

**Induktion der Endotoxin Toleranz und Kreuztoleranz in der
Darmmuskularis der Ratte**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Markus Klingenberg
aus Troisdorf
2006

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Nicolas T. Schwarz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Frank Stüber

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2006

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

Direktor: Prof. Dr. Andreas Hirner

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite 4
2.	Methoden und Material	Seite 8
2.1	Tiere	Seite 8
2.2	Vorbehandlung	Seite 8
2.3	Operativer Eingriff	Seite 8
2.4	Gewebeentnahme	Seite 9
2.5	Medikamente und Lösungen	Seite 12
2.6	RNA Extraktion und cDNA Synthese	Seite 12
2.7	Real Time PCR	Seite 12
2.8	Gastro-intestinaler Transit	Seite 14
2.9	Hanker-Yates Färbung	Seite 18
2.10	Daten Analyse	Seite 18
3.	Ergebnisse	Seite 19
3.1	LPS Toleranz	Seite 19
3.2	LPS Dosisbestimmung	Seite 27
3.3	LPS Kreuztoleranz	Seite 29
3.4	Gastrointestinaler Transit	Seite 35
3.5	Hanker-Yates Färbung	Seite 37
4.	Diskussion	Seite 41
5.	Zusammenfassung	Seite 48
6.	Literaturverzeichnis	Seite 49
8.	Abkürzungsverzeichnis	Seite 54
8.	Lebenslauf	Seite 55

1. Einleitung

Eine Traumatisierung des Darms verursacht eine akute molekulare und zelluläre inflammatorische Reaktion innerhalb der Darmmuskularis. Diese kann zu einer signifikanten Herabsetzung der Darmmotilität mit Ausbildung einer Darmatonie führen und die Ausbildung septischer Krankheitsbilder fördern (Kalff et al., 1999a). Das operative Trauma löst eine akute Entzündungsreaktion innerhalb der Darmmuskularis aus, die zum Teil durch die Induktion residenter Makrophagen gesteuert wird (Eskandari et al., 1997; Kalff et al., 1998, Kalff et al., 2003). Weitere Faktoren sind die Minderperfusion des Darms mit Ischämie - Reperfusionsschaden sowie möglicherweise eine Translokation von Bakterien und bakteriellen Substanzen durch eine Darmwandschädigung (Moore et al., 1997). Außerdem ist bekannt, dass eine vergleichbare Entzündungsreaktion und Funktionsstörung der Darmmuskularis durch die intraperitoneale Gabe von Lipopolysaccharid (LPS) hervorgerufen werden kann (Eskandari et al., 1997).

In verschiedenen Bereichen wurde inzwischen beschrieben, dass eine leichte präoperative systemische Schädigung bei anschließendem Folgetrauma geringere posttraumatische Reaktionen verursacht als ein vergleichbares Operationstrauma ohne Vorbehandlung. Eine ischämische Präkonditionierung im Bereich der Kardiochirurgie ruft geringere postischämische lokale und systemische Entzündungsreaktionen hervor und weist somit einen protektiven Effekt auf die Organfunktion auf (Jerome et al., 1995). In einer weiteren Studie führte auch eine LPS Präkonditionierung zu einem protektiven Effekt im Sinne einer Kreuztoleranz bei Ischämie/Reperfusions-Versuchen am Herzen (Wang et al., 2002).

Es wurde beobachtet, dass Tiere, die mit einer an sich funktionell unwirksamen LPS Dosis vorbehandelt wurden, unempfindlicher gegenüber den Schädigungsmechanismen eines operativen Darmtraumas sind, so dass *in vivo* eine Kreuztoleranz zwischen den Folgen der LPS Gabe und denen des Traumamechanismus diskutiert werden kann.

Es wurde inzwischen ausführlich belegt, dass Makrophagen und Monozyten *in vitro* Toleranzmechanismen gegenüber LPS entwickeln (Kastenbauer et al., 1999; Nomura et al., 2000). Die Mechanismen, die nach einer Vorbehandlung mit Endotoxin zu einer Kreuztoleranz führen, sind allerdings bisher unbekannt (Schwarz et al., 2002). So ist

auch unklar, warum ein operatives Darmtrauma bei zuvor LPS exponierten Tieren nicht zu einer Potenzierung der Entzündungsreaktion und funktionellen Einschränkungen führt, sondern zum Teil geringere Reaktionen auftreten.

Der Aspekt, dass eine *in vivo* Präkonditionierung durch ein niedrig dosiertes Endotoxin einen potentiell protektiven Effekt gegenüber den gravierenden Folgen des operativen Traumas aufweist, besitzt somit einen hohen klinischen Stellenwert. Angesichts der hohen Kosten, die Darmmotilitätsstörungen und deren Folgen nach Operationen im Gesundheitssystem verursachen, besitzt die Entwicklung erfolgreicher Strategien zur Vermeidung postoperativer Darmmotilitätsstörungen eine ökonomische Rolle.

Als einen weiteren Therapieansatz möchte ich an dieser Stelle die „Fast-track“ Programme erwähnen, bei denen über eine enge Zusammenarbeit von Operationsteam, Anästhesie und Pflegepersonal der Behandlungs- und Heilungsprozess der Patienten optimiert wird und so die Rate postoperativer Komplikationen gesenkt werden kann (Schwenk et al., 2004; Susa et al., 2004).

In *in vivo* Versuchen wie auch in Zellkulturmodellen wurden die molekularen und zellulären Auswirkungen der standardisierten Darmmanipulation wie auch die Gabe von LPS in der Darmmuskularis untersucht. Im Tiermodell verursachen sowohl LPS als auch die intestinale Manipulation eine dosisabhängige Leukozyten Infiltration in die Dünndarmmuskularis (Eskandari et al., 1997; Kalff et al., 1999b). In Folge kommt es zu einer signifikanten Hemmung der *in vivo* gemessenen Kontraktilität der Darmmuskularis und zu einer Verzögerung des gastro-intestinalen Transits (Lodato et al., 1999).

Sowohl die standardisierte Darmmanipulation als auch eine LPS Gabe führen zu einer raschen Aktivierung der residenten Muskularis Makrophagen. Diese Zellaktivierungen verursachen eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF kappa B, NF-IL-6, STAT) gefolgt von einer signifikanten Aufregulation proinflammatorischer Zytokine (TNF alpha, IL-6, iNOS, COX-2) innerhalb der Darmmuskularis (Schwarz et al., 2004, Wehner S et al., 2005). Durch die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommt es zu einer Freisetzung kinetisch wirksamer Mediatoren wie NO (Stickstoffmonoxid) und Prostaglandinen und zu einer signifikanten Hemmung der *in vitro* und *in vivo* messbaren Kontraktilität der glatten Darmmuskulatur (Schwarz et al., 2001a).

Dies führt zu einer intestinalen Überwucherung mit Bakterien und ihren Produkten. So kommt es zu einer Zerstörung der intestinalen Barriere durch LPS, zu einer

Translokation von Bakterien und Endotoxinen und einer daraus resultierenden lokalen Entzündungsreaktion in der Muskularis. Diese verursacht wiederum eine weitere Infiltration zirkulierender Abwehrzellen in die Darmmuskularis und es entwickelt sich ein *circulus vitiosus* mit weiteren Darmmotilitätsstörungen und deren Komplikationen.

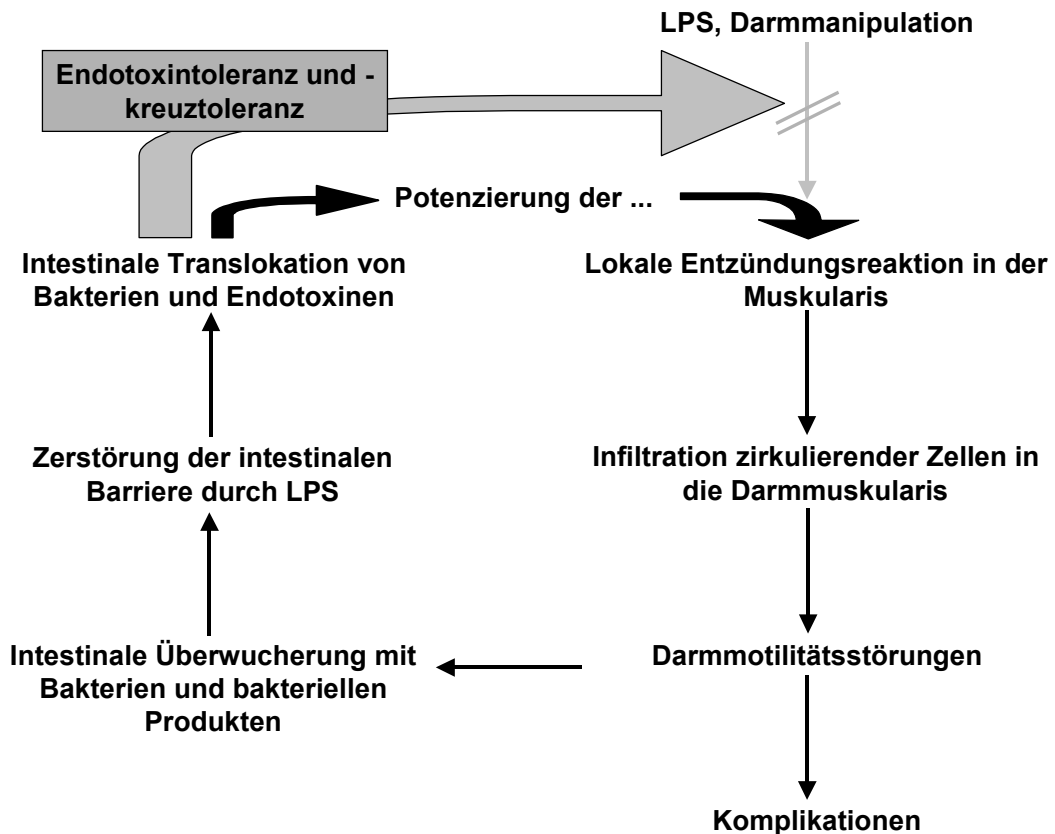


Abb. 1: Hypothetischer Kreislauf nach LPS-Stimulation oder Manipulation des Darms

Intraperitoneales LPS oder Darmmanipulation bewirken über die Ausbildung lokaler Entzündungsvorgänge eine Darmmotilitätsstörung, die eine bakterielle Translokation begünstigt, welche wiederum die lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen und damit die Folgen der Darmmotilitätsstörungen verstärkt. Die Ausbildung von LPS Toleranzmechanismen ermöglicht einen Ausweg aus diesem Kreislauf, indem die Toleranz eine verminderte muskuläre Entzündungsreaktion bewirkt.

In Untersuchungen an Tieren, die einmalig mit einer geringen, funktionell unbedeutenden LPS Dosis vorbehandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Manipulation des Darms 24 Stunden nach initialer intraperitonealer Endotoxininjektion nicht wie üblich zu einer signifikanten posttraumatischen Transitverlängerung führte, sondern nahezu ohne funktionelle Auswirkungen auf die Darmpassage blieb (Schwarz et al., 2002; Turler et al., 2002).

Ziel der Arbeit ist, zum einen die niedrigste Schwellendosis an Endotoxin zu untersuchen, mit der eine signifikante Präkonditionierung erreicht werden kann und zum anderen den Mechanismus der Toleranz und Kreuztoleranz innerhalb der Darmmuskularis der Ratte molekularbiologisch aufzuarbeiten.

2. Methoden und Material

2.1 Tiere

Männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 180-250 mg wurden über Harlan-Winkelmann (D-33178 Bochum) bezogen. Die Tiere wurden im Haus für Tierpflege des Universitätsklinikums Bonn unter standardisierten Bedingungen gehalten. Das umfasst einen 12 Stunden Tag/Nacht Zyklus sowie Standard Rattenfutter und Leitungswasser ohne Beschränkung.

Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 50.203.2-BN 21, 21/04 von der Bezirksregierung Köln gemäß des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) genehmigt.

Die Ratten wurden mit Hilfe des Isofluran Inhalators *Vapor 19.1* der Firma *Dräger* (Drägerwerk AG Lübeck) narkotisiert und das Abdomen per medianer Längsinzision eröffnet. Der auf diesem Weg entnommene Dünndarm wurde in einer eisgekühlten und voroxygenierten Krebs Ringer Lösung (KRB) gelagert.

2.2 Vorbehandlung

Die Vorbehandlung bestand darin, den Ratten unter einer Isofluran Kurznarkose die jeweilige Dosis LPS, aufgelöst in einem Milliliter pyrogenfreiem NaCl, intraperitoneal an bis zu 8 Tagen zu applizieren. Eine Gruppe von Kontrolltieren wurde in gleicher Weise ausschließlich mit NaCl behandelt, eine andere Kontrollgruppe bekam keine Vorbehandlung und wurde direkt getötet.

2.3 Operativer Eingriff

Die Tiere wurden nach einem in vorangehenden Studien standardisiertem Verfahren operiert und vier Stunden postoperativ getötet (Kalff J et al. 1997). Nach Anästhesie der Tiere mit Isofluran per inhalationem, Rasur und Hautdesinfektion wurde die Laparotomie vorgenommen. Nach Mittellinieninzision wurden das Dünndarmkonvolut mittels feuchter Watteträger auf eine feuchte Kompresse ausgelagert und die einzelnen Darmschlingen aufgereiht. Der Dünndarm wurde daraufhin durch eine aboral gerichtete standardisierte Rollbewegung mit Hilfe zweier feuchter Watteträger komprimiert, damit der Darminhalt in

das Zökum evakuiert wurde. Nach Abschluss dieser Prozedur wurde das Abdomen zweischichtig mit 4-0 Seide fortlaufend verschlossen. Die Tiere erholten sich im Käfig, wo in den ersten 6 Stunden Wasser aber keine Nahrung zur Verfügung stand.

Die Operationen wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, der Darm der Tiere wurde ausschließlich mit sterilen Watteträgern und in keinem Fall mit den Fingern berührt oder manipuliert. Zur Kontrolle diente der Darm unoperierter Tiere.



Abb.2: In vivo Manipulation des Darms

Nach medianer Laparotomie des Abdomens wird der Dünndarm durch gleichmäßige Rollbewegungen mit zwei feuchten Wattestäbchen nach aboral komprimiert und so der Darminhalt in Richtung Zökum evakuiert.

