

**Operatives Trauma des Darmes bei der Osteopetrosis-Maus:
Bedeutung der intestinalen Muskularis-Makrophagen**

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

Boris N. Lyutenski
aus Vratsa / Bulgarien

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff
2. Gutachter: PD Dr. med. Georg Baumgarten

Tag der Mündlichen Prüfung: 16. 09. 2010

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-,
Thorax-, und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Bonn
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Hirner

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Klinische und ökonomische Relevanz	9
1.2 Theorien der Pathogenese	10
1.2.1 Neurogene Theorien.....	10
1.2.2 Inflammatorische Theorien	11
1.2.3 Residente Makrophagen der Darmmuskularis	12
1.3 Die Osteopetrosis-Maus als genetisches Muskularis-Makrophagen- Depletionsmodel.....	15
1.4 Hypothesen und Ziele.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Tiere	17
2.2 Aufbau der experimentellen Gruppen.....	17
2.3 Operative Eingriffe.....	18
2.4 Präparate.....	18
2.4.1 Präparate zur RNA-Extraktion	18
2.4.2 Muskularis-Präparate (whole-mounts) zur Histo- und Immunhistochemie..	19
2.4.3 Muskelstreifen zur in vitro Kontraktilitätsmessung	19
2.4.4 Präparate zur gDNA-Extraktion	20
2.5 Histochemie.....	20
2.6 Immunhistochemie	20
2.7 RNA-Extraktion, Reverse Transkription (RT) und Real-Time quantitative RT- PCR.....	22
2.8 Isolierung von genomischer DNA (gDNA) und Allelic-discriminating (AD) TaqMan-PCR	24
2.9 Funktionelle Untersuchungen.....	29
2.9.1 In vitro Muskelkontraktilität	29
2.9.2 Gastrointestinaler Transit	29

2.10	Chemikalien, Lösungen, Substanzen	31
2.11	Statistik	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Genotypisierung	33
3.2	Histologie.....	34
3.2.1	Kontrolluntersuchungen.....	34
3.2.2	Auswirkungen der chirurgischen Manipulation	36
3.3	Zytokin-Expression	37
3.3.1	Makrophagenaktivierung	38
3.3.2	Inflammatorische Mediatoren und Enzyme	39
3.3.3	Chemokine und Adhäsionsmoleküle	40
3.4	Funktionelle Untersuchungen.....	42
3.4.1	In vitro Muskelkontraktilität	42
3.4.2	Gastrointestinaler Transit	44
4	Diskussion	45
4.1	Aktivierung der residenten Makrophagen nach chirurgischer Darmmanipulation mit nachfolgender massiver Entzündung in der Tunica muscularis und Motilitätsstörung	47
4.2	Genetisch bedingte Depletion der Muskularis-Makrophagen verhindert den postoperativen Ileus	48
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis	56

Abkürzungsverzeichnis

AbD	Assays-by-Design
AD-PCR	Allelic Discriminating TaqMan Polymerase Ketten Reaktion
ANOVA	Analysis of Variance
cDNA	Komplementäre (Einzelstrang-) Desoxyribonukleinsäure
CSF-1	Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (gleich M-CSF)
COX-2	Induzierbare Zykllooxygenase-2
CRF	Corticotropin Releasing Factor
C _T	Schwellenzyklus (threshold cycle)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FET	Fluoreszenz-Energie-Transfer
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GALT	Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (gut associated lymphoid tissue)
GC	Geometric Center
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
GIT	Gastrointestinaler Transit
ICAM-1	Interzelluläres Adhensionsmolekül-1
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IM	Intestinale Manipulation
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LPS	Lipopolysaccharide
L ₀	Muskellänge mit maximaler spontaner Kontraktionskraft
MCP-1	Monozyten Chemoattractant Protein-1
MF	Makrophagen
MGB	Minor Groove Binder
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
MM	Master Mix
MPO	Myeloperoxidase

mRNA	Boten (messenger) Ribonukleinsäure
NANC	Nicht-adrenerge nicht-cholinerge Nerven
NFQ	Nicht-fluoreszierender Quencher
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NTC	Negativ-Kontrolle (no template control)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
Rn	Normalisiertes Reportersignal
RT	Reverse Transcription
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
SEM	Standardabweichung (standard error of the mean)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelbasenaustausche
T _m	Schmelztemperatur eines DNA-Doppelstrangs
VIC	Fluoreszenzfarbstoff, chem. Struktur durch PE Biosystems nicht veröffentlicht
WM	Muskularis-Präparate (whole mounts)

1 Einleitung

1.1 Klinische und ökonomische Relevanz

Im chirurgischen Alltag kommt es im Rahmen abdomineller Eingriffe unausweichlich zu einer Manipulation des Darmes, die je nach Eingriff von subtilen Berührungen bis hin zu traumatisierender Kompression und stundenlanger Eventration des Darmkonvoluts reichen. Die resultierende postoperative Darmatonie bzw. in der fortgeschrittenen Form der postoperative Ileus stellt eine der häufigsten Komplikationen nach solchen chirurgischen Eingriffen dar (Iyer et al., 2009; Senagore, 2007). Die über mehrere Tage andauernde Minderung/Verlust der propulsiven Magendarmmotilität führt zu verzögerter Magenentleerung, Darmüberblähung, Störung der Nahrungs- und Gaspassage. Das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch starkes Unwohlsein, Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen bis hin zu respiratorischen Störungen inklusive Aspiration (Senagore, 2007). In manchen Fällen kann durch den postoperativen Ileus eine Relaparotomie erforderlich werden (Unalp et al., 2006). Der weitere Genesungsprozess und der gesamte klinische Verlauf solcher Patienten werden maßgeblich durch die gastrointestinale Funktion bestimmt. Trotz der großen Häufigkeit dieser Komplikationen nach abdominalen Operationen wurde der Darmmanipulation über die Jahre wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Da die zugrundeliegenden Pathomechanismen weitgehend unbekannt sind, beschränkt sich die Behandlung dieser Patienten auf symptomatisch-empirische Maßnahmen wie selektive gastrointestinale Dekompression und frühzeitiger Beginn des oralen Kostaufbaus (Han-Geurts et al., 2007; Nelson et al., 2005), Reduktion der Opioid-Analgetika und Anwendung der periduralen Anästhesie (Chen et al., 2009; Jansen et al., 2002; Nakayoshi et al., 2008), zielgerichteter Ausgleich perioperativer Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten (Bundgaard-Nielsen et al., 2007; Holte et al., 2007). Medikamentöse Therapieansätze mittels Antiadrenergika (Blandizzi, 2007), Dopamin – Antagonisten (Traut et al., 2008), Cholinergika (Caliskan et al., 2008) und Opioidantagonisten (Bream-Rouwenhorst und Cantrell, 2009; Taguchi et al., 2001) eine Steigerung der Motilität zu erzielen haben bisher nur einen begrenzten Erfolg gezeigt. Auch wenn die Einführung minimalinvasiver Techniken mit Hilfe der Laparoskopie (Allardyce et al., 2010; Delaney et al., 2009; Salimath et al., 2007) und des chirurgischen Fast-Track-Prinzips (Basse et al., 2005; Kehlet, 2008) diese Problematik positiv beeinflusst hat, existieren bis heute

praktisch keine kausalthérapeutische oder „prophylaktische“ Regime. Um eine kausale Therapie und vielmehr einen prophylaktischen Ansatz entwickeln zu können, müssen die initialen Schritte in der Entstehung des postoperativen Ileus genau erforscht werden.

Außerdem führen die chirurgisch induzierten Motilitätsstörungen insgesamt zu einer beträchtlichen Erhöhung der postoperativen Morbidität, der Liegedauer in der Klinik und damit der Krankenhauskosten. In den USA führt die Therapie dieser Problematik zu einem jährlichen finanziellen Mehraufwand von einer Milliarde Dollar (Holte und Kehlet, 2000; Livingston und Passaro, 1990; Prasad und Matthews, 1999). Mit dem zunehmenden wirtschaftlichen Druck nimmt die postoperative Darmatonie stark an Bedeutung zu und stellt somit ein Krankheitsbild von höchster Relevanz nicht nur unter klinischem, sondern auch unter ökonomischem Aspekt dar.

1.2 Theorien der Pathogenese

Vor über 100 Jahren wurde die Existenz postoperativer Darmfunktionsstörungen beschrieben und untersucht (Bayliss und Starling, 1899; Cannon und Murphy, 1907; Pal, 1890). Seither wurde im Rahmen zahlreicher Studien zur Pathogenese der postoperativen Darmatonie die Ursache der muskulären Funktionsstörung mit zum Teil kontroversen Theorien beschrieben (Bueno et al., 1978; Condon et al., 1986; Holte und Kehlet, 2000; Livingston und Passaro, 1990; Rothnie et al., 1963; Smith et al., 1977). Neben dem Einfluss sympathischer Reflexe werden die Aktivierung inhibitorischer nicht-adrenerger nicht-cholinerger (NANC)-Nerven, hemmende humorale Faktoren, der Einfluss von Anästhetika, die Freisetzung von Noradrenalin aus der Darmwand und lokale Faktoren wie Entzündungsprozesse diskutiert (Boeckxstaens et al., 1993; Livingston und Passaro, 1990; Mayer et al., 1988). Obwohl es sich hier offensichtlich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, sind die zugrundeliegenden Pathomechanismen bisher kaum aufgeklärt.

1.2.1 Neurogene Theorien

Viele Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit nervalen Einflüssen und untersuchten die Funktionsstörung innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden nach dem Eingriff. Eine von Taché et al. entwickelte neurale Theorie postuliert einen Einfluss zentraler inhibitorischer Regelkreise und die Freisetzung von Corticotropin Releasing Factor

(CRF) vom paraventriculären Kern des Hypothalamus und dem dorsalen vagalen Komplex (Barquist et al., 1996; Plourde et al., 1993; Taché et al., 1993). Somit kommt es über efferente Nervenfasern zur Stimulierung der inhibitorischen autonomen und enterischen Aktivität adrenerger und nitriderger Nerven (De Winter, 2003) und damit zur Hemmung der Muskelfunktion. Die Beteiligung dieser zentralen Mechanismen an der späteren, klinisch-relevanten Darmfunktionsstörung, die sich über viele Stunden bis Tage erstreckt, ist unwahrscheinlich. Als dafür möglicher Mechanismus wurde eine Entzündung in der Mukosa und in den nervalen Strukturen des Darmes postuliert (Livingston und Passaro, 1990; Mayer et al., 1988).

1.2.2 Inflammatorische Theorien

Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Bauer und Kalff zu den immunologischen und molekularen Abläufen in der glatten Darmmuskulatur erbrachten entscheidende neue Erkenntnisse in der Ätiopathologie der postoperativen Darmmotilitätsstörung (Kalff et al., 1998a; Kalff et al., 1999a; Kalff et al., 1999b; Kalff et al., 2000; Schwarz et al., 2001; Türler et al. 2002). In zahlreichen Tierversuchen wurde mithilfe eines standardisierten mechanischen Darmtraumas nachgewiesen, dass die funktionellen Einschränkungen der Darmmotilität durch eine posttraumatische, innerhalb der Tunica muscularis propria der Darmwand lokalisierte Entzündungsreaktion verursacht werden. Es wurde deutlich, dass residente und rekrutierte Leukozyten ganz wesentlich an der Ausbildung lokaler intramuskulärer Entzündungsvorgänge beteiligt sind, wobei hier die zentrale Rolle der residenten Muskularis-Makrophagen im „Orchestrieren“ dieser postoperativen lokalen Entzündungskaskade hervorgehoben wurde (Kalff et al., 1999b; Kalff et al., 2000; Schwarz et al., 2001).

Neuere Untersuchungen belegen, dass eine Interaktion immunologischer Prozesse mit dem Nervensystem existiert und hierdurch auch eine Steuerung der Motilität möglich ist (Bauer, 2008; Bonaz, 2007; Boeckxstaens und de Jonge, 2009; The et al., 2007; Van Der Zanden et al., 2009), wobei die initialen und gerade für einen prophylaktischen Ansatz interessanten Schritte weiterhin unbekannt bleiben. Auch wenn die frühzeitigen Veränderungen der Darmatonie nach einem Trauma womöglich durch nervale Einflüsse moduliert werden können, ist initial eine lokale, zelluläre Antwort auf den mechanischen Reiz im Sinne einer Mechanotransduktion erforderlich.

Unter den potentiellen Kandidaten für die Auslösung der immunologischen Veränderungen, die zur Motilitätsstörung führen, wurden Mastzellen und Makrophagen angeschuldigt (Bauer, 2008; Boeckxstaens und de Jonge, 2009; The et al., 2008; The et al., 2009). Immer mehr Erkenntnisse zeigen allerdings, dass die komplexe Antwort auf das intestinale Trauma multizellulären Ursprungs ist. So sind beispielsweise neben residenten Muskularis-Makrophagen auch Mastzellen an der frühen Phase der inflammatorischen Antwort beteiligt (The et al., 2008). Wechselwirkungen zwischen neuronalen und immunkompetenten Zellen und damit verbundene Regulationsmöglichkeiten der intestinalen Entzündung werden ebenso beschrieben (Boeckxstaens und de Jonge, 2009; Metz und Tracey, 2005). Das Auftreten einer pan-enterischen Inflammation nach selektivem lokalem Trauma – sog. gastrointestinaler Field Effect - bestätigt ebenfalls eine multizelluläre Beteiligung, woran vermutlich dendritische Zellen maßgeblich beteiligt sind (Koscielny et al., 2006; Schwarz et al., 2004).

Zusammenfassend handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem hauptsächlich neurogene und inflammatorische Phänomene eine Rolle spielen (Bauer, 2008; Bauer und Boeckxstaens, 2004; Boeckxstaens und de Jonge, 2009; Boeckxstaens, 2006; de Jonge et al., 2005; de Jonge et al., 2009).

1.2.3 Residente Makrophagen der Darmmuskularis

Die Rolle der Makrophagen im intestinalen Trakt wurde initial hauptsächlich in der Mukosa im Rahmen des Darm-assoziierten lymphatischen Systems (GALT) untersucht (Smythies et al., 2005), wo sie mit Funktionen der Immunabwehr betraut sind. Auch innerhalb der glatten Darmmuskulatur liegen residente Muskularis-Makrophagen in einem dichten Netzwerk regelhaft vor (Kalff et al., 1998b; Mikkelsen und Rumessen, 1992). Obwohl residente Makrophagen der Darmmuskulatur bereits seit 1965 bekannt sind (Taxi, 1965), wurde der Präsenz monozytärer Zellen in der glatten Darmmuskulatur zunächst nur wenig funktionelle Bedeutung zugemessen (Mikkelsen, 1995). Bereits in der Fetalzeit befinden sich Makrophagen in der Tunica muscularis, ohne dass für diese Besiedlung eine initiale Auseinandersetzung des Organismus mit pathologischen Erregern notwendig ist (Kalff et al., 1998b; Mikkelsen et al., 2004). Daher können die Muskularis-Makrophagen, anders als in der Mukosa, unter physiologischen

Bedingungen nicht konstant mit Abwehrfunktionen betraut sein. Die bereits in anderen Organen beschriebene Makrophagenaktivierung geht mit einer Erhöhung der Phagozytoseaktivität, Antigenpräsentation und der Induktion bzw. Freisetzung kinetisch-aktiver Substanzen und Mediatoren einher (z.B. Arachidonsäuremetabolite, NO, freie Radikale, Hormone und Zytokine) (Barnett und Brundage, 2010; Hamilton und Adams, 1987; Nathan, 1987; Schleicher und Bogdan, 2009). Somit sind diese hochpotente „immunologische“ Zellen potentiell zur Modulation der intestinalen Muskelaktivität fähig (Hori et al., 2001).

Kalff, Bauer und Mitarbeiter haben folgende Kaskade konsekutiver Abläufe postuliert, die nach chirurgischer Darmmanipulation zur Entwicklung postoperativer Darmatonie führt (**Abbildung 1**). Die einzelnen Schritte dieser Kaskade konnten die Autoren in Tierversuchen sowie an humanen Proben nach elektiver Darmresektion nachvollziehen (Bauer et al., 1996; Kalff et al., 1998a; Kalff et al., 1999a; Kalff et al., 1999b; Kalff et al., 2000; Kalff et al., 2003). So kommt es direkt nach Manipulation zu einer Makrophagenaktivierung mit frühzeitiger (bereits nach 1 - 3 Stunden) Aufregulierung wichtiger proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, MIP-1 α), Chemokine (z.B. MCP-1), Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1) und Enzyme (z.B. iNOS, COX-2) in der Darmmuskularis (Kalff et al., 1999a; Kalff et al., 2000; Schwarz et al., 2001). Nachfolgend kommt es zu einer frühen Phase der Darmmotilitätsstörung sowie zu einer massiven Rekrutierung verschiedener Leukozytenpopulationen (Monozyten, Neutrophile, Mastzellen, T-Zellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen), deren Anzahl in der Tunica muscularis ein Maximum nach 12 bis 24 Stunden erreicht und selbst Tage nach der Operation signifikant erhöht ist (Kalff et al., 1998a; Kalff et al., 1999b). Diese ausgeprägte lokale Entzündung führt dann zu einer zweiten, lang andauernden Phase der Darmatonie. Normale Verhältnisse sind erst nach etwa 2 - 3 Wochen wieder hergestellt (Kalff et al., 1999a).

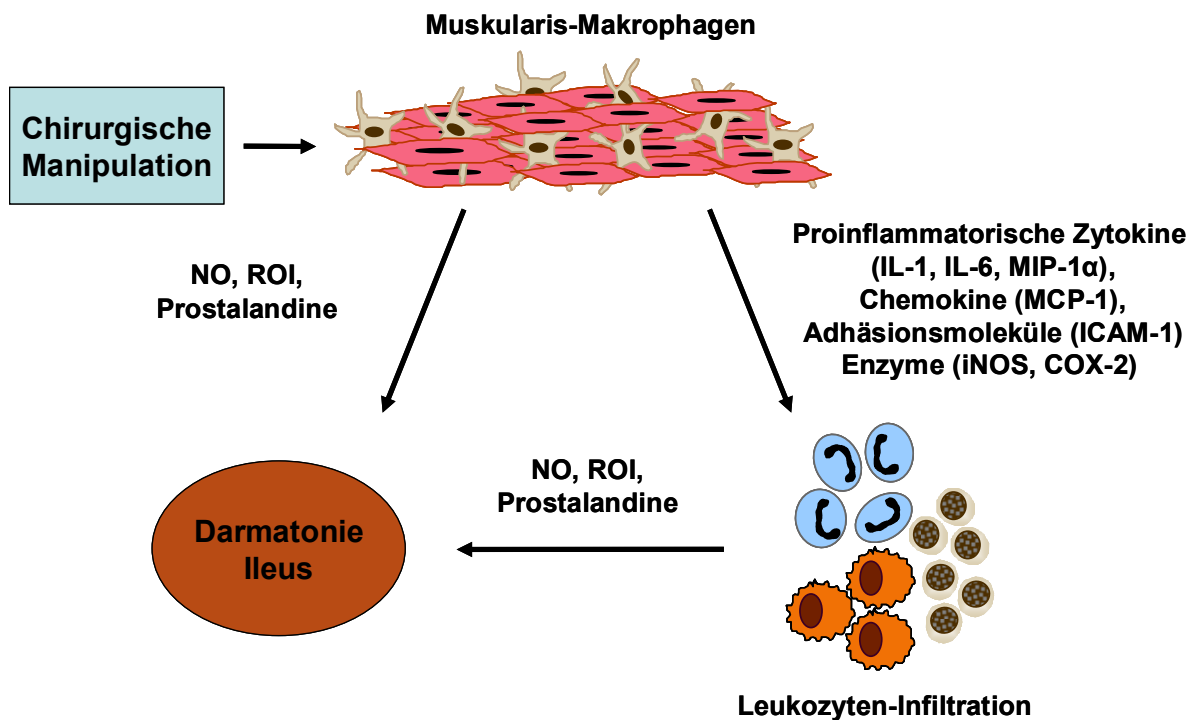


Abb. 1: Schematische Darstellung des biphasischen Pathomechanismus der postoperativen Darmatonie nach den Untersuchungen von Bauer und Kalff. Die chirurgische Manipulation führt zur Aktivierung der residenten Muskularis-Makrophagen, die nachfolgend kinetisch aktive Substanzen freisetzen und dadurch frühzeitig eine zunächst passagere Darmmotilitätsstörung verursachen. Parallel freigesetzte proinflammatorische Mediatoren sorgen für eine massive Leukozytenrekrutierung und Muskularisentzündung, die eine zweite, lang anhaltende Phase der Darmatonie bewirken.

Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche initiiierende Rolle der residenten Muskularis-Makrophagen in der oben beschriebenen postoperativen Kaskade. Diese Makrophagen könnten aufgrund ihrer Anzahl, ihres großen Potentials an Mediatoren und ihrer engen Nähe zu den Glattmuskelzellen, dem Plexus myentericus, den interstitiellen Zellen von Cajal (Schrittmacherzellen des Darmes) und den Gefäßen innerhalb der Tunica muscularis eine herausragende Rolle im Pathomechanismus der postoperativen Darmmotilitätsstörungen spielen (Faussone-Pellegrini et al., 1990; Kalff et al., 1998b; Mikkelsen, 1995; Sanders, 1996). Dennoch wurde in der Darmmuskularis auch eine große Anzahl weiterer residenter Leukozytenpopulationen (Monozyten, Neutrophille, Mastzellen, T-Zellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen) nachgewiesen (Kalff et al., 1998b). Außerdem sind eine Vielzahl anderer Zellen in der Darmmuskularis zur

Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren fähig (z.B. glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten) (De L Karlson et al., 2007; Heidemann et al., 2007; Ng et al., 2003; The et al., 2008; Zampetaki et al., 2005).

Daher war das Ziel dieser Arbeit den Nachweis einer initialen, direkten Beteiligung der Muskularis-Makrophagen bei der Entstehung der postoperativen Darmmotilitätsstörungen zu erbringen. Dies sollte anhand eines Tiermodells mit genetisch bedingt fehlenden Muskularis-Makrophagen (Osteopetrosis-Maus) erfolgen, um nach einer chirurgischen Manipulation die Auswirkung des Fehlens der Makrophagen und somit deren Rolle studieren zu können. Die Abklärung gerade dieser initialen Schritte des multifaktoriell bedingten Prozesses ist für die Entwicklung therapeutischer, respektive prophylaktischer Therapieansätze essentiell.

1.3 Die Osteopetrosis-Maus als genetisches Muskularis-Makrophagen-Depletionsmodell

Zur direkten Überprüfung der Rolle der Muskularis-Makrophagen in Bezug auf die postoperative Darmmotilität waren im Vorfeld Untersuchungen an Makrophagen-depletierten Ratten durchgeführt worden (Wehner et al., 2007). Durch die Einbindung von Chlodronsäure in Liposomen, die nach Phagozytose eine Makrophagen-Apoptose initiieren, wurde eine ca. 85 % selektive Depletion der Muskularis-Makrophagen erreicht. Nach einer weiteren pharmakologischen Blockade der Makrophagen-Aktivierung durch den selektiven Blocker von Stretch-aktivierten Kanälen Gadoliniumchlorid (Adding et al., 2001) konnte bei diesen Tieren nach intestinaler Manipulation eine signifikante Verminderung der Entzündungsreaktion in der Muskulatur und eine deutlich verbesserte postoperative Darmmotilität erreicht werden (Wehner et al., 2007). Hierbei ließ sich jedoch keine komplette Makrophagen-Depletion in der Muskularis erreichen, wohingegen in anderen Organen praktisch 95 – 100 % der Makrophagen depletiert sind (van Rooijen et al., 1989), wodurch die Aussagekraft über die Rolle der residenten Muskularis-Makrophagen in der postoperativen Darmatonie eingeschränkt ist.

Ein optimiertes Tiermodell für unsere Zielsetzung war daher die Osteopetrosis-Maus. Diese natürlich vorkommende Mutante weist eine spontan auftretende, autosomal-rezessive Mutation im CSF-1 Gen (colony stimulating factor 1) auf Chromosom 3 auf, wodurch das entstehende Zytokin funktionsunfähig ist. Dies ist bedingt durch eine

einzelne Baseninsertion (Thymidin) in einem frühen Abschnitt des Gens, was zur Ausbildung eines frühzeitigen Stopkodons führt (Yoshida et al., 1990). Resultierend kommt es zu einer Reduktion der Osteoklasten und einer systemischen Depletion von Monozyten und Makrophagen (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982). Von besonderer Bedeutung ist dabei das komplette Fehlen von Makrophagen innerhalb der intestinalen Tunica muscularis bei sonst normalen Muskularis-externa-Verhältnissen und reduzierten, aber vorhandenen Mukosa-Makrophagen (Mikkelsen und Thuneberg, 1999). Zudem zeigen Osteopetrosis-Mäuse trotz der systemischen Makrophagen-Armut eine adäquate Immunantwort bei bakteriellen Infektionen (Schonlau et al., 2003).

1.4 Hypothesen und Ziele

In dieser Studie wurden basierend auf den vorliegenden Untersuchungen die folgenden Hypothesen postuliert und durch die Bedeutung der intestinalen Muskularis-Makrophagen nach operativem Darmtrauma reflektiert.

1. Das dichte Netzwerk von residenten Muskularis-Makrophagen der Darmmuskulatur übernimmt eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der postoperativen Entzündungsreaktion und der Entstehung der postoperativen Darmatonie.
2. Genetische Depletion der Muskularis-Makrophagen verhindert bzw. reduziert die initialen Schritte der inflammatorischen Kaskade und verringert somit das Ausmaß der Entzündung.
3. Die reduzierte Muskularis-Entzündung führt zu einer Verbesserung der postoperativen Darmmotilität und verhindert den postoperativen Ileus.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Die Untersuchungen wurden an C57BL/6¹ und B6C3Fe *a/a-Csf1^{op2}* Mäusen im Alter von ca. 6 Wochen durchgeführt (Gewicht ca. 25 – 30 g). Heterozygote (+/*CSF-1^{op}*), Osteopetrosis- (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) und Wildtyp-Mäuse (+/+) wurden durch Verpaarung von heterozygoten Tieren (+/*CSF-1^{op}*) generiert. Die Genotypisierung der Nachkommen der einzelnen Generationen erfolgte über eine Allelic-discriminating (AD) TaqMan-PCR mit einem Single Nucleotide Polymorphism (SNP) – Assay³.

Die Versuche erfolgten nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Bonn und wurden von der Bezirksregierung Köln genehmigt (AZ 50.203.2 BN 21, 3/00). Sie erfolgten nach den vorgeschriebenen Richtlinien. Die Tiere wurden in Tiereinrichtungen gehalten, die den lokalen gesetzlichen Bestimmungen entsprechen. Die Mäuse waren einem 12 stündlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt und erhielten Wasser und Nahrung ad libitum. Die Osteopetrosis-Mäuse (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und aufgrund fehlender Schneidezähne mit eingeweichten und zerdrückten Futterpellets ernährt, deren Gewicht lag im Alter von 6 Wochen bei 10 – 15 g.

2.2 Aufbau der experimentellen Gruppen

C57BL/6-, heterozygote (+/*CSF-1^{op}*) und Osteopetrosis- (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) Mäuse (n=5/Gruppe) wurden einem in vorangehenden Studien standardisierten operativen Eingriff ausgesetzt und nach verschiedenen Zeitpunkten (3 und 24 h) postoperativ geopfert (Kalff et al., 1998b). Als Kontrollen dienten nicht operierte Tiere. Muskularis-Präparate wurden für histochemische und immunhistochemische Färbungen verwendet. Die Expression verschiedener Zytokine in den Darmwandschichten wurde mittels real-time PCR quantifiziert. Die *in vitro* Muskelkontraktilität wurde im Organbad an

¹ Charles River, Wilmington, MA, USA

² The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

³ Assays-by-DesignSM, Applied Biosystems

Jejunumstreifen gemessen. Der gastrointestinale Transit wurde *in vivo* nach intragastrischer Gabe von Fluoreszenz-markiertem Dextran bestimmt.

2.3 Operative Eingriffe

Nach Anästhesie der Tiere mit Isofluran⁴ per inhalationem und Hautdesinfektion⁵ wurde die Laparotomie vorgenommen. Nach Mittellinieninzision wurde das Dünndarmkonvolut mittels Watteträger auf eine feuchte Kompresse ausgelagert und die einzelnen Darmschlingen aufgereiht. Der Dünndarm wurde dann durch eine aboral gerichtete Rollbewegung mit Hilfe zweier feuchter Watteträger komprimiert und damit der Darminhalt in das Zökum evakuiert. Hiernach wurde der Darm ins Abdomen zurückgelegt und das Abdomen wurde zweischichtig mit 4-0 Seide⁶ fortlaufend verschlossen. Die Tiere erholten sich unter einer Wärmelampe im Käfig. Die Operationen wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, der Darm der Tiere wurde lediglich mit Instrumenten und in keinem Fall mit den Fingern berührt oder manipuliert.

2.4 Präparate

Zu den verschiedenen Zeitpunkten (3 und 24 Stunden nach Manipulation) wurden die Tiere erneut anästhesiert⁴ und die Bauchnähte wiedereröffnet. Das Dünndarmkonvolut wurde nun komplett entnommen und in präoxygenierter Krebs-Ringer-Lösung (KRB) bei 4 °C aufgearbeitet. Kontrolltiere wurden anästhesiert⁴ und der unmanipulierte Darm in identischer Weise entnommen.

2.4.1 Präparate zur RNA-Extraktion

Der entnommene Dünndarm wurde in ca. 5 cm lange Segmente geteilt und in gekühlter KRB gelagert. Die Segmente wurden in einer mit dem Silikonelastomer Sylgard^{®7} ausgegossenen Glasschale aufgespannt und das Mesenterium entfernt. Nachdem die Segmente auf einen Glasstab aufgezogen wurden, wurde der Darm vorsichtig an der mesenterialen Grenze mit Hilfe einer spitzen Pinzette inzidiert. Anschließend wurde die

⁴ Isofluran, Abbott, Wiesbaden

⁵ Cutasept F, Bode Chemie, Hamburg

⁶ 4-0 Perma-Hand-Seide, schwarz, geflochten, Ethicon GmbH, Norderstedt

⁷ Sylgard[®], Dow Corning GmbH, Wiesbaden

Muskularis von der darunterliegenden Mukosa mit Watteträgern abgeschert, sodass Muskulatur und Schleimhaut getrennt vorlagen. Diese Technik ist in Voruntersuchungen (Su et al., 1996) histologisch validiert. Die isolierten Dünndarm-Wandschichten wurden zur RNA-Extraktion in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.2 Muskularis-Präparate (whole-mounts) zur Histo- und Immunhistochemie

Zur Präparation von isolierten Muskularis-Präparaten (whole-mounts [WM]) wurde, wie zuvor beschrieben (Kalff et al., 1998a) ein ca. 5 cm langes Dünndarmsegment verwendet. Hierzu wurde das Lumen in einer mit KRB gefüllten Präparierschale entlang des Mesenteriums aufgeschnitten und das Segment anschließend auf 150 % der Länge und 250 % der Breite gedehnt und aufgespannt. Nach 10-minütiger Fixation des Segmentes mit 100 % Ethanol⁸ und zweimaligem Waschen mit KRB wurde die Mukosa unter einem Präparationsmikroskop⁹ von der Muskularis abgetrennt und verworfen. Die verbleibende Muskularis wurde nun in 0,05 M Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)¹⁰ mit Antibiotikazusatz (1000 U/ml Penicillin G und 1000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin)¹¹ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Färbung gelagert.

2.4.3 Muskelstreifen zur in vitro Kontraktilitätsmessung

Zur funktionellen Untersuchung der Muskelkontraktilität wurde ein Segment des mittleren Jejunums verwendet. Nachdem das Segment entlang des Mesenteriumansatzes eröffnet und in einer mit Sylgard^{®7} gefüllten Glasschale aufgespannt wurde, erfolgte das Abtrennen der Mukosa und Submukosa unter einem Präparationsmikroskop⁹ von der Muskularis. Parallel zur zirkulären Muskulatur wurden Muskelstreifen geschnitten (ca. $1 \times 10\text{ mm}$), deren eines Ende mit einer Schlaufe aus 7-0 Seide versehen wurde.

⁸ Ethanol absolut, Merck, Darmstadt

⁹ MZ 8, Leica, Bensheim

¹⁰ PBS, Biochrom KG, Berlin

¹¹ Penicillin-Streptomycin (100X), Sigma, Taufkirchen

2.4.4 Präparate zur gDNA-Extraktion

Für die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) zur Genotypisierung der Nachkommen wurden die Tiere im Alter von drei Wochen leicht anästhesiert⁴ und ein 0,5 – 1 cm langes Stück des Schwanzes kupiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C gelagert.

2.5 Histochemie

Der Nachweis der Infiltration der Muskularis mit Neutrophilen geschah mit einer Myeloperoxidase (MPO)-Färbung unter Verwendung der Hanker-Yates-Reaktion (Hanker et al., 1977). Hierzu wurden die gewonnenen WM-Präparate in einer Mischung von 10 mg Hanker-Yates Reagenz¹², 10 ml KRB und 100 µl 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung für 10 Minuten inkubiert und anschließend dreimal mit KRB gewaschen. Die so gefärbten WM-Präparate wurden auf einen Objektträger aufgezogen und eingedeckt¹³. Zur Auswertung wurden die MPO-positiven Zellen in 5 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern unter einem Lichtmikroskop¹⁴ bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie diente der Darstellung von Makrophagen und Zytokinen in der Muskularis. Nach 24-stündigem Inkubieren der WM in dem entsprechenden primären Antikörper und anschließend dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten in PBS¹⁰ erfolgte die Inkubation im sekundären, fluoreszierenden Antikörper über Nacht und das wiederholte dreimalige Waschen in PBS¹⁰. Nun wurden die WM auf einem Objektträger aufgezogen und eingedeckt¹⁵. Als Kontrolle dienten WM-Präparate, die ohne Primärantikörper mitgefärbt wurden.

Die F4/80-Makrophagenfärbung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll, wie von Ozaki et al. beschrieben (Ozaki et al., 2004). Das in der Sylgard®-Petrischale⁷ aufgespannte Vollwand-Dünndarmpräparat wurde zunächst mit 4 % Paraformaldehyd-

¹² Fluka, Sigma, Taufkirchen

¹³ SuperFrost® Adhäsions Objektträger und Deckgläser, Menzel-Gläser, Braunschweig

¹⁴ SM-LU, Leica, Bensheim

¹⁵ Fluorescent Mounting Medium, Dako, Hamburg

Lösung¹⁶ bei 4 °C für 30 Minuten fixiert. Hiernach wurden wie unter 2.4.2 beschrieben die Mukosa und Submukosa von der Muskularis abgetrennt und das WM-Präparat für 2 Stunden in PBS gewaschen. Nach Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS)¹⁷ erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 24 Stunden bei 4 °C und danach mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die WM-Präparate für 2 Stunden mit PBS gewaschen und zur mikroskopischen Untersuchung eingedeckt.

Zur histologischen Auswertung wurden 5 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder unter einem Fluoreszenzmikroskop¹⁸ eingestellt und bei einer Vergrößerung von 100× und 200× ausgewertet.

Primäre monoklonale Antikörper wurden gegen Makrophagen (F4/80) angewendet. Die sekundären, fluoreszierenden Antikörper waren spezifisch gegen die primären Antikörper gerichtet. Sämtliche Antikörper wurden gemäß Herstellerempfehlungen mit einer Verdünnungslösung, die sich aus 0,05 M PBS¹⁰, 0,2 % FCS-Albumin¹⁷ und Antibiotikazusatz (1000 U/ml Penicillin G und 1000 µg/ml Streptomycin)¹¹ zusammensetzte, verdünnt (**Tabelle 1**).

Antikörper	Konzentration	Spezifität
F4/80 ¹⁹	10 µg/ml	Maus: residente MF, Blutmonozyten
donkey-anti-rat IgG ²⁰	20 µg/ml	sek. Antikörper gegen Ratte-IgG

Tabelle 1: Aufstellung der zur Immunhistochemie verwendeten primären und sekundären Antikörper, deren Konzentration und Spezifität.

¹⁶ Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt

¹⁷ FCS, hitzeinaktiviert, Biochrom KG Seromed, Berlin

¹⁸ TE-2000, Nikon, Düsseldorf

¹⁹ F4/80 rat-anti-mouse, Serotec, Düsseldorf

²⁰ Donkey-anti-rat IgG, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.7 RNA-Extraktion, Reverse Transkription (RT) und Real-Time quantitative RT-PCR

Zur Quantifizierung und Analyse der Genexpression verschiedener Zytokine und Mediatoren erfolgte zunächst die RNA-Extraktion aus der isolierten Muskularis und Mukosa des Darms. Gesamt-RNA wurde nach Homogenisierung²¹ des Gewebes mittels des RNeasy Mini Extraction Kits²² gemäß der Herstelleranleitung extrahiert, kontaminierende DNA in den RNA-Extrakten wurde durch Ambion DNA-free²³ entfernt. Dann wurden Aliquots (2 µl) der RNA-Proben mit Hilfe eines Spektrophotometers²⁴ qualifiziert (260/280 nm-Quotient) und quantifiziert (Konzentration ng/µl). Aliquotierte RNA (500 ng) wurde in einer reversen Transkriptionsreaktion in die stabilere komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurde der Omniscript Reverse Transcriptase Kit²⁵ mit einem rRNase Inhibitor²⁶ und d(T)₁₅ Primer²⁷ verwendet. Die Reaktionsmischung wurde bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert, danach um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren auf 93 °C für 5 Minuten erhitzt mit abschließender Kühlung bei 4 °C²⁸. Die so erzeugten cDNA-Stränge wurden in einer anschließenden SYBR Green Ein-Schritt real-time RT-PCR amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonucleotidprimer sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

Die Herstellung der Primer erfolgte nach Sequenzangabe kommerziell²⁹. Als endogene Kontrolle diente β-Actin. Für die Zusammensetzung des PCR-Reaktions-Mixes wurde der 2X SYBR Green PCR Master Mix³⁰, die entsprechenden Primer und 6,25 ng cDNA verwendet (**Tabelle 3**).

²¹ Polytron, Bioblock Scientific, Illkirch, France

²² RNeasy Mini Extraction Kit, Qiagen, Hilden

²³ Ambion DNA-free, Austin, TX, USA

²⁴ BIORAD Smart Spec 3000, BIORAD, München

²⁵ Omniscript Reverse Transcriptase Kit, Qiagen, Hilden

²⁶ rRNAase Inhibitor, Promega, Madison, WI, USA

²⁷ d(T)₁₅ Primer, Roche, Mannheim

²⁸ UNO-Thermoblock, Biometra, Göttingen

²⁹ Metabion, Plenegg-Martinsried, Germany

³⁰ SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Darmstadt

Gen	Primer	Sequenz
β -Actin	forward reverse	5`-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3` 5`-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3` PCR-Produkt Größe: 148 bp
IL-6	forward reverse	5`-TCA ATT CCA GAA ACC GCT ATG-3` 5`-CCT CCG ACT TGT GAA GTG GT-3` PCR-Produkt Größe: 176 bp
MCP-1	forward reverse	5`-CCC AAT GAG TAG GCT GGA GA-3` 5`-GCT GAA GAC CTT AGG GCA GA-3` PCR-Produkt Größe: 210 bp
MIP-1 α	forward reverse	5`-ACC ATG ACA CTC TGC AAC CA-3` 5`-CCC AGG TCT CTT TGG AGT CA-3` PCR-Produkt Größe: 202 bp
ICAM-1	forward reverse	5`-AGG GCT GGC ATT GTT CTC TA-3` 5`-CTT CAG AGG CAG GAA ACA GG-3` PCR-Produkt Größe: 158 bp
COX-2	forward reverse	5`-CCT GAT CCT GGT TTT GTG CT-3` 5`-TCT GCA GTC CAG GTT CAA TG-3` PCR-Produkt Größe: 205 bp

Tabelle 2: Aufstellung der Primer für die real-time RT-PCR.

