraperitoneal behandelten Tieren (n = 5-7). Bei beiden Applikationsformen wird durch Semapimod eine signifikante Verminderung der Infiltration erreicht (\*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsformen ist nicht vorhanden (#). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. (B) Exemplarische Ausschnitte von Aufnahmen der Muskularis-Whole mounts intraperitoneal behandelter Tiere nach MPO-Färbung bei 400facher Vergrößerung.

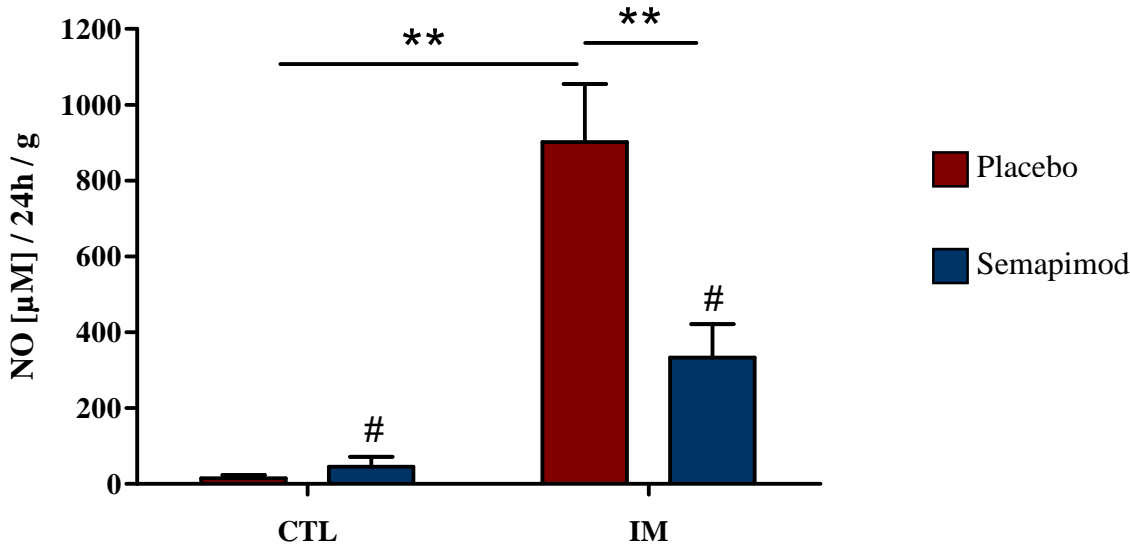
#### 4.5 NO-Produktion in Muskularis-Gewebekulturen

Das Ausmaß der NO-Produktion in der Muskularis untersuchten wir indirekt durch Bestimmung der Nitritmenge ( $\text{NO}_2$ ) in den Überständen von Gewebekulturen mittels der Griess-Reaktion.

Es wurde deutlich, dass sich unoperierte Tiere in ihrer basalen NO-Produktion nach einer intravenösen Behandlung mit Placebo ( $15,0 \pm 13,7 \mu\text{M}/24\text{h/g}$ ) oder Semapimod ( $45,5 \pm 52,2 \mu\text{M}/24\text{h/g}$ ) nicht signifikant unterscheiden.

Intestinal manipulierte Placebo-Tiere zeigten eine signifikant erhöhte NO-Freisetzung von  $901 \pm 306 \mu\text{M}/24\text{h/g}$ . Nach Gabe von Semapimod konnten wir eine um 63% signifikant verminderte NO-Freisetzung von  $333 \pm 198 \mu\text{M}/24\text{h/g}$  nachweisen. Die Werte waren so weit abgesunken,

dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der manipulierten und der unoperierten Semapimod-Gruppe feststellbar war (Figure 6).



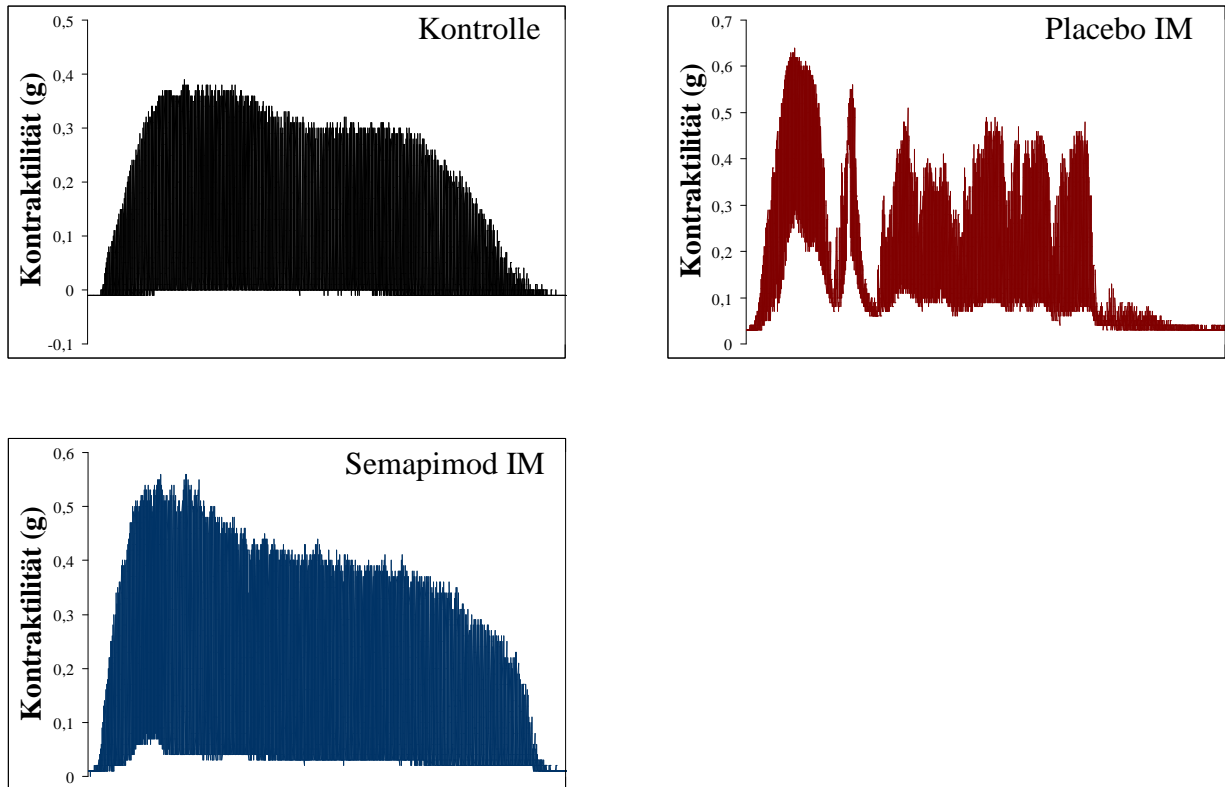
**Figure 6.** NO-Produktion in Muskularis-Gewebekulturen von unoperierten sowie intestinal manipulierten Placebo- und Semapimod-Tieren (n = 4-5). Nach IM lag bei der Placebo-Gruppe eine signifikant erhöhte NO-Produktion (\*\*P < 0,01) vor. Im Vergleich dazu waren die Werte der manipulierten Semapimod-Gruppe signifikant (\*\*P < 0,01) so weit vermindert, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zur unoperierten Kontrollgruppe (CTL) vorhanden war (#). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