2.4 Gewebeentnahme

Vier Stunden nach der letzten Injektion oder dem operativen Eingriff wurden die Ratten unter einer weiteren Isofluran Narkose mit einem medianen abdominellen Längsschnitt laparotomiert, anschließend das Zwerchfell eröffnet und thorakal die Vena cava durchtrennt, um ein Verbluten zu erreichen. Nach dem Herzstillstand wurde das gesamte Dünndarmpaket entfernt und in eisgekühltem und mit Carbogen

angereichertem Krebs-Ringer-Puffer (Krebs-Ringer's Buffer = KRB) gelagert. Dann wurde der Dünndarm in jeweils 3-5 cm große Segmente geschnitten und zur Entfernung des Mesenteriums auf einer eisgekühlten Silgard® Platte in KBR mit Hilfe von kleinen Nadeln aufgespannt.

An diesem Punkt teilt sich der Vorgang auf. Entweder wurde wie im Folgenden beschrieben das Gewebe zwecks RNA Extraktion weiter verarbeitet oder direkt einer Histochemie unterzogen (siehe 2.9 Histochemie).

Die Darmstücke wurden nach Entfernung der Kotreste auf eine Stricknadel aufgezogen (siehe Abb. 3 und Abb. 4), die Muscularis längs mit einer Pinzette angeritzt und mit Hilfe von Q-Tipps stumpf von der Mukosa getrennt und mit einer Pinzette abgezogen (siehe Abb. 5). Mukosa und Muskularis wurden anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

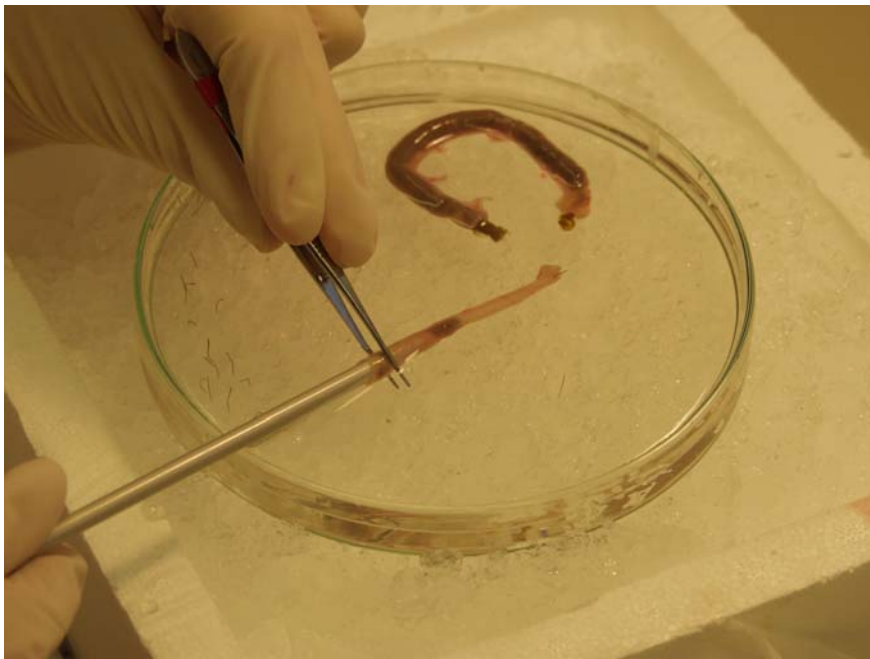


Abb.3: Aufbereitung des Dünndarms

Entfernung von Kotresten und Aufziehen eines ca. 5cm großen Dünndarmabschnittes auf eine Stricknadel.



Abb.4: Trennung von Mukosa und Muskularis

Die Muskularis wird längs mit einer Pinzette angeritzt und mit Hilfe von Q-Tipps stumpf von der Mukosa getrennt und aufgerollt.



Abb.5: Gewinnung von Dünndarmmuskularis

Die Muskularis wird mit einer Pinzette vorsichtig von der Mukosa abgelöst.

2.5 Medikamente und Lösungen

Das LPS E.coli, Serotyp 0111:B4 wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D- 91625 Schnelldorf) bezogen. Es wurde ein Standard Krebs-Ringer's Puffer benutzt: Na^+ , 137,4; K^+ 5,9; Ca^{2+} , 2,3; Mg^{2+} , 1,2; Cl^- , 134; HCO_3^- , 15,5; H_2PO_4 , 1,2; und Glukose, 11,5. Diese physiologische Lösung wurde mit 100% Carbogen angereichert, um einen pH von ca. 7,4 zu erreichen. Die zur Herstellung des KRB benötigten Chemikalien wurden ebenfalls über die Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

2.6 RNA Extraktion und cDNA Synthese

Die RNA Extraktion wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Quiagen GmbH (D-40724 Hilden) durchgeführt. Für den DNA Verdau wurde das Kit DNA-free der Firma Ambion verwendet und für die c-DNA Synthese das Kit Omniscript RT von Quiagen sowie der (dT)15-Primer der Firma Roche.

2.7 Real-Time PCR

Gerät

Die Real-Time PCR wurde mit dem Lightcycler® (Roche Diagnostics) durchgeführt. Mit Hilfe spezifischer Primer wurde die cDNA amplifiziert und mit einer Kontrolle von 18s-rRNA verglichen. Der Lightcycler ist eine Kombination aus Thermocycler und Fluorimeter, der Zielnukleinsäuren in 30-40 Minuten amplifiziert und das PCR Produkt nach jedem Zyklus über Fluoreszenzmessung überwacht.

Primer

Die Primer Paare wurden selbst entworfen und dabei gezielt auf Sequenzen aus der Kodierungs-Sequenz der jeweiligen mRNA abgestimmt (Eskandari et al., 1997). Nach Sequenzierung erfolgte die Herstellung der Primer kommerziell über die Firma Metabion (D-82152 Planegg-Martinsried).

Primername	Basenreihenfolge
IL-6-rat -fwd	5'-ccactgccttcctacttca-3'
IL-6-rat-rev	5'-acagtgcacatcatcgctgttc-3'
TNF-alpha-rat-fwd	5'-tgcctcagcctcttctcatt-3'
TNF-alpha-rat-rev	5'-gcttggtggttgctagac-3'
iNOS-rat-fwd	5'-cctgatcttgctggagg-3'
iNOS-rat-rev	5'-gcgctgtgtcacagaagt-3'
MCP-1-rat-fwd	5'-ccagaaaccagccaactctc-3'
MCP-1-rat-rev	5'-ccgactcattgggatcatctt-3'
ICAM-rat -fwd	5'-aggtatccatccatcccaca-3'
ICAM-rat-rev	5'-gccacagttctcaaagcacag-3'
TLR-4-rat -fwd	5'-agtgggtcaaggaccagaaaa-3'
TLR-4-rat -rev	5'-ggctaccacaagcactga-3'
IL-10a-rat-fwd	5'-ttaaagggttacttggttc-3'
IL-10a-rat-rev	5'-gctccactgccttgcttta-3'
18 S-rRNA-fwd	5'-gtggagcgattgtctggtt-3'
18 S-rRNA-rev	5'-cgctgagccagttcagtga-3'

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Primerpaare und deren Sequenzen

PCR Bedingungen

Die quantitative PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 10µl pro Glaskapillare durchgeführt, das sich wie folgt zusammensetzte: 2µl H₂O, 0,5µl Primer forward (10 pmol/µl), 0,5µl Primer reverse (10 pmol/µl), 5µl MgCl₂ (2mM), 1µl SybrGreen® und 1 µl der jeweiligen cDNA Probe. Die Amplifizierungsprogramme für IL6, TNF α , ICAM, MCP-1 und IL-10 wiesen die gleiche Annealingtemperatur von 60° auf. Nach einer initialen Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C folgten 45 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 0 Sekunden, Annealing bei 60°C für 10 Sekunden und Extension bei 72°C für 15 Sekunden. Es folgte die Schmelzkurvenanalyse mit Denaturierung bei 95°C für 0 Sekunden, Abkühlen auf 65°C und erneutes Aufheizen und kontinuierliche Messung in

0,1°C Schritten bis 95°C. Nach Beendigung der Schmelzkurvenanalyse folgte der Kühlmodus bei 40°C.

Normalisierung und Quantifikation

Um die absolute Kopienanzahl zu ermitteln, wurde eine Kalibrierungskurve aus einer Verdünnungsreihe eines Standards mit dem Housekeeping-Gen 18s-rRNA erstellt. Dieser wurde aus der Darmmuskularis von vier Kontrollraten, deren Proben gepoolt wurden, hergestellt. Von jeder unbekannt Probe wurde die Kopienzahl von 18s-rRNA und der jeweiligen Zielnukleinsäure anhand der Lightcycler Software Version 3.5.3. ermittelt und dann die relative Kopienzahl der Zielnukleinsäure durch Normalisierung am jeweiligen 18s-rRNA errechnet.

2.8 Gastro-intestinaler Transit

Der gastrointestinale Transit (GIT) wurde mit Fluoreszenzmarkiertem Dextran gemessen (dextran, fluorescein, 70.000 MW, anionisch, Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

Die Ratten wurden zuerst leicht anästhesiert, um ihnen 0,2 ml Dextran Lösung (6,25 mg Dextran/ml NaCl) per Gavage zu verabreichen (NaCl 0,9%, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen).

Nach zwei Stunden wurden die Tiere in eine tiefe Narkose gelegt, getötet und es wurden der Magen, Dün- und Dickdarm, sowie das Zökum entnommen. Der Magen-Darm-Trakt wurde auf einer Platte fixiert und folgendermaßen unterteilt:

Der Magen und das Zökum stellen je ein Segment dar, der Dünndarm wurde von oral bis aboral in zehn gleichlange Abschnitte und der Dickdarm in drei Segmente unterteilt.

Jedes Segment wurde komplett längs eröffnet und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt (Reagenzröhrchen Polystyrol 12 ml, Labomedic, Bonn). Für die Abschnitte Magen und Zökum wurden je 4 ml KRB zugefügt und für die übrigen Abschnitte je 2 ml. Die Röhrchen wurden für ca. 20 Sekunden zentrifugiert, um den kompletten Segmentinhalt in Lösung zu bringen.

Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau) und 1,5 ml des Überstandes in 2 ml Reaktionsgefäße überführt (Safe-Lock-Reaktionsgefäß, Eppendorf, Hamburg). Diese wurden bei 12.000

U/min für 5 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) und 100 Mikroliter der Probe in eine Multiwell Fluoreszenzplatte pipettiert (96 Well Microplate black, Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen).

Die Fluoreszenz wurde mit einem Multidetektions-Leser (Safire, Tecan, Crailsheim) ermittelt. Die Wellenlänge für die Absorption betrug 494 nm und die Emission 521 nm.

Zur Auswertung wurde der prozentuale Fluoreszenzanteil in jedem Segment bezogen auf die Gesamtfluoreszenz berechnet. Anschließend wurde das Geometrische Zentrum (GZ), das heißt der mathematisch errechnete höchste Fluoreszenzwert über alle gemessenen Darmsegmente hinweg, als Maß für den gastrointestinalen Transit mit folgender Formel bestimmt.

$$GZ = \sum (\% \text{ an der gesamten Fluoreszenz im Segment} * \text{Segmentnummer}) / 100$$

Das Geometrische Zentrum konnte also Werte zwischen 1 (=Segment Magen) und 15 (Segment distales Kolon) annehmen.



Abb.6 Applikation der Dextran Lösung

Die Ratten wurden zuerst leicht anästhesiert, um ihnen 0,2 ml Dextran Lösung (6,25 mg Dextran/ml NaCl) per Gavage zu verabreichen.

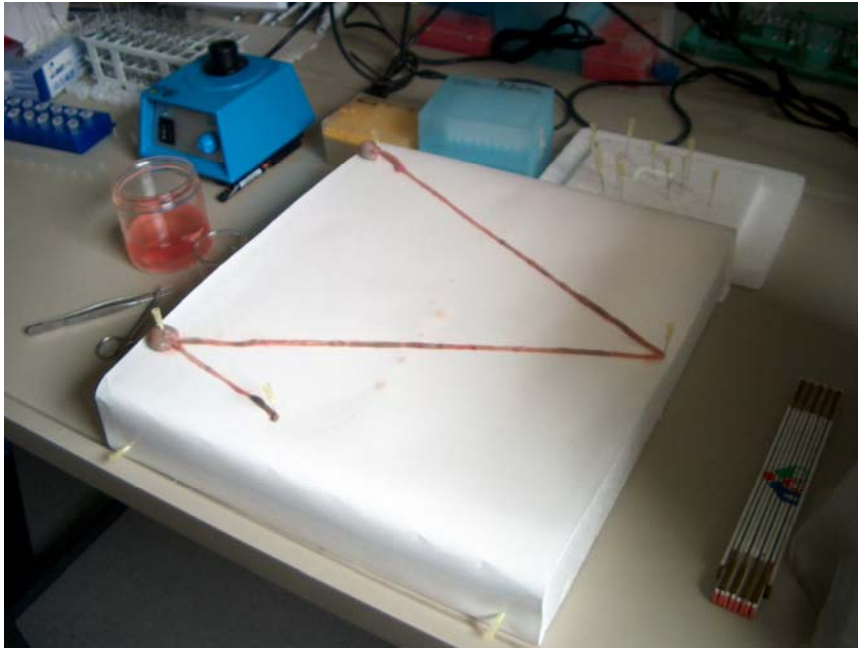


Abb.7 Einteilung des Darms zur Kontrolle des gastrointestinalen Transits

Nach zwei Stunden wurden die Tiere in eine tiefe Narkose gelegt, getötet und es wurden der Magen, Dünn- und Dickdarm, sowie das Zökum entnommen. Der Magen-Darm-Trakt wurde auf einer Platte fixiert und folgendermaßen unterteilt:

Der Magen und das Zökum stellen je ein Segment dar, der Dünndarm wurde von oral bis aboral in zehn gleichlange Abschnitte und der Dickdarm in drei Segmente unterteilt.

2.9 Histochemie

Hanker-Yates Färbung

Die gewonnenen Muskularis Präparate wurden in einer Mischung von 10 mg Hanker-Yates Reagenz (Fa. Fluka; Bestellnr.51320), 10 ml KHB oder PBS und 100 µl 3% Wasserstoffperoxyd für 10 min inkubiert und anschließend dreimal mit KHB oder PBS gewaschen. Die Muskularis Präparate wurden auf Objektträger aufgezogen und eingedeckt. Die Myeloperoxidase (MPO)-positiven Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop bei 160-facher Vergrößerung in 5 Gesichtsfeldern ausgezählt.

2.10 Daten Analyse

Die Daten wurden zusammengestellt mit einer mittleren Standardabweichung. Statistische Analysen wurden mit Hilfe eines nicht paarigen Studenten t-Tests durchgeführt. Daten wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$.

Die Auswertung und die Anfertigung von Diagrammen erfolgten mit Hilfe von Excel 2000 (Microsoft Corporation).