Reagenz	Konzentration	Menge
SYBR Green MM	2x	5 μ l
Forward Primer	5 μ M	0,5 μ l
Reverse Primer	5 μ M	0,5 μ l
gDNA		6,25 ng
H ₂ O steril		ad 10 μ l

Tabelle 3: Ansatz für 10 μ l Reaktionsvolumen der SYBR Green RT-PCR.

Die Reaktionsansätze wurden in 384-well Platten³¹ in einem Endvolumen von 10 μ l pipettiert und die DNA wurde in einem AbiPrism 7900 HT cycler³² amplifiziert. Das Temperaturprofil der PCR-Reaktion ist in **Tabelle 4** dargestellt.

Zyklus	Vorgang	Temperatur	Zeit
1 Zyklus	AmpErase [®] UNG – Verdau	50 °C	5 min
	Polymeraseaktivierung	95 °C	2 min
	Annealing und Elongation	60 °C	1 min
2-40 Zyklus	Denaturierung	95 °C	15 s
	Annealing und Elongation	60 °C	1 min

Tabelle 4: Temperaturprofil der Real-Time PCR.

Die Versuchsbedingungen wurden wie vom Hersteller empfohlen eingehalten. Alle Proben wurden jeweils in Triplikaten angesetzt und hieraus ein Mittelwert gebildet. Die Daten der real-time PCR wurden graphisch als ΔRn des Fluoreszenzsignals gegen die Zyklus-Anzahl aufgetragen. Hierbei wurde für jede Probe der so genannte C_T -Wert automatisch ermittelt. Der C_T -Wert bezeichnet jene Zykluszahl, bei der zum ersten Mal ein bestimmter Schwellenwert der durch die PCR-Amplifikation entstandenen Fluoreszenz erreicht wird. Ebenso wurden bei jedem PCR-Lauf die C_T -Werte bekannter Template-Verdünnungen (Standardverdünnungen) ermittelt und eine Standardkurve konstruiert, anhand derer man aus dem C_T -Wert jeder Probe durch Interpolierung auf die zugehörige Konzentration schließen konnte³³.

2.8 Isolierung von genomischer DNA (gDNA) und Allelic-discriminating (AD) TaqMan-PCR

Die für die Genotypisierung notwendige gDNA wurde aus den Schwanzbiopsien mit dem DNeasy Tissue Kit³⁴ wie vom Hersteller empfohlen extrahiert. Dann wurden Aliquots

³¹ 384-well PCR plate, ABgene House, Epsom, UK

³² AbiPrism 7900 HT cycler, Applied Biosystems, Darmstadt

³³ AbiPrism 7900 HT User Bulletin 2 (SDS 2.0 Software), Applied Biosystems, Darmstadt

³⁴ DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Hilden

(2 µl) der gDNA-Proben mit Hilfe eines Spektrophotometers²⁴ qualifiziert (260/280 nm-Quotient) und quantifiziert (Konzentration ng/µl).

Aliquotierte gDNA wurde in einer Allelic-discriminating (AD) TaqMan-PCR eingesetzt, um die zwei verschiedenen Allele des CSF-1 Gens (Wildtyp und/oder Mutante) in jeder Probe zu identifizieren. Hierzu wurde ein spezifischer mCSF-1 SNP - "Assay-by-Design" der Firma Applied Biosystems verwendet³⁵. Dieser Assay enthält die normalen zwei Primer für die Amplifikation der betreffenden CSF-1 Sequenz sowie zwei Oligonukleotid-Sonden (TaqMan MGB-Probes) zur Detektion der untersuchten Sequenzen der beiden CSF-1 Allele (**Tabelle 5**).

CSF-1-Gen	Sequenz
Primer	5'-CTG GAT GAT CCT GTT TGC TAC CTA A-3' (forward) 5'-GCG CAT GGT CTC ATC TAT TAT GTC T-3' (reverse)
VIC-Sonde (Mutation)	5'-AAG GCC TTT TTT <u>I</u> CT GGT ACA-3'
FAM-Sonde (Wildtyp)	5'-AAG GCC TTT TTT CTG GTA CA-3'

Tabelle 5: Aufstellung der Primer- und Sondensequenzen für die AD TaqMan-PCR.

Die Sonden sind am 5'-Ende mit unterschiedlichen Reporterfarbstoffen markiert, die Mutationssonde mit VIC[®], die Wildtyp-Sonde mit FAM[™], deren Fluoreszenz durch die räumliche Nähe eines am 3'-Ende platzierten nicht-fluoreszierenden Quencher unterdrückt wird. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) bezeichnet (Förster, 1948; Lakowicz, 1988). Durch den am 3'-Ende befindlichen MGB (Minor Groove Binder) binden diese Sonden in die kleine Furche der DNA, wodurch deren Schmelztemperatur (T_m) erhöht wird. Aus diesem Grund ist auch bei kürzeren Sonden eine hohe Präzision der AD-PCR möglich (Afonina et al., 1997).

³⁵ Assays-by-DesignSM, Applied Biosystems, Darmstadt

Hybridisiert die Wildtyp- oder die Mutationssonde perfekt an komplementäre DNA (match), so wird sie bei der Neustrang-Synthese (Primer Extension) während der PCR durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Hierbei wird der Reporter vom Quencher getrennt, was zu einer Zunahme der entsprechenden Reporterfluoreszenz führt. Wenn im umgekehrten Fall die Sonde aufgrund eines Basenfehlers (mismatch) nicht hybridisiert, bleibt sie intakt und die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs bleibt weiterhin durch den Quencher unterdrückt (Livak et al., 1995) (**Abbildung 2**).

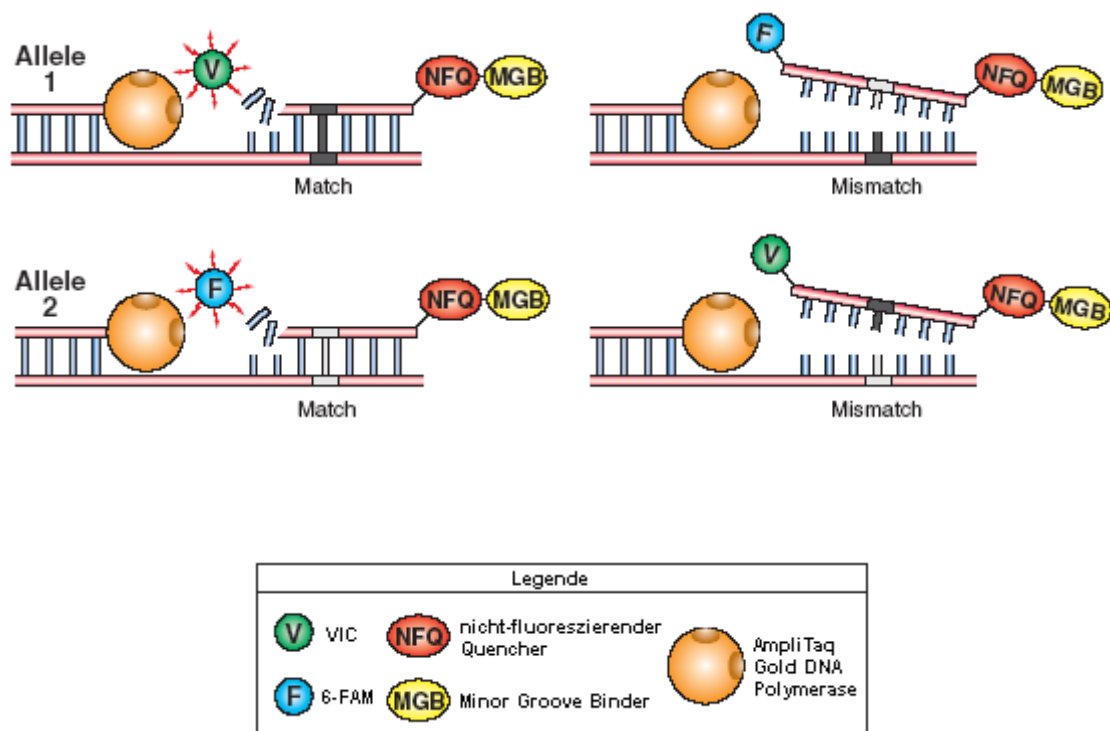


Abb. 2: Korrekte Paarung (match) und Fehlpaarung (mismatch) zwischen DNA-Zielsequenz und Oligonukleotid-Sonden in dem mCSF-1 SNP – Assay-by-Design³⁵ mit Zunahme der entsprechenden Reporterfluoreszenz im Falle einer perfekten Hybridisierung. (Mit freundlicher Erlaubnis von Applied Biosystems LCC)

Die AD-PCR wurde unter Verwendung von TaqMan® Universal PCR Master Mix³⁶ ebenso auf dem AbiPrism 7900 HT Sequence Detection System durchgeführt³². Bei TaqMan® Universal PCR Master Mix handelt es sich um einen optimierten Puffer, der außer den Primern, den Sonden und der zu untersuchenden gDNA alle notwendigen Substanzen enthält.

Die PCR-Amplifikation wurde in einem 10 µl Reaktionsansatz durchgeführt wie in **Tabelle 6** aufgeführt. Der Reaktionsansatz wurde in Triplikaten (10 µl pro Kavität) auf die 96 Well-Platte³⁷ aufgetragen und nach dem gleichen Amplifikationsprogramm, wie unter 2.7 beschrieben, inkubiert. Hier wurde jedoch zur optimalen Hybridisierung der Oligonukleotid-Sonden gemäß Herstellerempfehlung die Temperatur für Annealing und Elongation auf 62 °C angehoben.

Reagenz	Konzentration	Menge
Universal MM	2x	5 µl
CSF-1 AbD Mix	40x	0,25 µl
H ₂ O steril		2,25 µl
gDNA	2 ng/µl	2,5 µl

Tabelle 6: Ansatz für 10 µl Reaktionsvolumen der AD-PCR.

Als Positivkontrolle für die Wildtyp-Allele wurde gDNA aus C57BL/6-Mäusen verwendet, für die Mutationsallele entsprechend gDNA aus Osteopetrosis- (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) Mäusen. Auf jede 96-well Platte wurden jeweils zwei von o.g. Positivkontrollen und jeweils eine Negativ-Kontrolle (2,5 µl H₂O statt Proben-DNA) pipettiert.

Nach Beenden der PCR erfolgte ein Plate-Read-Lauf, wobei für jede Probe die Endfluoreszenz der beiden Reporterfarbstoffe bestimmt und zweidimensional dargestellt wurde (**Abbildung 3**). Wenn nur Wildtyp-DNA vorlag, entstand nur Fluoreszenz entlang der y-Achse, wenn nur mutierte DNA vorlag, entstand nur Fluoreszenz entlang der x-

³⁶ TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Darmstadt

³⁷ 96-well PCR plate, ABgene House, Epsom, UK

Achse. Bei heterozygoter DNA entstand Fluoreszenz von beiden Typen und die entsprechenden Datenpunkte lagen in der Mitte.

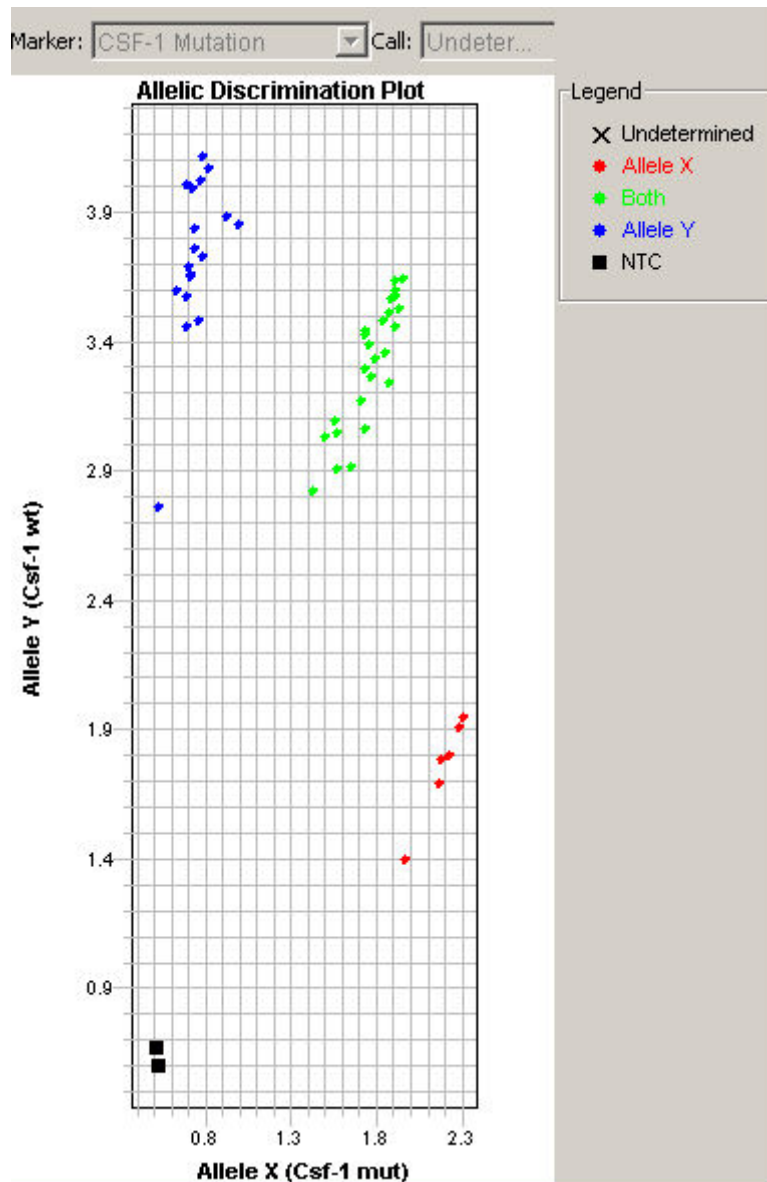


Abb. 3: Schematische Darstellung der Ergebnisse der AD-PCR. Folgende Genotypen können differenziert werden: homozygote Osteopetrosis-Mutante (Allele X), homozygoter Wildtyp (Allele Y), Heterozygotie (Both), Negativ-Kontrolle (NTC).

2.9 Funktionelle Untersuchungen

2.9.1 In vitro Muskelkontraktilität

Die bereits vorbereiteten Muskelstreifen wurden in einem standardisierten Organbad mit präoxygenierter (95 % O₂/5 % CO₂), temperierter (37±0,5 °C) KRB perfundiert (**Abbildung 4**). Die Organbad-Temperatur wurde hierfür mit einem Thermostat³⁸ geregelt. Dann wurde das eine Ende des Muskels an einer Stahlnadel am Boden fixiert und das andere mit Hilfe der Schlaufe an einem Kraftüberträger³⁹ befestigt. Nach einer Äquilibrationsphase von ca. einer Stunde erfolgte eine schrittweise Dehnung des Muskels, die der Ermittlung der Länge der maximalen spontanen Kontraktionskraft (L₀) diente. Nach optimaler Vorspannung wurde dem Bad der muskarine Agonist Bethanechol⁴⁰ in steigender Dosierung (0,1 - 300 µM) zugesetzt und die Muskelkontraktionen online über die Zeit aufgezeichnet. Hierzu diente ein Analog/Digital-Wandler und ein Computersystem⁴¹. Die Perfusion der Muskelpräparate erfolgte für jeweils 10 Minuten mit Bethanechol-haltiger KRB, gefolgt von einer 10-minütigen Waschphase mit KRB. Die Analyse der ermittelten Dosis-Wirkungskurven erfolgte durch die integrierte Software, und die Muskelkontraktilität wurde in Gramm/mm²/Sekunde berechnet. Hierzu wurden nach Beendigung des Versuchs Länge und Gewicht des Muskelstreifens bestimmt und mit der Formel (Gewicht(mg))/1,03 x Länge (mm)) in mm² umgerechnet (Eskandari et al., 1997).

2.9.2 Gastrointestinaler Transit

Die Messung des gastrointestinalen Transits erfolgte bei Kontrollen als auch bei manipulierten Tieren 24 Stunden postoperativ nach intragastrischer Gabe von fluoreszenz-markiertem Dextran (FITC- Dextran)⁴². Hierzu wurde den Mäusen unter Narkose⁴ 150 µl FITC-Dextran-Lösung (12.5 mg FITC-Dextran/ml NaCl⁴³) intragastrisch

³⁸ Ecoline RE 306, LAUDA, Lauda-Königshofen

³⁹ WPI, Sarasota, USA

⁴⁰ Bethanechol, Sigma, Darmstadt

⁴¹ Acknowledge A/D Programm, Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA

⁴² dextran, fluorescein isothiocyanate, 70.000 MW, anionic, Molecular Probes, Leiden, Niederlande

⁴³ NaCl 0,9%, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen

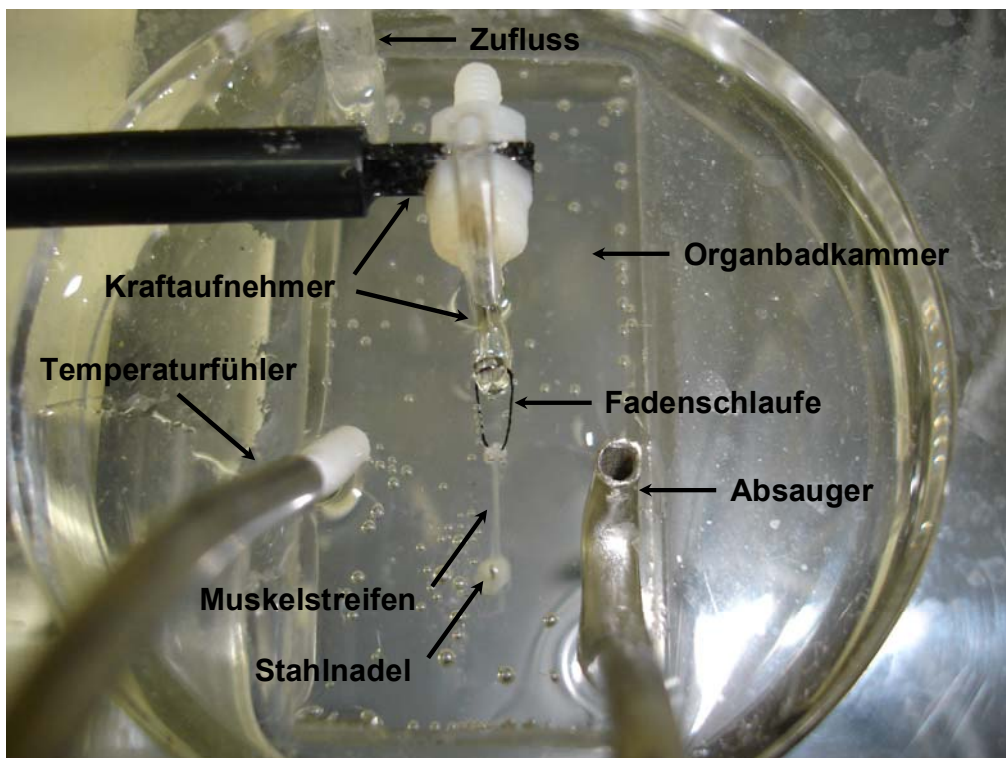
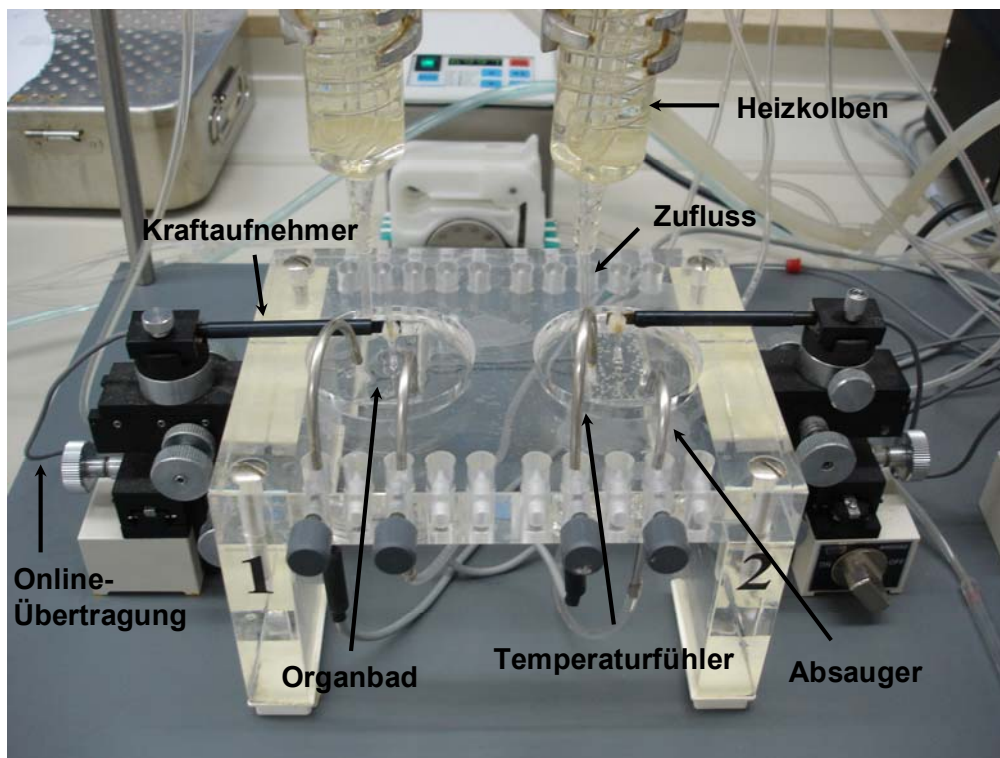