#### 4.6 Muskelkontraktilität in vitro

Die Kontraktilität der Dünndarmmuskulatur bestimmten wir durch Messung der spontanen bzw. durch Bethanecol stimulierten Kontraktionen zirkulärer Muskularispräparate des Jejunum von manipulierten Placebo- und Semapimod-Tieren sowie unbehandelten, unoperierten Kontrolltieren.

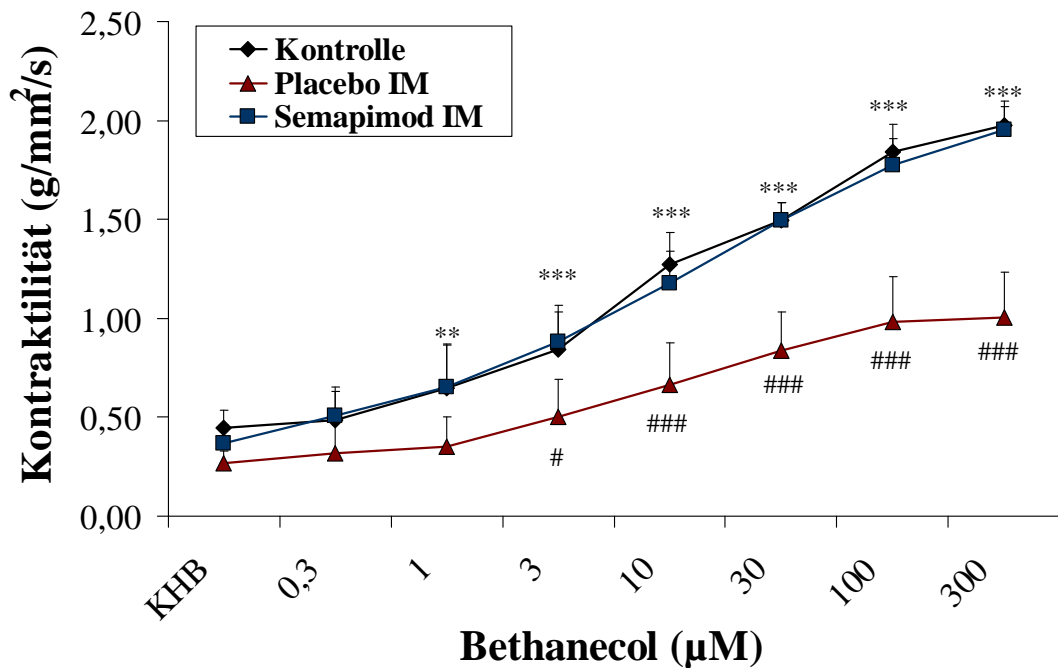
Bei der Betrachtung von Ableitungen der Kontraktionen unter Bethanecol (Figure 5A) zeigte sich, dass die Ausschläge bei den Kontrolltieren ein Plateau ausbildeten und über die gesamte Phase der Stimulation hielten, während die Ausschläge bei manipulierten Placebo-Tieren nach einem vergleichbaren Anfangsniveau wiederholt abfielen. Die Ableitungen von manipulierten Tieren der Semapimod-Gruppe glichen hingegen weitgehend denen der Kontrolltiere (Figure 7).





**Figure 7.** Repräsentative Ableitungen der untersuchten Gruppen bei einer Bethanecolkonzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$ . Während die Ausschläge der Kontroll- und Semapimod-Tiere ein stabiles Plateau ausbilden, kommt es bei der manipulierten Placebo-Gruppe phasenweise zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktilität.

Die Auswertung der Messwerte ergab, dass sich die Kontraktilität manipulierter Placebo-Tiere in der Spontanaktivität sowie bei Stimulation mit Bethanecolkonzentrationen von  $0,3$  und  $1 \mu\text{mol/l}$  nicht signifikant von den Kontrolltieren unterscheidet. Bei allen weiteren Konzentrationen ( $3$ - $300 \mu\text{mol/l}$ ) war die Kontraktilität nach IM signifikant verringert. Im Vergleich zwischen den manipulierten Placebo- und Semapimod-Tieren war die Kontraktilität der Semapimod-Gruppe bei allen Konzentrationen außer  $0,3 \mu\text{mol/l}$  signifikant erhöht. Zwischen der manipulierten Semapimod-Gruppe sowie der Kontrollgruppe lag bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied vor (Figure 8).



**Figure 8.** Spontane und durch Bethanecol stimulierte Kontraktilität zirkulärer ME-Präparate aus manipulierten Placebo- und Semapimod-Tieren ( $n = 8-9$ ) sowie unbehandelten, unoperierten Kontrollen ( $n = 4$ ).

Die Kontraktilität der Placebo-Tiere ist ab einer Bethanecolkonzentration von  $3\mu\text{mol/l}$  signifikant geringer als die der unoperierten Kontrollen ( $\#P < 0,05$ ,  $###P < 0,001$ ). Ab der Konzentration  $1\mu\text{mol/l}$  ist eine signifikant verbesserte Kontraktilität der Semapimod-Tiere gegenüber der Placebo-Gruppe erkennbar ( $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- sowie der Semapimod-Gruppe bestehen nicht. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt.

#### 4.7 Gastrointestinaler Transit (GIT)

Die Bestimmung des GIT ermöglicht die *in vivo* Beurteilung der motorischen Darmfunktion und ist somit einer der wichtigsten Parameter zur Bewertung der postoperativen Darmatonie.