3. Ergebnisse:

3.1 LPS Toleranz

In den ersten Versuchen sollte das Auftreten einer LPS Toleranz gegenüber einem wiederkehrenden LPS Reiz durch die Untersuchung der Expression verschiedener Zytokine und Chemokine in der Dünndarmmuskularis nachgewiesen werden. Dazu wurde einer Gruppe (Gruppe 2) von Ratten eine LPS Dosis von 1 mg/kg KG (Bezeichnung: 1,0 LPS 4 h) wie oben beschrieben appliziert und die Tiere wurden vier Stunden später getötet. Im Vergleich dazu wurde eine Gruppe mit derselben LPS Dosis über einen Zeitraum von einer Woche vorbehandelt (Gruppe 4), am 8. Tag wurde den Tieren erneut 1,0 mg/kg KG LPS gegeben, bevor sie vier Stunden später getötet wurden (Bezeichnung: 7 d LPS + 4 h LPS). Um die Ergebnisse ausreichend interpretieren zu können wurden zwei Kontrollgruppen erstellt:

Als native Kontrolle (Gruppe 1) dienten Ratten, die ohne jede Vorbehandlung direkt getötet wurden. Eine weitere Kontrolle (Gruppe 3) bestand aus einer Gruppe von Ratten, die über sieben Tage einen Milliliter NaCl injiziert bekamen und ein weiteres Mal am 8. Tag, bevor sie vier Stunden später getötet wurde (Bezeichnung: NaCl 7 d + NaCl = Gruppe 3). Diese Gruppe sollte dazu dienen, den Effekt einer täglichen Kurznarkose, des minimalen Injektionstraumas und des intraperitonealen NaCl zu überprüfen.

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Kontrollgruppe	LPS Stimulation	NaCl Gabe	LPS Stimulation
Keine Vorbehandlung	Einmalige Gabe von LPS	Präkonditionierung mit NaCl	Präkonditionierung mit LPS

Tab. 2

Übersicht der Gruppen zur Prüfung der LPS Toleranz

Die folgenden Diagramme zeigen die Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Zytokine und Chemokine, beginnend mit Interleukin-6 (IL-6).

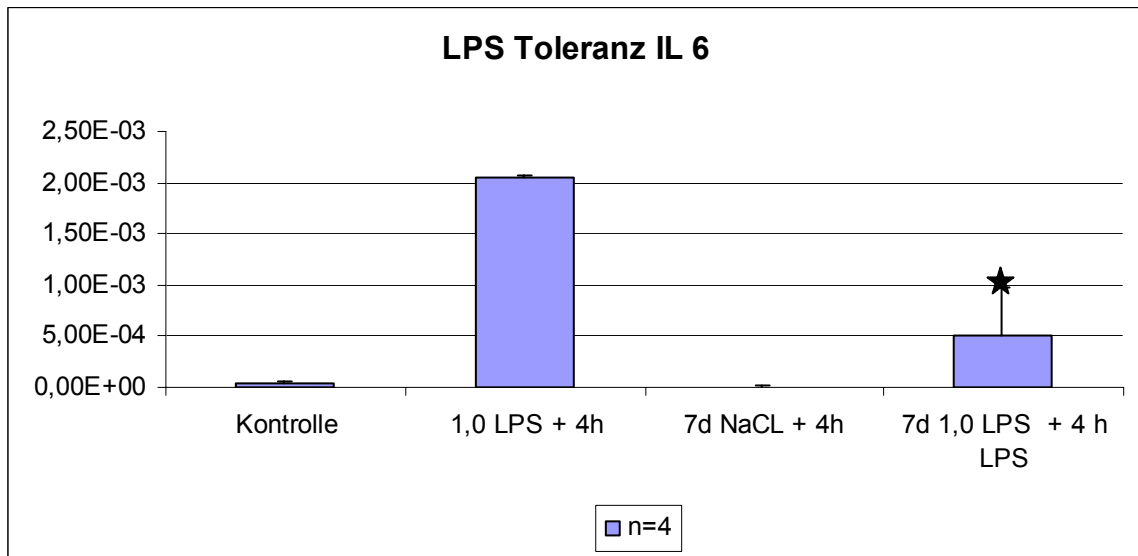


Abb. 8: Toleranzentwicklung bei IL-6

Darstellung der einmalig und der in Reihe sieben Mal mit LPS vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen.

Die Untersuchung zeigt einen signifikanten Unterschied in der Expression von IL-6 zwischen der einmaligen LPS Gabe und der über sieben Tage wiederholten LPS Gabe gleicher Dosis ($t = 0,041$). Auffällig ist auch, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der mit NaCl präkonditionierten Gruppe besteht.

IL-6 ist ein typisches proinflammatorisches Zytokin. Es ist ein entscheidendes Pyrogen, das lokal und systemisch wirkt, indem es thermoregulative Neurone im vorderen Anteil des Hypothalamus aktiviert, die ACTH Sekretion erhöht und direkt auf die Nebennieren wirkt.

Ein weiteres typisches proinflammatorisches Zytokin ist der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α), dessen Expression im Zellkern durch den nuklearen Transkriptionsfaktor κ B (NF κ B) gesteuert wird und welches dieses auch wiederum umgekehrt in seiner Funktion beeinflusst. Auf diesem Weg kann ein inflammatorisches Geschehen in seiner Intensität weiter verstärkt werden.

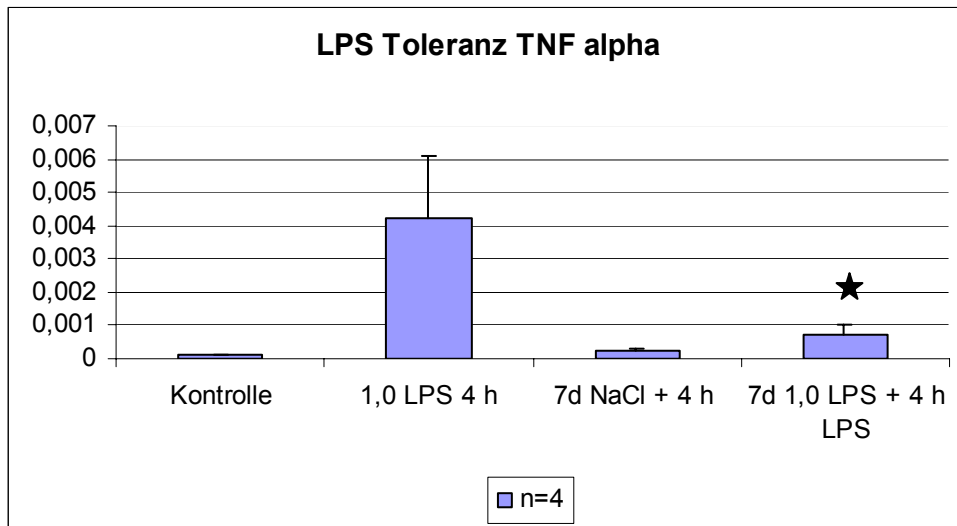


Abb. 9: Toleranzentwicklung bei TNF-alpha

Darstellung der einmalig und der in Reihe sieben Mal mit LPS vorbehandelten Tiere mit Ihren unbehandelten Kontrollgruppen.

Die Untersuchung zeigt einen signifikanten Unterschied in der Expression von TNF- α zwischen der einmaligen LPS Gabe und der über sieben Tage wiederholten LPS Gabe gleicher Dosis ($t = 0,015$).

Auch hier zeigt sich ein beinahe identisch niedrige TNF- α Expression bei der Kontroll- und der NaCl-Gruppe.

Im Weiteren untersuchten wir die Expression der induzierbaren Nitritmonoxyd Synthetase (iNOS) mRNA, einem ebenfalls von NFκB gesteuerten typischen proinflammatorischen Zytokin.

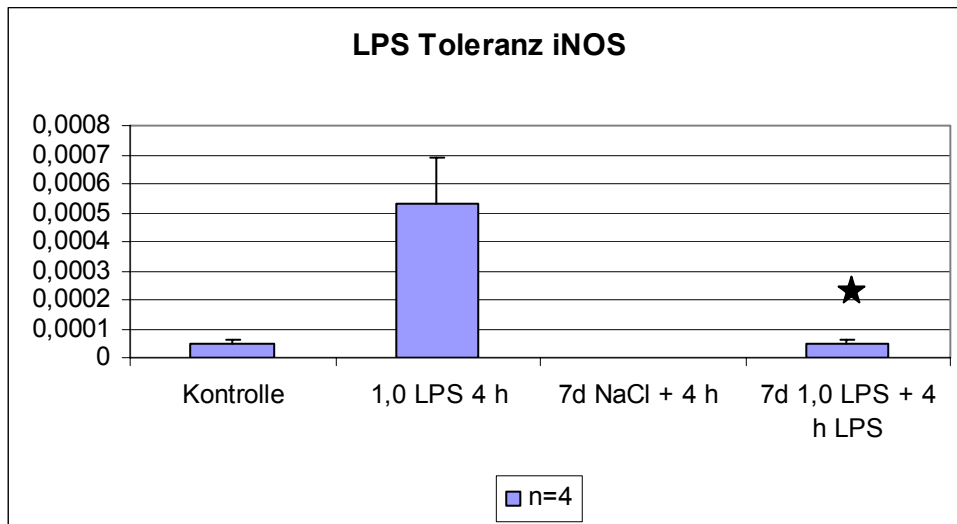


Abb. 10: Toleranzentwicklung bei iNOS

Darstellung der einmalig und der in Reihe sieben Mal mit LPS vorbehandelten Tiere mit Ihren unbehandelten Kontrollgruppen.

Die Untersuchung zeigt einen signifikanten Unterschied in der Expression von iNOS zwischen der einmaligen LPS Gabe und der über sieben Tage wiederholten LPS Gabe gleicher Dosis ($t = 0,0368$).

Der inflammatorische Mediator iNOS (induzierbare Stickstoff Synthetase) führt zu einer Erhöhung der NO Produktion im betroffenen Gewebe, die wiederum eine Beeinträchtigung der Darmmotilität zur Folge hat (Kalff et al., 2000; Uno et al., 2004).

Da in Voruntersuchungen Zellinfiltrationen in der Darmmuskularis beobachtet wurden, wollten wir weiterhin die Aufregulation relevanter Chemokine und Adhäsionsmoleküle untersuchen.

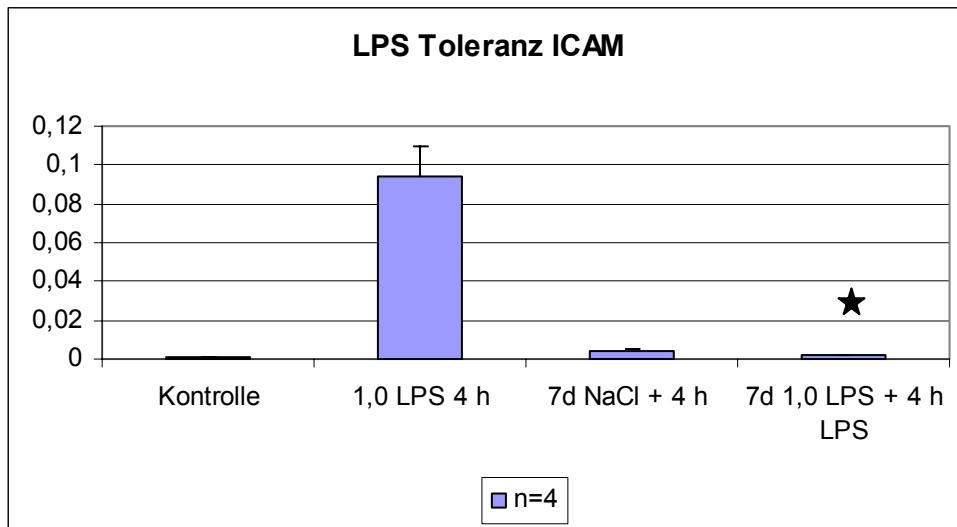


Abb. 11: Toleranzentwicklung bei ICAM

Darstellung der einmalig und der in Reihe sieben Mal mit LPS vorbehandelten Tiere mit Ihren unbehandelten Kontrollgruppen.

Die Untersuchung zeigt einen signifikanten Unterschied in der Expression von ICAM (Interzelluläres Adhäsions-Molekül) zwischen der einmaligen LPS Gabe und der über sieben Tage wiederholten LPS Gabe gleicher Dosis ($t = 0,00043$).

Die Expression von ICAM-1 fördert frühzeitig die lokale Rekrutierung von Leukozyten, die zu einer Beeinträchtigung der intestinalen Kontraktilität führt.

Das Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ist ein weiteres Chemokin, das für die Rekrutierung von Monozyten verantwortlich ist (Türler et al., 2002).

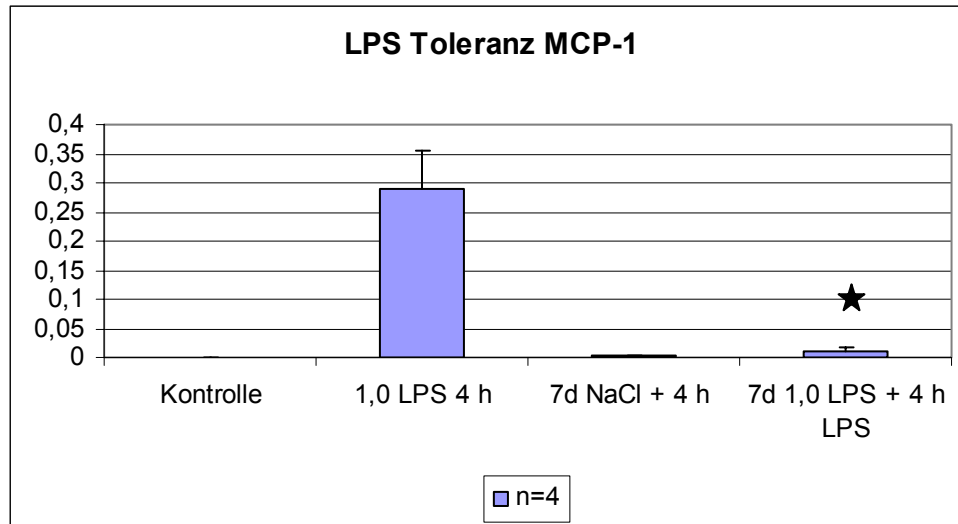


Abb. 12: Toleranzentwicklung bei MCP-1

Darstellung und Vergleich der einmalig und der in Reihe sieben Mal mit LPS vorbehandelten Tiere mit Ihren unbehandelten Kontrollgruppen.

Die Untersuchung zeigt einen signifikanten Unterschied in der Expression von MCP-1 zwischen der einmaligen LPS Gabe und der über sieben Tage wiederholten LPS Gabe gleicher Dosis ($t = 0,0418$).