Abb. 4: Aufbau zur *in vitro* Kontraktilitätsmessung. Im Organbad wurde das eine Ende der Muskelstreifen durch eine Fadenschlaufe am Kraftaufnehmer befestigt, das andere Ende wurde mit einer Stahlnadel am Boden fixiert. Durch dauerhaften Zu- und Abfluss von präoxygenierter (95 % O₂/5 % CO₂), temperierter (37±0,5 °C) KRB wurde der Muskel perfundiert und der muskarine Agonist Bethanechol ein- bzw. ausgewaschen. Die Kontraktilität wurde über Direktleitung auf einem Computer online aufgezeichnet.

verabreicht. Den Osteopetrosis-Mäusen (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) wurde gewichtsadaptiert entsprechend 75 µl der FITC-Dextran-Lösung gegeben. Nach 90 Minuten wurden die Tiere erneut anästhesiert⁴, der gesamte Gastrointestinaltrakt wurde entnommen und in 15 Segmente unterteilt (Magen, 10 gleich große Dünndarmsegmente, Zökum und 3 gleich große Kolonsegmente). Jedes Segment wurde komplett aufgeschnitten und in 2 ml Reaktionsgefäße⁴⁴ überführt, die jeweils 600 µl KRB enthielten. Damit der gesamte Segmentinhalt in Lösung ging, wurden die Reaktionsgefäße für ca. 20 Sekunden gevortext. Die Proben wurden anschließend bei 3.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert⁴⁵ und 350 µl des Überstandes in 1,7 ml Reaktionsgefäße⁴⁴ überführt. Diese wurden dann bei 12.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert⁴⁵ und 100 µl des Überstandes der jeweiligen Probe in eine Multi-well Fluoreszenzplatte pipettiert⁴⁶.

Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen angesetzt und analysiert. Die Ermittlung der Fluoreszenz erfolgte durch einen Multidetektion-Reader⁴⁷, wobei die Wellenlänge für die Absorption 494 nm und für die Emission 521 nm betrug.

Zur Auswertung wurde der prozentuale Fluoreszenz-Anteil in jedem Segment bezogen auf die Gesamtfluoreszenz berechnet und dann das Geometric Center (GC) als Maß für den gastrointestinalen Transit mit folgender Formel ausgerechnet:

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

Somit konnte das GC Werte zwischen 1 (Segment 1 = Magen) und 15 (Segment 15 = distales Kolon) annehmen.

2.10 Chemikalien, Lösungen, Substanzen

Die Puffer für gebrauchsfertige Kits wurden, wie vom Hersteller geliefert, benutzt. Ihre Zusammensetzung ist aus den entsprechenden Bedienungsanleitungen ersichtlich und hier nicht weiter aufgeführt. Die Krebs-Ringer-Lösung wurde nach einem standardisierten Verfahren hergestellt und war wie folgt zusammengesetzt (mmol/l):

⁴⁴ Safe-Lock-Reaktionsgefäße, Eppendorf, Hamburg

⁴⁵ Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg

⁴⁶ 96 Well Microplate black, Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen

⁴⁷ Safire, Tecan, Crailsheim

Na^+ 137,4; K^+ 5,9; Ca^{2+} 2,5; Mg^{2+} 1,2; Cl^- 134; HCO_3^- 15,5; HPO_4^- 1,2 und Glucose 11,5. Natriumchlorid und Kaliumchlorid wurden von Merck, Darmstadt bezogen. Calciumchloriddihydrat, Magnesiumchloridhexahydrat, Natriumphosphat (monohydrat), Natriumbicarbonat und Glucose stammten von Sigma, Taufkirchen. Die Chemikalien wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und die Lösung wurde präoxygeniert (95 % O_2 /5 % CO_2), um einen pH von 7,4 zu erreichen.

Die Antikörper-Verdünnungslösung setzte sich aus 0,05 M PBS¹⁰, 0,2% Kälberserum-Albumin⁴⁸, 1000 U/ml Penicillin G und 1000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin¹¹ zusammen.

2.11 Statistik

Berechnet wurden die Mittelwerte und das SEM. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand des ungepaarten Student t-Test und two-way ANOVA mit Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) oder $p < 0,001$ (***), gefolgt von einem Bonferoni post-test.

⁴⁸ Bovine Serum Albumin, Sigma, Steinheim

3 Ergebnisse

Die chirurgischen Eingriffe wurden von den Mäusen problemlos toleriert, die Tiere erholten sich postoperativ rasch und zeigten normale Aktivität und Flüssigkeitsaufnahme. Postoperative Komplikationen im Sinne einer Blutung, Darmperforation oder Peritonitis wurden nicht beobachtet, die Letalität in allen Gruppen betrug 0 %.

3.1 Genotypisierung

Wie beschrieben (Cecchini et al., 1994; Ryan et al., 2001) wiesen die heterozygoten Nachkommen (+/*CSF-1^{op}*) einen normalen Phänotyp auf und ließen sich erst nach Genotypisierung von den Wildtyp-Tieren (+/+) unterscheiden. Die Osteopetrosis-Mäuse (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) konnten schon nach ca. 10 Tagen anhand typischer morphologischer Merkmale (Marks and Lane, 1976) phänotypisch erkannt werden: fehlender Durchbruch der Schneidezähne, kuppelförmiger Schädel, Wachstumsretardierung (**Abbildung 5**). Alle nach phänotypischen Kriterien als osteopetrotisch identifizierten Mäuse konnten auch nach Genotypisierung bestätigt werden.

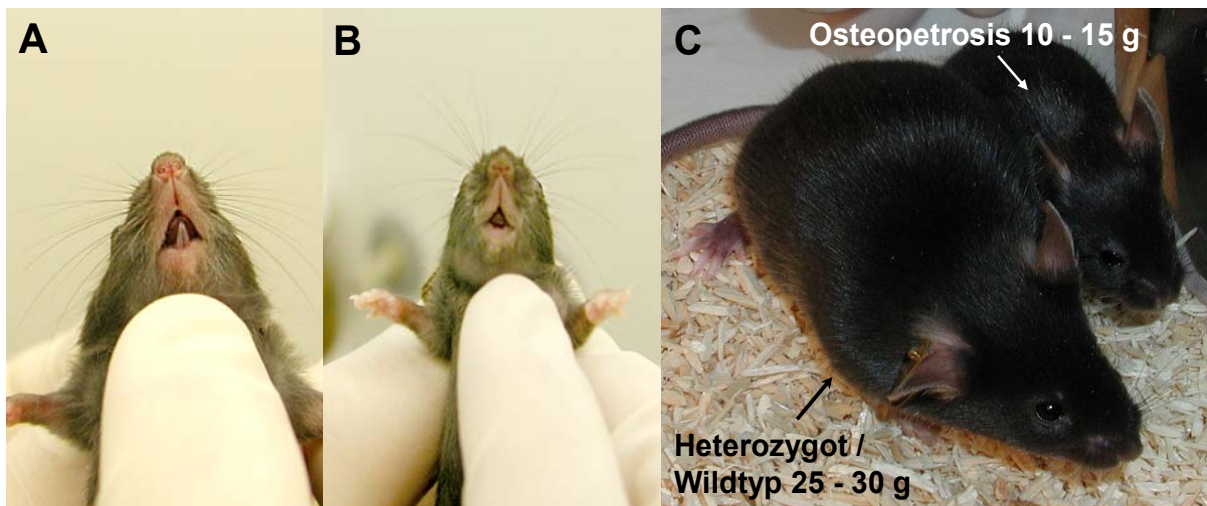


Abb. 5: Im Alter von 2 Wochen ist der fehlende Durchbruch der Schneidezähne und der kuppelförmige Schädel der Osteopetrosis-Mäuse (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) (B) im Vergleich zu den heterozygoten (+/*CSF-1^{op}*) und Wildtyp-Mäusen (+/+) (A) eindeutig sichtbar. Im Alter von 6 Wochen (C) ist die Wachstumsretardierung der Osteopetrosis-Mäuse (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) noch deutlicher.

3.2 Histologie

3.2.1 Kontrolluntersuchungen

In der Muskularis der Kontrolltiere waren kaum MPO^+ -Zellen (PMN) vorhanden: 0.1 ± 0.01 Zellen pro Gesichtsfeld, 200x für heterozygote ($+/CSF-1^{op}$), resp. 0.3 ± 0.01 für Wildtyp- ($+/+$) und 0.0 ± 0 für Osteopetrosis-Mäuse ($CSF-1^{op}/CSF-1^{op}$) (**Abbildung 6**).

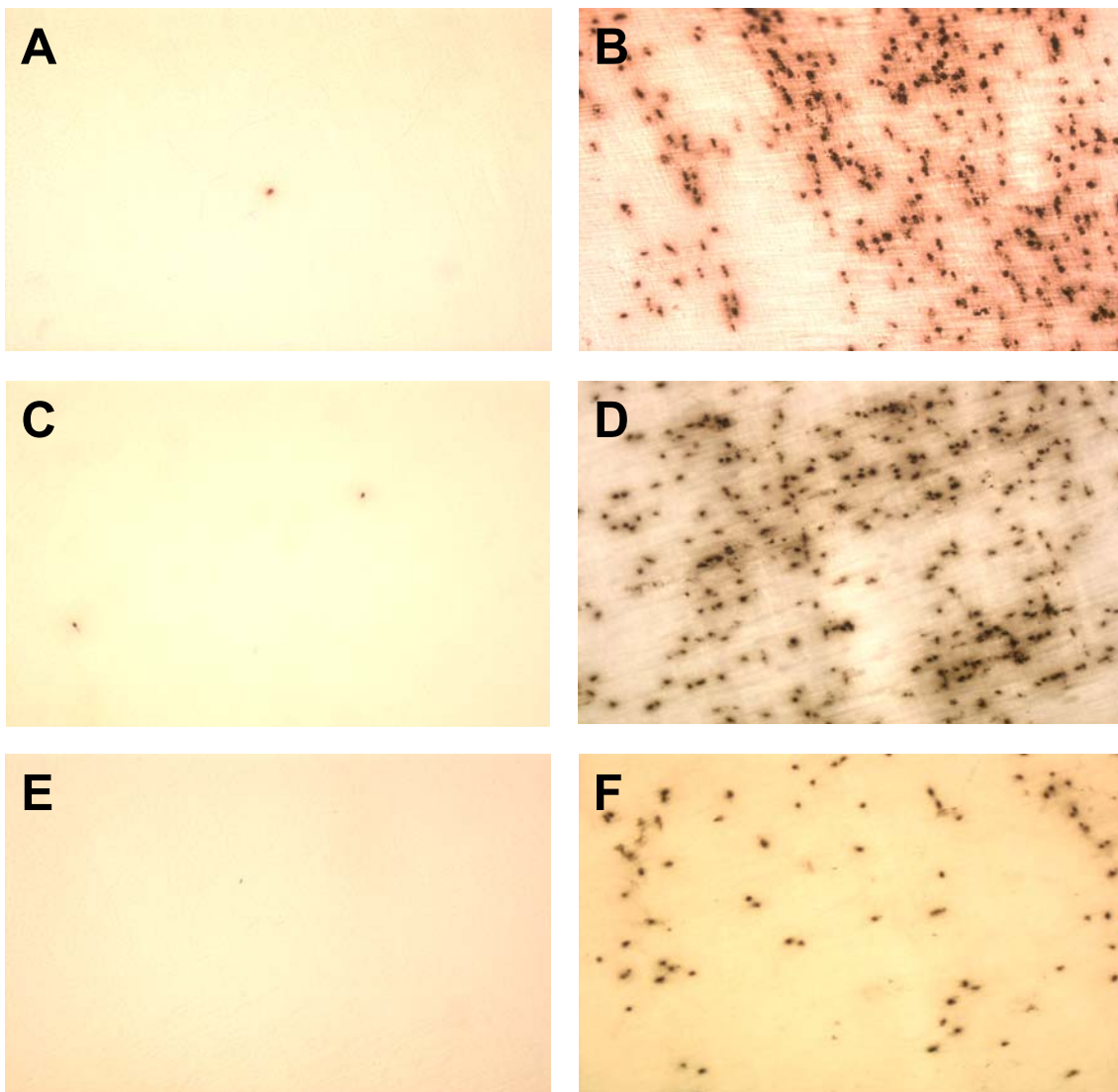


Abb. 6: Myeloperoxidase-Histochemie von Muskularis-Präparaten der Maus. In der Muskularis der Wildtyp- ($+/+$) (A), der heterozygoten ($+/CSF-1^{op}$) (C) und Osteopetrosis-Kontrolltiere ($CSF-1^{op}/CSF-1^{op}$) (E) sind kaum MPO^+ -Zellen vorhanden. 24 Stunden nach Manipulation ist die Muskularis der Wildtyp- ($+/+$) (B) und der heterozygoten ($+/CSF-1^{op}$) (D) Tiere dicht mit PMN besiedelt. Im Gegensatz dazu führt die Manipulation bei der Osteopetrosis-Gruppe ($CSF-1^{op}/CSF-1^{op}$) (F) jedoch lediglich zu einer geringen Infiltration. Vergrößerung A - F 100-fach.

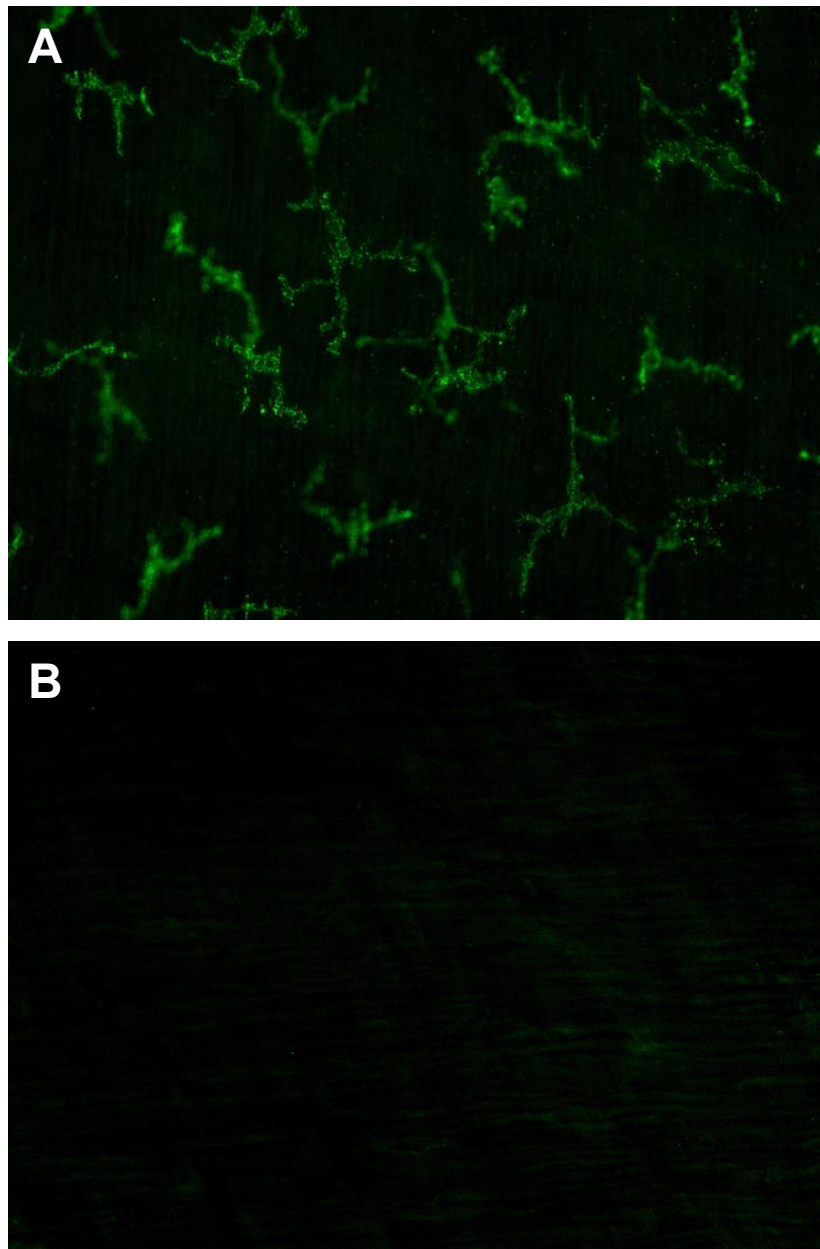


Abb. 7: Immunhistochemische Färbung der Dünndarmmuskularis eines heterozygoten ($+/CSF-1^{op}$) (A) und eines Osteopetrosis-Kontrolltiers ($CSF-1^{op}/CSF-1^{op}$) (B) mit einem spezifischen Antikörper gegen Makrophagen (F4/80). Zu erkennen ist das dichte Netzwerk der residenten Makrophagen mit deutlich sichtbaren Dendriten (A). Bei der Osteopetrosis-Mutante werden keine Makrophagen detektiert. Aufnahme mit einem Fluoreszenzmikroskop, Vergrößerung A + B 200-fach.

Immunhistochemische Färbungen der Dünndarm-Muskularis mit Antikörpern gegen Gewebemakrophagen (F4/80) konnten bei heterozygoten ($+/CSF-1^{op}$) und Wildtyp- ($+/+$) Kontrolltieren das charakteristische dichte Netzwerk der residenten Muskularis-

Makrophagen nachweisen, das bei den homozygoten (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) Mäusen nicht vorhanden war (**Abbildung 7**).

3.2.2 Auswirkungen der chirurgischen Manipulation

Das Bild der zahlenmäßig geringen Präsenz bzw. Abwesenheit von Leukozyten in der Muskularis bei den Kontrolluntersuchungen änderte sich nach erfolgter Darmmanipulation erheblich. Infolge der chirurgischen Manipulation nahm 24 Stunden postoperativ die Anzahl MPO⁺-Zellen in der Muskularis bei allen Tieren massiv zu. Bei der histochemischen Untersuchung färbten sich nach 10 Minuten Inkubationszeit mit Hanker-Yates-Reagenz große ovale Zellen intensiv braun, die als polymorphkernige Neutrophile (PMN) identifiziert wurden (**Abbildung 6**). Diese zeigten aktive Zeichen der Degranulation, die insbesondere in Arealen dichter Infiltration bei höherer Vergrößerung erkennbar waren. Die extrazellulären Granula befanden sich als dunkler perizellulärer Saum in enger Beziehung zu den PMN (**Abbildung 8**).