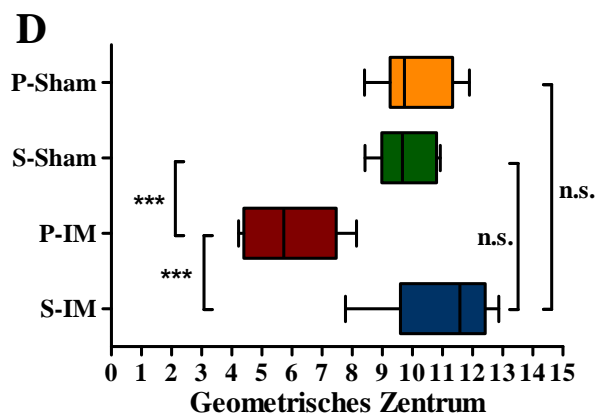
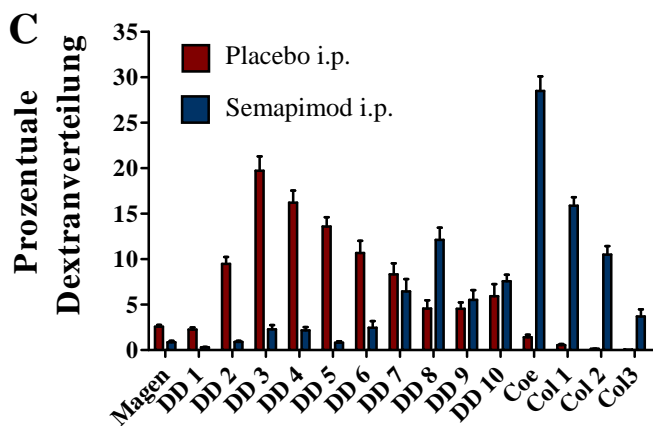
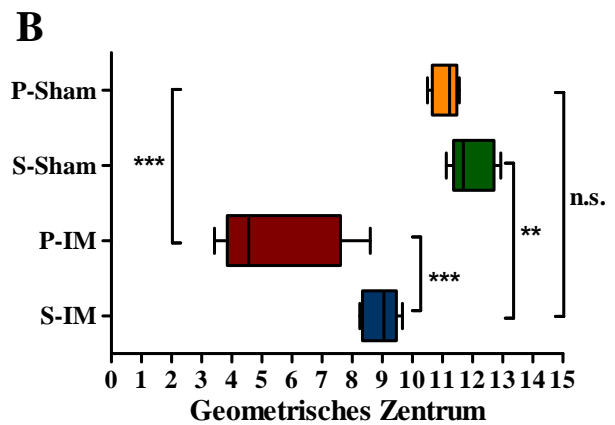
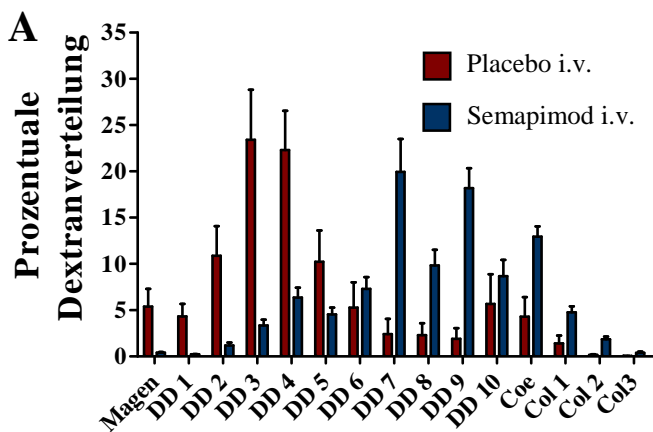
Die 90 min präoperativ intravenös behandelten Placebo-Tiere wiesen nach IM einen GIT auf, der mit einem geometrischen Zentrum (GC) von  $5,44 \pm 2,0$  im Vergleich zu sham-operierten Tieren ( $11,13 \pm 0,45$ ) signifikant verzögert war. Die intravenöse Applikation von Semapimod führte zu einem normalisierten GIT mit einem GC von  $8,97 \pm 0,60$ . Dieser war signifikant schneller als bei den manipulierten Placebo-Tieren, aber signifikant langsamer als bei den sham-operierten Tieren der Semapimod-Gruppe, die ein GC von  $11,98 \pm 0,73$  hatte. (Figure 9A u. B).

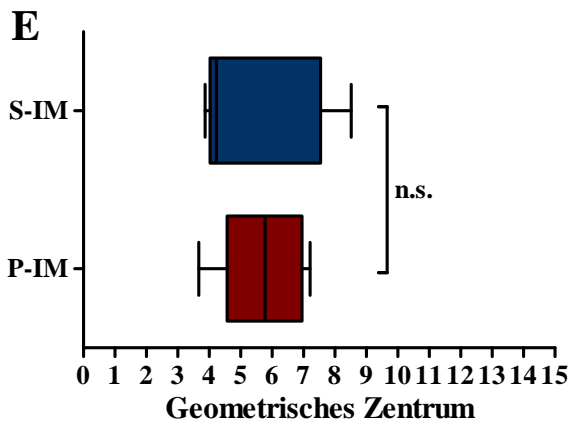
Bei der intraperitonealen Gabe ließ sich ebenfalls feststellen, dass die manipulierten Placebo-Tiere ( $5,97 \pm 1,54$ ) einen signifikant langsameren GIT aufwiesen als die sham-operierten Tiere

der Placebo- ( $10,09 \pm 1,2$ ) und Semapimod-Gruppe ( $9,81 \pm 0,92$ ). Die Behandlung mit Semapimod hatte auch hier einen signifikant beschleunigten GIT ( $10,96 \pm 1,71$ ) zur Folge. Das GC hatte sich so weit normalisiert, dass kein signifikanter Unterschied zu den sham-operierten Kontrollen bestand (Figure 9C u. D). Ein signifikanter Unterschied zur intravenös behandelten und manipulierten Semapimod-Gruppe war jedoch nicht nachweisbar.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den sham-operierten Gruppen lag bei beiden Applikationsformen nicht vor.

Im Gegensatz zu diesen Resultaten fiel auf, dass die Normalisierung des GIT ausblieb, wenn die intravenöse Behandlung mit Semapimod erst unmittelbar vor IM stattfand. Mit nicht signifikant unterschiedlichen GC-Werten von  $5,48 \pm 2,01$  (Semapimod) und  $5,77 \pm 1,37$  (Placebo) zeigten beide Gruppen eine deutlich verzögerte Darmpassage (Figure 9E).