MCP-1, ein β -Chemokin, ist mit verantwortlich für die Rekrutierung von Monozyten im traumatisierten Gewebe, dargestellt in verschiedenen Entzündungsmodellen (Lu B et al., 1998). Damit spielt es eine Schlüsselrolle bei der sich entwickelnden Dysfunktion der Kontraktilität der Dünndarmmuskularis bei der LPS induzierten Monozyteninfiltration. Der durch LPS verursachte Anstieg von MCP-1 mRNA erreicht seinen Höhepunkt nach 3 Stunden und bleibt für etwa 48 Stunden erhöht.

Der Toll-Like-Receptor-4 (TLR-4) ist der wichtigste zelluläre Oberflächenrezeptor für Lipopolysaccharid (LPS). Daher untersuchten wir auch dessen Expression auf mRNA-Ebene bei den verschiedenen Gruppen.

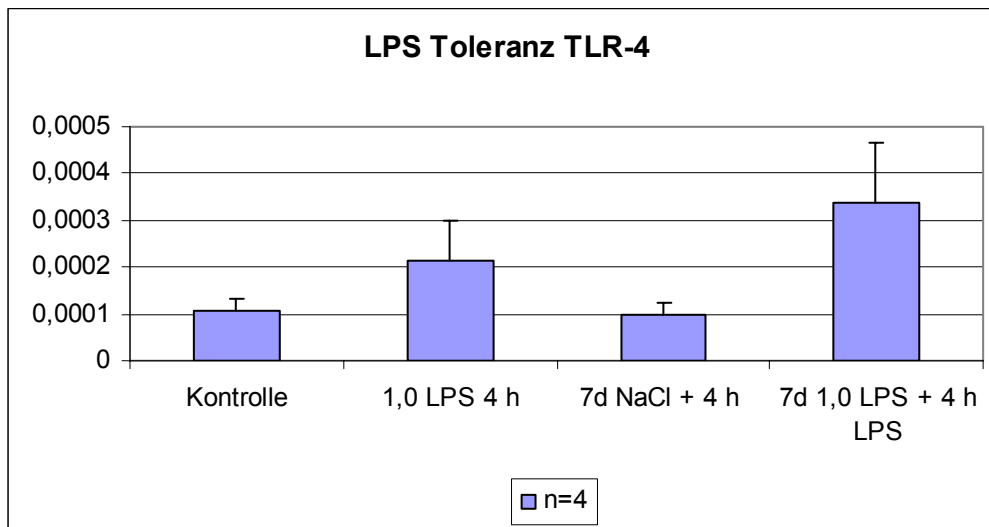


Abb. 13: Toleranzentwicklung bei TLR-4

Darstellung der einmalig und der in Reihe sieben Mal mit LPS vorbehandelten Tiere mit Ihren unbehandelten Kontrollgruppen.

Die Untersuchung zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Expression von TLR-4 (Toll-like-receptor 4) zwischen der einmaligen LPS Gabe und der über sieben Tage wiederholten LPS Gabe gleicher Dosis ($t = 0,21488785$).

TLR-4 ist ein Typ 1 Membranglykoprotein, aktiviert zusammen mit einem weiteren Glykoprotein (MD-2) NF- κ B und führt so zur Signalübertragung des LPS Reizes. Dieser Rezeptor ist somit entscheidend für die intrazelluläre Weiterleitung eines LPS Reizes und stellt daher einen möglichen Schlüsselpunkt in der Präkonditionierung der Darmmuskularis durch LPS dar.

Nach der Untersuchung der proinflammatorischen Zytokine, Chemokine und Rezeptoren betrachteten wir die Expression von IL-10, als ein Beispiel für ein anti-inflammatorisches Zytokin.

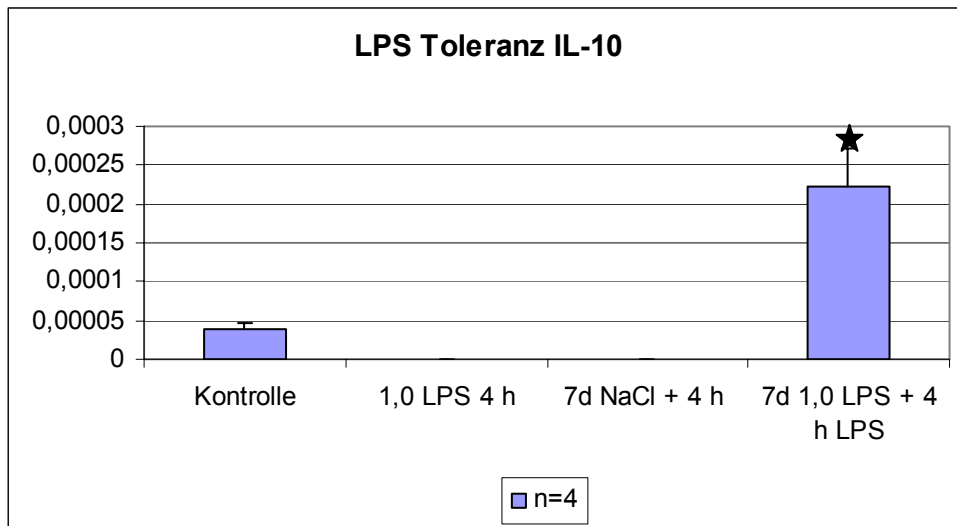


Abb. 14: Toleranzentwicklung bei IL-10

Darstellung und Vergleich der einmalig und der in Reihe sieben Mal mit LPS vorbehandelten Tiere mit Ihren unbehandelten Kontrollgruppen.

Die Untersuchung zeigt einen signifikanten Unterschied in der Expression von IL-10 zwischen der einmaligen LPS Gabe und der über sieben Tage wiederholten LPS Gabe gleicher Dosis ($t = 0,0197$).

Bei der Untersuchung von IL-10 handelt es sich um einen grundsätzlich anderen Weg. Vorstellbar für die Entwicklung einer Toleranz ist, wie zuvor untersucht, einerseits eine geringere proinflammatorische Antwort als Folge einer Präkonditionierung, andererseits aber auch eine verstärkte Expression protektiver Zytokine wie beispielsweise IL-10. Über eine Modulation der Aktivität des HO-1 Gens im Zellkern führt IL-10 zu einer Unterdrückung der Expression von IL-6, TNF- α und IL-1.

3.2 LPS Dosisbestimmung

Im zweiten Versuchsabschnitt soll geklärt werden, welche minimale Endotoxindosis ausreicht, um innerhalb der Darmmuskularis eine molekularbiologisch messbare LPS-Reaktion hervorzurufen, die jedoch keine klinische und funktionelle Wirkung zeigt. Im Weiteren wollten wir überprüfen, ob diese Dosis ausreichend ist, eine geringere posttraumatische Reaktion, beziehungsweise eine Kreuztoleranz gegenüber Operationstraumata als Folgetrauma hervorzurufen.

Es wurden drei Gruppen zu je zwei Ratten mit den Dosierungen 1,0 mg; 0,5 mg und 0,01 mg LPS pro Kilogramm Körpergewicht vorbehandelt. Das LPS wurde hierzu in einem halben Milliliter pyrogenfreiem NaCl aufgelöst. Die Tiere wurden mit Isofluran in eine Kurznarkose gebracht, während dessen die Lösung intraperitoneal injiziert wurde. Eine Kontrollgruppe wurde mit einem halben Milliliter NaCl ohne LPS behandelt.

Vier Stunden nach Injektion wurden die Tiere getötet. Der Darm wurde entnommen und in eisgekühltem KRB gelagert. Dann wurde der Darm in 2-4 cm lange Stücke aufgeteilt, das Mesenterium abgetrennt und anschließend wie eingangs beschrieben die Darmmuskularis von der Mukosa abpräpariert. Nach Aufbereitung der Proben wurde mittels PCR die Expression von IL-6 bestimmt (Abb. 15).

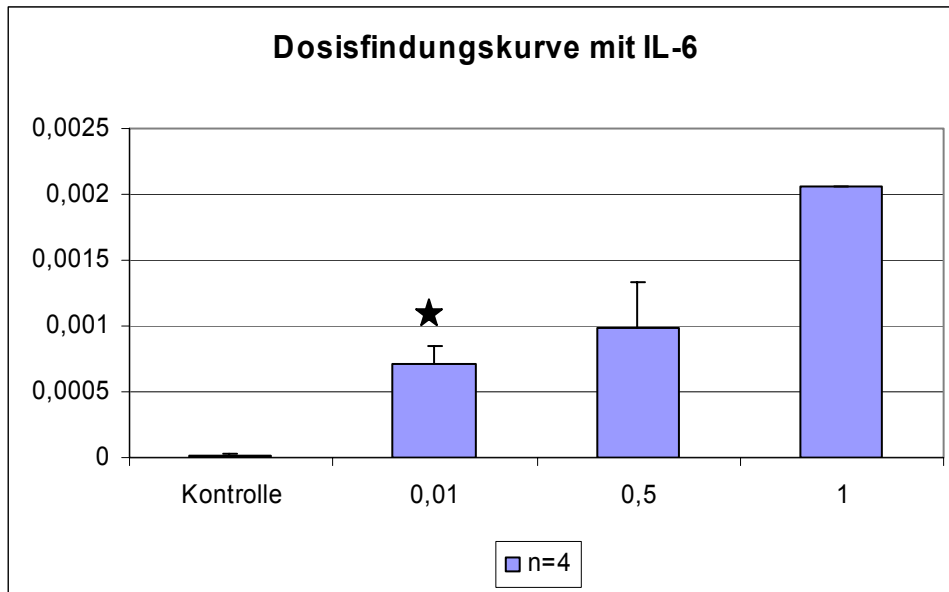


Abb. 15: LPS Dosisfindungskurve

Die Tiere wurden einmalig mit verschiedenen LPS Injektionen vorbehandelt und 4 Stunden später getötet. Anschließend wurde mittels PCR die Expression von IL-6 mRNA in der Darmmuskularis untersucht.

Die Abbildung zeigt einen geringen Unterschied zwischen den Dosierungen 0,5 und 1,0 mg/kg KG. Die geringste verwendete Dosierung von 0,01 mg/kg KG, zeigt eine signifikant ($t = 0,0047$) niedrigere Expression von IL-6, ist aber gleichzeitig signifikant höher als bei der NaCl Kontrollgruppe. Klinisch waren die mit 0,01 mg LPS/kg KG behandelten Tiere unauffällig.

Aus diesem Grund wurde die Dosierung von 0,01 mg LPS pro Kilogramm Körpergewicht für die folgenden Untersuchungen einer Kreuztoleranz zwischen einer LPS Präkonditionierung und einem chirurgischen Trauma verwendet.

3.3 LPS Kreuztoleranz

Ausgehend von den Ergebnissen der Dosisfindungskurve wurden jeweils vier Tiere mit 1,0 mg (Gruppe 3) und 0,01 mg/kg KG LPS (Gruppe 4) vorbehandelt und derweil unter den oben beschriebenen Bedingungen gehalten. Die LPS Gabe erfolgte jeden Morgen um die gleiche Uhrzeit und unter den gleichen Bedingungen. Die jeweiligen Gruppen wurden über 7 Tage vorbehandelt, am 8. Tag chirurgisch manipuliert und vier Stunden später getötet. Als Vergleich dienten Tiere, die ohne Vorbehandlung chirurgisch manipuliert (Gruppe 2) und vier Stunden später getötet wurden, sowie eine Gruppe von Tieren (Gruppe 1), die über 7 Tage an Stelle einer LPS Lösung pyrogenfreies NaCl injiziert bekamen.

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Vorbehandlung mit NaCl	Keine Vorbehandlung	Präkonditionierung mit LPS Standarddosis	Präkonditionierung mit LPS Standarddosis
NaCl Gabe	Manipulation	Manipulation	Manipulation

Tab. 3:

Übersicht der Gruppen zur Untersuchung einer LPS Kreuztoleranz

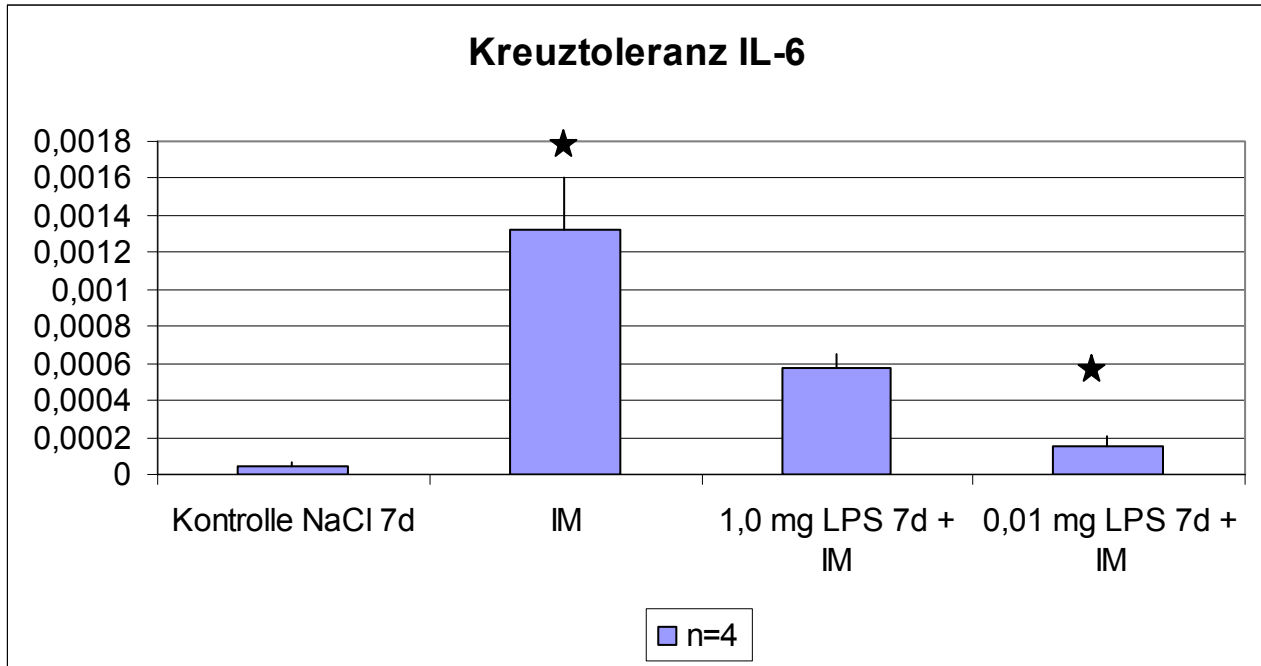


Abb. 16: Untersuchung der IL-6 mRNA Expression in der Kreuztoleranz

Die Tiere wurden über 7 Tage je nach Gruppe mit verschiedenen LPS Injektionen oder pyrogenfreiem NaCl vorbehandelt und 4 Stunden später getötet. Eine weitere Gruppe wurde ausschließlich manipuliert und 4 Stunden später getötet. Anschließend wurde in der Darmmuskularis mittels PCR die Expression von IL-6 untersucht.

Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied im Bezug auf die IL-6 Expression im Vergleich zu den über sieben Tage mit 0,01 mg LPS vorbehandelten und manipulierten Tieren ($t = 0,0016$), und zwar sowohl gegenüber der ausschließlich manipulierten Gruppe (IM), als auch gegenüber den mit 1,0 mg LPS vorbehandelten Tieren ($t = 0,0019$).

Unterschiedliches beobachteten wir bei der Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α in der Kreuztoleranz.

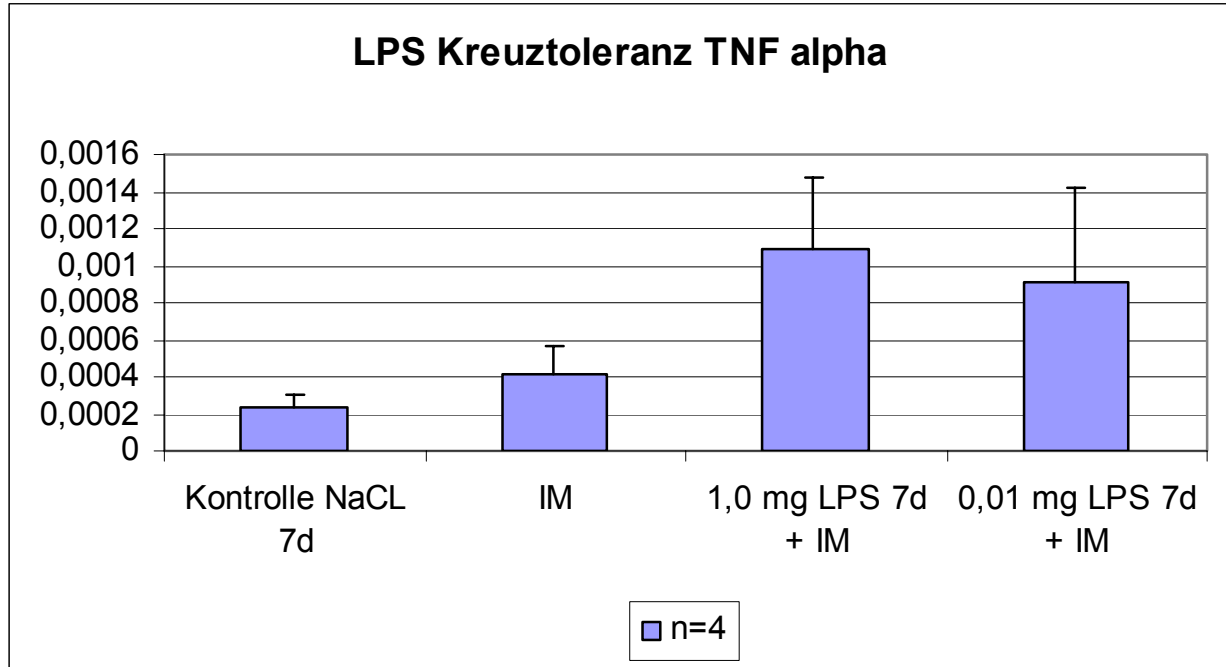


Abb. 17: Untersuchung der TNF- α mRNA Expression in der Kreuztoleranz

Die Tiere wurden über 7 Tage je nach Gruppe mit verschiedenen LPS Injektionen oder pyrogenfreiem NaCl vorbehandelt und 4 Stunden später getötet. Eine weitere Gruppe wurde ausschließlich manipuliert und 4 Stunden später getötet. Anschließend wurde in der Darmmuskularis mittels PCR die Expression von TNF- α untersucht.

Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied der TNF- α Expression im Vergleich der Gruppen, die mit 1,0 mg und 0,01 mg LPS/kg KG vorbehandelten worden waren (t-Test = 0,39). Vergleicht man die manipulierten Gruppe (IM) mit den mit 0,01 mg LPS vorbehandelten Tieren zeigt sich keine signifikant niedrigere TNF- α mRNA Expression bei der IM Gruppe (t = 0,1339).

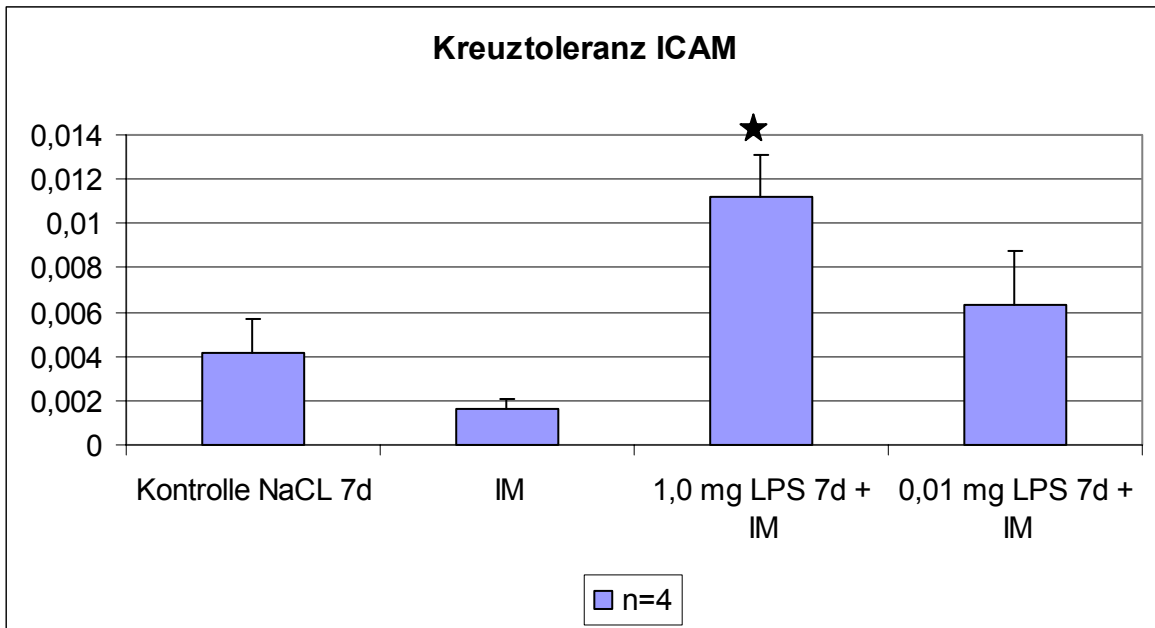


Abb. 19: Untersuchung der ICAM mRNA Expression in der Kreuztoleranz

Die Tiere wurden über 7 Tage je nach Gruppe mit verschiedenen LPS Injektionen oder pyrogenfreiem NaCl vorbehandelt und 4 Stunden später getötet. Eine weitere Gruppe wurde ausschließlich manipuliert und 4 Stunden später getötet. Anschließend wurde in der Darmmuskularis mittels PCR die Expression von ICAM untersucht.

Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied der ICAM Expression im Vergleich der beiden mit verschiedenen LPS Dosierungen über sieben Tage vorbehandelten und manipulierten Tiere (t-Test = 0,098). Signifikant ist der Unterschied der ausschließlich manipulierten Gruppe (IM), verglichen mit der mit 1,0 mg LPS präkonditionierten Gruppe (t-Test = 0,00199). Im Vergleich der manipulierten Gruppe (IM) mit der 0,01 mg LPS Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied (t-Test = 0,057).

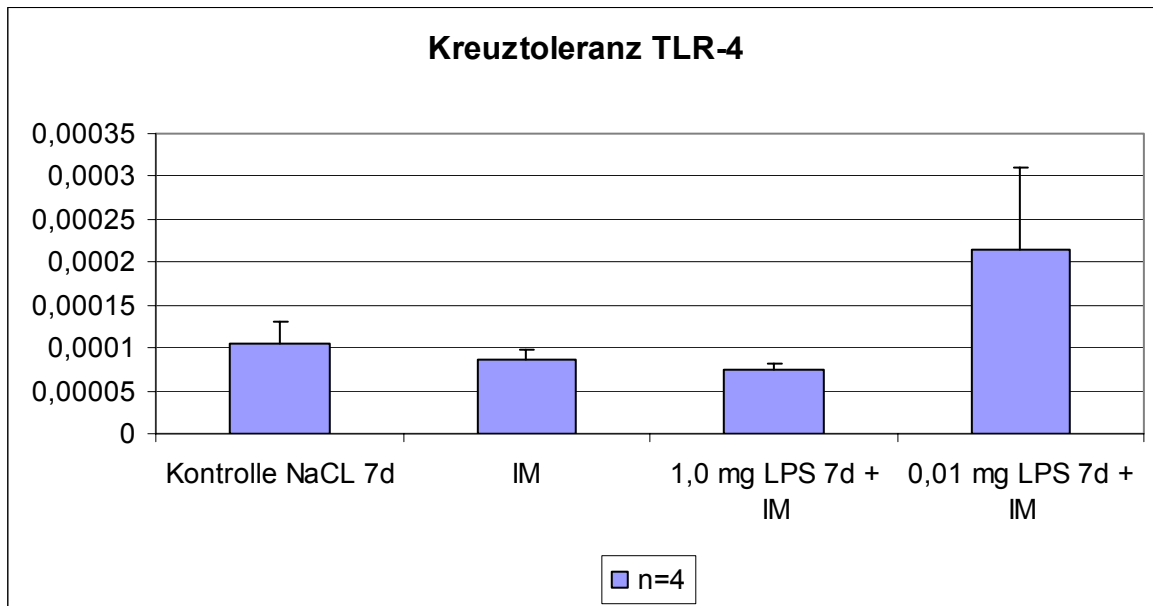


Abb. 20: Untersuchung auf Kreuztoleranz mit TLR-4

Die Tiere wurden über 7 Tage je nach Gruppe mit verschiedenen LPS Injektionen oder pyrogenfreiem NaCl vorbehandelt und 4 Stunden später getötet. Eine weitere Gruppe wurde ausschließlich manipuliert und 4 Stunden später getötet. Anschließend wurde in der Darmmuskularis mittels PCR die Expression von TLR-4 untersucht.

Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied der TLR-4 Expression auf mRNA Ebene im Vergleich zu den beiden mit verschiedenen LPS Dosen über sieben Tage vorbehandelten und manipulierten Tiere (t-Test 0,11). Auffällig allerdings ist eine hohe Standardabweichung bei den mit 0,01 mg LPS behandelten Tieren.

Zusammenfassung der molekularbiologischen Untersuchungen:

Die Untersuchungen zeigen am Beispiel der IL-6 mRNA Expression, stellvertretend für ein proinflammatorisches Zytokin, eine signifikante Herunterregulierung der mRNA im Anschluss an eine Vorbehandlung mit der kleinsten LPS Dosis von 0,01 mg. Das entspricht der initialen Annahme, dass nach LPS Präkonditionierung eine verminderte Entzündungsreaktion beobachtet wird.

Die Untersuchungen der übrigen Zytokine, Chemokine und des LPS Rezeptors TLR-4 zeigen keine signifikante Herunterregulierung der entsprechenden mRNA. Da die molekularbiologischen Ergebnisse auf mRNA Ebene alleine zu keinem eindeutigen Ergebnis führen, werden sie durch eine funktionelle gastrointestinale Transit Untersuchung und eine immunhistologische Färbung der Darmmuskularis erweitert.

3.4 Gastrointestinaler Transit

Die *in vivo* Transit Untersuchung 24 Stunden nach Manipulation und Gabe eines fluoreszierenden Dextran zeigen folgende Ergebnisse:

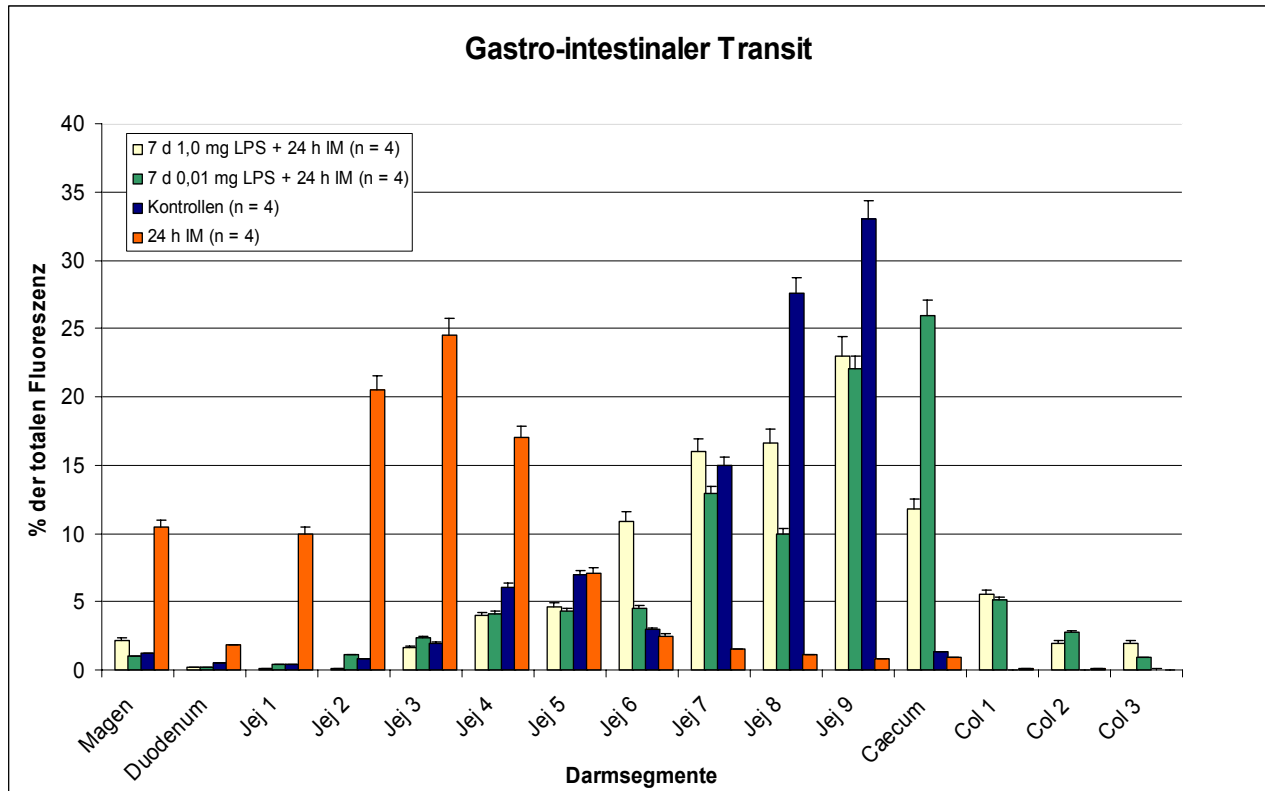


Abb. 22: Gastrointestinaler Transit

Vergleich des Gastro-intestinalen Transits (GIT) von Kontrolltieren mit dem Transit präkonditionierter Tiere und manipulierter Tieren ohne Vorbehandlung, jeweils 24 h nach intestinaler Manipulation (IM).