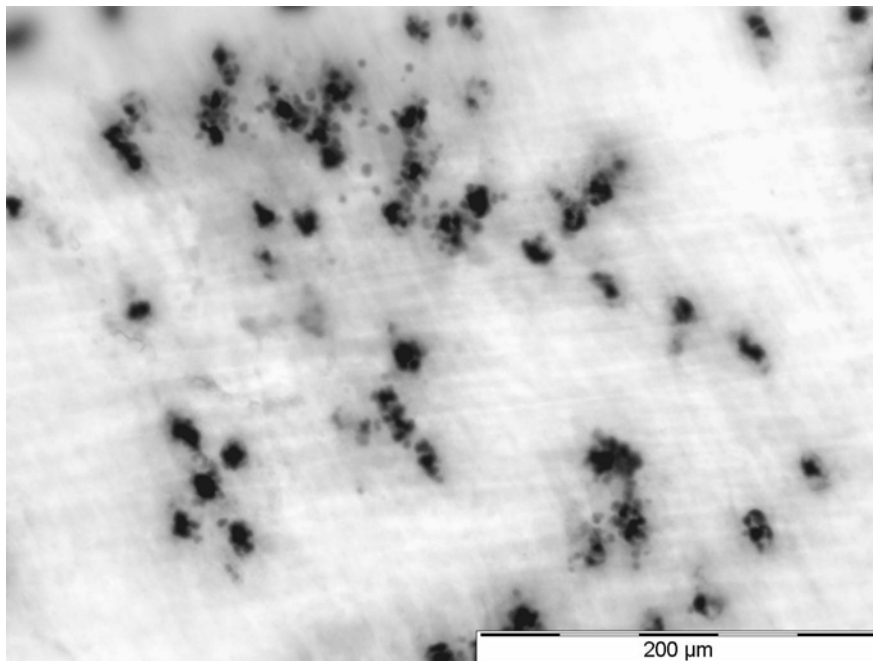


Abb. 8: Myeloperoxidase-Histochemie von Muskularis-Präparat einer heterozygoten Maus 24 Stunden nach Manipulation. Sichtbar sind MPO⁺-Zellen (PMN) mit dunklem Randsaum. Es handelt sich um degranulierte polymorphkernige Neutrophile, deren Myeloperoxidase-Granula bei 200-facher Vergrößerung deutlich erkennbar sind.

Nach Auszählung zeigte sich bei allen manipulierten Tieren ein signifikanter Anstieg der Phagozyten in der Muskularis im Vergleich zu nicht manipulierten Tieren. Bei den Makrophagen-depletierten Osteopetrosis-Mäusen war diese Zunahme signifikant geringer (43-fach vs. 180-fach $+/+$ und 176-fach $+/CSF-1^{op}$) (**Abbildung 9**).

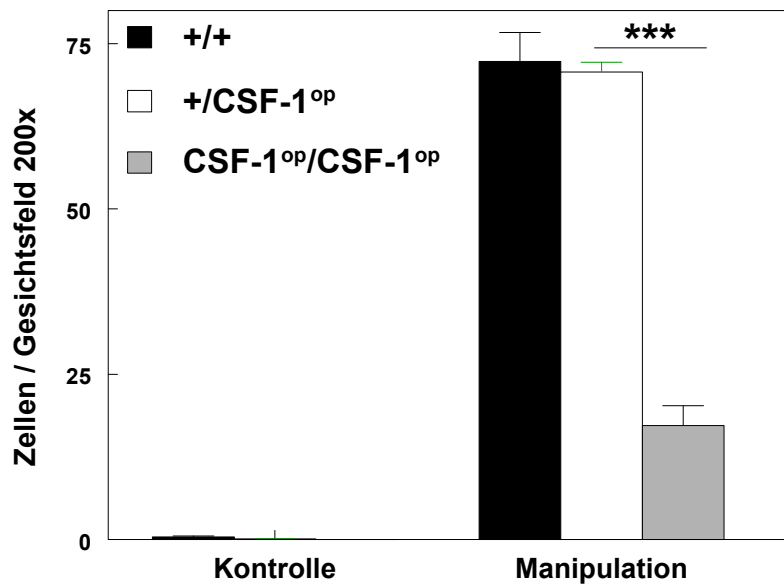


Abb. 9: Neutrophilenzahl in der intestinalen Muskularis der verschiedenen Untersuchungsgruppen. Bei den Kontrolltieren konnten nur ganz vereinzelt neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Nach chirurgischer Darmmanipulation kam es zu einer massiven Zunahme der Neutrophilenzahl. Im Vergleich zu den Wildtyp- ($+/+$) ($72,3 \pm 4,41$ Zellen pro Gesichtsfeld, 200x) und heterozygoten ($+/CSF-1^{op}$) ($70,7 \pm 1,46$) Tieren war diese Zunahme bei den Osteopetrosis-Mäusen ($CSF-1^{op}/CSF-1^{op}$) ($17,2 \pm 3,0$) signifikant geringer. Mittelwert und SEM, $n=5/$ Gruppe, $***p<0,001$.

Die genetische Depletion der residenten Muskularis-Makrophagen führte demnach zu einer signifikant geringeren postoperativen Leukozyten-Rekrutierung in die Darmmuskularis.

3.3 Zytokin-Expression

In unseren Vorarbeiten hatten wir den kausalen Zusammenhang zwischen der Muskularisinfiltration und der Muskelfunktion nach chirurgischer Manipulation erbracht und die Hypothese aufgestellt, dass die residenten Makrophagen einen initiierenden

Einfluss in der Entwicklung der posttraumatischen Entzündungsvorgänge der glatten Darmmuskulatur haben (Kalff et al., 1998a). Letztere sind potente Immunzellen und sezernieren bekanntermaßen inflammatorische Mediatoren und Zytokine und bewirken somit die Induktion von zellulären Adhäsionsmolekülen (De Caterina et al., 1995; Nathan, 1987). Daher haben wir in dieser Versuchsreihe die mRNA Expression von Makrophagen-Aktivierungsmarker (MIP-1 α), inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen (COX-2, IL-6), Chemokinen (MCP-1) und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) in der isolierten Darmwandmuskulatur zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (Kontrollen, 3 und 24 Stunden nach Manipulation).

3.3.1 Makrophagenaktivierung

Bei Kontrolltieren wurden nur geringgradige basale Expressionen des Makrophagen-Aktivierungsmarker MIP-1 α nachgewiesen. Postoperativ kam es bei heterozygoten (+/CSF-1^{op}) Tieren sehr schnell innerhalb von drei Stunden zu einer starken Aufregulation von MIP-1 α (41-fach). Bei Osteopetrosis-Mäusen (CSF-1^{op}/CSF-1^{op}) war die MIP-1 α Expression nicht signifikant aufreguliert (**Abbildung 10**).

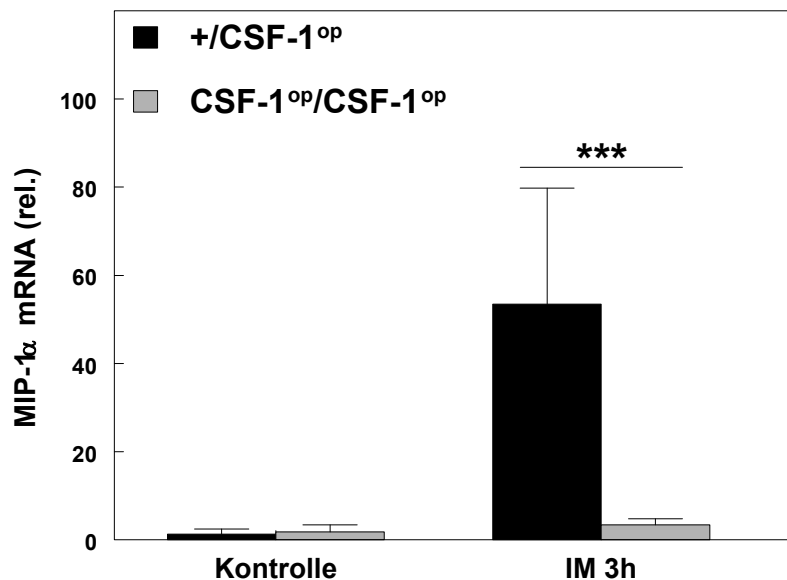


Abb. 10: mRNA-Expression des Zytokins MIP-1 α in der Dünndarmmuskularis nach Manipulation. Im Gegensatz zu heterozygoten Mäusen (+/CSF-1^{op}) zeigten die Osteopetrosis-Mäuse (CSF-1^{op}/CSF-1^{op}) keine Aufregulation von MIP-1 α . 3 Stunden nach chirurgischem Trauma. Analyse mit quantitativer PCR im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittelwert und SEM, n=5/Gruppe, ***p<0,001.

3.3.2 Inflammatorische Mediatoren und Enzyme

Das prototypische proinflammatorische Zytokin Interleukin-6 (IL-6) zeigte bei heterozygoten (+/*CSF-1^{op}*) Tieren eine signifikante Aufregulierung in der Muskularis 3 Stunden nach Manipulation (2365-fach) um nachfolgend nach 24 Stunden auf Kontrollniveau abzufallen. Diese Aufregulierung war deutlich geringer (3 Stunden: 673-fach) bei den homozygoten Mutanten (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) (**Abbildung 11**).

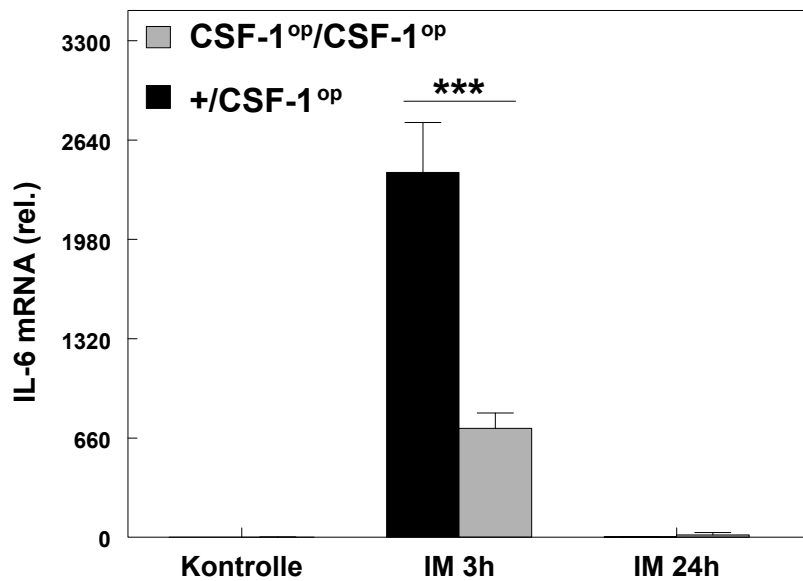


Abb. 11: mRNA-Expression des Zytokins IL-6 in der Dünndarmmuskularis nach Manipulation. Im Vergleich zu heterozygoten Mäusen (+/*CSF-1^{op}*) war bei den Osteopetrosis-Mäusen (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) die IL-6 Aufregulierung nach chirurgischem Trauma deutlich vermindert. Analyse mit quantitativer PCR im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittelwert und SEM, n=5/Gruppe, ***p<0,001.

Die mRNA-Expression des proinflammatorischen Mediators COX-2, die bei Kontrolltieren lediglich Basis-Werte aufwies, zeigte 3 Stunden nach Darmtrauma eine signifikante Zunahme, welche bei den Osteopetrosis-Mäusen (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) wiederum deutlich geringer ausgeprägt war (28-fach) im Vergleich zu den heterozygoten (+/*CSF-1^{op}*) Tieren (64-fach). Innerhalb von 24 Stunden fiel die COX-2 Expression auf Kontrollwerte ab (**Abbildung 12**).

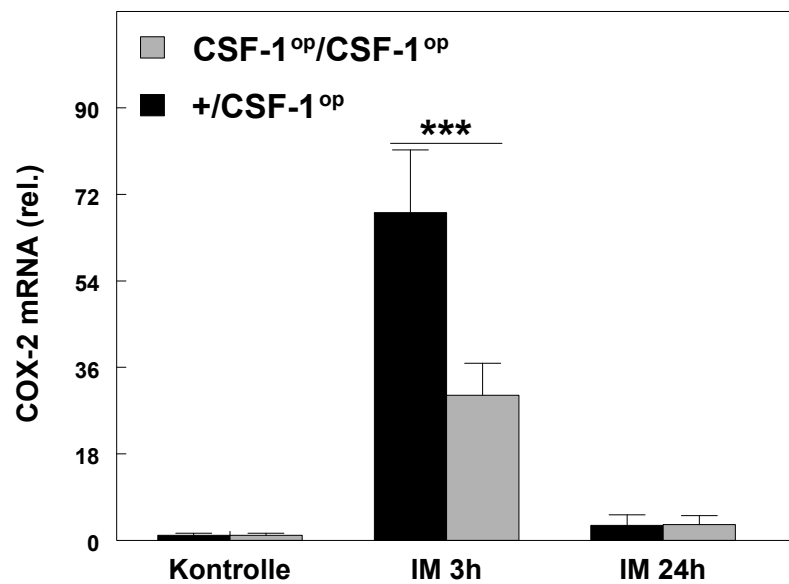


Abb. 12: mRNA-Expression von COX-2 in der Dünndarmmuskularis nach Manipulation. Die COX-2 Aufregulierung nach chirurgischem Trauma war bei Osteopetrosis-Mäusen ($CSF-1^{op}/CSF-1^{op}$) signifikant niedriger als bei heterozygoten Mäusen ($+ /CSF-1^{op}$). Analyse mit quantitativer PCR im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittelwert und SEM, $n=5/Gruppe$, $***p<0,001$.

3.3.3 Chemokine und Adhäsionsmoleküle

Wie bereits nachgewiesen, resultiert die chirurgische Dünndarmmanipulation in einer massiven Rekrutierung inflammatorischer Zellen in die intestinale Muskularis (Kalff et al., 1998a; Kalff et al., 2003). Bei dieser Zellenrekrutierung spielen das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und das Monozyten-chemoattraktive Protein-1 (MCP-1) eine zentrale Rolle (Kalff et al., 1999b; Türler et al., 2002). Die heterozygoten Tiere ($+ /CSF-1^{op}$) zeigten eine signifikante Aufregulierung von ICAM-1 in der Muskularis 3 Stunden nach Manipulation (29,6-fach), die Osteopetrosis-Mäuse ($CSF-1^{op}/CSF-1^{op}$) jedoch nicht (**Abbildung 13**). Die MCP-1 mRNA Expression demonstrierte nach 3 Stunden bei beiden Tiergruppen eine signifikante Zunahme, diese war jedoch deutlich geringer bei den homozygoten Mutanten ($CSF-1^{op}/CSF-1^{op}$) (15,4-fach) im Vergleich zu den Heterozygoten ($+ /CSF-1^{op}$) (288,8). Nach 24 Stunden waren die MCP-1 mRNA Spiegel beider Tiergruppen weiterhin erhöht gegenüber Kontrollwerten (**Abbildung 13**).

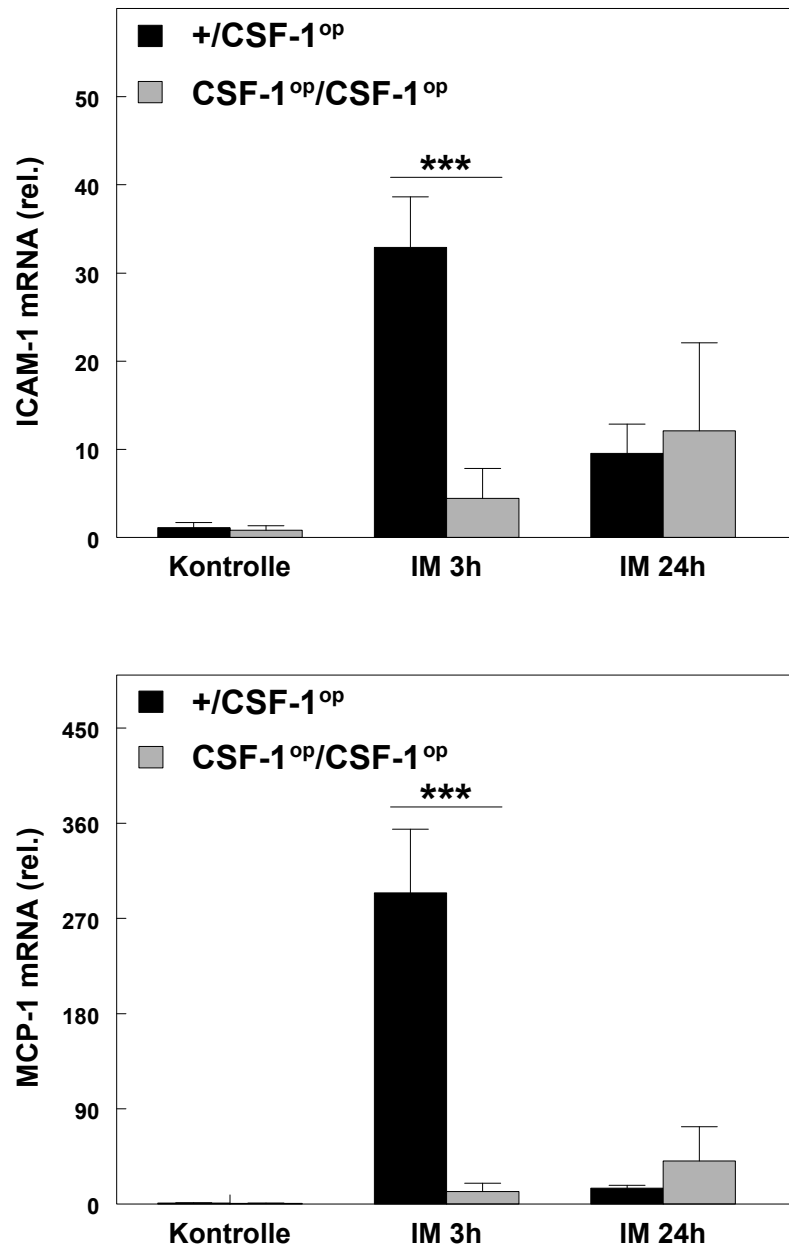


Abb. 13: Expression von ICAM-1 und MCP-1 mRNA in der Dünndarmmuskularis nach Manipulation. Bei den Osteopetrosis-Mäusen (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) kommt es zu einem dramatischen Abfall der ICAM-1 and MCP-1 Expression 3 Stunden nach intestinaler Manipulation. Analyse mit quantitativer PCR im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittelwert und SEM, n=5/Gruppe, ***p<0,001.

In der Zusammenschau der PCR- und Immunhistochemie-Ergebnisse führt das genetisch bedingte Fehlen der Muskularis-Makrophagen bei der Osteopetrosis-Maus zu einer deutlichen Minderung der lokalen Entzündung der Darmmuskulatur auf molekularer Ebene.

3.4 Funktionelle Untersuchungen

Es ist bereits nachgewiesen, dass zwischen der Zunahme des zellulären Infiltrates und der Abnahme der Muskelfunktion eine graduelle und zeitliche Korrelation besteht (Kalff et al., 1998a; Kalff et al., 1998b). Auch in dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der intestinalen Manipulation unter funktionellen Aspekten betrachtet. Bei den *in vitro* und *in vivo* Messungen der Muskelaktivität wurde ein besonderes Augenmerk auf die Folgen der herabgesetzten postoperativen Entzündungsreaktion in der Makrophagen-depletierten Muskularis der Osteopetrosis-Maus (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) gelegt.