**Figure 9.** Gastrointestinaler Transit (GIT) i.v. und i.p. behandelter Tiere nach IM oder Sham-OP. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von FITC-Dextran in 15 Segmenten (A und C), bestehend aus Magen, Dünndarm (DD 1-10), Zökum (Coe), und Colon (Col 1-3), sowie das geometrische Zentrum (GC) der Verteilung (B, D und E) 90 min nach oraler Gabe. (A und C) Der Großteil an FITC-Dextran befindet sich bei den Semapimod-Gruppen beider Applikationsformen deutlich weiter distal als bei den Placebo-Gruppen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. (B und D) Manipulierte Placebo-Tiere (P-IM) weisen bei beiden Applikationsformen ( $n = 7-10$ ) einen im Vergleich zu den sham-operierten Kontrollen (P-Sham, S-Sham) und den manipulierten Semapimod-Tieren (S-IM) signifikant verlangsamten ( $***P < 0,001$ ) GIT auf. Bei i.v. mit Semapimod behandelten Tieren zeigt sich nach IM eine im Vergleich zu sham-operierten Semapimod-Tieren ein signifikant verlangsamter GIT ( $**P < 0,01$ ). Zur sham-operierten Placebo-Gruppe ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Die i.p. Behandlung mit Semapimod führt zu einem normalisierten GIT auf Kontrollniveau. Ein signifikanter Unterschied zwischen den manipulierten Semapimod-Gruppen beider Applikationsformen besteht nicht. (E) Nach i.v. Behandlung mit Semapimod direkt vor IM ( $n = 5$ ) bleibt eine Verbesserung des GIT im Vergleich zur Placebo-Gruppe vollständig aus.

## 5 Diskussion

Die Entstehung eines mit erhöhter Morbidität, Mortalität und wirtschaftlichem Schaden einhergehenden postoperativen Ileus (POI) gehört zu den wichtigsten Komplikationen abdominalchirurgischer Eingriffe. Eine gezielte und ausreichend effiziente Therapie ist bis heute nicht verfügbar. Daher ist die Entwicklung neuer, wenn möglich prophylaktischer Therapieansätze für den klinischen Einsatz von großer Bedeutung.

Die Pathogenese des POI beruht auf sich gegenseitig beeinflussenden neurogenen, inflammatorischen und pharmakologischen Faktoren. Die postoperative Entzündung in der Tunica muscularis, deren Ausmaß unmittelbar von der Schwere der intraoperativen Traumatisierung des Darmes abhängt, ist hierbei die für die Dauer und Ausprägung der Motilitätsstörung wichtigste Komponente. Ein dichtes Netzwerk von residenten Makrophagen in der Tunica muscularis nimmt bei der Initiierung dieser Entzündungsreaktion, die sich in der Rekrutierung immunkompetenter Leukozyten aus dem Blutkreislauf und der Freisetzung kinetisch aktiver Mediatoren wie NO oder Prostaglandinen äußert, eine Schlüsselrolle ein (Bauer et al., 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu überprüfen, ob sich diese Entzündung und die durch sie bedingte Störung der Darmmotilität durch gezielte Hemmung der proinflammatorischen p38 MAPK-Signalkaskade in Makrophagen verhindern lässt. Hierzu dienten die Quantifizierung der proinflammatorischen Genexpression, der leukozytären Gewebeinfiltration und der NO-Produktion sowie die Analyse der Darmmotilität nach operativem Trauma. Wir konnten zeigen, dass die p38 MAPK, eine entscheidend an der Vermittlung entzündlicher Reaktionen beteiligte Proteinkinase, unmittelbar nach intestinaler Manipulation verstärkt in ihrer aktivierten Form vorliegt. Die präoperative Verabreichung des spezifischen p38 MAPK-Inhibitors Semaipimod hatte postoperativ eine reduzierte Entzündung sowie eine völlig normalisierte Darmmotilität zur Folge. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass die präoperative Gabe von Semaipimod eine geeignete Option für einen prophylaktischen Therapieansatz des POI in der Klinik darstellen könnte.

Seitdem die Bedeutung der Muskularis-Makrophagen und der durch sie ausgelösten entzündlichen Reaktion in der Genese des POI bekannt ist, wurde wiederholt versucht eine Abmilderung der postoperativen Störung der Darmmotilität durch selektive antiinflammatorische

Strategien zu erreichen. Diese waren meist gegen einzelne proinflammatorische Mediatoren wie IL-6, ICAM-1 oder MCP-1 gerichtet (The et al., 2005; Türler et al., 2002; Wehner et al., 2005). In anderen Studien wurden inhibitorisch auf die glatte Darmmuskulatur wirkende Substanzen, wie NO oder Prostaglandine untersucht (Kalff et al., 2000; Schwarz et al. 2001). Obwohl all diese Ansätze die postoperative Darmmotilität günstig beeinflussten, stellt die gezielte Blockade eines einzelnen proinflammatorischen Mediators wohl keine Option zu einer effektiven Prophylaxe des POI dar. Klinische Studien belegen, dass ein solches Vorgehen nicht ausreicht um ein komplexes inflammatorisches Geschehen ausreichend abzumildern (Minnich et al., 2004).

Wehner et al. (2007) zeigten erstmals, dass eine pharmakologische Inaktivierung bzw. das genetisch bedingte Fehlen der Muskularis-Makrophagen in einer deutlich verminderten Entzündungsreaktion sowie einer normalisierten Darmmotilität nach intestinaler Manipulation resultiert. Der Vorteil des in dieser Studie durchgeführten pharmakologischen Eingreifens liegt in der Hemmung der initialen Aktivierung der Makrophagen, was mit einer deutlich verringerten Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren einhergeht. Dies scheint eine im Vergleich zur Blockade einzelner Mediatoren deutlich potentere Option zur Eindämmung der komplexen Entzündung in der Tunica muscularis zu sein.

Die von Wehner et al. angewandte Methode ist allerdings aufgrund des hohen Zeitaufwandes und der Möglichkeit einer andauernden, systemischen Immunsuppression in der Klinik nicht einsetzbar. Eine Alternative könnte die gezielte Inhibition proinflammatorischer Signalkaskaden in Makrophagen darstellen. Eine wichtige Rolle innerhalb dieser Signalwege nimmt die p38 MAPK ein, von der bekannt ist, dass sie während komplexen inflammatorischen Vorgängen wie einer Sepsis oder bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verstärkt in ihrer aktivierten Form vorliegt (Hollenbach et al., 2004; Wätzig et al., 2002). Eine zentrale Beteiligung dieses Signalweges in der Pathogenese des POI wurde bisher nicht überprüft. Anhand unserer Ergebnisse, die eine starke Phosphorylierung der p38 MAPK unmittelbar nach intestinaler Manipulation zeigten, konnten wir diese Beteiligung nachweisen.

Das tetravalente Guanylhydrazon Semapimod (ehemals CNI 1493) wurde mehrfach als makrophagenspezifischer Inhibitor des p38 MAPK-Signalweges, sowie der ebenfalls an der Regulation entzündlicher Reaktionen beteiligten JNK/SAPK beschrieben (Bianchi et al., 1996; Cohen et al., 1996; Löwenberg et al., 2005).

Ein wichtiger Mechanismus für diese Makrophagenspezifität scheint die Opsonierung von Semapimod durch das Serumprotein Fetuin zu sein. Dieses besitzt eine hohe Affinität für die Zellmembran von Makrophagen und ermöglicht die Aufnahme von Semapimod ins Zellinnere. Die Aufhebung der Wirkung von Semapimod nach Behandlung mit gegen Fetuin gerichteten Antikörpern verdeutlicht die Bedeutung dieses Vorganges (Wang et al., 1998).

Wir konnten zeigen, dass die Menge an phosphorylierter p38 MAPK in der Muskularis von Mäusen, die präoperativ intravenös mit Semapimod behandelt wurden, deutlich geringer ist als bei unbehandelten Tieren. Eine Restaktivierung des Enzyms bestand allerdings auch bei behandelten Tieren. In Versuchen mit homozygoten Osteopetrosis-Mäusen ( $OP^{-/-}$ ), deren Resultate gemeinsam mit den Erkenntnissen dieser Studie veröffentlicht wurden, konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der p38 MAPK vor allem in den Makrophagen stattfindet und ausschließlich in diesen durch Semapimod inhibiert wird. So ergab sich bei den  $OP^{-/-}$ -Mäusen, die aufgrund einer Mutation im CSF-1-Gen praktisch keine Muskularis-Makrophagen besitzen, eine signifikant verringerte Phosphorylierung der p38 MAPK nach intestinaler Manipulation. Eine präoperative Behandlung dieser Tiere mit Semapimod hatte jedoch keine darüber hinausgehenden Verringerung der Enzymphosphorylierung zur Folge (Wehner et al., 2009).

Diese Ergebnisse führen gleichzeitig zu der Schlussfolgerung einer nicht ausschließlich auf die Muskularis-Makrophagen begrenzten postoperativen p38 MAPK-Aktivierung. Neben anderen ortständigen Leukozyten könnte die residuale Enzymphosphorylierung auf glatte Muskelzellen zurückzuführen sein, da auch von diesen bekannt ist, dass sie über eine Aktivierung der p38 MAPK an der Verbreitung proinflammatorischer Signale im Gastrointestinaltrakt beteiligt sind (Salinthoné et al., 2004).

Die JNK/SAPK ließ sich nach intestinaler Manipulation ebenfalls vermehrt in ihrer aktivierten Form nachweisen. Allerdings hatte die Behandlung mit Semapimod in diesem Fall keinen hemmenden Einfluss auf die Enzymaktivierung. Demnach konnte die von Löwenberg et al. (2005) beschriebene Beobachtung einer verminderten Aktivierung der JNK/SAPK nach Behandlung mit Semapimod in unserem Modell nicht nachvollzogen werden. Unsere Resultate sprechen für eine selektiv hemmende Wirkung von Semapimod auf die Phosphorylierung der p38 MAPK. Eine mögliche Ursache dieser Abweichung könnten Unterschiede in den Signalmustern zwischen den von uns untersuchten residenten Muskularis-Makrophagen sowie der von Löwenberg et al. verwendeten immortalisierten v-myc Makrophagen-Zelllinie sein.

De Jonge et al. (2004) stellten die Hypothese einer initialen Aktivierung von Mastzellen als Ursache der postoperativen Entzündungsreaktion in der Darmwand auf. Die von uns nachgewiesene schnelle Aktivierung der p38 MAPK unterstützt jedoch die von Wehner et al. (2007) geäußerte Hypothese einer frühzeitigen Beteiligung der Makrophagen an der Initiierung der Inflammation. Ob und in welcher Form eine chronologische Abfolge in der Aktivierung dieser Zellpopulationen besteht lässt sich anhand unserer Ergebnisse allerdings nicht abschließend feststellen. Hierzu werden weitere Studien notwendig sein.

Die intravenöse Behandlung mit Semapimod hatte sowohl in der initialen als auch der Effektorphase der postoperativen Entzündung eine signifikante Abnahme der proinflammatorischen Genexpression zur Folge. Dies spiegelte sich auch in einer deutlich verminderten Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Tunica muscularis wieder. Allerdings waren sowohl die proinflammatorische Genexpression als auch die entzündliche Infiltration bei den intestinal manipulierten Semapimod-Tieren nicht vollständig aufgehoben, sondern im Vergleich zu sham-operierten Kontrolltieren signifikant erhöht. Als Ursache dessen kommen die bereits beschriebene fehlende Hemmung der p38 MAPK in anderen Zellen der Tunica muscularis sowie parallel ablaufende proinflammatorische MAPK-Kaskaden wie beispielsweise der JNK/SAPK-Signalweg in Frage. Dennoch unterstreicht die ausgeprägte Abnahme der inflammatorischen Reaktionen durch gezielte Hemmung der p38 MAPK deren zentrale Bedeutung für die Aktivierung der Muskularis-Makrophagen nach operativem Trauma.

Die in vitro- Beurteilung der postoperativen Motilität der Dünndarmmuskulatur nach intravenöser Behandlung mit Semapimod im Organbad-Setup ergab eine völlig normalisierte Muskelfunktion auf Kontrollniveau. Die in vivo-Untersuchung des gastrointestinalen Transits (GIT) bestätigte die deutliche Verbesserung der motorischen Darmfunktion durch Semapimod.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den intraperitoneal und intravenös mit Semapimod behandelten Tieren war bei keinem unserer Experimente nachweisbar. Diese Beobachtung ist deshalb von Bedeutung, weil sie für eine eventuelle zukünftige Anwendung von Semapimod in der Klinik die einfacher durchzuführende intravenöse Gabe ermöglicht, ohne relevante Wirkungsverluste befürchten zu müssen.

Vor dem Hintergrund einer lediglich partiellen Abmilderung der postoperativen Entzündungsreaktion durch Semapimod wirft unsere Beobachtung einer vollständigen



Aufhebung der motorischen Dysfunktion Fragen nach weiteren Mechanismen auf. Ursprünglich wurde Semapimod von Bianchi et al. (1995) als Hemmstoff der zellulären Aufnahme von Arginin entwickelt, um die enorme Produktion von NO in Makrophagen während einer Sepsis zu verringern. Da die Freisetzung von NO beim POI entscheidend für die Entstehung der Motilitätsstörung verantwortlich ist, untersuchten wir die Auswirkung von Semapimod auf das Ausmaß der NO-Produktion (Kalff et al., 2000).

Die intravenöse Behandlung mit Semapimod resultierte bei intestinal manipulierten Tieren in einer weitgehend normalisierten NO-Produktion, deren Werte sich nicht signifikant von denen sham-operierter Kontrolltiere unterschieden. Dies erklärt die Normalisierung der postoperativen Darmmotilität trotz bestehender entzündlicher Infiltration und stellt einen positiven Zusatzeffekt im Wirkspektrum von Semapimod dar.

Es ist bekannt, dass parasympathische Signale des N. vagus die Aktivierung von Makrophagen hemmen, was als cholinerg antiinflammatorischer Signalweg bezeichnet wird (Oke et al., 2008). Semapimod wurde neben seiner Wirkung auf proinflammatorische Signalkaskaden auch als Auslöser vagaler Impulse an Makrophagen beschrieben. So zeigten Bernik et al. (2002) eine deutlich abgeschwächte systemische Produktion von TNF $\alpha$  bei Endotoxinämie nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Applikation geringer Konzentrationen von Semapimod. The et al. (2007) beobachteten eine verringerte postoperative Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis sowie eine verbesserte Magenmotilität nach i.c.v.-Applikation von Semapimod. Voraussetzung für diese Effekte war ein intakter N. vagus, was verschiedene Autoren zu der Hypothese führte, dass die antiinflammatorische Wirkung von Semapimod vor allem auf der Auslösung parasympathischer Signale an Makrophagen beruht (De Jonge et al., 2005, 2009; The et al., 2007).

In diesen Studien wurde jedoch nicht überprüft, ob die angewandte Methodik auch zu einer Verbesserung der Kontraktilität der Darmmuskulatur oder des gastrointestinalen Transits führt. Dies hätte jedoch eine Aussage über die postoperative Funktion tiefer gelegener Abschnitte des Gastrointestinaltraktes, die für eine Beurteilung der Ausprägung eines POI entscheidender sind, ermöglicht. Die intravenöse Behandlung mit Semapimod 90 min vor einer intestinalen Manipulation hatte in unserer Studie eine fast vollständige Normalisierung des gastrointestinalen Transits zur Folge. Dieser Effekt war bei einer Gabe unmittelbar vor dem operativen Eingriff vollständig aufgehoben. Bei Annahme einer zentralen Rolle des cholinergen

antiinflammatorischen Reflexes sollte jedoch auch eine solche intraoperative Behandlung einen entzündungshemmenden Impuls auslösen, der stark genug ist um die postoperative Verzögerung der Darmpassage zumindest teilweise wieder aufzuheben. Unsere Ergebnisse deuten daher auf eine zentrale Rolle der peripheren Inhibition der p38 MAPK sowie der NO-Produktion in Makrophagen.

Dennoch ist auch die Aktivierung des cholinergen antiinflammatorischen Signalweges als Wirkkomponente von Semapimod anzusehen. Inwieweit sich die einzelnen Wirkmechanismen gegenseitig beeinflussen und welcher Mechanismus wie stark an der Abmilderung des POI beteiligt ist kann anhand der bisherigen Daten nicht abschließend geklärt werden. Allerdings kann aufgrund der Vielzahl an Studien mit unterschiedlichen Ansätzen die grundsätzliche Wirksamkeit von Semapimod bezüglich einer deutlichen Verbesserung der postoperativen Motilität des Gastrointestinaltraktes als gesichert angesehen werden.

Nächste Schritte beinhalten die Überprüfung der Wirksamkeit von Semapimod im Großtierversuch. Hierbei könnten zusätzlich die Auswirkungen auf die motorische Funktion des Colon überprüft werden. Dieses ist in der Regel der Abschnitt des Gastrointestinaltraktes, der nach chirurgischen Eingriffen als letztes seine physiologische Motilität wieder erreicht und daher für die Dauer des POI von besonderer Bedeutung (Livingston und Passaro, 1990). Um klinisch relevante Aussagen über die Colonmotilität treffen zu können ist der Großtierversuch deutlich besser geeignet als das in unserer Studie verwendete Mausmodell. Da für Makrophagen auch eine entscheidende Beteiligung an der Wundheilung diskutiert wird, sollte weiterhin überprüft werden, ob eine Behandlung mit Semapimod die Heilung intestinaler Anastomosen negativ beeinflusst (Martin et al., 2003; Pull et al., 2005).

Ist dies nicht der Fall und sollten sich die von uns beobachteten Effekte im Großtierversuch bestätigen könnte Semapimod anschließend in klinischen Studien verwendet werden. Da der Wirkstoff bereits in klinischen Studien zu anderen entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Crohn oder ERCP-induzierter Pankreatitis eingesetzt wurde, ist eine Gefährdung der Patienten in Bezug auf Toxizität und Toleranz weitgehend auszuschließen (Löwenberg et al., 2005; van Westerloo et al., 2008). Hierbei ist zusätzlich zu beachten, dass Semapimod in diesen Studien teilweise über mehrere Tage verabreicht wurde, während in unserer Studie eine einmalige Applikation ausreichte, um den POI zu verhindern.

Zusammengefasst zeigen unsere Daten, dass die p38 MAPK frühzeitig nach einer intestinalen Manipulation aktiviert ist und entscheidend an der Vermittlung der postoperativen Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis, die die Grundlage des POI bildet, mitwirkt. Die gezielte Inhibition des p38 MAPK-Signalweges durch eine einmalige intravenöse Applikation von Semapimod 90 min vor dem operativen Eingriff hat eine signifikante Reduktion der inflammatorischen Vorgänge zur Folge. Gemeinsam mit dem Zusatzeffekt einer stark supprimierten NO-Produktion resultiert dies in einer vollständigen Normalisierung der Motilität der Dünndarmmuskulatur sowie des gastrointestinalen Transits.

Demzufolge ist die präoperative Behandlung mit Semapimod ein aussichtsreicher Ansatz zur zukünftigen Entwicklung einer klinisch anwendbaren prophylaktischen Therapie des POI.

## 6 Zusammenfassung

Der mit erhöhter Morbidität und Mortalität einhergehende postoperative Ileus (POI) gehört zu den wichtigsten Komplikationen abdominalchirurgischer Eingriffe. Die Entwicklung neuer therapeutischer und vor allem prophylaktischer Ansätze wäre für den klinischen Einsatz von großer Bedeutung.

Im Zentrum der Pathogenese des POI steht eine durch die intraoperative Manipulation des Darmes ausgelöste Entzündung in der Tunica muscularis der Darmwand. Diese äußert sich durch die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer und kinetisch wirksamer Mediatoren sowie die Einwanderung immunkompetenter Leukozyten aus dem Blutkreislauf und führt zu einer ausgeprägten Abnahme der Motilität des gesamten Gastrointestinaltraktes. Ortständige Gewebsmakrophagen der Muskularis, die sich normalerweise in einem inaktivierten Ruhezustand befinden und durch das chirurgische Trauma aktiviert werden, nehmen bei der Koordination dieser Entzündung eine Schlüsselrolle ein. Die Aktivierung von Makrophagen geschieht über verschiedene zelluläre Signalkaskaden, wobei für den p38 MAP Kinase-Signalweg eine zentrale Beteiligung angenommen wird. Ziel dieser Studie war zu überprüfen, ob sich mittels Semapimod, einem makrophagenspezifischen Inhibitor des p38 MAPK-Signalweges, eine Abmilderung der Entzündungsreaktion und eine Verbesserung der Darmmotilität nach operativem Trauma erreichen lässt.

Hierzu wurden männliche C57BL/6J-Mäuse 90 min vor einer intestinalen Manipulation (IM) oder ausschließlicher Laparatomie (Sham-OP) intravenös oder intraperitoneal mit einem Placebo oder Semapimod (5 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Zunächst wurde untersucht, in welchem Ausmaß die p38 MAPK frühzeitig nach IM in ihrer phosphorylierten und somit aktivierten Form vorliegt und ob Semapimod diese Phosphorylierung verhindert. Anschließend wurden die proinflammatorische Genexpression (quantitative RT-PCR), die Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Muskularis (MPO-Färbungen) und die NO-Produktion (Griess-Reaktion) als Marker der Entzündungsreaktion bestimmt. Die Untersuchung der motorischen Darmfunktion erfolgte durch in vitro-Messungen der Kontraktilität von Dünndarmmuskularis-Präparaten im Organbad-Setup sowie der in vivo-Bestimmung des gastrointestinalen Transits (GIT).

Unsere Resultate erbrachten den Nachweis einer frühzeitigen, verstärkten Phosphorylierung der p38 MAPK nach IM, welche nach vorheriger Behandlung mit Semapimod weitgehend aufgehoben war. Des Weiteren zeigten unsere Ergebnisse eine signifikant verminderte proinflammatorische Genexpression und leukozytäre Infiltration nach Behandlung mit Semapimod. Die postoperative NO-Produktion wurde durch Semapimod auf das Niveau unoperierter Kontrolltiere gesenkt. Diese Effekte resultierten gemeinsam in einer völligen Normalisierung der in vitro-Kontraktilität sowie des GIT nach intestinalem Trauma. Ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Wirksamkeit ergab sich hierbei zwischen den beiden Applikationsformen nicht.

Zusammengefasst führen unsere Resultate zu dem Schluss, dass die p38 MAPK an der postoperativen Aktivierung der residenten Muskularis-Makrophagen und somit der Entstehung des POI zentral beteiligt ist. Die gezielte Hemmung dieses Signalweges in Makrophagen mittels Semapimod verringert die postoperative Entzündungsreaktion und verhindert, gemeinsam mit dem positiven Zusatzeffekt einer stark verminderten NO-Produktion, das Auftreten einer intestinalen Motilitätsstörung nach chirurgischem Trauma im Mausmodell.

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt die präoperative Behandlung mit Semapimod einen vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung einer perioperativen Prophylaxe des postoperativen Ileus dar.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Adding LC, Bannenberg GL, Gustafsson LE. Basic experimental studies and clinical aspects of gadolinium salts and chelates. *Cardiovasc Drug Rev* 2001; 19: 41-56
- 2 Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH. Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum. *Gastroenterology* 1991; 101: 970-976
- 3 Bauer AJ, Martin JA, Kalff JC, Lee KKW, Medich DS, Schraut WH. Human intestinal circular muscle is inhibited by prostanoids secreted from resident muscularis macrophages activated with microbial enterotoxins. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1902
- 4 Bauer AJ, Boeckxstaens GE. Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 2: 54-60
- 5 Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervations of the small intestine. *J Physiol* 1899; 31: 272-304
- 6 Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova SM, Tracey KJ. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* 2002; 195: 781-788
- 7 Bianchi M, Ulrich P, Bloom O, Meistrell M, III, Zimmerman GA, Schmidtmayerova H, Bukrinsky M, Donnelley T, Bucala R, Sherry B. An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol Med* 1995; 1: 254-266
- 8 Bianchi M, Bloom O, Raabe T, Cohen PS, Chesney J, Sherry B, Schmidtmayerova H, Calandra T, Zhang X, Bukrinsky M, Ulrich P, Cerami A, Tracey KJ. Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanylhydrazone. *J Exp Med* 1996; 183: 927-936
- 9 Bjork L, Tracey KJ, Ulrich P, Bianchi M, Cohen PS, Akerlund K, Fehniger TE, Andersson U, Andersson J. Targeted suppression of cytokine production in monocytes but not in T-lymphocytes by a tetravalent guanylhydrazone (CNI-1493). *J Infect Dis* 1997; 176: 1303-1312
- 10 Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, van Maercke YM, Hermann AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345: 346-347

- 11 Cohen PS, Nakshatri H, Dennis J, Caragine T, Bianchi M, Cerami A, Tracey KJ. CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 3967-3971
- 12 Collins SM, Hurst SM, Main C, Stanley E, Khan I, Blennerhassett P, Swain M. Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release. *Ann NY Acad Sci* 1992; 664: 415-424
- 13 de Jonge WJ, van den Wijngaard RM, The FO, ter Beek ML, Bennink RJ, Tytgat GN, Buijs RM, Reitsma PH, van Deventer SJ, Boeckxstaens GE. Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 1137-1147
- 14 de Jonge WJ, The FO, van der Coelen D, Bennink RJ, Reitsma PH, van Deventer SJ, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2004; 127: 535-545
- 15 de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005; 6: 844-851
- 16 de Jonge WJ, The FO, Löwenberg M, Boeckxstaens GE. P38 MAPK inhibitor Semaipimod reduces postoperative ileus via peripheral and central mechanisms. *Gastroenterology* 2009; 136: 1841-1842
- 17 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
- 18 Eskandari MK, Kalff JC, Billiar TR, Lee KK, Bauer AJ. LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity. *Am J Physiol* 1999; 277: 478-486
- 19 Espat NJ, Cheng G, Kelley MC, Vogel SB, Sninsky CA, Hocking MP. Vasoactive intestinal peptide and substance p receptor antagonists improve postoperative ileus. *J Surg Res* 1995; 58: 719-723
- 20 Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 8667-8671

- 21 Hannigan M, Zhan L, Ai Y, Huang CK. The role of p38 MAP kinase in TGF-1 $\beta$ -induced signal transduction in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 55-58
- 22 Holte K, Kehlet H. Postoperative ileus: a preventable event. *Br J Surg* 2000; 87: 1480-1493
- 23 Holzer P, Lippe IT, Amann R. Participation of capsaicin-sensitive afferent neurons in gastric motor inhibition caused by laparotomy and intraperitoneal acid. *Neuroscience* 1992; 48: 715-722
- 24 Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of p38 MAP kinase-and RICK/NF-kappa B-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J* 2004; 18: 1550-1552
- 25 Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJH. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 2003; 52: 144-151
- 26 Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis externa: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol* 1998 (a); 63: 683-691
- 27 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 (b); 228: 652-663
- 28 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
- 29 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
- 30 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
- 31 Livingston EH, Passaro EP, Jr. Postoperative ileus. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 121-132
- 32 Lobo DN, Bostock KA, Neal KR, Perkins AC, Rowlands BJ, Allison SP. Effect of salt and water balance on recovery of gastrointestinal function after elective colonic resection: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 359: 1812-1818



- 33 Löwenberg M, Verhaar A, van den Blink B, ten Kate F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D. Specific inhibition of c-Raf activity by semapimod induces clinical remission in severe Crohn's disease. *J Immunol* 2005; 175: 2293-2300
- 34 Luckey A, Wang L, Jamieson PM, Basa NR, Million M, Czimmer J. Corticotropin-releasing factor receptor 1-deficient mice do not develop postoperative gastric ileus. *Gastroenterology* 2003; 125: 654-659
- 35 Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R and McKercher SR. Wound healing in the PU.1 null mouse-tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* 2003; 13: 1122-1128
- 36 Mikkelsen HB. Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histol Histopathol* 1995; 10: 719-736
- 37 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
- 38 Minnich DJ, Moldawer LL. Anti-cytokine and anti-inflammatory therapies for the treatment of severe sepsis: progress and pitfalls. *Proc Nutr Soc* 2004; 63: 437-441
- 39 Moore BA, Turler A, Pezzone MA, Dyer K, Grandis J, Bauer AJ. Tyrphostin AG 126 inhibits development of postoperative ileus induced by surgical manipulation of murine colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 214-224
- 40 Nick JA, Avdi NJ, Young SK. Selective activation and functional significance of p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 1999; 103: 851-858
- 41 Oke SL, Tracey KJ. From CNI-1493 to the immunological homunculus: physiology of the inflammatory reflex. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 512-517
- 42 Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: Activation and function. *Cell Signal* 2000; 12: 1-13
- 43 Pal J. Über den Einfluss des Bauchschnittes auf die Darmbewegung. *Zentralbl Physiol* 1890; 4: 338
- 44 Pearson B, Wexner SD. The Management of Postoperative Ileus. *Curr Probl Surg* 2006; 43: 12-65
- 45 Pearson G, Robinson F, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22: 153-183

- 46 Prasad M, Matthews JB. Deflating postoperative ileus. *Gastroenterology* 1999; 117: 489-492
- 47 Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 99-104
- 48 Salinithone S, Singer CA, Gerthoffer WT. Inflammatory gene expression by human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 627-637
- 49 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
- 50 Stark MB, Bauer AJ, Szurszewski JH. Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. *J Physiol* 1991; 444: 743-761
- 51 Taxi J. Contribution à l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. *Ann Natur- Zool Biol Animale* 1965; 7: 413-674
- 52 The FO, de Jonge WJ, Bennink RJ, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. The ICAM-1 antisense oligonucleotide ISIS-3082 prevents the development of postoperative ileus in mice. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 252-258
- 53 The FO, Boeckxstaens GE, Snoek SA, Cash JL, Bennink R, Larosa GJ, van den Wijngaard RM, Greaves DR, de Jonge WJ. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2007; 133: 1219-1228
- 54 Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-859
- 55 Türler A, Schwarz NT, Turler E, Kalff JC, Bauer AJ. MCP-1 causes leukocyte recruitment and subsequently endotoxemic ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: 145-155
- 56 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
- 57 van Westerloo DJ, Rauws EA, Hommes D, de Fos AF, van der Poll T, Powers BL, Fockens P, Dijkgraaf MG, Bruno MJ. Pre-ERCP infusion of Semaipimod, a mitogen-activated protein kinase inhibitor, lowers post-ERCP hyperamylasemia but not pancreatitis incidence. *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 246- 254

- 58 Villa P, Meassa M, Sironi M, Bianchi M, Tracey KJ, Ghezzi P. Protection against lethal polymicrobial sepsis by CNI 1493, an inhibitor of proinflammatory cytokine synthesis. *J Endotoxin Res* 1997; 4: 197-204
- 59 Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002; 168: 5342-5351
- 60 Wang H, Zhang M, Bianchi M. Fetuin ( $\alpha$ 2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14429-14434
- 61 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
- 62 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
- 63 Wehner S, Straesser S, Vilz TO, Pantelis D, Sielecki T, de IC, V, Hirner A, Kalff JC. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase pathway as prophylaxis of postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2009; 136: 619-629
- 64 Yang X, Szabolcs M, Minanov O, Ma N, Sciacca RR, Bianchi M, Tracey KJ, Michler RE, Cannon PJ. CNI-1493 prolongs survival and reduces myocyte loss, apoptosis, and inflammation during rat cardiac allograft rejection. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: 146-155
- 65 Zittel TT, Lloyd KC, Rothenhöfer I, Wong H, Walsh JH, Raybould HE. Calcitonin gene-related peptide and spinal afferents partly mediate postoperative colonic ileus in the rat. *Surgery* 1998; 123: 518-527
- 66 Zittel TT, Meile T, Hüge A, Kreis ME, Becker HD, Jehle EC. Preoperative intraluminal application of capsaicin increases postoperative gastric and colonic motility in rats. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 503-513