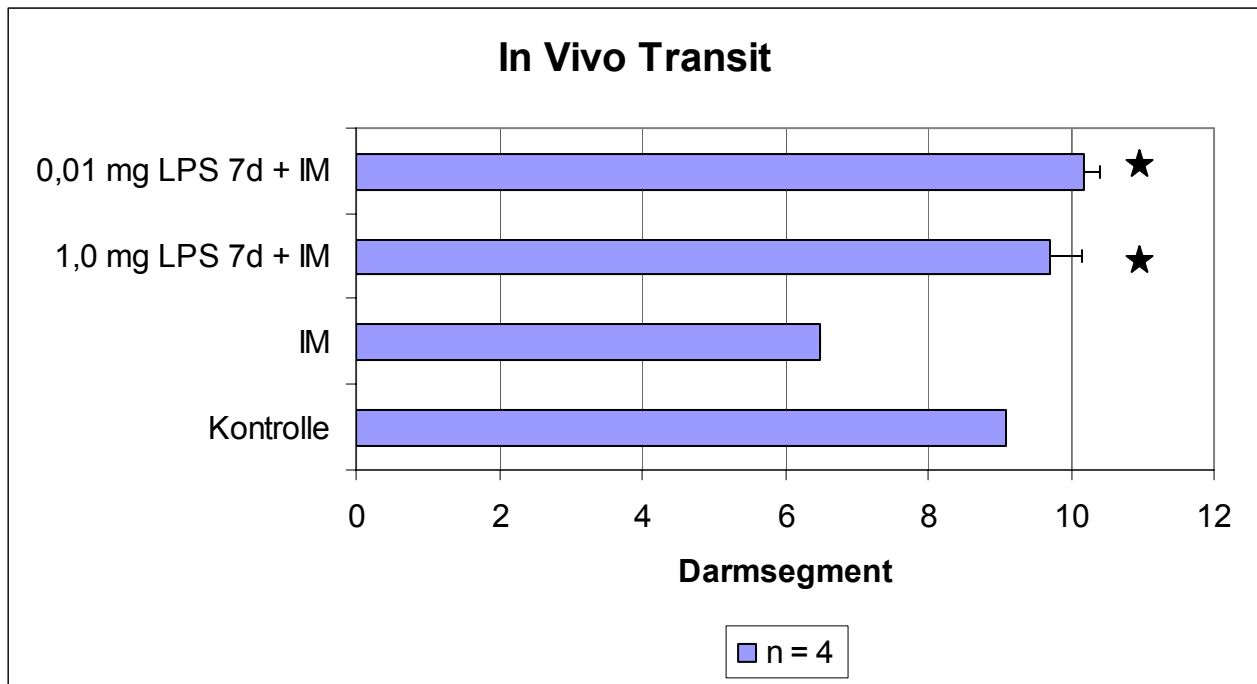


Abb. 23: Vergleich des *in Vivo* Transits mit Angabe des jeweiligen Geometrischen Zentrums (GZ)

Die Balken zeigen an, in welchem Darmsegment das Geometrische Zentrum (GZ), d.h. die über alle Darmsegmente gemessene und vergleichbar höchste Fluoreszenz liegt. Das GZ kann Werte zwischen 1 (= Segment Magen) und 15 (distales Kolon) annehmen.

Es zeigt sich, dass die beiden Gruppen, die mit den LPS Dosierungen 0,01 mg und 1,0 mg LPS pro Kilogramm Körpergewicht über sieben aufeinander folgende Tage vorbehandelt wurden, untereinander keinen signifikanten Unterschied in der durchschnittlichen Transitstrecke aufweisen. Das GZ liegt bei der Gruppe mit 0,01 mg LPS/kg KG bei 10,2 und bei der Gruppe mit 1,0 mg LPS/kg KG bei 9,7, d.h. im terminalen Dünndarm.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Hier liegt das GZ bei 9,1 Segmenten.

Unterschiedlich verläuft der Darmtransit bei nicht präkonditionierten aber intestinal manipulierten Tieren. In dieser Gruppe ist der Darmtransit signifikant verlangsamt, das gemessene Geometrische Zentrum liegt dementsprechend bei 6,5.

3.5 Hanker-Yates Färbung

Die Untersuchung mit Hilfe der Hanker-Yates Färbung dient der Darstellung von Myeloperoxidase(MPO)-positiven Zellen, hier insbesondere Neutrophile und Monozyten in Schnitten, so genannten Whole-mounts der Darmmuskularis.

Folgende vier Gruppen wurden miteinander verglichen:

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Keine Vorbehandlung	Keine Vorbehandlung	Präkonditionierung mit LPS (1,0 mg)	Präkonditionierung mit LPS (0,01 mg)
Native Kontrolle	Manipulation	Manipulation	Manipulation

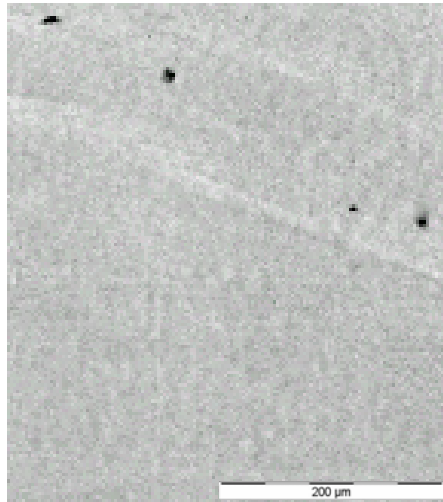
Tab.4

Übersicht der Gruppen, in denen mit einer Hanker-Yates Färbung die Anzahl Myeloperoxidase-positiver Zellen im mikroskopischen Schnitt der Dünndarmmuskularis demonstriert wird.

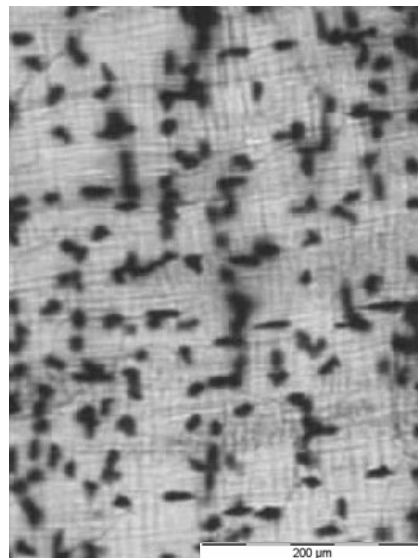
Die Färbung visualisiert am zellulären Infiltrat der Darmmuskularis, inwieweit eine erfolgreiche Präkonditionierung des Darms mit Veränderungen der Infiltration von Neutrophilen in die Darmmuskularis verknüpft ist. Ein vermehrtes Vorhandensein von Neutrophilen spricht für eine verstärkte Entzündungsreaktion im untersuchten Gewebe.

Die Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop bei 160-facher Vergrößerung in 5 unterschiedlichen, willkürlich gewählten Gesichtsfeldern ausgezählt und ein Mittelwert ermittelt.

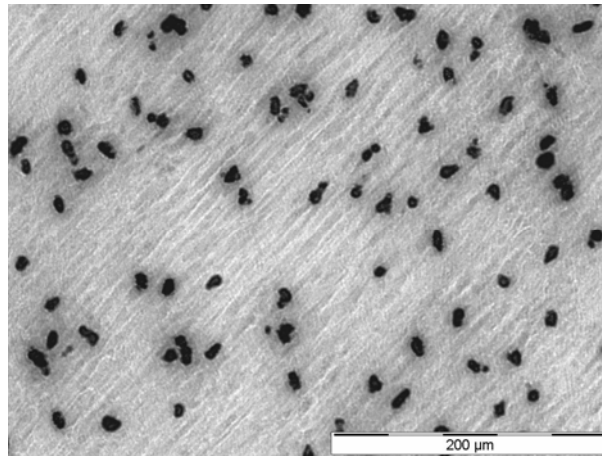
Es folgen die lichtmikroskopischen Ausschnitte der vier Gruppen.

Native Kontrolle**Abb. 24**

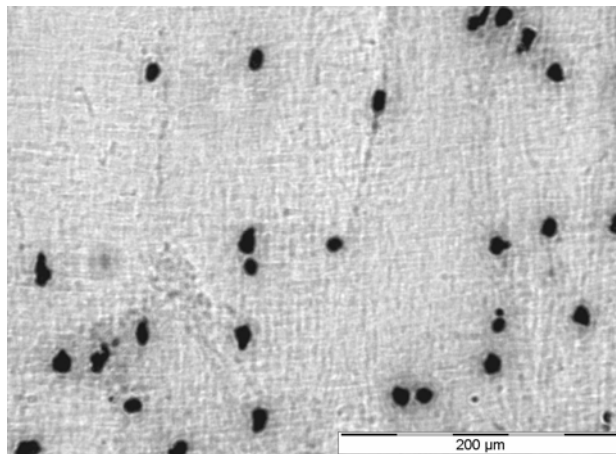
Die Abbildung zeigt einen lichtmikroskopischen Ausschnitt der Dünndarmmuskularis eines unbehandelten Kontrolltieres in 160-facher Vergrößerung. Die Haker-Yates Färbung stellt infiltrierte Myeloperoxidase(MPO)-positive Zellen dar.

IM + 24 h**Abb. 25**

Die Abbildung zeigt die Dünndarmmuskularis eines Tieres mit infiltrierte Myeloperoxidase(MPO)-positiven Zellen in einem lichtmikroskopischen Ausschnitt in 160-facher Vergrößerung. Das Präparat wurde 24 Stunden nach chirurgischer Manipulation bei einer Ratte ohne Präkonditionierung mit LPS gewonnen.

7 Tage 1,0 mg LPS/kg KG + IM + 24 h**Abb. 26**

Die Abbildung zeigt die Dünndarmmuskularis eines Tieres mit infiltrierten Myeloperoxidase(MPO)-positiven Zellen in einem lichtmikroskopischen Ausschnitt in 160-facher Vergrößerung. Das Präparat wurde 24 Stunden nach chirurgischer Manipulation bei einer Ratte gewonnen. Die Präkonditionierung wurde über 7 Tage mit 1,0 mg LPS/kg KG durchgeführt.

7 Tage 0,01 mg LPS/kg KG + IM + 24 h**Abb. 27**

Die Abbildung zeigt die Dünndarmmuskularis eines Tieres mit infiltrierten Myeloperoxidase(MPO)-positiven Zellen in einem lichtmikroskopischen Ausschnitt in 160-facher Vergrößerung. Das Präparat wurde 24 Stunden nach chirurgischer Manipulation bei einer Ratte gewonnen. Die Präkonditionierung wurde über 7 Tage mit 0,01 mg LPS/kg KG durchgeführt.

Abschließend folgt eine graphische Darstellung der durchschnittlichen Anzahl Myeloperoxidase(MPO)-positiver Zellen in den unterschiedlich behandelten Gruppen.

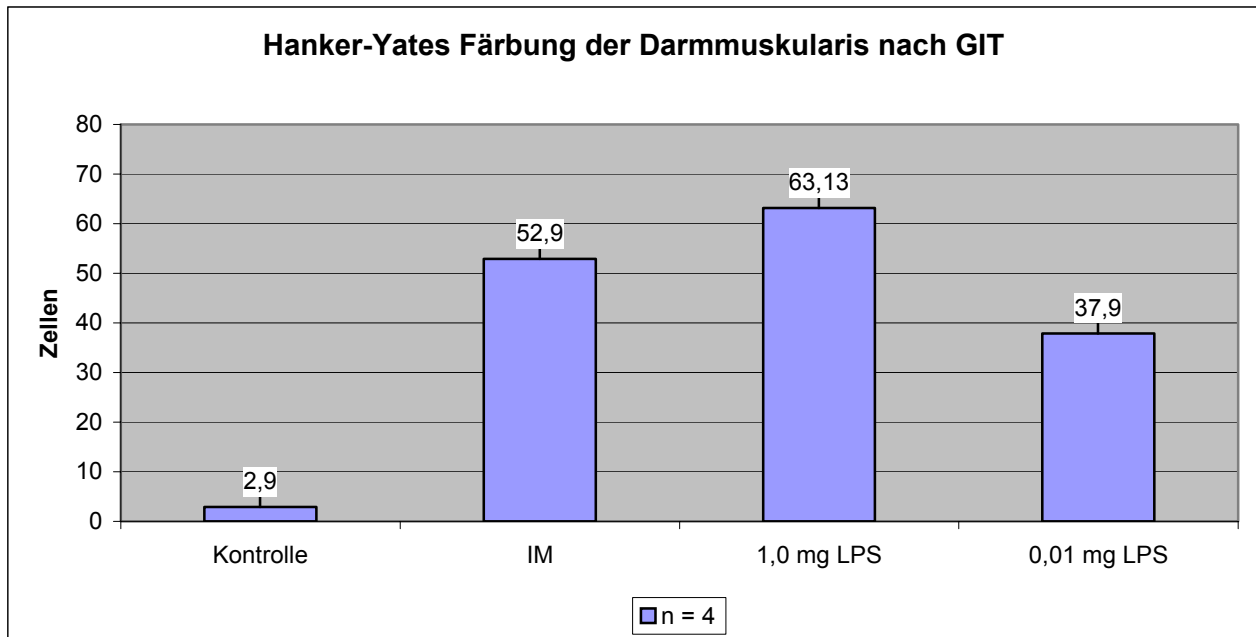


Abb. 28: Hanker-Yates Färbung der Darmmuskularis nach GI Transit

Darstellung der MPO-positiven Zellen in Schnitten der Darmmuskularis als Zeichen für die Infiltration von Neutrophilen in die Darmmuskularis.