3.4.1 In vitro Muskelkontraktilität

Die Muskelstreifen von Kontrolltieren wiesen regelmäßige, monophasische Kontraktionen mit einer Frequenz von $40 \pm 1,7$ Aktionen/Minute auf (n=5-6). Die Stimulierung der Kontrollmuskelstreifen mit dem muskarinen Agonisten Bethanechol resultierte in einem Anstieg der Kontraktionen mit großen, regelmäßigen Amplituden. Bei den deutlich kleineren und leichteren Osteopetrosis-Mäusen waren der Darm und die WM kleiner dimensioniert. Entsprechend kleiner und leichter waren die präparierten Muskelstreifen zur Kontraktilitätsmessung (Osteopetrosis: $4,04 \pm 0,7$ mm, $0,26 \pm 0,09$ g; Wildtyp: $5,67 \pm 0,9$ mm, $0,44 \pm 0,16$ g; Heterozygot: $5,13 \pm 0,9$ mm, $0,36 \pm 0,16$ g) und die Osteopetrosis-Tiere (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) wiesen eine insgesamt schwächere Kontraktion auf als Wildtyp- (+/+) und heterozygote (+/*CSF-1^{op}*) Tiere (Osteopetrosis: $0,59 \pm 0,07$; Wildtyp: $1,17 \pm 0,10$; Heterozygot: $1,07 \pm 0,15$ g/mm²/s bei 100 μ M Bethanechol).

Die Muskelkontraktionen waren in allen operierten Gruppen geringer im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Ein signifikanter Abfall der Kontraktionskraft zeigte sowohl die spontane Muskelaktivität als auch die stimulierten Kontraktionen (Osteopetrosis: $0,51 \pm 0,06$; Wildtyp: $0,69 \pm 0,12$; Heterozygot: $0,68 \pm 0,05$ g/mm²/s bei 100 μ M Bethanechol). Bei den Osteopetrosis-Mäusen (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) war diese Minderung der Muskelfunktion nach Darmmanipulation signifikant geringer (Osteopetrosis 13,6% vs. Wildtyp 41% und Heterozygot 36,4%). **Abbildung 14** demonstriert die Dosis-Wirkungskurven für die einzelnen Gruppen.

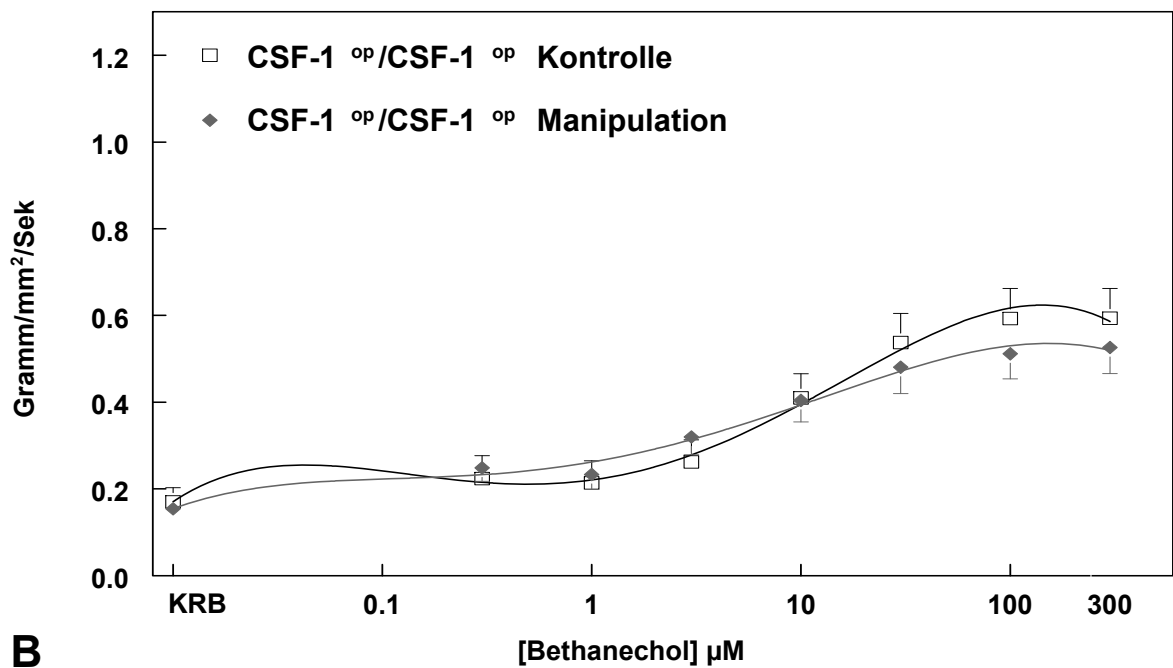
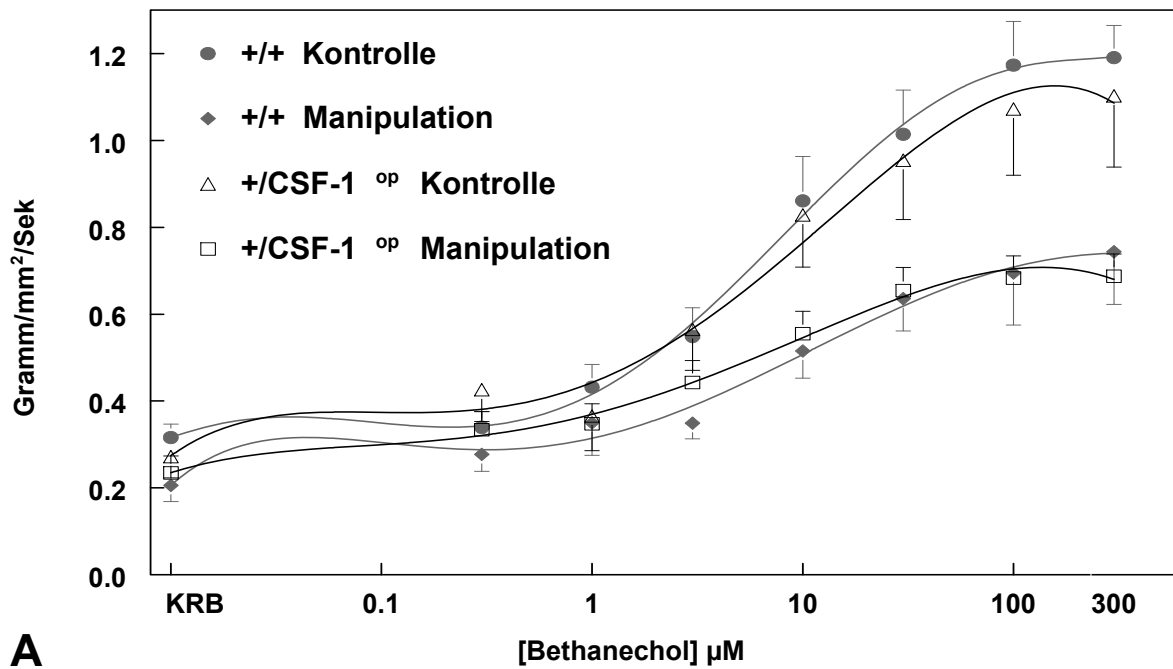


Abb. 14: Dosis-Wirkungs-Kurven der Kontraktionskraft zirkulärer Muskelstreifen des Maus-Jejunums zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach chirurgischer Manipulation. Unter steigenden Konzentrationen des muskarinen Agonisten Bethanechol kam es zu einem Anstieg der Kontraktionskraft bei Wildtyp- (+/+), heterozygoten (+/CSF-1^{op}) und Osteopetrosis-Tieren (CSF-1^{op}/CSF-1^{op}). Die Darmmanipulation führte zu einem Abfall der Muskelkontraktilität (A). Dieser dramatische Abfall konnte bei der makrophagenarmen Mutante (CSF-1^{op}/CSF-1^{op}) verhindert werden und die Kontraktionskraft blieb fast auf Kontrollniveau (B). Kontraktionskraft gemessen in Grammm/mm²/Sekunde unter steigender Konzentration von Bethanechol (0,1 - 300 µM). Mittelwert und SEM, n=5/Gruppe.

3.4.2 Gastrointestinaler Transit

Alle Kontrolltiere zeigten normale Transitzeiten, das fluoreszierende Dextran wurde bis zum distalen Ende des Darmes transportiert. Das GC lag für die Wildtyp- (+/+), heterozygoten (+/*CSF-1^{op}*) und Osteopetrosis-Mäuse (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) entsprechend bei den Segmenten $11,11 \pm 0,19$, $10,90 \pm 0,46$ und $12,04 \pm 0,22$ (**Abbildung 15**).

Die intestinale Manipulation bewirkte einen signifikant verlangsamten Transit bei Wildtyp- (+/+) und heterozygoten (+/*CSF-1^{op}*) Mäusen mit einem Maximum des Fluoreszenzsignals im proximalen Darmbereich (GC $3,23 \pm 0,30$ resp. $4,74 \pm 0,35$). Bei den Osteopetrosis-Tieren (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) zeigte sich dagegen bei normaler Transitzeit (GC $10,09 \pm 0,70$) keine signifikante Auswirkung des chirurgischen Darmtraumas (**Abbildung 15**).

Die Abwesenheit der residenten Muskularis-Makrophagen führte demnach zu einer Normalisierung der postoperativen Motilitätstörung *in vivo*.

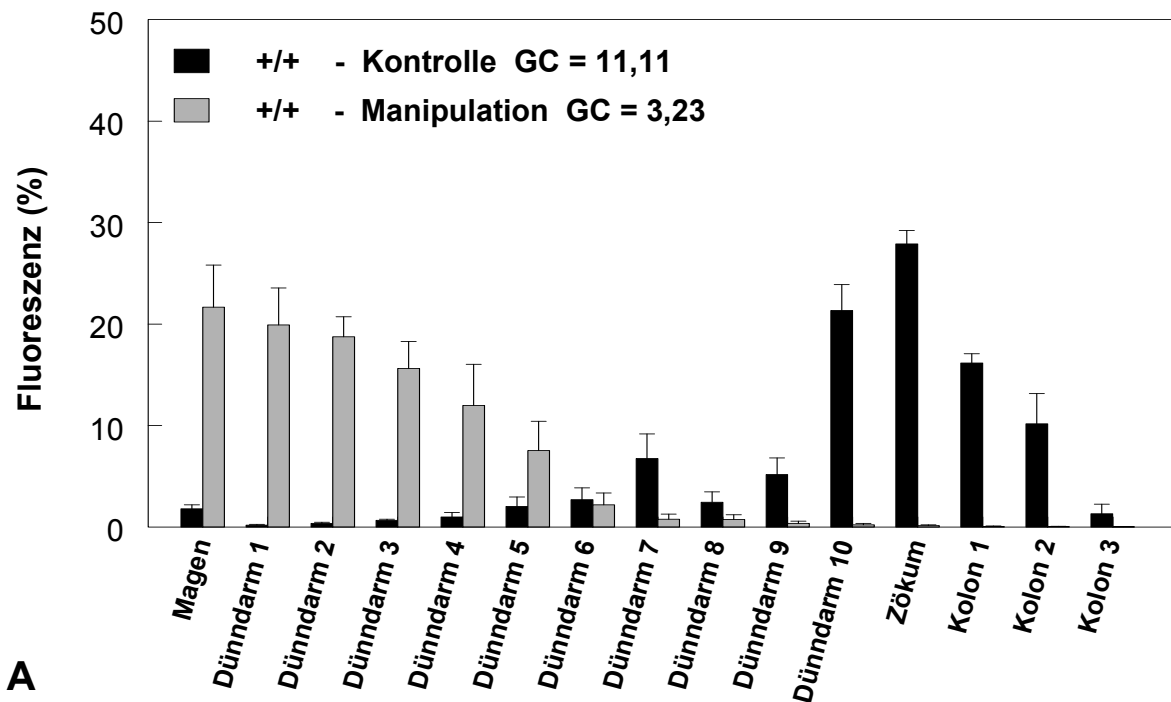


Abb. 15: Bestimmung des GIT durch Messung der prozentualen Verteilung von nicht-resorbierbarem, fluoreszenzmarkiertem Dextran im Magen-Darm-Trakt 1,5 Stunden nach oraler Gabe. Bei Wildtyp- (+/+) (A) und heterozygoten (+/*CSF-1^{op}*) (B) Mäusen wurde der Transit 24 Stunden nach intestinaler Manipulation signifikant verzögert (GC = 3,23 resp. 4,74). Bei den Osteopetrosis- (*CSF-1^{op}/CSF-1^{op}*) Tieren (C) wurde der Transit nach Manipulation nicht signifikant verändert (GC = 10,09) im Vergleich zu Kontrolltieren (GC = 12,04). Mittelwert und SEM, n=5-8/ Gruppe, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

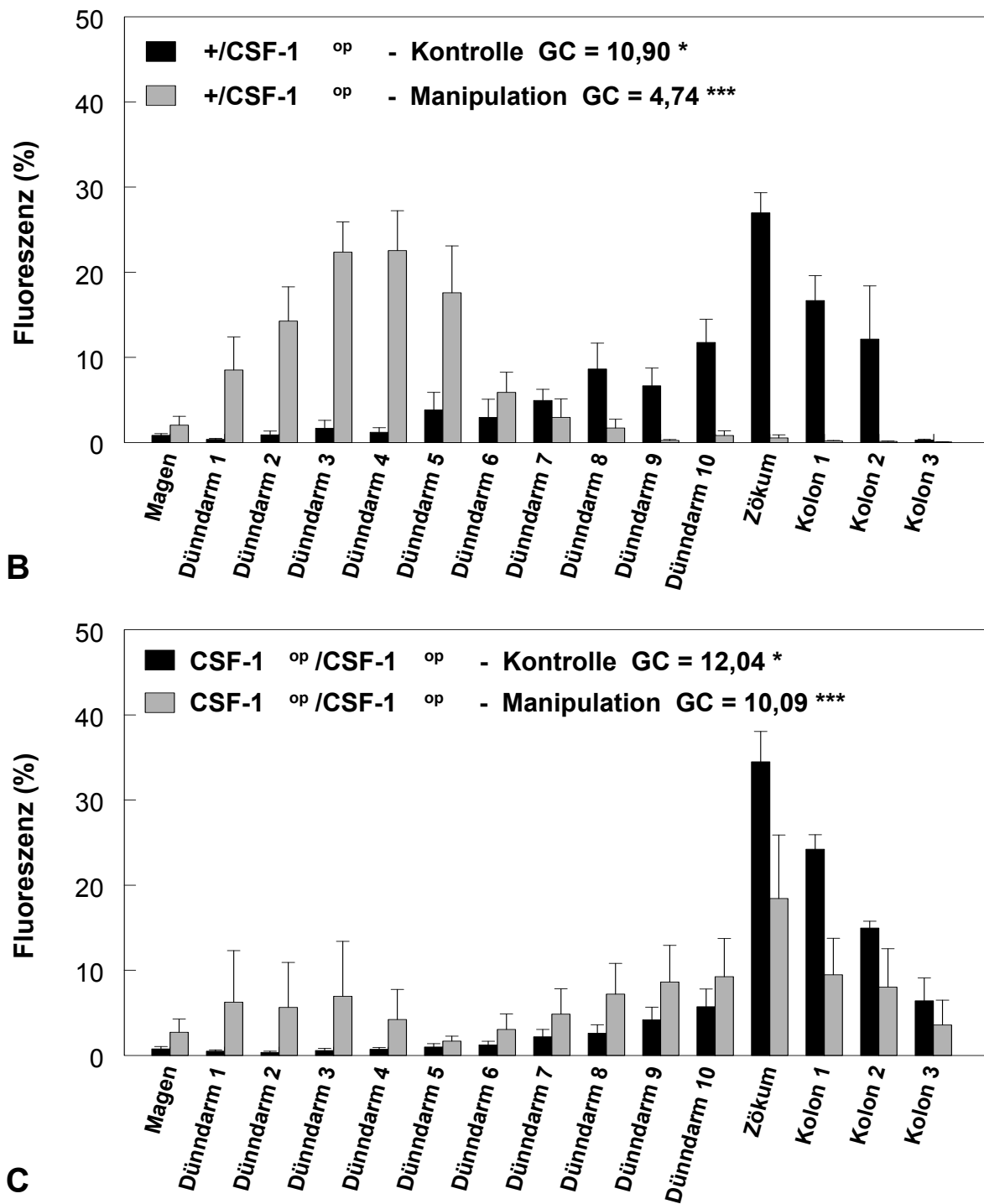


Abb. 15: Bestimmung des GIT durch Messung der prozentualen Verteilung von nicht-resorbierbarem, fluoreszenzmarkiertem Dextran im Magen-Darm-Trakt 1,5 Stunden nach oraler Gabe. Bei Wildtyp- (+/+) (A) und heterozygoten (+/CSF-1^{op}) (B) Mäusen wurde der Transit 24 Stunden nach intestinaler Manipulation signifikant verzögert (GC = 3,23 resp. 4,74). Bei den Osteopetrosis- (CSF-1^{op}/CSF-1^{op}) Tieren (C) wurde der Transit nach Manipulation nicht signifikant verändert (GC = 10,09) im Vergleich zu Kontrolltieren (GC = 12,04). Mittelwert und SEM, n=5-8/ Gruppe, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4 Diskussion

Die chirurgisch-induzierte Darmatonie ist eine sehr häufige und bis heute unvermeidbare Konsequenz abdomineller Eingriffe, die für postoperative Beschwerden verantwortlich ist und zur Verlängerung des Krankenhausaufenthalts führt. Aufgrund der erheblichen klinischen und ökonomischen Relevanz hat sich in den letzten Jahren das Verständnis der Pathophysiologie des postoperativen Ileus deutlich erweitert, jedoch ist über den zugrundeliegenden initialen Mechanismus wenig bekannt.

Viele Hypothesen beschäftigen sich hauptsächlich mit den neuralen Abläufen in den ersten postoperativen Stunden nach Darmmanipulation (Barquist et al., 1997; Boeckxstaens et al., 1993; De Winter et al., 1997; Plorude et al., 1993; Taché et al., 1993) und sind nicht ausreichend, um den klinisch-relevanten Funktionsverlust der glatten Darmmuskulatur, der sich über viele Stunden bis Tage erstreckt, zu erklären.

In unseren vorangegangenen Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass die lange Phase der funktionellen Einschränkung der Darmmotilität durch eine posttraumatische, innerhalb der intestinalen Muskularis lokalisierte Entzündungsreaktion verursacht wird (Kalff et al., 1998a; Kalff et al., 1999a; Kalff et al., 1999b). Weiterhin wurde postoperativ eine frühzeitige Aktivierung der ortsständigen Muskularis-Makrophagen mit der Freisetzung einer Vielzahl potenter proinflammatorischer Mediatoren in die glatte Muskulatur festgestellt (Kalff et al., 2003; Kalff et al., 1998b; Wehner et al., 2005). Auf Grund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass dem residenten Netzwerk von Muskularis-Makrophagen eine herausragende Rolle in Bezug auf die postoperative Darmmotilität zukommt.

In der vorliegenden Studie konnte diese Hypothese mit Hilfe des Osteopetrosis-Mausmodells untersucht und bestätigt werden. Die genetisch bedingte vollständige Depletion der Muskularis-Makrophagen führt zu einer signifikanten Reduktion der inflammatorischen Antwort und damit einhergehend zu einer Abmilderung der postoperativen Motilitätsveränderungen und verhindert auf diese Weise den postoperativen Ileus.

4.1 Aktivierung der residenten Makrophagen nach chirurgischer Darmmanipulation mit nachfolgender massiver Entzündung in der Tunica muscularis und Motilitätsstörung

Bei den heterozygoten und Wildtyp-Tieren verursachte die Darmmanipulation eine massive Entzündungsreaktion innerhalb der Tunica muscularis, die wir durch die Induktion proinflammatorischer Mediatoren (IL-6, COX-2), Chemokine (MCP-1, MIP-1 α), Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) sowie durch die massive Leukozyteninfiltration quantifizierten.

Eine der ersten Reaktionen war die frühzeitige Aufregulation von MIP-1 α innerhalb von 60 – 180 Minuten nach direkter Darmmanipulation als Zeichen der initialen Makrophagenaktivierung (Maurer und von Stebut, 2004). Der beschriebene darauf folgende Abfall der Expression auf Normalniveau unterstützt die Hypothese über einen initialen Trigger der Inflammation durch die ortsständige Makrophagenpopulation (Wehner et al., 2007).

Weiterhin wurde 3 Stunden postoperativ ein Maximum der Induktion von IL-6 in der Tunica muscularis verzeichnet. Die frühzeitige Aufregulation von IL-6 weist auf die residenten Muskularis-Makrophagen und die Glattmuskelzellen als Quelle dieser Zytokininduktion (Wehner et al., 2005). IL-6 reguliert als prototypisches inflammatorisches Zytokin die Rekrutierung von Leukozyten (De Caterina et al., 1995; Hierholzer et al., 1997; Hierholzer et al., 2001; Romano et al., 1997) und bleibt für 12 Stunden aufreguliert um dann allmählich auf Ausgangswerte abzufallen (Wehner et al., 2005). Immunhistochemisch wird das Zytokin 24 Stunden postoperativ hauptsächlich auf residenten Makrophagen lokalisiert und ab 12 Stunden postoperativ zunehmend auf rekrutierten Leukozyten (Wehner et al., 2005). Dies legt nahe, dass die residenten Makrophagen zumindest anteilig für die initiale, starke IL-6 Induktion verantwortlich sind, wohingegen die prolongierte IL-6 Aufregulation hauptsächlich durch die infiltrierenden Phagozyten hervorgerufen wird.

Das freigesetzte IL-6 kann durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie die Aufregulierung von ICAM-1 und MCP-1 induzieren (Caldenhoven et al., 1996; Romano et al., 1997). Die freigesetzten Chemokine und Adhäsionsmoleküle ermöglichen dann die Adhäsion und Transmigration der Leukozyten in die glatte Darmmuskulatur und die Ausbildung des beschriebenen Entzündungsinfiltrats (Carlos

und Harlan, 1994; Cook-Mills und Deem, 2005; Rot und von Andrian, 2004). Konform mit den Ergebnissen im Rattenmodell (Türler et al., 2002; Kalff et al., 1999) konnte auch in dieser Versuchsreihe (bei den genetisch unveränderten Mäusen) ein identischer zeitlicher Verlauf der ICAM-1 und MCP-1 Expression nach Manipulation festgestellt werden.

Zusammenfassend bewirkt die chirurgische Darmmanipulation eine frühzeitige Aktivierung der ansonsten ruhenden Gewebsmakrophagen in der Tunica muscularis mit nachfolgender Kaskade lokaler Entzündungsvorgänge. (Kalff et al., 1998a). Als Konsequenz der verstärkten Entzündung in der Tunica muscularis resultierte ein starker Verlust der Muskelfunktion. Es zeigte sich eine Abnahme der Muskelaktivität sowohl bei der *in vitro* Messung der Kontraktilität, als auch im *in vivo* untersuchten GIT (Kalff et al., 1999a; Kalff et al., 1999b).

4.2 Genetisch bedingtes Fehlen der Muskularis-Makrophagen verhindert den postoperativen Ileus

In Kenntnis des kausalen Zusammenhanges zwischen post-chirurgischer Entzündung in der intestinalen Tunica muscularis und der nachfolgenden Dysfunktion der glatten Darmmuskulatur wurden bereits diverse Experimente mit modulierendem Eingriff in die Entzündungskaskade durchgeführt, um die Darmatonie zu verhindern (Kalff et al., 1999b; Kalff et al., 2000; Kalff et al., 2003; Schwarz et al., 2001; The et al., 2005; Türler et al., 2002; Wehner et al., 2005). Hierbei wurde durch pharmakologische Enzymblockade oder durch Antikörperblockade selektiver Mediatoren die bereits in Gang gesetzte oder manifeste postoperative Entzündung abgeschwächt. Da die postoperative Entzündungsreaktion über eine Vielzahl parallel ablaufender Kaskaden über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen charakterisiert ist, erscheint ein selektiver Eingriff in die bereits gestartete Inflammationskaskade als mögliche therapeutische Intervention nicht Erfolg versprechend.

Mit der Hypothese, dass die residenten Muskularis-Makrophagen eine Schlüsselrolle in der Initiierung der postoperativen Entzündung und Darmatonie besitzen, ergibt sich die potentielle Möglichkeit noch in der initialen Phase der Entzündungskaskade präventiv einzugreifen. Somit erfolgte zur Abklärung einer direkten, initialen Beteiligung der

residenten Muskularis-Makrophagen bei der Entstehung der postoperativen Darmmotilitätsstörungen eine Serie von Versuchen an makrophagendepletierten Tieren. In vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurden in Ratten die Muskularis-Makrophagen durch i.v. Gabe von Clodronat-Liposomen pharmakologisch depletiert und durch Gadoliniumchlorid zusätzlich pharmakologisch inaktiviert (Adding et al., 2001). Somit konnte nach intestinaler Manipulation eine signifikante Verminderung der Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis und damit eine deutlich verbesserte postoperative Darmmotilität erreicht werden (Wehner et al., 2007). In diesem Tiermodell konnte eine Schlüsselrolle gerade der residenten Muskularis-Makrophagen letztendlich nicht eindeutig genug belegt werden, denn es wurde eine ca. 85 %-ige und keine komplette Makrophagen-Depletion in der Tunica muscularis erreicht, wohingegen in anderen Organen praktisch 95-100 % der Makrophagen depletiert wurden (van Rooijen et al., 1989). Die trotz Depletion in der Tunica muscularis verbleibenden Makrophagen (ca. 15 %) könnten theoretisch trotz Inaktivierung durch Gadoliniumchlorid an dem initialen Triggern der postchirurgischen Inflammation teilnehmen und somit konnte deren Rolle in der Entzündungskaskade durch die unvollständige Depletion nicht genau studiert werden.

Durch die selektive, jedoch nicht organspezifische Wirkung der i.v. applizierten Clodronat-Liposomen wurden die Kupfferzellen der Leber und die Milzmakrophagen vollständig eliminiert (van Rooijen et al., 1990) und fast 70 % der Knochenmarksmakrophagen depletiert (Giuliani et al., 2001). Zudem wurden durch das Gadoliniumchlorid nicht nur die residenten Muskularis-Makrophagen inaktiviert, sondern all diejenigen, die sich im direkten Kontakt des Blutstroms befinden, z.B. Kupfferzellen, Milzmakrophagen, intravaskuläre Pulmonalmakrophagen. Es ist bekannt, dass die Reduktion vor allem der Kupfferzellen, die ca. 90 % der Gewebemakrophagen ausmachen, generell zu einer geringeren Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt (Hildebrand et al., 2006; Keller et al., 2005; O'Neill et al., 1994). So hat die systemische Depletion und Inaktivierung der Makrophagen generell eine herabgesetzte chirurgisch induzierte Inflammation zur Folge, wodurch die Rolle der residenten Muskularis-Makrophagen in der postoperativen Darmatonie maskiert wird.

Schließlich war zur Absicherung der erreichten Ergebnisse nach pharmakologischer Makrophagendepletion und –Inaktivierung ein geeigneteres Versuchsmodell notwendig,

das im Idealfall eine alleinige und komplette Depletion der Muskularis-Makrophagen bei ansonsten unverminderter systemischer Makrophagenzahl und ohne weitere strukturelle oder funktionelle Darmveränderungen beinhaltet. Da ein solches Modell bislang aus technischen Gründen nicht möglich war, wurde als nächst geeignete Variante die Osteopetrosis Maus gewählt. Im Vergleich zum pharmakologischen Depletionsmodell weist diese Mutante trotz genereller Makrophagenarmut ein komplettes Fehlen der Makrophagen in der sonst unveränderten Tunica muscularis bei regelhaft vorliegenden Mukosa-Makrophagen auf (Mikkelsen und Thuneberg, 1999).

Im Rahmen der selektiven, nicht-organspezifischen Monozyten- und Makrophagendepletion ist bei der Osteopetrosis Maus die Makrophagenzahl im gesamten Organismus reduziert (Cecchini et al., 1994; Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982). Somit stellt die generelle Makrophagenarmut, die in verschiedenen Organen unterschiedlich ausgeprägt ist (Cecchini et al., 1994), nach wie vor einen gewissen Nachteil dar. Andere Zelltypen sind jedoch nicht betroffen und die Makrophagen sind, vor allem in der Leber, in ausreichender Anzahl vorhanden (Cecchini et al., 1994).

Zu den Nachteilen der systemischen Makrophagen-Armut zählt das weniger effektive Immunsystem, wobei die Osteopetrosis-Mäuse in der Lage sind, eine potente Immunreaktion bei bakteriellen Infektionen zu generieren (Feltis et al., 1994; Schonlau et al., 2003). Feltis und Mitarbeiter konnten beispielsweise in einem Sepsismodell mit antibiotisch induzierter Bakterienüberwucherung im Darmlumen, bakterieller Translokation und Endotoxinämie ähnliche Morbidität und Mortalität bei Osteopetrosis- und Wildtyp-Tieren nachweisen (Feltis et al., 1994). Weiterhin sind Osteopetrosis-Mäuse trotz systemischer Makrophagen-Armut zu einer adäquaten spezifischen Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene wie *Leishmania major* fähig (Schonlau et al., 2003). Die dramatische Reduktion der postoperativen Leukozyteninfiltration in der osteopetrotischen Tunica muscularis scheint nicht mit einer Funktionsstörung der Leukozyten verbunden zu sein, denn eine peritoneale Infektion der Osteopetrosis-Maus mit *Escherichia coli* resultiert auch in einer Herunterregulation der Neutrophilenrekrutierung, wobei die Funktion dieser Zellen normal ist (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1996). Eine normale Neutrophilenfunktion konnte auch in der Leber der Mutante nach LPS Gabe festgestellt werden (Jiang et al., 2000).

Mit diesen Eigenschaften war die Osteopetrosis-Maus für uns das Modell der Wahl, um die Rolle der Muskularis-Makrophagen bei der Entstehung der postoperativen Darmatonie detaillierter zu bestimmen. So wurden in der dargestellten Studie zum ersten Mal Tiere mit komplett (100 %) fehlenden Muskularis-Makrophagen in Bezug auf die postoperative Entzündung und Darmatonie untersucht und damit konnte die direkte Beteiligung dieser Zellen bei der Entstehung der postoperativen Darmmotilitätsstörungen studiert werden. Die massiv ausgeprägte lokale Entzündungsreaktion, die sich nach chirurgischer Manipulation in der glatten Darmmuskulatur entwickelt, wird bei den Osteopetrosis-Tieren durch die vollständige Depletion der residenten Muskularis-Makrophagen auf molekularer und zellulärer Ebene signifikant verringert: sowohl die Expression der proinflammatorischen Zytokine und Mediatoren wie auch die Leukozyten-Rekrutierung in die Muskularis ist signifikant reduziert. Im Gegensatz zu den phänotypisch normalen Tieren, die nach Manipulation eine maximal gestörte Muskelfunktion aufweisen, erbringen die funktionellen Untersuchungen bei der Osteopetrosis-Maus *in vitro* und *in vivo* eine nahezu normalisierte Muskelfunktion.

Der postoperative Entzündungsprozess wird trotz kompletter Depletion der Muskularis-Makrophagen jedoch nicht vollständig verhindert. Obwohl die IL-6 Expression im Vergleich zu phänotypisch normalen Tieren bei 3 Stunden massiv reduziert ist, konnte eine geringe aber dennoch signifikante Aufregulation dieses Zytokins detektiert werden. Signifikant aufreguliert sind auch die restlichen inflammatorischen Zytokine mit resultierend sehr milder, aber dennoch vorhandener leukozytärer Entzündungsreaktion in die osteopetrotische Tunica muscularis. Zur Freisetzung der gemessenen proinflammatorischen Mediatoren sind potentiell die vereinzelt in der Darmserosa befindlichen Makrophagen (Cecchini et al., 1994) und die Peritonealmakrophagen fähig. Da es sich um hochpotente immunologische Zellen handelt, sind sie möglicherweise trotz ihrer geringen Anzahl in der Lage, diese leichte Entzündungsreaktion hervorzurufen. Andere Zellen in der Tunica muscularis, z.B. glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Mastzellen (De L Karlson et al., 2007; Iwaki et al., 2009; Ng et al., 2003; The et al., 2008; Zampetaki et al., 2005) sind möglicherweise ebenfalls an der Entstehung des Entzündungsprozesses beteiligt und tragen zusammen zum Gesamtbild bei.

Insgesamt hatte aber die registrierte leichte postoperative Entzündung anhand der dargestellten Ergebnisse kaum Einfluss auf die Darmmotilität und das klinisch relevante Krankheitsbild des postoperativen Ileus wurde nahezu komplett verhindert.

Letztlich bleiben die initialen Abläufe auf molekularer Ebene noch unklar. Aufgrund der Beobachtung, dass der Schweregrad der Entzündung in der Tunica muscularis von der Intensivität der Darmmanipulation abhängt (Kalff et al., 1998a) ist es jedoch vorstellbar, dass die residenten Muskularis-Makrophagen bei der intestinalen Manipulation über Stretch-aktivierte Ionenkanäle direkt mechanisch aktiviert werden. Wie die residenten Muskularis-Makrophagen genau aktiviert werden bedarf weiterer Untersuchungen. Bei *in vitro* Untersuchungen von Alveolarmakrophagen wurde beispielsweise festgestellt, dass diese Zellen Stretch-aktivierbar sind und in der Lage sind auf mechanischen Reiz Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-8 und TNF- α freizusetzen (Dixon et al., 2008; Dunn und Pugin, 1999; Pugin et al., 1998). Weiterhin konnten im Rahmen von Patch-Clamp Untersuchungen Stretch-aktivierte Kaliumionenkanäle auf humanen Makrophagen nachgewiesen werden (Martin et al., 1995).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Auswirkung der vollständigen Depletion der residenten Muskularis-Makrophagen in Bezug auf die postoperative Darmmotilität in einem geeigneten Nagetiermodell untersucht werden. Dieses ermöglichte die Untersuchung der Rolle der Makrophagen in der Entwicklung postoperativer Motilitätsstörungen. Das genetisch bedingte Fehlen dieser Zellen bei der Osteopetrosis-Maus führte zu einer signifikanten Minderung der Expression proinflammatorischer Mediatoren und nachfolgend zu einer signifikant verringerten Leukozyteninfiltration. Die Herabsetzung der lokalen Entzündungsreaktion war begleitet von einer nahezu normalen postoperativen Muskelkontraktilität und Darmpassage und verhinderte damit das klinische Bild des postoperativen Ileus (**Abbildung 16**). Demzufolge sind die residenten Muskularis-Makrophagen für die postoperative Entzündung in der Darmmuskularis und für die gestörte Motilität zumindest anteilig verantwortlich. Eine präoperative Inhibition dieser Zellen kann daher als ein viel versprechender Therapieansatz zur Prophylaxe postoperativer Darmmotilitätsstörungen betrachtet werden.

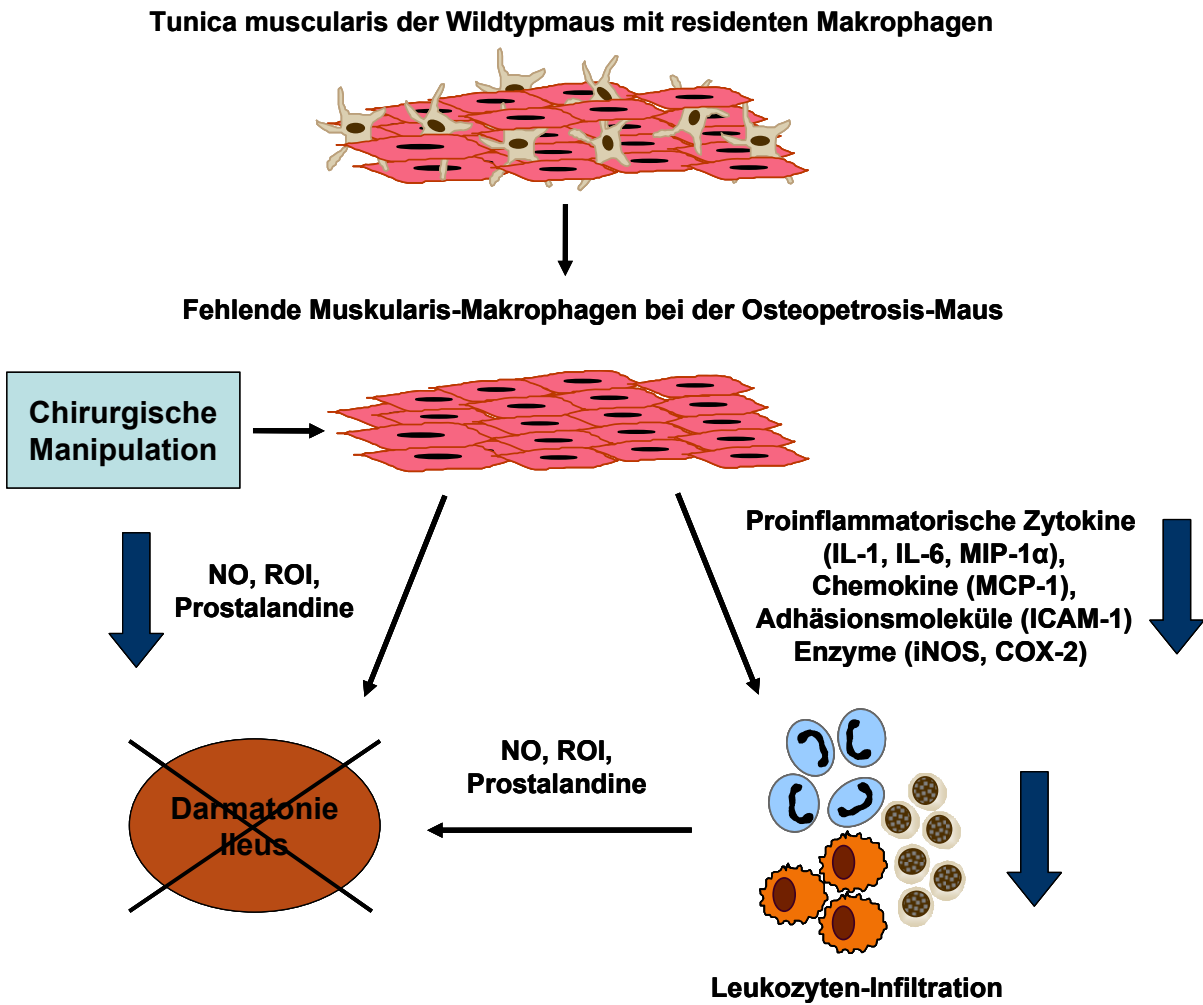


Abb. 16: Das genetisch bedingte Fehlen der Muskularis-Makrophagen im Darm der Osteopetrosis-Maus verhindert die Entstehung des postoperativen Ileus durch eine signifikante Reduktion der lokalen Entzündungsreaktion in der intestinalen Tunica muscularis.

5 Zusammenfassung

Abdominelle Operationen bewirken eine massive Entzündungsreaktion in der Darmwand, die unter anderem zur postoperativen Darmatonie führt. Der postoperative Ileus als fortgeschrittene Form der Darmatonie ist eine alltägliche Komplikation der Abdominalchirurgie und stellt somit klinisch, aber auch ökonomisch ein höchst relevantes Krankheitsbild dar.

Die zugrunde liegenden Pathomechanismen der postoperativen Darmatonie sind trotz ihres alltäglichen Charakters und vieler Erklärungshypothesen weitgehend unbekannt, somit beschränkt sich deren Behandlung auf symptomatisch-empirische Maßnahmen. Um eine kausale Therapie und darüber hinaus eine Prävention entwickeln zu können, müssen die initialen Schritte der Entstehung des postoperativen Ileus genau erforscht werden.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass residente Muskularis-Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Entstehung der postoperativen Entzündungsreaktion in der intestinalen Tunica muscularis spielen. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob das vollständige Fehlen der Muskularis-Makrophagen zu einer Reduktion der postoperativen Muskularis-Entzündung und nachfolgend zu einer normalisierten Muskelfunktion führt.

Verwendet wurden Osteopetrosis-Mäuse mit komplett fehlenden Makrophagen innerhalb der Tunica muscularis des Darmes, bei verminderter Anzahl der Makrophagen in der Mukosa und in anderen Organen.

Osteopetrosis-, Wildtyp- und heterozygote Mäuse wurden einer standardisierten Manipulation des Dünndarms ausgesetzt und 3 und 24 Stunden postoperativ untersucht. Als Kontrollen dienten nicht operierte Tiere. Muskularis-Präparate wurden für histochemische und immunhistochemische Färbungen zur Phagozyten-Quantifizierung resp. Makrophagenlokalisation verwendet. Die Expression von Entzündungsmediatoren wie MIP-1 α , IL-6, COX-2, ICAM-1 und MCP-1 in der Darmwand wurde zu verschiedenen Zeitpunkten postoperativ mittels real-time PCR quantifiziert. Weiterhin wurde die *in vitro* Muskelkontraktilität im Organbad an Jejunumstreifen gemessen. Der gastrointestinale Transit wurde *in vivo* nach intragastrischer Gabe von Fluoreszenz-markiertem Dextran bestimmt.

Histochemisch zeigte sich bei allen drei manipulierten Gruppen ein signifikanter Anstieg der Phagozyten in der Tunica muscularis im Vergleich zu nicht manipulierten Tieren. Bei den Osteopetrosis-Mäusen war diese Zunahme signifikant geringer (43-fach vs. 180-fach Wildtyp und 176-fach Heterozygote). Die Darmmanipulation bewirkte bei Heterozygoten und Wildtypmäusen eine massive Expression der untersuchten Entzündungsmediatoren in der Tunica muscularis mit einem Maximum nach drei Stunden. Bei den Osteopetrosis-Mäusen war die Mediatoraktivierung signifikant vermindert (MIP-1 α : 12,1-fach; IL-6: 3,5-fach; COX-2: 2,3-fach; ICAM-1: 6,7-fach und MCP-1: 18,8-fach). Bei der *in vitro* Kontraktilitätsmessung war bei Osteopetrosis-Mäusen die bekannte postoperative Minderung der glatten Muskelfunktion signifikant geringer ausgeprägt (13,6 % vs. 41 % Wildtyp und 36,4 % Heterozygote). In dem *in vivo* GIT wiesen die Osteopetrosis-Tiere bei normalisierter Transitzeit (GC \pm SEM: 10,09 \pm 0,70 vs. 3,2 \pm 0,30 für Wildtyp und 4,7 \pm 0,35 für Heterozygote) keine signifikante Auswirkung des chirurgischen Darmtraumas auf.

Unsere Daten zeigen eindeutig, dass durch das komplette Fehlen der Muskularis-Makrophagen bei der Osteopetrosis-Maus sowohl die lokale Entzündungsreaktion der Darmwand als auch die resultierende Motilitätsstörung nach chirurgischem Trauma signifikant gemindert sind. Diese Ergebnisse verdeutlichen die herausragende Rolle der residenten Muskularis-Makrophagen bei den initialen Schritten der Pathogenese des postoperativen Ileus.

6 Literaturverzeichnis

Adding LC, Bannenberg GL, Gustafsson LE. Basic experimental studies and clinical aspects of gadolinium salts and chelates. *Cardiovasc Drug Rev* 2001; 19: 41-56

Afonina I, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2657-2660

Allardyce RA, Bagshaw PF, Frampton CM, Frizelle FA, Hewett PJ, Rieger NA, Smith JS, Solomon MJ, Stevenson AR. Australasian Laparoscopic Colon Cancer Study shows that elderly patients may benefit from lower postoperative complication rates following laparoscopic versus open resection. *Br J Surg* 2010; 97: 86-91

Barnett JB, Brundage KM. Evaluating macrophages in immunotoxicity testing. *Methods Mol Biol* 2010; 598: 75-94

Barquist E, Bonaz B, Martinez V, Rivier J, Zinner MJ, Taché Y. Neuronal pathways involved in abdominal surgery-induced gastric ileus in rats. *Am J Physiol* 1996; 270: 888-894

Basse L, Jakobsen DH, Bardram L, Billesbølle P, Lund C, Mogensen T, Rosenberg J, Kehlet H. Functional recovery after open versus laparoscopic colonic resection: a randomized, blinded study. *Ann Surg* 2005; 241: 416-423

Bauer AJ, Boeckxstaens GE. Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 54-60

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

Bauer AJ. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 81-90

Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* 1899; 24: 99-143

Blandizzi C. Enteric alpha-2 adrenoceptors: pathophysiological implications in functional and inflammatory bowel disorders. *Neurochem Int* 2007; 51: 282-288

Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Herman AG, Van Maercke YM. Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. *Gastroenterology* 1993; 104: 690-697

Boeckxstaens GE. Neuroimmune interaction in the gut: from bench to bedside. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2006; 68: 329-355

Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. Neuroimmune mechanisms in postoperative ileus. *Gut* 2009; 58: 1300-1311

Bonaz B. The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2007; 133: 1370-1373

Bream-Rouwenhorst HR, Cantrell MA. Alvimopan for postoperative ileus. *Am J Health Syst Pharm* 2009; 66: 1267-1277

Bueno L, Ferre JP, Ruckebusch Y. Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. *Am J Dig Dis* 1978; 23: 690-695

Bundgaard-Nielsen M, Holte K, Secher NH, Kehlet H. Monitoring of perioperative fluid administration by individualized goal-directed therapy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007; 51: 331-340

Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* 1996; 271: 13221-13227

Caliskan E, Turkoz A, Sener M, Bozdogan N, Gulcan O, Turkoz R. A prospective randomized double-blind study to determine the effect of thoracic epidural neostigmine on postoperative ileus after abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 2008; 106: 959-964

Cannon WB, Murphy FT. Physiologic observations on experimentally induced ileus. *JAMA* 1907; 49: 840-843

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101

Cecchini MG, Dominguez MG, Mocci S, Wetterwald A, Felix R, Fleisch H, Chisholm O, Hofstetter W, Pollard JW, Stanley ER. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* 1994; 120: 1357-1372

Chen JY, Ko TL, Wen YR, Wu SC, Chou YH, Yien HW, Kuo CD. Opioid-sparing effects of ketorolac and its correlation with the recovery of postoperative bowel function in colorectal surgery patients: a prospective randomized double-blinded study. *Clin J Pain* 2009; 25: 485-489

Condon RE, Frantzides CT, Cowles VE, Mahoney JL, Schulte WJ, Sarna SK. Resolution of postoperative ileus in humans. *Ann Surg* 1986; 203: 574-581

Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 487-495

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96: 60-68

de Jonge WJ, The FO, Löwenberg M, Boeckxstaens GE. P38 MAPK inhibitor semapimod reduces postoperative ileus via peripheral and central mechanisms. *Gastroenterology* 2009; 136: 1841-1842

de Jonge WJ, The FO, van der Zanden EP, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Inflammation and gut motility; neural control of intestinal immune cell activation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 10-11

De L Karlson T, Whiting CV, Bland PW. Proinflammatory cytokine synthesis by mucosal fibroblasts from mouse colitis is enhanced by interferon-gamma-mediated up-regulation of CD40 signalling. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 313-323

Delaney CP, Marcello PW, Sonoda T, Wise P, Bauer J, Techner L. Gastrointestinal recovery after laparoscopic colectomy: results of a prospective, observational, multicenter study. *Surg Endosc* 2010; 24: 653-661

De Winter BY. Study of the pathogenesis of paralytic ileus in animal models of experimentally induced postoperative and septic ileus. *Verh K Acad Geneeskd Belg* 2003; 65: 293-324

Dixon DL, Barr HA, Bersten AD, Doyle IR. Intracellular storage of surfactant and proinflammatory cytokines in co-cultured alveolar epithelium and macrophages in response to increasing CO₂ and cyclic cell stretch. *Exp Lung Res* 2008; 34: 37-47

Dunn I, Pugin J. Mechanical ventilation of various human lung cells in vitro: identification of the macrophage as the main producer of inflammatory mediators. *Chest* 1999; 116: 95-97

Eskandari MK, Kalff JC, Billiar TR, Lee KK, Bauer AJ. Lipopolysaccharide activates the muscularis macrophage network and suppresses circular smooth muscle activity. *Am J Physiol* 1997; 273: 727-734

Faussone-Pellegrini MS, Pantalone D, Cortesini C. Smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal and myenteric plexus interrelationships in the human colon. *Acta Anat* 1990; 139: 31-44

Feltis BA, Jechorek RP, Erlandsen SL, Wells CL. Bacterial translocation and lipopolysaccharide-induced mortality in genetically macrophage-deficient op/op mice. *Shock* 1994; 2: 29-33

Förster T. Zwischemolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 1948; 2: 55-75

Giuliani AL, Wiener E, Lee MJ, Brown IN, Berti G, Wickramasinghe SN. Changes in murine bone marrow macrophages and erythroid burst-forming cells following the intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate (Cl₂MDP). *Eur J Haematol* 2001; 66: 221-229

Hamilton TA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 1987; 8: 151-158

Han-Geurts IJ, Hop WC, Kok NF, Lim A, Brouwer KJ, Jeekel J. Randomized clinical trial of the impact of early enteral feeding on postoperative ileus and recovery. *Br J Surg* 2007; 94: 555-561

Hanker JS, Yates PE, Metz CB, Rustioni A. A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *Histochem J* 1977; 9: 789-792

Heidemann J, Rüther C, Kebschull M, Domschke W, Brüwer M, Koch S, Kucharzik T, Maaser C. Expression of IL-12-related molecules in human intestinal microvascular endothelial cells is regulated by TLR3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: 1315-1324

Hierholzer C, Kalff JC, Bauer AJ, Kelly E, Billiar TR, Tweardy DJ. Produktion von G-CSF und IL-6 und Aktivierung von STAT Proteinen in Mukosa und Muskularis des Jejunums im hämorrhagischen Schock. *Langenbeck Arch Chir* 1997; Suppl: 579-583

Hierholzer C, Kalff JC, Chakraborty A, Watkins SC, Billiar TR, Bauer AJ, Tweardy DJ. Impaired gut contractility following hemorrhagic shock is accompanied by IL-6 and G-CSF production and neutrophil infiltration. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 230-241

Hildebrand F, Hubbard WJ, Choudhry MA, Frink M, Pape HC, Kunkel SL, Chaudry IH. Kupffer cells and their mediators: the culprits in producing distant organ damage after trauma-hemorrhage. *Am J Pathol* 2006; 169: 784-794

Holte K, Kehlet H. Postoperative ileus: a preventable event. *Br J Surg* 2000; 87: 1480-1493

Holte K, Foss NB, Andersen J, Valentiner L, Lund C, Bie P, Kehlet H. Liberal or restrictive fluid administration in fast-track colonic surgery: a randomized, double-blind study. *Br J Anaesth* 2007; 99: 500-508

Hori M, Kita M, Torihashi S, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, Ozaki H, Karaki H. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G930-938

Iwaki M, Ito S, Morioka M, Iwata S, Numaguchi Y, Ishii M, Kondo M, Kume H, Naruse K, Sokabe M, Hasegawa Y. Mechanical stretch enhances IL-8 production in pulmonary microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389: 531-536

Iyer S, Saunders WB, Stemkowski S. Economic burden of postoperative ileus associated with colectomy in the United States. *J Manag Care Pharm* 2009; 15: 485-494

Jansen M, Fass J, Tittel A, Mumme T, Anurov M, Titkova S, Polivoda M, Ottinger A, Schumpelick V. Influence of postoperative epidural analgesia with bupivacaine on intestinal motility, transit time, and anastomotic healing. *World J Surg* 2002; 26: 303-306

Jiang S, Naito M, Kaizu C, Kuwata K, Hasegawa G, Mukaida N, Shultz LD. Lipopolysaccharide-induced cytokine and receptor expression and neutrophil infiltration in the liver of osteopetrosis (op/op) mutant mice. *Liver* 2000; 20: 465-474

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* 1999a; 126: 498-509

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* 1999b; 117: 378-387

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

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* 1998a; 228: 652-663

Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol* 1998b; 63: 683-691

Kalff JC, Türler 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

Kehlet H. Postoperative ileus--an update on preventive techniques. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 552-558

Keller SA, Paxian M, Lee SM, Clemens MG, Huynh T. Kupffer cell ablation attenuates cyclooxygenase-2 expression after trauma and sepsis. *J Surg Res.* 2005; 124: 126-133

Koscielny A, Boerner T, Wehner S, Kurts C, Kalff JC. The role of dendritic cells in the gastrointestinal field effect. *Transplant Proc* 2006; 38: 1815-1817

Lakowicz JR. Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and applications to cell membranes. *Subcell Biochem* 1988; 13: 89-126

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357-362

Livingston EH, Passaro EP Jr. Postoperative ileus. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 121-132

Malech HL, Gallin JI. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987; 317: 687-694

Marks SC Jr, Lane PW. Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J Hered* 1976; 67: 11-18

Martin DK, Bootcov MR, Campbell TJ, French PW, Breit SN. Human macrophages contain a stretch-sensitive potassium channel that is activated by adherence and cytokines. *J Membr Biol* 1995; 147: 305-315

Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1882-1886

Mayer EA, Raybould H, Koelbel C. Neuropeptides, inflammation, and motility. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 71-77

Metz CN, Tracey KJ. It takes nerve to dampen inflammation. *Nat Immunol* 2005; 6: 756-757

Mikkelsen HB, Garbarsch C, Trantum-Jensen J, Thuneberg L. Macrophages in the small intestinal muscularis externa of embryos, newborn and adult germ-free mice. *J Mol Histol* 2004; 35: 377-387

Mikkelsen HB, Rumessen JJ. Characterization of macrophage-like cells in the external layers of human small and large intestine. *Cell Tissue Res* 1992; 270: 273-279

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

Mikkelsen HB. Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histol Histopathol* 1995; 10: 719-736

Nakayoshi T, Kawasaki N, Suzuki Y, Urashima M, Hanyu N, Yanaga K. Epidural analgesia and gastrointestinal motility after open abdominal surgery--a review. *J Smooth Muscle Res* 2008; 44: 57-64

Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319-326

Nelson R, Tse B, Edwards S. Systematic review of prophylactic nasogastric decompression after abdominal operations. *Br J Surg* 2005; 92: 673-680

Ng EK, Panesar N, Longo WE, Shapiro MJ, Kaminski DL, Tolman KC, Mazuski JE. Human intestinal epithelial and smooth muscle cells are potent producers of IL-6. *Mediators Inflamm* 2003; 12: 3-8

O'Neill PJ, Ayala A, Wang P, Ba ZF, Morrison MH, Schultze AE, Reich SS, Chaudry IH. Role of Kupffer cells in interleukin-6 release following trauma-hemorrhage and resuscitation. *Shock* 1994; 1: 43-47

Ozaki H, Kawai T, Shuttleworth CW, Won KJ, Suzuki T, Sato K, Horiguchi H, Hori M, Karaki H, Torihashi S, Ward SM, Sanders KM. Isolation and characterization of resident macrophages from the smooth muscle layers of murine small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 39-51

Pal J. Über den Einfluss des Bauchschnittes auf die Darmbewegung. *Zentralblatt Physiologie* 1890; 4: 338

Plourde V, Wong HC, Walsh JH, Raybould HE, Taché Y. CGRP antagonists and capsaicin on celiac ganglia partly prevent postoperative gastric ileus. *Peptides* 1993; 14: 1225-1229

Prasad M, Matthews JB. Deflating postoperative ileus. *Gastroenterology* 1999; 117: 489-492

Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, Chevrolet JC. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol* 1998; 275: 1040-1050

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; 6: 315-325

Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928

Rothnie NG, Harper RA, Catchpole BN. Early postoperative gastrointestinal activity. *Lancet* 1963; 2: 64-67

Ryan GR, Dai XM, Dominguez MG, Tong W, Chuan F, Chisholm O, Russell RG, Pollard JW, Stanley ER. Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood* 2001; 98: 74-84

Salimath J, Jones MW, Hunt DL, Lane MK. Comparison of return of bowel function and length of stay in patients undergoing laparoscopic versus open colectomy. *JLS* 2007; 11: 72-75

Salvemini D, de Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6328-6332

Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1996; 111: 492-515

Schleicher U, Bogdan C. Generation, culture and flow-cytometric characterization of primary mouse macrophages. *Methods Mol Biol* 2009; 531: 203-224

Schönlau F, Schlesiger C, Ehrchen J, Grabbe S, Sorg C, Sunderkötter C. Monocyte and macrophage functions in M-CSF-deficient op/op mice during experimental leishmaniasis. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 564-573

Schwarz NT, Kalff JC, Türler 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

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

Senagore AJ. Pathogenesis and clinical and economic consequences of postoperative ileus. *Am J Health Syst Pharm* 2007; 64: 3-7

Smith J, Kelly KA, Weinshilboum RM. Pathophysiology of postoperative ileus. *Arch Surg* 1977; 112: 203-209

Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; 115: 66-75

Stark ME, Bauer AJ, Szurszewski JH. Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. *J Physiol* 1991; 444: 743-761

Su GL, Walgenbach KJ, Heeckt PH, Wang Q, Halfter W, Whiteside TL, Bauer AJ. Increased expression of interferon-gamma in a rat model of chronic intestinal allograft rejection. *Transplantation* 1996; 62: 242-248

Taché Y, Mönnikes H, Bonaz B, Rivier J. Role of CRF in stress-related alterations of gastric and colonic motor function. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 697: 233-243

Taguchi A, Sharma N, Saleem RM, Sessler DI, Carpenter RL, Seyedsadr M, Kurz A. Selective postoperative inhibition of gastrointestinal opioid receptors. *N Engl J Med* 2001; 345: 935-940

Taxi J. Contribution à l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. *Ann Sci Nat Zool* 1965; 7: 413-674

The FO, Bennink RJ, Ankum WM, Buist MR, Busch OR, Gouma DJ, van der Heide S, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ, Boeckxstaens GE. Intestinal handling induced mast cell activation and inflammation in human post-operative ileus. *Gut* 2008; 57: 33-40

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

The FO, Buist MR, Lei A, Bennink RJ, Hofland J, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ, Boeckxstaens GE. The role of mast cell stabilization in treatment of postoperative ileus: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2257-2266

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

Traut U, Brügger L, Kunz R, Pauli-Magnus C, Haug K, Bucher HC, Koller MT. Systemic prokinetic pharmacologic treatment for postoperative adynamic ileus following abdominal surgery in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 1: CD004930

Türler A, Schwarz NT, Türler E, Kalff JC, Bauer AJ. MCP-1 causes leukocyte recruitment and subsequently endotoxemic ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G145-155

Unalp HR, Kamer E, Kar H, Bal A, Peskersoy M, Ali Onal M. Urgent abdominal re-explorations. *World J Emerg Surg* 2006; 1: 10

Van Der Zanden EP, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 6-17

Van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 1990; 260: 215-222

van Rooijen N. The liposome-mediated macrophage "suicide" technique. *J Immunol Methods* 1989; 124: 1-6

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

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

Wiktor-Jedrzejczak W, Dzwigala B, Szperl M, Maruszynski M, Urbanowska E, Szwech P. Colony-stimulating factor 1-dependent resident macrophages play a regulatory role in fighting *Escherichia coli* fecal peritonitis. *Infect Immun* 1996; 64: 1577-1581

Wiktor-Jedrzejczak WW, Ahmed A, Szczylik C, Skelly RR. Hematological characterization of congenital osteopetrosis in op/op mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *J Exp Med* 1982; 156: 1516-1527

Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; 345: 442-444

Zampetaki A, Zhang Z, Hu Y, Xu Q Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 2946-2954