Die Übersichtsgraphik zeigt eine geringere Anzahl von Myeloperoxidase(MPO)-positiven Zellen bei den Tieren, die mit 0,01 mg LPS/kg KG präkonditioniert wurden im Vergleich zu den nicht präkonditionierten manipulierten Tieren. Bei der Gruppe der mit 1,0 mg LPS/kg KG behandelten Tiere verhält es sich umgekehrt. In der nativen Kontrollgruppe können innerhalb der Darmmuskularis nur spärlich MPO-positive Zellen nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Das Fernziel mehrerer Forschungsgruppen ist die Entwicklung einer möglichst nebenwirkungsarmen und atraumatischen *in vivo* Präkonditionierung im Vorfeld einer chirurgischen Manipulation. Die vorliegende Arbeit verfolgt den Ansatz, durch eine Präkonditionierung mit einem intraabdominell injizierten Endotoxin (LPS) im Sinne einer Kreuztoleranz die immunologische Reaktion eines Organismus auf eine elektive Traumatisierung des Darms signifikant zu reduzieren und einen signifikanten Rückgang der potenziell lebensbedrohlichen posttraumatischen, lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen zu erreichen.

Das Grundprinzip der Behandlung ist die mehrmalige intraabdominelle Applikation einer minimalen Endotoxin Dosis, die einerseits vor einem nachfolgenden Endotoxinreiz zu schützen vermag, andererseits aber auch die negativen Folgen einer chirurgischen Darmmanipulation auf die Darmmotilität vermindern soll.

Der erste Versuchsabschnitt belegt das Auftreten einer Toleranzentwicklung mittels einer mehrtätig applizierten, nicht letalen Dosis von LPS (1,0 mg/kg KG LPS) gegenüber einem weiteren, höherdosierten LPS Trauma (12,5 mg/kg KG LPS). Diese Ergebnisse erweitern die vorhergehenden Untersuchungen, bei denen Tiere 24 h nach einer LPS Gabe manipuliert wurden (Schwarz et al., 2002). Anschließend konnte im Rahmen einer Dosisfindungskurve (Abb. 15) am Beispiel der IL-6 Expression mit Hilfe der PCR gezeigt werden, dass eine LPS Präkonditionierung mit einer niedrigen Dosis von 0,01 mg/kg KG nur zu einer geringen, nicht signifikanten Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine führte.

Im zweiten Versuchsabschnitt wiesen die mit niedrigen Dosen von Endotoxin (0,01 mg/kg KG LPS) präkonditionierten Tiere im Anschluss an eine chirurgische Manipulation eine signifikante Herunterregulierung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 auf. Die Untersuchung weiterer Zytokine und Chemokine führten allerdings nicht zu dem Bild einer generellen Herunterregulierung proinflammatorischer Faktoren in der untersuchten Darmmuskularis. Die klinische Relevanz einer Präkonditionierung mit minimalen Endotoxinmengen wurde dann im dritten Schritt mit der Durchführung einer gastrointestinalen Transit Untersuchung (Abb. 22 + 23) nachgewiesen. Dort zeigte sich, dass

die gewählte niedrige Endotoxinvorbehandlung die negativen Auswirkungen einer chirurgischen Manipulation auf die Darmmotilität vollständig verhindert.

In der Zusammenschau mit den PCR Ergebnissen der Kreuztoleranzuntersuchung lässt sich eine weitere systemisch wirkende Einflussgröße vermuten.

Mit Ausnahme von IL-6 zeigt sich bei den anderen untersuchten proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und dem toll-like Rezeptor TLR-4 keine signifikante Herunterregulierung durch die Präkonditionierung vor einer chirurgischen Manipulation.

Hierin liegt ein entscheidender Unterschied zu der Präkonditionierung mit LPS gegenüber einem weiteren LPS Reiz, bei der sich eine signifikante Herunterregulierung mehrerer proinflammatorischer Zytokine und eine Aufregulierung des antiinflammatorischen wirkenden Zytokins IL-10 zeigte. Dies stimmt auch mit der bisherigen Literatur überein (Schwarz et al., 2002).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die gezielte Blockade einzelner Zytokine wie beispielsweise iNOS, COX-2 und MCP-1 unerwünschte Reaktionen in der Darmmuskularis (Monozyteninfiltration, Reduktion der Spontankontraktilität) gegenüber einem Endotoxin (LPS) Reiz signifikant reduziert (Kalff et al., 2000; Kuhn R et al., 2005; Schwarz et al., 2001; Türler et al., 2001).

Gemeinsam ist diesen Untersuchungen und der vorliegenden Arbeit der weitestgehende Erhalt der Kontraktilität der Darmmuskularis. Sowohl die gezielte systemische Blockade einzelner proinflammatorischer Zytokine, wie auch die Konditionierung des Immunsystems mittels wiederholter niedrig dosierter intraperitonealer LPS-Applikation zeigen einen signifikanten positiven funktionellen Einfluss auf die Darmmotilität. Die gezielte präventive Blockade proinflammatorischer Zytokine war bisher noch nicht im Zusammenhang mit einem chirurgischen Trauma überprüft worden.

Interessant ist die Betrachtung der Hanker-Yates Färbung im Zusammenhang mit den Ergebnissen des Gastrointestinalen Transits. Es zeigen sich sowohl bei den präkonditionierten Gruppen, wie auch bei der ausschließlich operierten Gruppe eine signifikant höhere Zellinfiltration in die Dünndarmmuskularis. Dies ist Ausdruck eines immunologischen Geschehens, wobei der Gastro-intestinale Transit in den präkonditionierten Gruppen signifikant bessere Ergebnisse liefert als in der ausschließlich operierten Gruppe. Dabei entsprechen die Ergebnisse der präkonditionierten Gruppe denen der nicht operierten unbehandelten Kontrollgruppe.

Die klinisch wirksame Präkonditionierung geht mit einer funktionellen Inaktivität der infiltrierenden immunkompetenten Zellen einher, so dass es zu keinem signifikanten negativen Einfluss auf die Darmmotilität kommt.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die infiltrierten Myeloperoxidase-positiven Zellen hinsichtlich ihrer Funktion einem weiteren modulierenden Einfluss unterliegen müssen. Diese Interpretation unterstützt auch das Ergebnis der ICAM (interzelluläres Adhäsionsmolekül) Expression in den Kreuztoleranz Untersuchungen. Dort wiesen die präkonditionierten Gruppen eine zum Teil signifikant höhere Expression der ICAM mRNA auf. Als Adhäsionsmolekül ist ICAM vor allem für die Infiltration von immunkompetenten Zellen in das entzündete Gewebe verantwortlich. Eine gezielte Blockade von ICAM-1 Rezeptoren mit Antikörpern führt im Rattenmodell zu einer Verhinderung der postoperativ bedingten Monozyten- und Leukozyteninfiltration. Dadurch bedingt kam es auch nicht zu einer Unterdrückung der intestinalen Muskelfunktion (Kalff et al., 1999b).

Betrachtet man die gastrointestinale Transituntersuchung besteht kein direkter Zusammenhang zwischen Darmmotilität und quantitativer Zellinfiltration in der Dünndarmmuskularis. Damit widerspricht das PCR Ergebnis der ICAM Expression in der Dünndarmmuskularis nicht den funktionellen besseren Resultaten der vorbehandelten Gruppen.

Folgt man dem Gedanken, dass eine überregionale oder systemische immunologische Komponente für die Entwicklung einer Kreuztoleranz verantwortlich sein kann, so ergeben sich zahlreiche interessante Überlegungen, die zum Teil durch bereits veröffentlichte Literatur unterstützt werden. Besonders im Fachbereich Anästhesie finden sich die unterschiedlichsten Untersuchungen zum Thema Präkonditionierung, die, vor allem wenn sie den protektiven Einsatz von volatilen Anästhetika untersuchen, für unser Versuchsmodell (Isofluran Narkose) interessante Zusatzinformationen bieten. Einen besonderen Schwerpunkt bildet dabei die Präkonditionierung am Herzen (Tanaka et al., 2004; Weber et al., 2005a-c). Volatile Anästhetika zeigen dort direkt protektive Effekte gegenüber reversiblen und irreversiblen myokardialen Schäden (De Hert SG; 2005). Dabei scheint die Isofluran vermittelte Präkonditionierung unter anderem über eine Hochregulierung von iNOS im Herzen zu erfolgen (Wakeno-Takahashi M et al., 2005).

Eine Präkonditionierung die zu einer Protektion der Neurone im Gehirn führte konnte in Ischämie Versuchen der Ratte alleine durch Einsatz einer Isofluran Narkose erreicht werden (Zheng und Zuo, 2004).

Die direkte Beeinflussung der Expression verschiedener Zytokine und ihrer Rezeptoren ist auch mit anderen Anästhesieprotokollen beschrieben worden (Schneemilch und Bank, 2001). Dabei führte eine TIVA (totale intravenöse Anästhesie) verglichen mit einer BIA (balancierte inhalative Anästhesie) bestehend aus Trapanal und Sevofluran zu einer signifikant geringeren IL-6 Produktion und zu einer signifikant höheren Freisetzung vom anti-inflammatorisch wirksamen IL-1 Rezeptor Antagonisten im Blutplasma. Auch waren die postoperativen Spiegel von Kortison, Adrenalin und Noradrenalin im Blutplasma deutlich verringert.

Zusammengefasst ergibt sich ein Hinweis auf einen signifikanten Einfluss des Anästhesieprotokolls auf das postoperative inflammatorische Geschehen.

Da in der vorliegenden Arbeit die Tiere für jede intraabdominelle Injektion und für die chirurgischen Manipulationen mittels Isofluran narkotisiert wurden, ist dies ein möglicher modulierender Faktor im vorliegenden Model einer Präkonditionierung.

Die besondere Bedeutung der optimalen Kombination der Anästhetika, sowie der Koordination zwischen Anästhesie und Chirurgie zur Verringerung postoperativer Komplikationen nach Operationen beschreibt auch eine russische Studie, die speziell ältere Patienten untersuchte (Golub IE et al., 2004). Die gezielte postoperative Schmerztherapie mit Hilfe eines Periduralkatheters scheint ebenfalls geeignet zu sein, die Kontraktilität des Darms nach einem chirurgischen Eingriff positiv zu beeinflussen (Jansen M et al., 2003).

In unserem Tiermodell wurde bewusst keine postoperative Schmerztherapie durchgeführt, im Rahmen einer klinischen Umsetzung einer Präkonditionierung am Menschen sollte dieser Aspekt jedoch speziell berücksichtigt werden.

Der folgende Aspekt einer zentralen Reaktion auf einen LPS Reiz ist Gegenstand zahlreicher Forschungsgruppen unterschiedlicher Fachrichtungen. LPS, ob einmalig oder mehrfach appliziert, führt über eine Aktivierung peripherer Immunzellen und deren Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF-alpha) zu einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (Gadek-Michalska A und Bugajski J, 2004; Turnbull AV et al., 1998; Wang J und Dunn AJ, 1999). Über diesen Weg kommt

es vermittelt durch CRH (Corticotropin releasing hormone) und ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) zu einer Aktivierung der Kortisonproduktion in den Nebennieren (Beishuizen A und Thijs LG, 2003). Die so vermehrt freigesetzten Glukokortikoide wirken inhibitorisch auf den entzündlichen Prozess und die Freisetzung inflammatorischer Zytokine. Dieser Kortisonanstieg ist besonders ausgeprägt im Anschluss an ein akutes LPS-Trauma, eine wiederholte LPS Behandlung führt zu einer Anpassung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (Chang et al., 2005). Die CRH-Produktion und Freisetzung wiederum wird über Katecholamine, Prostaglandine und Stickstoffmonoxide (NO), welche in der Peripherie und zentral produziert werden, rückgekoppelt gesteuert. Stickstoffmonoxid (NO) beispielsweise unterdrückt die Reaktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse gegenüber zirkulierenden Zytokinen, nicht jedoch gegenüber Zytokinen im Gehirn selbst. Der Reaktionsmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse auf einen Endotoxinreiz ist insgesamt sehr komplex und wahrscheinlich vorwiegend abhängig von der Art, der Intensität und Dauer einer Immunstimulation (Turnbull AV et al., 1998).

Betrachtet man unsere PCR Ergebnisse mit den zum Teil erhöhten Expressionsraten für Zytokine präkonditionierter Tiere, so bekräftigen diese Literaturstellen die Vermutung einer ausgeprägten zentralen Steuerungskomponente im Rahmen der Präkonditionierung.

Neben der LPS vermittelten Präkonditionierung wird eine erfolgreiche Vorbehandlungen ebenfalls mit intraarteriell applizierten hypertonen Kochsalzlösungen erreicht (Oreopoulos et al., 2004). Eine intraarteriell applizierte hyperosmolare Salzlösung schützt vor Leberschäden bei Ischämie/Reperfusionen Versuchen. Diese Lösung erhöhte die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) in der Leber und senkte gleichzeitig die Expression des Tumor Nekrose Faktors alpha (TNF-alpha). Eine weitere Studie beschreibt eine erfolgreiche Inhibierung der Reaktion alveolarer Makrophagen auf einen LPS-Reiz durch Präkonditionierung mit einer hypertonen NaCl- oder Mannitol Lösung (Cuschieri J et al., 2002). Die Schlussfolgerung hieraus ist die Beeinflussbarkeit einer Makrophagenreaktion durch hypertone extrazelluläre Bedingungen.

Die Möglichkeit einer erfolgreichen Präkonditionierung durch die intraabdominelle Injektion einer nicht toxischen hyperosmolaren Salzlösung anstelle eines Endotoxins stellt einen interessanten Behandlungsansatz für zukünftige Versuche dar, gegebenenfalls auch als postoperative Therapie.

Vorstellbar ist auch, dass das wiederholte Trauma einer intraabdominellen Injektion selbst schon einen modulierenden Effekt auf immunologischer Ebene besitzt.

Eine weitere Variable unseres Modells stellt das intraabdominell applizierte Volumen und dessen Temperatur dar. Zu diesen beiden Ansätzen findet sich allerdings zurzeit keine entsprechende Literatur.

Eine mechanische Vorbehandlung des Darms mit dem Ziel, diesen präoperativ zu leeren und so postoperative Komplikationen zu verringern wird in einer Vergleichsstudie als unwirksam beschrieben (Ram et al., 2005).

Einen beeindruckend einfachen und kostengünstigen Weg die postoperative Darmmotilitätsstörung zu verringern belegt eine weitere aktuelle Studie. Die Patienten mussten im Anschluss an eine elektive offene Kolonresektion dreimal pro Tag für eine Stunde Kaugummi kauen. Der gesamte Krankenhausaufenthalt war dabei mit 4,3 Tagen gegenüber 6,8 Tagen signifikant verkürzt (Schuster et al; 2006).

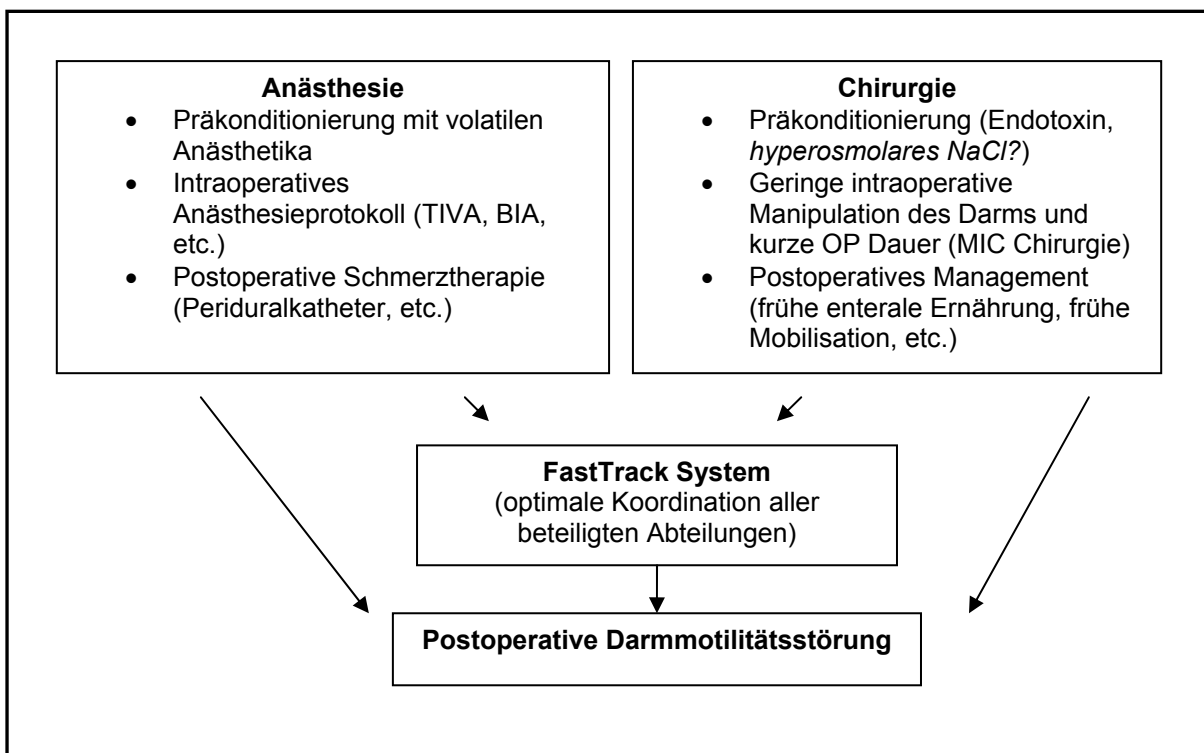


Abb. 29: Einflussfaktoren auf die postoperative Darmmotilität

Darstellung verschiedener Faktoren zur Beeinflussung der postoperativen Darmmotilitätsstörung

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung eines Kreuztoleranz Phänomens gegenüber einer chirurgischen Manipulation am Darm bei Verwendung geringster intraperitonealer LPS-Injektionen. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so stellt dies ein klinisch betrachtet erfolgreiches Behandlungsverfahren am Tiermodell dar. Offen bleibt allerdings weiterhin eine lückenlose, zusammenhängende molekularbiologische Erklärung des zugrunde liegenden Mechanismus. Die Entwicklung einer Toleranz gegenüber einem chirurgischen Trauma durch eine Präkonditionierung scheint auf unterschiedlichen Wegen möglich zu sein. Welche Behandlung die effektivsten und komplikationsärmsten Ergebnisse liefert, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Von herausragender Bedeutung ist sicherlich auch, dass neue Entwicklungen im Bereich des prä- und postoperativen Managements von operativen Eingriffen am Darm konsequent im klinischen Alltag umgesetzt werden - sei es eine Präkonditionierung oder ein Fast-track Behandlungsschema (Anderson AD et al.; 2003; Basse L et al., 2004; Hjort Jakobsen D et al.; 2004; Schwenk W et al., 2004). Eine aktuelle Multicenter-Studie zeigt gravierende Differenzen in der Umsetzung evidenzbasierter Erkenntnisse im Vergleich zwischen den USA und Europa, sowie innerhalb Europas (Kehlet H et al; 2006).

Abschließend sollte noch einmal betont werden, dass eine effektive Koordination zwischen den Fachbereichen Anästhesie und Chirurgie eine der entscheidenden Säulen in einem effektiven Behandlungsmodell des postoperativen Ileus darstellt (Luckey A et al., 2003).

5. Zusammenfassung

Vorarbeiten haben gezeigt, dass ein mit Endotoxin präkonditionierter Organismus gegenüber einem nicht vorbehandelten Organismus eine geringere Störung der Darmmotilität nach chirurgischer Manipulation am Darm aufweist. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Kreuztoleranz und die genaue Steuerung sind aber noch unbekannt.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, eine minimale Endotoxin Schwellendosis zu ermitteln, die bei möglichst geringer klinischer und funktioneller Beeinträchtigung eine protektive Wirkung gegenüber einer chirurgischen Darmmanipulation erzeugt. Im ersten Versuchsabschnitt sollte das Auftreten einer LPS Toleranz gegenüber einer wiederholten Endotoxingabe an Hand verschiedener Zytokine und Chemokine aufgezeigt werden. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde eine minimale Endotoxindosis bestimmt, die innerhalb der Darmmuskularis eine noch messbare, wenn auch nicht signifikante molekularbiologische Endotoxinantwort hervorruft. Mit dieser Dosis wurde dann im dritten Abschnitt das Phänomen der Kreuztoleranz an Hand der Expression verschiedener Zytokine und Chemokine auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Zusätzlich wurden funktionelle und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, um die gewählte Schwellendosis auch hinsichtlich ihrer klinischen Wirksamkeit bewerten zu können.

Die Ergebnisse auf molekularbiologischer Ebene alleine ergeben keine eindeutige Erklärung des der Kreuztoleranz zugrunde liegenden Mechanismus. Jedoch zeigen die funktionellen Untersuchungen einen signifikanten Vorteil der mit einer geringen Endotoxin Schwellendosis präkonditionierten Tiere, verglichen mit den ausschließlich chirurgisch manipulierten Tieren.

In der Diskussion mit aktuellen Forschungsergebnissen ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete Präkonditionierung ein multifaktorielles Geschehen darstellt, bestehend aus einer lokalen Herabregulierung proinflammatorischer Zytokine und einer Aufregulierung anti-inflammatorischer Zytokine zusätzlich beeinflusst durch überregionale humorale Faktoren.

6. Literaturverzeichnis

1. Anderson AD, McNaught CE, MacFie J, Tring I, Barker P, Mitchell CJ. Randomized clinical trial of multimodal optimization and standard perioperative surgical care. *Br J Surg.* 2003;90:1497-1504
2. Basse L, Thorbol JE, Lossl K, Kehlet H. Colonic Surgery With Accelerated Rehabilitation or Conventional Care. *Dis Colon Rectum* 2004;47:277-278
3. Bauer AJ, Schwarz NT, Moore BA, Turler A, Kalff JC. Ileus in critical illness: mechanisms and management. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:152-157
4. Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res.* 2003;9:3-24
5. Chang SL, Cloak CC, Malellari L, Chang L. The effects of repeated Endotoxin exposure on rat brain metabolites as measured by ex vivo ¹HMRS. *J Neuroimmunol.* 2005;166:39-46
6. Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Hypertonic preconditioning inhibits macrophage responsiveness to endotoxin. *J Immunol.* 2002;168(3):1389-1396
7. De Hert SG. The concept of anaesthetic-induced cardioprotection: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2005;19:445-459
8. Eskandari MK, Kalff JC, Billiar TR, Lee KK, Bauer AJ. Lipopolysaccharide activates the muscularis macrophage network and suppresses circular muscle activity. *Am J Physiol.* 1997;273:727-734
9. Eskandari MK, Schraut WH, 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
10. Gadek-Michalska A, Bugajski J. Role of prostaglandins and nitric oxide in the Lipopolysaccharide-induced ACTH and corticosterone response. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:663-675
11. Golub IE, Sorakina LV, Kovyrshin AV. Multimodal antinociceptive management of patients with ileus in surgery. *Anesteziol Reanimatol.* 2004;4:35-37

12. Jerome S, Akimitsu T, Gute D, Korthuis R. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol.* 1995;268:2063-2067
13. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 1999;68:1244-1254
14. Hjort Jakobsen D, Sonne E, Basse L, Bisgaard T, Kehlet H. Convalescence after colonic resection with fast-track versus conventional care. *Scand J Surg.* 2004;93:24-28
15. Jansen M, Lynen Jansen P, Junge K, Anurov M, Titkova S, Ottinger A, Schumpelik V. Postoperative peridural analgesia increases the strength of colonic contractions without impairing anastomotic healing in rats. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18:50-54
16. Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Surgical Manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg.* 1998;228:652-663
17. Kalff JC, Buchholz BM, 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 rat. *Surgery* 1999(a);126:498-509
18. Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 1999(b);117:489-492
19. 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;128:831-841
20. Kastenbauer S, Ziegler-Heitbrock HW. NF-kB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun.* 1999;67:1553-1559
21. Kehlet H, Buchler MW, Beart RW Jr., Billingham RP, Williamson R. Care after colonic operation – is it evidence based? Results from a multinational survey in Europe and the United States. *J Am Coll Surg.* 2006;202:45-54

22. Kuhn R, Schubert D, Tautenhahn J, Nestler G, Schulz HU, Bartelmann M, Lippert H, Pross M. Effect of intraperitoneal application of endotoxin inhibitor on survival time in a laparoscopic model of peritonitis in rats. *World J Surg.* 2005;29:766-770
23. Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg.* 1999;178:449-453
24. Lodato RF, Khan AR, Zembowicz MJ, Weisbrodt NW, Pressley TA, Li YF, Lodato JA, Zembowicz A, Moody FG. Roles of IL-1 and TNF in the decreased ileal muscle contractility induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol.* 1999;6:1356-1362
25. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerad C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998;187:601-608
26. Luckey A, Livingston E, Yvette T. Mechanisms and treatment of postoperative ileus. *Arch Surg.* 2003;138:206-214
27. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2000;165:7096-7101
28. Oreopoulos GD, Wu H, Szasz K, Fan J, Marshall JC, Khadaroo RG, He R, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: a role for interleukin 10. *Hepatology* 2004;40:211-220
29. Ram E, Yevgeni S, Weil R, Vishne T, Kravarusic D, Dreznik Z. Is mechanical bowel preparation mandatory for elective colon surgery? *Arch Surg.* 2005;140:285-288
30. Schneemilch CE, Bank U. Release of pro- and anti-inflammatory cytokines during different anesthesia procedures. *Anaesthesiol Reanim.* 2001;26:4-10
31. Schuster R, Grewal N, Greaney GC, Waxman K. Gum chewing reduces ileus after elective open sigmoid colectomy. *Arch Surg.* 2006;141:174-176
32. Schwarz NT, Türler A, Bauer AJ, Hirner A, Kalff JC. Neue Aspekte der postoperativen Darmatonie. *Viszeralchirurgie* 2001(a);36:402-408

33. 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(b);121:1354-1371
34. Schwarz NT, Engel B, Eskandari MK, Kalff JC, Grandis JR, Bauer AJ. Lipopolysaccharide Preconditioning and Cross-Tolerance: The Induction of Protective Mechanisms for Rat Intestinal Ileus. *Gastroenterology* 2002;123:586-598
35. Schwarz NT, Kalff JC, Turler A, Speidel N, Grandis JR, Billiar TR, Bauer AJ. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. *Gastroenterology* 2004;126:159-169
36. Schwenk W, Raue W, Haase O, Junghans T, Muller JM. „Fast-track- Kolonchirurgie“. Erste Erfahrungen mit einem “clinical pathway” zur Beschleunigung der postoperativen Rekonvaleszenz. *Der Chirurg* 2004; 75:508-514
37. Susa A, Roveran A, Bocchi A, Carrer S, Tartari S. FastTrack approach to major colorectal surgery. *Chir Ital.* 2004;56:817-824
38. Tanaka K, Ludwig LM, Krolikowski JG, Alcindor D, Pratt PF, Kersten JR, Pagel PS, Wartier DC. Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2. *Anesthesiology* 2004;100:525-531
39. Turnbull AV, Lee S, Rivier C. Mechanisms of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation by immune signals in adult rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:434-443
40. Turler A, Schwarz NT, Turler E, Kalff JC, Bauer AJ. MCP-1 causes leukocyte recruitment and subsequently endotoxemic ileus in rat. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 2002(a);282:145-155
41. Turler A, Moore BA, Pezzone MA, Overhaus M, Kalff JC, Bauer AJ. Colonic postoperative inflammatory ileus in the rat. *Ann Surg.* 2002(b);236:56-66
42. Uno K., Iuchi Y, Fujii J, Sugata H, Iijima K, Kato K, Shimosegawa T, Yoshimura T. In vivo study on cross talk between inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase in rat gastric mucosa: effect of cyclooxygenase activity on nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:995-1002

43. Wakeno-Takahashi M, Otani H, Nakao S, Imamura H, Shingu K. Isoflurane induces second window of preconditioning through upregulation of inducible nitric oxide synthase in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:2585-2591
44. Wang J, Dunn AJ. The role of interleukin-6 in the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain indoleamines by endotoxin and interleukin-1 beta. *Brain Res.* 1999;815:337-348
45. Wang YP, Sato C, Mizoguchi K, Yamashita Y, Oe M, Maeta H. Lipopolysaccharide triggers late preconditioning against myocardial infarction via inducible nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res.* 2002;56:33-42
46. Weber NC, Preckel B, Schlack W. The effect of anaesthetics on the myocardium –new insights into myocardial protection. *Eur J Anaesthesiol.* 2005(a);22:647-657
47. Weber NC, Schlack W. The concept of anaesthetic-induced cardioprotection: mechanism of action. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2005(b);19:429-443
48. Weber NC, Toma O, Awan S, Frassdorf J, Preckel B, Schlack W. Effects of nitrous oxide on the rat heart in vivo: another inhalational anaesthetic that preconditions the heart. *Anesthesiology* 2005(c);103:1174-1182
49. 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
50. Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases. *Mol. Pharmacol.* 2004;65:1172-1180

8. Abkürzungsverzeichnis

COX-2	Cyclooxygenase-2
ICAM	Interzelluläres Adhäsions-Molekül
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
iNOS	induzierbare Nitritmonoxyd Synthetase
GIT	Gastro-Intestinaler Transit
GZ	Geometrisches Zentrum
KBR	Krebs-Ringer´s Buffer
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
MPO	Myeloperoxidase
NFκB	Nuclear factor κB
PCR	Polymerase-chain-reaction (=Polymerase-Ketten-Reaktion)
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TLR-4	Toll-Like-Receptor-4
TNF alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha