

**Einfluss der Makrophagendepletion und Peritonitis als zweiten
Schädigungsparameter auf die Heilung von Dickdarmanastomosen
im Mausmodell**

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

Anke Beißel
aus Simmerath

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kurts

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.05.2011

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäß-
chirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	5
2 Einleitung	7
2.1 Der postoperative Ileus (POI)	7
2.2 Heilung intestinaler Anastomosen	9
2.2.1 Ablauf der Wundheilung	10
2.2.2 Die intestinale Anastomosenheilung	11
2.2.3 Bedeutung der Darmwandschichten	12
2.2.4 Die Rolle des Kollagens	13
2.2.5 Die Rolle der Makrophagen bei der Wundheilung	14
2.3 Pharmakologische und genetische Makrophagendepletion	14
2.4 Peritonitis und Endotoxinämie	16
2.5 Zielsetzung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Tiere	18
3.2 Experimentelle Gruppen	18
3.3 Pharmakologische Makrophagendepletion und Immunhistochemie	19
3.4. Induktion der Peritonitis	20
3.5 Operativer Eingriff: Anastomosenanlage und Präparatentnahme	21
3.6 Postoperative Untersuchungen	22
3.7 Molekularbiologische Untersuchungen	23
3.7.1 Probenaufbereitung	23
3.7.2 Quantitative RT-PCR	24
3.8 Biochemische Untersuchungen	25
3.9 Histochemische und polarisationsoptische Untersuchungen	26
3.10 Funktionelle Untersuchungen	27
3.11 Verwendete Chemikalien	30
3.12 Statistik	31

4 Ergebnisse	32
4.1 Postoperative Untersuchungen	32
4.1.1 Generelle Beobachtungen	32
4.1.2 Letalitäten und deren Ursachen	32
4.1.3 Allgemeinzustand	33
4.1.4 Gewichtsverläufe	34
4.1.5 Adhäsions-Score	35
4.2 Immunhistochemie	37
4.3 Molekularbiologische Untersuchungen	39
4.4 Biochemische Untersuchungen	41
4.5 Histochemische Untersuchungen	42
4.6 Polarisationsoptische Untersuchungen	49
4.7 Funktionelle Untersuchungen	53
5 Diskussion	55
6 Zusammenfassung	63
7 Literaturverzeichnis	65

1 Abkürzungsverzeichnis

ABP	Anastomosen-Berstungsdruck
AHS	Anastomosen-Heilungsscore
AI	Anastomoseninsuffizienz
ANOVA	Analysis of variance
b-FGF	Basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
Col	Kollagen
COX-2	Cyclooxygenase-2
CSF-1	Colony stimulation factor-1
CTL	Kontrolltiere
DI-Ratten	Makrophagendepletierte und -inaktivierte Ratten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LPS	Lipopolysaccharid
MD-2	Myeloid differentiation-2
MOV	Multiorganversagen
mRNA	messenger RNA
NO	Stickstoffmonoxid
op ^{-/-}	genetisch makrophagendepletierte Osteopetrosis-Mäuse (homozygot)
op ^{+/-}	genetisch makrophagendepletierte Osteopetrosis-Mäuse (heterozygot)
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
pMD	pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse
PMN	polymorphkernige Leukozyten

POI	Postoperativer Ileus
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase-Chain-Reaction
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic inflammatory response syndrom
s-op ^{-/-}	genetisch makrophagendepletierte Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis (homozygot)
s-pMD	pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse mit Peritonitis
s-WT	Wildtyp-Mäuse mit Peritonitis
TGF	Transforming growth factor
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp-Mäuse

2 Einleitung

2.1 Der postoperative Ileus (POI)

Die postoperative Darmatonie oder synonym der postoperative Ileus (POI) stellt bis heute eine der häufigsten Komplikationen nach chirurgischen Eingriffen dar, die letztlich zu einer erhöhten Morbidität mit systemischer Entzündungsreaktion (SIRS), Sepsis und Multiorganversagen (MOV) und somit auch zu einer erhöhten Mortalität führt (Bauer und Boeckxstaens, 2004; Livingston und Passaro, 1990). Auslöser des POI ist die intraoperative intestinale Manipulation, von geringfügigen Berührungen bis zu traumatisierenden Kompressionen und stundenlanger Eventration des Darms, die im Rahmen abdominalchirurgischer Eingriffe unvermeidbar ist (Kalff et al., 1998b).

In der Klinik präsentiert sich der POI durch verzögerte Magenentleerung, Darmüberblähung, Veränderung bzw. Verlust des propulsiven Kontraktilitätsmusters und das Ausbleiben von Gas- und Stuhlpassage. Das klinische Bild geht mit Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Atemfunktionsstörungen bis hin zur Aspiration einher und führt zu einer beträchtlichen Erhöhung der Liegedauer der Patienten und somit der Krankenhauskosten. Diese wurden auf eine Milliarde US-Dollar pro Jahr in den USA geschätzt (Livingston und Passaro, 1990).

Therapeutische und insbesondere prophylaktische Ansätze zur Verhinderung des POI existieren bisher praktisch nicht, auch wenn die Einführung des Fast-track Prinzips eine positive Beeinflussung der Problematik zur Folge hatte (Basse et al., 2005). Die Begründung hierfür liegt wohl darin, dass es sich ätiologisch um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Bei diesem spielen neben Hormonen, Neuropeptiden, Anästhetika und Analgetika vor allem neurogene (autonomes und enterisches Nervensystem) und inflammatorische Prozesse eine Rolle (Bueno et al., 1978; De Winter et al., 1997; Espat et al., 1995; Kalff et al., 1998b; Reisine und Pasternak, 1996; Schwarz et al., 2001, 2004; Taché et al., 1993; Zittel et al., 1998). Die Beeinträchtigung der Darmmotilität durch nervale Impulse ist hierbei vor allem intraoperativ von Bedeutung. Die Aufrechterhaltung der Darmatonie beruht jedoch auf der im Anschluss an das operative Trauma ablaufenden intestinalen Entzündungsreaktion (Bauer und Boeckxstaens, 2004). Ein Eingriff in diese inflammatorischen Vorgänge, die über eine Vielzahl von parallel ablaufenden Kaskaden über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen erfolgen, stellt daher einen potentiellen

therapeutischen Ansatz dar. Um das Ausmaß der multizellulär vermittelten Entzündungsreaktion zu vermindern, wäre eine Blockade der initialen zellulären Auslösemechanismen besonders geeignet. Als Zellpopulationen, die am Anfang der Entzündungskaskade stehen, werden vor allem Makrophagen und Mastzellen diskutiert (Kalff et al., 1998b; De Jonge et al., 2004).

In unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass die residenten Makrophagen der Tunica muscularis eine entscheidende Rolle bei der Induktion der lokalen intestinalen Entzündungsreaktion spielen. Diese liegen in einem dichten Netzwerk innerhalb der glatten Darmmuskulatur vor (Kalff et al., 1998a). Sie wurden erstmals 1965 von Taxi beschrieben und danach von Mikkelsen (1995) weiter in Struktur und Vorkommen untersucht, wobei ihnen zu diesem Zeitpunkt noch keine besondere Bedeutung zugeschrieben wurde. Erst neuere Untersuchungen deuten auf verschiedene Aufgaben dieser Zellpopulation hin. Die residenten Muskularis-Makrophagen lassen sich schon in neonatalen Tieren nachweisen, wo sie sich auch in Abwesenheit fremder Antigene entwickeln (Mikkelsen et al., 2004). Nach einem mechanischen Trauma der Darmwand beispielsweise durch Dehnung oder Kompression kommt es zu einer sofortigen Aktivierung der ansonsten ruhenden Makrophagen (Kalff et al., 2000; Schwarz et al., 2001). Das geht einher mit einer Erhöhung der Phagozytose-Aktivität, Antigenpräsentation und der Freisetzung von Mediatoren (Hamilton und Adams, 1987; Nathan, 1987). Hierzu gehören vor allem kinetisch-aktive Substanzen wie Arachidonsäure-Metabolite (COX-2), NO, freie Radikale, Hormone und proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6), die die intestinale Muskelaktivität negativ beeinflussen (Nathan, 1987; Schwarz et al., 2001; Stark et al., 1991). Weiterhin kommt es durch die proinflammatorischen Zytokine zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Rekrutierung leukozytärer Zellen (PMNs, Monozyten, Mastzellen, T-Zellen, NK-Zellen und dendritische Zellen), die ihrerseits weitere kinetisch-aktive Substanzen freisetzen und eine Herabsetzung der Muskelaktivität zur Folge haben (Kalff et al., 1998a, 1998b).

Die Muskularis-Makrophagen und die von ihnen freigesetzten Substanzen sind also maßgeblich an den initialen Vorgängen der postoperativen, intestinalen Entzündungsreaktion beteiligt (Kalff et al., 1998b; Wehner et al., 2005). Sie spielen damit eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des POI. Eine perioperative pharmakologische Inhibition dieser Zellen ist daher ein potentieller Ansatz zur Prophylaxe postoperativer Darmmotilitätsstörungen. Zuvor müssen Komplikationen dieser pharmakologischen Depletion, wie die Beeinträchtigung wichtiger lokaler

und immunologischer Schutz- und Reparaturfunktionen, ausgeschlossen werden (Wehner et al., 2007).

2.2 Heilung intestinaler Anastomosen

Neben dem POI ist das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz (AI) eine weitere schwerwiegende Komplikation der Viszeralchirurgie (Stumpf et al., 2004). Trotz stetiger Fortschritte der chirurgischen Technik, der verwendeten Materialien und der adjuvanten Konzepte geht die Entstehung einer AI mit unverändert hoher Morbidität und Mortalität einher, häufig verbunden mit dem Risiko einer erneuten Operation (Golub et al., 1997; Makela et al., 2003). Die Insuffizienzrate ist abhängig von der Lokalisation der Anastomose. Dünndarmanastomosen zeigen Insuffizienzraten von unter 1 %, während die Insuffizienzrate von Kolonanastomosen ohne Rektumbeteiligung bei 1-3 % und die von Rektumanastomosen nach anteriorer Rektumresektion bis zu 10-15 % beträgt (Hallböök und Sjudahl, 1996; Platell et al., 2007).

Verschiedene Faktoren, die das Auftreten einer AI beeinflussen, sind bereits beschrieben worden. Zum einen sind dies operativ-technische Faktoren, das heißt neben der Erfahrung des Operateurs sind eine adäquate Gewebepfusion und eine spannungsfreie Adaptation der Anastomosenenden unabdingbar für eine ideale Anastomosenheilung (Senagore et al., 1990; Sheridan et al., 1987; Vignali et al., 2000). Zum anderen wirken sich allgemeine Risikofaktoren auf die Wundheilung des Gastrointestinaltrakts aus: So scheinen sich Rauchen oder der Konsum von Alkohol sowie bestimmte Medikamente (Cortison, u.a.) nachteilig auf die Anastomosenheilung auszuwirken (Kasperk et al., 2000; Sorensen et al., 1999). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass ein signifikant erniedrigtes Kollagen Typ I- zu III-Verhältnis sowie eine verstärkte Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen das Insuffizienzrisiko nach kolorektalen Resektionen steigern lässt (Stumpf et al., 2005). Alle diese Faktoren haben unzweifelhaft Einfluss auf die Anastomosenheilung. Während zahlreiche experimentelle Studien die Bedeutung der chirurgischen Technik für die Anastomosenheilung in den Vordergrund stellen, zeigen aktuelle Daten bezüglich allgemeiner prognostischer Faktoren ein uneinheitliches Bild. Anstrengungen, über bekannte Einflussgrößen individuelle Risikofaktoren oder Scores mit daraus ableitbaren Therapieempfehlungen zu entwickeln, sind bislang noch ohne Erfolg. Die Schwierigkeiten bei der Risikoeinschätzung für das Auftreten einer AI liegen in der Komplexität der bisher nur unvollständig verstandenen Wundheilungsvorgänge (Stumpf et al., 2004).

2.2.1 Ablauf der Wundheilung

Die genauen Abläufe der Wundheilung im Gastrointestinaltrakt sind zur Zeit noch nicht vollständig geklärt. Besonderes Augenmerk liegt auf der frühen Phase der Wundheilung, da die meisten Insuffizienzen zwischen dem 5. und 7. postoperativen Tag auftreten (Kasperk et al., 2000; Sorensen et al., 1999). Die intestinale Wunde heilt analog zu den allgemeinen Prinzipien der kutanen Wundheilung. Es kommt zu einer komplexen Kaskade zellulärer und biochemischer Reaktionen, die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer Gesamtheit die Wundheilung darstellen (Schumpelick et al., 2000).

Morphologisch betrachtet wird die Wundheilung in eine exsudative, proliferative und reparative Phase, die sich in ihrer Abfolge überschneiden, unterteilt (Hernandez-Richter und Struck, 1971). Die exsudative Phase (0. – 4. Tag) wird durch Traumatisierung des Gewebes oder chirurgische Manipulation eingeleitet. Es kommt zur Migration verschiedener Zellpopulationen (Makrophagen, Thrombozyten, Granulozyten) und zur Ausbildung eines Ödems. Die sich rasch ausbildende lokale Hypoxie führt zu einem Umschalten des Energiestoffwechsels hin zur Glykolyse mit der Freisetzung von Mediatoren und Zytokinen. Hierbei handelt es sich um Histamin und Serotonin aus Mastzellen, Prostaglandine und Leukotriene aus polymorphkernigen Leukozyten, Bradykinin, Kallikrein und Wachstumshormone. Die Glykolyse verursacht außerdem eine pH-Verschiebung im Gewebe in den sauren Bereich, was zu einer Depolymerisierung der Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix führt. Überwiegend aus Fibroblasten stammende Kollagenasen beginnen das freigewordene Kollagen abzubauen, welches danach weiter durch unspezifische Proteasen abgebaut werden kann. Seinerseits bewirkt das Kollagen die Freisetzung des Plättchenfaktors 3, der aus den Thrombozyten stammt und mit dem Hagemann-Faktor die plasmatische Gerinnung aktiviert. Hierbei gebildetes lösliches Fibrin S wird durch den aktivierten Faktor 13a zum unlöslichen Fibrin I. In dieses sich bildende Netzwerk wird Fibronectin eingebaut. Es handelt sich um ein Glykoprotein, dass aus Fibrin, Kollagen und Glykosaminoglykanen Komplexe bildet. Somit ist ein provisorischer Wundverschluss entstanden, der die Wunde zu Beginn zusammen mit der Naht vor mechanischen Einwirkungen und Infektionen schützt (Linder, 1982).

Die Bildung des endgültigen Wundverschlusses unter Rückbildung von Ödem und Entzündungszeichen sowie Abräumung nekrotischen Gewebes beginnt in der proliferativen Phase (3. – 14. Tag). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die durch Nekrosen, Zelltrümmer und Bakterien aktiviert wurden, säubern die Wunde und Fibroblasten bauen ein neues Kollagen-

fasernetzwerk auf. Letztere differenzieren nach Stimulation durch PDGF und TGF auch zu Myofibroblasten aus und sorgen für eine Verkleinerung der Wundfläche durch Kontraktion (Ehrlich, 1988). Gleichzeitig kommt es zum Einsprossen von Kapillaren durch Proliferation von Endothelzellen gesteuert durch b-FGF, VEGF und TNF- α . Zwischen dem entstehenden Kapillarnetzwerk bilden Fibroblasten neues Bindegewebe. Alle diese Komponenten stellen in ihrer Einheit das stark vaskularisierte Granulationsgewebe, eine Übergangsmatrix mit hoher Zelldichte und ohne epitheliale Oberfläche, dar.

In der letzten Phase, der reparativen Wundheilungsphase (10. – 80. Tag), kommt es zu einer Verminderung der Zellzahl im Gewebe und zu einer Zunahme der Kollagenbiosynthese, wobei die Synthese den Abbau quantitativ überwiegt. Es findet eine zunehmende Quervernetzung des Kollagens statt und das bis jetzt im Granulationsgewebe vorherrschende mechanisch instabile Kollagen Typ III wird zum mechanisch festeren Kollagen Typ I, dem vorherrschenden Kollagen des definitiven Narbengewebes, umgewandelt. Als Ergebnis der Wundheilung verbleibt eine Defektheilung mit Narbe.

2.2.2 Die intestinale Anastomosenheilung

Die Anastomosenheilung am Darm entspricht in ihren Phasen im Wesentlichen den allgemeinen Prinzipien der Wundheilung, ist aber in ihrem Ablauf schneller. In den ersten vier postoperativen Tagen nach Anastomosenanlage kommt es, vor allem in den Wundrändern, zur maximalen Reduktion von Kollagen Typ I und III, was mit einem deutlichen Stabilitätsverlust einhergeht (Braskén, 1991). Die Anastomosenfestigkeit beträgt am 3. - 4. postoperativen Tag nur etwa 10 % der Festigkeit des intakten Darms und 15 % der Festigkeit unmittelbar nach Anastomosenanlage (Meyer et al., 2007). In dieser Phase kommt der Unterstützung durch die Naht die größte Bedeutung zu.

Unmittelbar nach dem chirurgischen Trauma kommt es im Anastomosenbereich zur Aktivierung der Kollagen Typ I- und III-Gen-Expression. Die Kollagenolyse erreicht ihr Maximum am 3. Tag, während sich für die Bildung von Kollagen Typ I erst am 7. postoperativen Tag ein Maximum verzeichnen lässt. In der proliferativen Phase überwiegt dann die Kollagenbiosynthese, so dass nach 7 – 10 Tagen auch ohne unterstützendes Nahtmaterial eine ausreichende mechanische Festigkeit der Anastomose gegeben ist (Jiborn et al., 1980).

Vergleicht man weiterhin die Wundheilung von Kolonanastomosen mit solchen am Dünndarm, so stellt man fest, dass diese im Bereich des Dünndarms schneller und risikoärmer heilen als im

Bereich des Kolons (Onodera et al., 2004). Die erhöhte Komplikationsrate ist unter anderem auf die stärkere bakterielle Besiedlung und die schlechtere Gefäßversorgung im Bereich des Dickdarms im Vergleich zu Magen und Dünndarm zurückzuführen (Betzler und Schmidt, 2005). Betrachtet man die ersten fünf postoperativen Tage, so ist der Rekapillarierungsprozess am Dickdarm deutlich schwächer ausgeprägt als am Dünndarm. Die durch Kollagenolyse verursachte Schwächung der Darmwand ist am Kolon stärker ausgeprägt als am Dünndarm (Meyer et al., 2007). Außerdem ist ein Mukosadefekt des Dünndarms innerhalb der ersten Woche nach Anastomosenanlage regelmäßig verschwunden, während dieser am Dickdarm noch regelmäßig vorhanden ist. Im Hinblick auf die Peristaltik verläuft der Transport des Darminhalts im Dünndarm bei polarer Muskelarchitektur von kranial nach kaudal, während es bei apolarer Muskelarchitektur im Dickdarm zu Pendelbewegungen kommt (Meyer et al., 2000). Diese Beobachtungen verdeutlichen den speziellen Charakter der Dickdarmanastomose und ihre sensible Wundheilungssituation im Gastrointestinaltrakt.

2.2.3 Bedeutung der Darmwandschichten

Der Darm als Organ ist durch verschiedene Charakteristika geprägt. Er weist einen vielschichtigen Aufbau, einen Serosaüberzug, eine Blutversorgung mit eigenen Regulationsmöglichkeiten, sowie einen hohen luminalen Mikroorganismenbestand auf. Die im folgenden beschriebenen histologischen und funktionellen Erkenntnisse über den Darm und seinen Wandaufbau stammen aus einer anderen Ära der Forschung, haben aber bis heute ihre Gültigkeit nicht verloren.

Im Hinblick auf die Wundheilung hat die Tunica mucosa die Funktion eine Abdeckung der Granulation durch Migration und Hyperplasie und somit eine Versiegelung des Wunddefekts herbeizuführen. Damit ist die Barrierefunktion zum Lumen wieder hergestellt. Alleine die Tunica mucosa erlangt wieder ihre ursprüngliche Gewebeintegrität.

Die Tela submucosa dient als Nahtlager und sorgt für die mechanische Stabilität der Darmwand (Halsted, 1887). Sie besteht zum großen Teil aus kollagenen und elastischen Fasern, Nervenplexus, Lymphgefäßen und größeren versorgenden Gefäßen. Sie muss bei der Anastomosenanlage als wichtigste Schicht adaptiert werden, da hier das neugebildete Kollagen seinen Ursprung findet (Kostic, 1994).

Es folgt die Tunica muscularis, die von der Tunica serosa begrenzt wird. Diese wird vom Mesothel der Peritonealhöhle überzogen, welches die Wunde durch Proliferation abdichtet und

durch Enzymreichtum und hohe regenerative Potenz zur ungestörten Anastomosenheilung vor allem in späteren Phasen beiträgt (Linder, 1982).

2.2.4 Die Rolle des Kollagens

Kollagen, das etwa 25 % des Gesamtkörperproteins umfasst, ist ein wesentlicher Bestandteil der organischen Grundsubstanz des Bindegewebes, dessen Eigenschaften und Funktion es weitgehend bestimmt und somit für mechanische Stabilität und strukturelle Integrität von Geweben und Organen sorgt (Löffler, 2003). Es gehört neben Elastin, Proteoglykanen und Strukturglykoproteinen zu den Makromolekülen der extrazellulären Matrix.

Man unterscheidet mittlerweile 20 verschiedene Kollagene (Löffler, 2003). Diese werden unterteilt in Fibrillen-bildende Kollagene und nicht-fibrilläre Kollagene. Die Fibrillen-bildenden Kollagene umfassen 90 % des Gesamtkollagens mit den Haupttypen Kollagen Typ I, II und III. Zu den nicht-fibrillären Kollagenen gehören das in der Basalmembran vorkommende, netzartig fächerförmig strukturierte Kollagen Typ IV und das für Wechselwirkungen mit anderen Kollagenen und Matrixproteinen verantwortliche Kollagen Typ VI. Die Fasern des Kollagen Typ I bilden dicke, dicht gepackte Bündel und kommen vor allem in Dermis, Knochen, Sehnen, Faszien und der Sklera vor. Kollagen Typ III bildet Netze aus relativ dünnen Fasern und findet sich in der glatten Muskulatur, Gefäßwänden, Leber, Lunge und lymphatischen Organen wieder. Als wesentliches Strukturmerkmal bestehen die Kollagenmoleküle aus drei Polypeptidketten, die eine sich wiederholende Tripeptidsequenz aus Gly-X-Y aufweisen. Nach Hydroxylierung und Glykosylierung der Polypeptidketten bilden je drei eine Tripelhelix. Für die Stabilisierung der Tripelhelix ist Hydroxyprolin verantwortlich, welches durch Oxidation von Prolin nach dessen Einbau in die Polypeptidkette entsteht. Dieses Hydroxyprolin ist mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Boigk et al. (1997) und Jamall et al. (1981) bestimmbar und dient als Maß für die Kollagenbiosynthese. Die Tripelhelix wird per Exozytose aus den Kollagen bildenden Zellen (z.B. Fibroblasten und Chondroblasten, im Magen-Darmtrakt auch von glatten Muskelzellen) ausgeschleust, wo das Tropokollagen durch Quervernetzung entsteht. Vier Tropokollagenmoleküle lagern sich dann zu einer Protofibrille zusammen, die mit einigen anderen zur Mikrofibrille polymerisiert. Diese bilden Kollagenfibrillen, die sich letztlich zu Kollagenfasern zusammenfügen. Als Kofaktoren bei der Kollagenbildung werden Eisen, Kupfer und Vitamin C benötigt.

2.2.5 Die Rolle der Makrophagen bei der Wundheilung

Eine insuffiziente Anastomose führt häufig zu Peritonitis, Sepsis und Multiorganversagen bis hin zum Tod des Patienten. Zu Beginn dieser Entzündungskaskade stehen zahlreiche Interaktionen zwischen inflammatorischen Zellen. Die Einzelheiten der Steuerung dieser Vorgänge sind letztlich noch ungeklärt, wobei die Rolle der Makrophagen kontrovers diskutiert wird. Eine Beteiligung von aktivierten Makrophagen wird von einigen Autoren als Schlüssel der Wundheilung vermutet (Park und Barbul, 2004; Pull et al., 2004). Weitere Studien zeigen, dass eine Stimulation der Makrophagen sowohl bei der kutanen als auch bei der intestinalen Wundheilung eine erhöhte Kollagenbiosynthese und eine höhere Festigkeit der Wunde nach sich zieht (Compton et al., 1996; Portera et al., 1997). Auch die Gabe von GM-CSF, einem Wachstumsfaktor, der für die Differenzierung der Makrophagen benötigt wird, verbessert die Anastomosenheilung (Cetinkaya et al., 2005; Dinc et al., 2004).

Im Gegensatz dazu zeigen Untersuchungen an „PU.1 Null Mäusen“ (genetisch bedingt makrophagenlose Mäuse) eine in Dauer und Verlauf normale Wundheilung im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen (Martin et al., 2003). Andere Arbeitsgruppen konnten sogar nachweisen, dass die Depletion der Entzündungszellen eine gesteigerte Wundheilung zur Folge hat (Dovi et al., 2003; Martin und Leibovich, 2005). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass die perioperative pharmakologische Makrophagendepletion bei Wildtyp-Mäusen und die genetisch bedingte Abwesenheit der residenten Muskularis-Makrophagen bei Osteopetrosis-Mäusen keine negativen Auswirkungen auf die Heilung von Dünndarmanastomosen hat (Pantelis et al., 2010).

2.3 Pharmakologische und genetische Makrophagendepletion

Die residenten Muskularis-Makrophagen und die von ihnen freigesetzten Mediatoren nehmen eine Schlüsselfunktion bei den initialen Vorgängen der postoperativen Darmmotilitätsstörung ein. Eine perioperative pharmakologische Inhibition dieser Zellen ist daher ein potentieller Ansatz zur Prophylaxe der postoperativen Entzündungsreaktion.

Zur Untersuchung dieser Problematik wurde mit Hilfe eines pharmakologischen und eines genetischen Modells, der Osteopetrosis-Maus, eine signifikante Reduktion und eine komplette Abwesenheit der residenten Muskularis-Makrophagen angestrebt. Die pharmakologische Makrophagendepletion wurde durch die intravenöse Applikation von Clodronat-Liposomen erzielt, welche nach einer modifizierten Methode von van Rooijen und Sanders (1994) hergestellt

wurden. Diese führen zur Induktion der Apoptose bei den residenten Muskularis-Makrophagen und ermöglichen die selektive Makrophagendepletion *in vivo* (Naito et al., 1996; Van Rooijen et al., 1996). Leukozyten und unreifen Knochenmarkszellen werden durch die Behandlung nicht tangiert, da nur reife Makrophagen die Clodronat-Liposomen in effektiver, d.h. toxischer, Menge phagozytieren können (Wehner et al., 2007). Es muss allerdings eine zweizeitige Verabreichung der Clodronat-Liposomen erfolgen, da die Repopulation durch zirkulierende Monozyten verhindert werden muss. Die Clodronsäure gehört zur Gruppe der Bisphosphonate und wird im klinischen Alltag zur Behandlung von Osteolysen, z.B. bei der Osteoporose und dem Morbus Paget, eingesetzt. Zusätzlich wurden die Makrophagen durch die intravenöse Gabe von Gadoliniumchlorid inaktiviert. Es handelt sich hierbei um einen selektiven Inhibitor der mechano-sensitiven Ionenkanäle (Adding et al., 2001). Gadolinium, welches zur Gruppe der Lanthanoide gehört, findet in Form von intravenös injizierten Verbindungen als Kontrastmittel bei Untersuchungen im Kernspintomographen seinen Einsatz.

Versuche an Makrophagen-depletierten und -inaktivierten Ratten (DI-Ratten), die einer intestinalen Manipulation unterzogen wurden, zeigten eine verminderte Entzündungsreaktion, einen normwertigen gastrointestinalen Transit und eine deutliche Verbesserung der Muskelaktivität (Wehner et al., 2007). Da die kombinierte Behandlung mit Clodronat-Liposomen und Gadoliniumchlorid aber nicht nur die intestinalen Muskularis-Makrophagen, sondern auch andere Phagozyten im Organismus depletiert und inaktiviert, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines genetischen Makrophagen-Depletions-Modells in Mäusen überprüft. Es handelt sich hierbei um eine natürlich vorkommende Mutante, die Osteopetrosis-Maus, die eine Mutation im CSF-1 Gen aufweist, wodurch das entstehende Zytokin funktionsunfähig bleibt (Yoshida et al., 1990). Dies geht mit der Depletion von Monozyten und Makrophagen einher. Neben veränderten phänotypischen Merkmalen (z.B. Gewichts-, Zahn- und Reproduktionsdefekte) weisen die Tiere eine verminderte Anzahl funktioneller Makrophagen im gesamten Organismus bei kompletter Abwesenheit der Makrophagen in der Tunica muscularis auf (Mikkelsen und Thuneberg, 1999). Trotz der systemischen Makrophagen-Armut ist eine ausreichende Immunreaktion bei bakteriellen Infektionen möglich (Schonlau et al., 2003). Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten bei den Osteopetrosis-Mäusen eine noch stärkere Reduktion der Entzündungsreaktion nach intestinaler Manipulation im Vergleich zu den DI-Ratten (Wehner et al., 2007). Ein Problem stellt jedoch die mögliche negative Auswirkung der Makrophagen-Depletion auf die Wundheilung im Gastrointestinaltrakt dar, die letztlich nichts anderes als eine inflammatorische

Reaktion ist. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Wundheilung von Dünndarmanastomosen durch die perioperativ passagere, pharmakologische Depletion bzw. das genetisch bedingte Fehlen der residenten Muskularis-Makrophagen in den ersten zwei Wochen postoperativ nicht negativ beeinflusst wird (Pantelis et al., 2010). In unseren jetzigen weiterführenden Studien haben wir als Modell die standardisierte Dickdarmanastomose untersucht, da diese im klinischen Alltag häufiger Heilungsstörungen mit relevanten AI aufgrund des oben beschriebenen sensiblen Wundheilungscharakters nach sich zieht.

2.4 Peritonitis und Endotoxinämie

In den bisherigen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde die Rolle der residenten Muskularis-Makrophagen im Rahmen der Anastomosenheilung vor allem unter ungestörten Heilungsbedingungen bei gesunden Mäusen untersucht (Pantelis et al., 2010). In dieser Studie soll darüber hinaus der Einfluss der pharmakologischen und genetischen Depletion der Makrophagen auf die intestinale Anastomosenheilung bei Vorliegen eines zweiten Schädigungsparameters, der Peritonitis und Endotoxinämie, untersucht werden. Sinn ist es zu überprüfen, ob eine Prophylaxe des POI durch die perioperative Makrophagendepletion auch unter diesen Bedingungen möglich ist oder ob es zu einer Beeinträchtigung wichtiger Schutz- und Reparaturfunktionen kommt. Diese müssen ausgeschlossen werden bevor die perioperative pharmakologische Depletion der Muskularis-Makrophagen zur Prophylaxe des POI in der Klinik eingesetzt werden kann. Trotz vielseitiger intensivmedizinischer und chirurgischer Behandlungsregime stellt die Peritonitis und Sepsis bis heute ein gefürchtetes Krankheitsbild mit einer hohen Morbidität und Mortalität dar. In Deutschland versterben jährlich etwa 18000 Menschen an den Folgen einer Peritonitis (Scheuerlein et al., 2000). Diese umfassen das „Systemic Inflammatory Response Syndrom“ und das sich daraus häufig ergebende, schwer beherrschbare Multiorganversagen.

Die Induktion einer lokalen Peritonitis mit nachfolgender Endotoxinämie wurde in unserem Modell durch eine intraperitoneale Lipopolysaccharid-Gabe (LPS) realisiert. Hierbei handelt es sich um einen als Endotoxin bezeichneten Molekülkomplex, der in der äußeren Membran der Zellwand gramnegativer Bakterien verankert ist, aber nicht von intakten Bakterien abgegeben wird (Kayser et al., 2005). LPS besteht aus dem Lipoid A, welches für die toxische Wirkung verantwortlich ist, der O-spezifischen Polysaccharidkette, die zur Typisierung in Serovarietäten verwendet wird, und dem „Core“-Polysaccharid. Nach der Injektion bildet LPS mit dem LPS-Bindungsprotein einen Komplex, der an CD14-Rezeptoren von Makrophagen bindet. Diese

liegen in einem Komplex mit TLR4 und MD-2, einem weiteren Oberflächenmolekül, vor (Shimazu et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Wright et al., 1990). Durch diesen und weitere Signalwege kommt es letztlich zur Bildung proinflammatorischer Zytokine, vor allem TNF- α , IL-1 und IL-6, der Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskade, der vermehrten Bildung von sekundären Mediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen und damit zur Induktion der Peritonitis und Endotoxinämie (Dinarello, 1997).

2.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die perioperative pharmakologische Depletion und Inaktivierung bzw. das genetisch bedingte Fehlen der residenten Muskularis-Makrophagen negative Auswirkungen auf die Heilung von Dickdarmanastomosen im Peritonitis-Modell hat.

Zusammenfassend sollen die Untersuchungen über folgende Fragestellungen Aufschluss geben:

1. Führt die perioperative Depletion und Inaktivierung der residenten Muskularis-Makrophagen bzw. das genetisch bedingte Fehlen dieser Zellen zu einer Beeinträchtigung der Anastomosenheilung am Dickdarm?
2. Kann eine perioperative Prophylaxe der Darmatonie durch selektive kurzzeitige Makrophagen-Depletion bzw. -Inaktivierung auch bei Vorliegen eines zweiten Schädigungsparameters, also der Peritonitis und Endotoxinämie, ohne entscheidende Beeinträchtigung der Anastomosenheilung durchgeführt werden?
3. Beeinträchtigt das genetisch bedingte Fehlen der Muskularis-Makrophagen die Anastomosenheilung in Anwesenheit des „second-hit“-Parameters Peritonitis?

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Die Tierversuche wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt und der Tierversuchsantrag (AZ: 50.203.2-BN 21, 14/06) von der Bezirksregierung Köln genehmigt.

Als Versuchstiere dienten zum einen männliche B1-6-Mäuse des Stammes C57BL/6JCrIbr im Alter von 6 bis 8 Wochen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20 Gramm, die bei der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) erworben wurden. Die Mäuse wurden im Haus für Experimentelle Therapie (HET) der Universität Bonn in einem vollklimatisierten Raum mit 12-stündigem Hell-/ Dunkel-Zyklus gehalten und mit handelsüblichem Mausfutter (ssniff Spezialdiäten, Soest) sowie Wasser ad libitum versorgt. Zum anderen dienten homozygote Osteopetrosis-Mäuse ($op^{-/-}$) im gleichen Alter mit einem durchschnittlichen Gewicht von 10 Gramm als Versuchstiere, welche aus B6C3Fe a/a F1-Mäusen, die heterozygot für das CSF-1 Gen sind ($op^{+/-}$), gezüchtet wurden. Sie wurden mit selbstgemachtem Futterbrei (Mischung aus mit Leitungswasser eingeweichtem Mausfutter (200 g, s.o.) und Speisestärke (10 g reine Maisstärke, RUF Lebensmittelwerk KG, Quakenbrück)) und Wasser ad libitum versorgt.

3.2 Experimentelle Gruppen

Die Versuchsmäuse, bei denen eine Kolonanastomose angelegt wurde, verteilten sich auf die in Tabelle 1 aufgeführten 6 Gruppen. Funktionelle und histochemische Untersuchungen erfolgten nach Euthanasie der Tiere am 2., 5. und 10. Tag nach dem operativen Eingriff. Die biochemischen Experimente wurden am 5. postoperativen Tag und die molekularbiologischen Experimente nach 12 Stunden, 24 Stunden und 5 Tagen durchgeführt. Pro Gruppe und Zeitpunkt wurden je 5 Tiere für die statistische Auswertung benötigt. Hinzu kamen 10 nicht operierte Wildtyp-Mäuse, 10 nicht operierte pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse und 5 nicht operierte Osteopetrosis-Mäuse, die als Kontrolltiere für die Hydroxyprolin-Messung und die RT-PCR dienten.

Gruppe			Anzahl Operationen
1	WT	Wildtyp-Mäuse	61
2	s-WT	Wildtyp-Mäuse mit Peritonitis	56
3	pMD	pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse	54
4	s-pMD	pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse mit Peritonitis	48
5	op^{-/-}	genetisch makrophagendepletierte Osteopetrosis-Mäuse	36
6	s-op^{-/-}	genetisch makrophagendepletierte Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis	35
Gesamt			290

Tabelle 1: Die Tabelle listet die 6 Versuchsgruppen mit der Anzahl der in der jeweiligen Gruppe operierten Tiere auf.

3.3 Pharmakologische Makrophagendepletion und Immunhistochemie (IHC)

Die pharmakologische Depletion der residenten Muskularis-Makrophagen wurde nach einer Methode von van Rooijen et al. (1996), modifiziert nach Wehner et al. (2007), durchgeführt. Den Mäusen wurde an den Tagen minus 4 und minus 2 vor Anastomosenanlage 0,3 ml Clodronat-Liposomen (50 mg Clodronat/kg KG) und alternierend an den Tagen minus 3 und minus 1 0,15 ml Gadoliniumchlorid (10 mg/kg KG) in die Schwanzvene injiziert.

Die Clodronat-Liposomen wurden nach einem Protokoll von van Rooijen und Sanders (1994) hergestellt. Hierzu wurden 8 mg Cholesterol und 86 mg L- α -Phosphatidylcholin in Chloroform gelöst, mit Hilfe eines Vakuum-Exsikkators (Hydro TechTM Vacuum Pump, Bio-Rad, Hercules, USA) evaporiert und in 10 ml Clodronat-Lösung (2,5 g Clodronat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)/ 10 ml Aqua bidest.) gelöst. Nach einem Ultraschallbad (Typ RK 52 H, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) wurde das nicht-encapsulierte Clodronat durch Zentrifugation von der Suspension getrennt (15 Minuten bei 1000 min⁻¹). Die Clodronat-Liposomen wurden zweimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und in 4 ml desselben resuspendiert. Für die weitere Verwendung wurde die entstandene Suspension mit einem Mini-Extruder (Avanti[®] Polar Lipids, Inc., Alabaster, USA) durch eine Polycarbonat-Membran (Nucleopore Track-Etch Membran, Whatman International Ltd., Maidstone Kent, UK) der Porengröße 400 nm filtriert.

Der Erfolg der pharmakologischen Depletion der Muskularis-Makrophagen wurde mittels Immunhistochemie (IHC) überprüft. Dazu wurden 2 nicht operierte Wildtyp-Mäuse (Kontrollen) und je 2 nicht operierte, pharmakologisch depletierte Mäuse an Tag 0, 1 und 3 diesem Verfahren unterzogen. Die IHC wurde an isolierter Muskularis externa des Dünndarms durchgeführt. Dazu wurden Dünndarmsegmente in Krebs-Ringer-Puffer (KRB) eröffnet und in 100%igem Ethanol für 10 Minuten fixiert. Nach einem Waschschrift mit KRB wurden Mukosa und Submukosa unter mikroskopischer Sicht (Leica MZ 8, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) von der Muskularis externa abpräpariert. Die Muskularis Whole Mounts wurden in 0,5 x 1 cm große Stücke geschnitten und für 2 Stunden in IHC-Lösung (PBS, 1 % BSA und 1 % Penicillin-Streptomycin-Mix) geblockt. Dann wurden die Präparate über Nacht bei 4°C im Primärantikörper (F4/80 rat-anti-mouse, 200 µg/ml, Caltag Laboratories, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) inkubiert, 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen und für 2 Stunden bei 4°C im Sekundärantikörper (Cy3 donkey-anti-rat, 1,5 mg/ml, Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen à 15 Minuten mit PBS wurden die Präparate auf Objektträger verbracht und eingedeckelt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (TE-2000, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) wurden die Makrophagen in 5 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bei 200facher Vergrößerung gezählt und der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3.4 Induktion der Peritonitis

Den Mäusen der Gruppen 2, 4 und 6 wurde einmalig 24 Stunden vor Anastomosenanlage 5 mg/kg KG LPS (0111:B4 Escherichia coli, Sigma L4130) als Bolus intraperitoneal nach Desinfektion der Injektionsstelle verabreicht. Dazu wurden die Mäuse kurzzeitig inhalativ mit Isofluran anästhesiert. Die Tiere der Gruppen 2 und 4 erhielten ein Volumen von 1 ml einer Gebrauchslösung von 10 mg LPS pro 50 ml NaCl. In Angleichung an ein Mindestgewicht von 8 Gramm einer Osteopetrosis-Maus erhielten diese ein Volumen von 0,3 ml der gleichen Gebrauchslösung, welches mit NaCl auf 0,5 ml aufgefüllt wurde. Die Gruppen 1 und 3 erhielten 1 ml NaCl intraperitoneal, während der Gruppe 5 0,5 ml NaCl gespritzt wurde.

3.5 Operativer Eingriff: Anastomosenanlage und Präparatentnahme

Die Mäuse wurden mit Isofluran bei einem O₂-Flow von 2 l/min und einem Isofluran-Anteil von 2-2,5 Vol% (Iso Flo Eickemeyer, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) inhalativ anästhesiert. Die Operationsdauer lag im Durchschnitt bei 30 Minuten. Zur Schmerzprophylaxe wurde den Tieren subkutan Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) verabreicht. Nach Rasur des Abdomens und Hautdesinfektion erfolgte das Eröffnen der Bauchhöhle durch eine mediane Laparotomie. Das Zökum wurde mit zwei Watteträgern aufgesucht und vorsichtig eventriert. Zökum und Kolon ascendens wurden auf mit steriler, 0,9%iger NaCl-Lösung getränkten Kompressen dargestellt und eine geeigneten Stelle für die Anastomose ausgewählt. Diese sollte im Bereich 0,5 – 1,0 cm distal des Zökums im Bereich des Kolon ascendens liegen. Nach entsprechender Ligatur der Gefäße im präsumptiven Anastomosenbereich erfolgte die Transsektion des Kolons unter 16facher Vergrößerung (Mikroskop: Leica M651, Leica Microsystems, Shanghai, China) (Abb. 1, A). Eine Verletzung der blutversorgenden Gefäßarkaden der A. mesenterica superior konnte vermieden werden. Fäzes im Transsektionsbereich wurde vorsichtig mit Watteträgern entfernt. Die so entstandenen Darmenden wurden in einem ersten Schritt durch zwei gegenüberliegende allschichtig gestochene Einzelknopfnähte adaptiert. Es wurde ein resorbierbarer monofiler Faden der Stärke 8-0 (Vicryl, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Durch leichten Zug am dem Mesenterium gegenüberliegenden Faden wurde der Darm gespannt und die zu anastomosierenden Darmanteile ideal positioniert. In Knotenabständen von etwa 2 mm wurde die Anastomose ventral und dorsal mit je 3 Einzelknopfnähten unter Vermeidung einer Eventration der Mukosa vervollständigt. Nach Komplettierung dieser beiden Nahtreihen präsentierte sich eine Anastomose bestehend aus 8 Einzelknopfnähten (Abb. 1, B). Anschließend wurde zur Kontrolle der Dichtigkeit und Festigkeit ein wenig Darminhalt mit zwei Watteträger durch das Lumen in diesem Bereich bewegt. Nachdem die eventrierten Darmanteile vorsichtig in die Bauchhöhle zurück geschoben wurden, wurden Peritoneum und Haut einreihig fortlaufend mit einem Faden der Stärke 4-0 (Seide, Ethicon GmbH) verschlossen. Zur Anhebung der Körpertemperatur und zur schnelleren Erholung wurden die Tiere postoperativ für etwa 15 Minuten unter eine Rotlichtlampe gelegt.

An den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran getötet und relaparotomiert. Nach Durchtrennen des Treitz'schen Bandes sowie der Mesenterialwurzel, wurde das gesamte Darmkonvolut vom Pylorus bis zum Rektum für die weiteren Untersuchungen entnommen. Die Präparation erfolgte in oxygeniertem, gekühltem KRB.

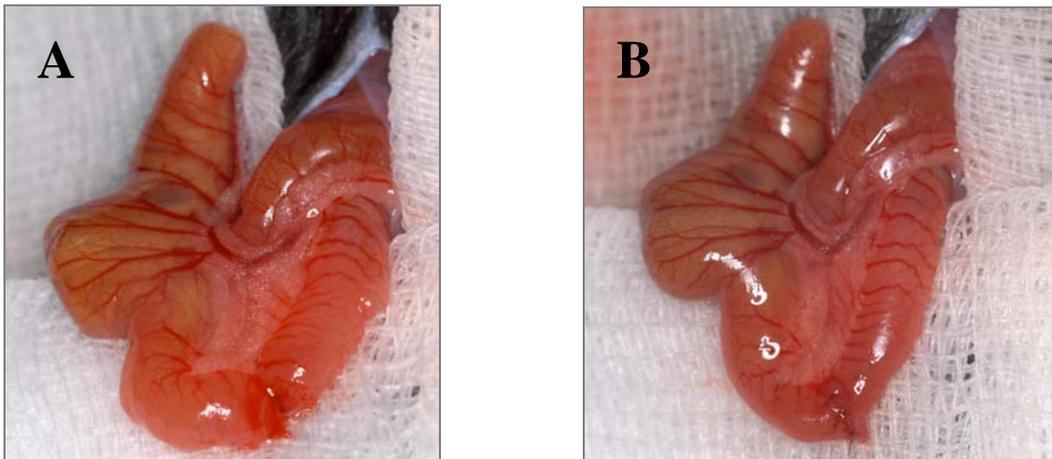


Abbildung 1: Intraoperativer Situs nach Transsektion des Kolon ascendens (A) und nach Anlage der Kolon ascendens Anastomose (B). Die unter standardisierten Bedingungen mit 8 Einzelknopfnähten durchgeführte Anastomosenanlage bildete die Grundlage der nachfolgenden Untersuchungen bezüglich der klinischen und experimentellen Parameter der Anastomosenheilung.

3.6 Postoperative Untersuchungen

Zu den postoperativen Untersuchungen gehörte neben generellen Beobachtungen die Aufzeichnung der Letalität und deren Ursachen wie Stenosen, AI und Ischämien. Als weitere Parameter wurden aus jeder Versuchsgruppe 5 Mäuse an den Tagen -1, 0, 1, 2 und 5 gewogen und bei jeweils 10 Mäusen der Allgemeinzustand mit Hilfe eines Scores folgendermaßen beurteilt: 1: keine Einschränkung, freie Beweglichkeit, normale Nahrungsaufnahme; 2: leichte Einschränkung, etwas reduzierte Mobilität, normale Nahrungsaufnahme; 3: deutliche Einschränkung, deutlich reduzierte Mobilität, Nahrungsaufnahme möglich und 4: schwerste Einschränkung, keine Mobilität, diese Tiere wurden umgehend euthanasiert. An den entsprechenden Versuchszeitpunkten wurde das Darmkonvolut zunächst auf makroskopisch sichtbare Wundheilungsstörungen und Abzessbildungen untersucht. Hierbei wurde ein Adhäsions-Score nach van der Ham (1993) verwendet, der folgende Wertung vornimmt: 0: keine Adhäsionen, 1: minimale Adhäsionen (hauptsächlich zwischen Omentum majus und Anastomose), 2: moderate Adhäsionen (zwischen Omentum majus und Anastomose bzw. zwischen Anastomose und Dünndarmschlinge) und 3: schwere und ausgedehnte Adhäsionen, Abszessbildung miteingeschlossen.

3.7 Molekularbiologische Untersuchungen

Die im Jahr 1985 von Karl Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Darstellung geringer Quantitäten von mRNA. Nach unspezifischer mRNA-Extraktion und cDNA-Synthese erfolgt die Amplifikation in der PCR, wobei man das gesuchte Endprodukt durch den Einsatz von für dieses spezifischen Primern erhält. In diesem Fall kamen Primer für Kollagen Typ I (Col I, Sigma B8178-057/ -058) und III (Col III, Sigma B8178-059/ -060) zum Einsatz, da die Quantifizierung der Kollagen Typ I- und III-Genexpression eine Aussage über den Heilungsprozess der Anastomose zulässt. Als Haushaltsgen wurde β -Actin (Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland) ausgewählt.

<u>Zielgen</u>	<u>Primersequenz</u>	<u>Länge (bp)</u>
Col I	5' (forward): 5'-ACCTGTGTGTTCCCTACTCA-3'	20
	3' (reverse): 5'-GACTGTTGCCTTCGCCTCTG-3'	20
Col III	5' (forward): 5'-AATGGTGGTTTTTCAGTTCAGC-3'	21
	3' (reverse): 5'-TGGGGTTTCAGAGAGTTTGGC-3'	21
β -Actin	5' (forward): 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	20
	3' (reverse): 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'	21

3.7.1 Probenaufbereitung

Zu den Zeitpunkten 12 Stunden, 24 Stunden und 5 Tagen wurde das Darmkonvolut entsprechend vorigen Ausführungen entnommen und in oxygeniertem, gekühltem KRB präpariert. Dazu wurde der Darm entlang des Mesenteriums eröffnet, eventuelle Darminhalte vorsichtig entfernt und die Anastomose 2 mm proximal und distal herausgetrennt, halbiert und in sterilen Kryotubes schockgefroren und bei minus 80°C asserviert.

Die Durchführung der totalen RNA-Extraktion und der DNA-Verdau zur Beseitigung eventueller Verunreinigungen durch genomische DNA wurde nach der NucleoSpin[®] RNA II Methode (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) vorgenommen. Zur RNA-Isolation wurden zwischen 10 und 20 mg Gewebe eingesetzt, welches zur Lyse der zellulären Strukturen einer mechanischen Homogenisierung mittels eines Polytron[®] (Kinematica AG, Littau/ Luzern,

Schweiz) unterzogen wurde. Die erhaltenen RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei minus 80°C aufbewahrt.

Damit gewährleistet werden konnte, dass für die cDNA-Synthese jeweils gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden, mussten die RNA-Proben spektrophotometrisch mit Hilfe des Nano-Drop (Spectrophotometer ND-1000, PEQ LAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) qualifiziert und quantifiziert werden. Es wurden die Absorptionen bei Wellenlängen von 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen und hieraus letztlich die jeweils einzusetzende Menge an RNA errechnet (Werte aufgrund der großen Datenmenge nicht aufgeführt).

Die cDNA-Synthese wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden die Reagenzien in einem „Master Mix“ gepoolt, um einen gleichmäßigen Zusatz zu allen Proben zu gewährleisten. Es wurden definierte Volumina des 10× RT Buffer, des 25× dNTP Mixes (100 mM), der 10× RT Random Primers, der MultiScribe Reverse Transcriptase und des RNase Inhibitors eingesetzt. In einem UNO-Thermoblock (Biotron, Göttingen, Deutschland) wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 25°C, für 120 Minuten bei 37°C und schließlich für 5 Sekunden bei 85°C inkubiert. Nach Verdünnung der gewonnenen cDNA im Verhältnis 1:5 wurde diese bei minus 20°C aufbewahrt.

3.7.2 Quantitative RT-PCR

Die mRNA-Expression von Kollagen Typ I und III wurde mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR unter Verwendung des Absolute SYBR Green ROX Mix von ABgene (Epsom, UK) bestimmt. Für jeden Primer wurde ein Primer-Master-Mix-Gemisch hergestellt, welches aus Master Mix, aus den Primern (forward und reverse je 5 µM) und DEPC-H₂O bestand. Das Gemisch wurde zu der verdünnten cDNA Probe gegeben und als Triplikate auf die Platte pipettiert.

Am Abi Prism 7700 Sequence Detection System von Applied Biosystems folgten auf eine initiale Denaturierung für 10 Minuten bei einer Temperatur von 95°C 40 Zyklen Denaturierung für 15 Sekunden bei 95°C und Annealing- und Elongationsphase für 1 Minute bei 60°C. An jede PCR wurde ein Schmelzkurve angeschlossen, die für jeweils 15 Sekunden nacheinander folgende Temperaturstufen durchläuft: 95°C, 60°C und 95°C.

Die Auswertung der erhaltenen Daten wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode vorgenommen wie sie im User Bulletin #2 für den Abi Prism 7700 von Applied Biosystems beschrieben ist.

3.8 Biochemische Untersuchungen

Bei der Kollagenbiosynthese ist die Aminosäure Hydroxyprolin essentiell für die Bildung der Tripelhelix. Durch die Messung der Hydroxyprolin-Konzentration lassen sich Rückschlüsse auf die Kollagenbiosynthese in der Anastomosenregion und somit auf die Wundheilung ziehen (Ishimura et al., 1998).

Diese Methode wurde nur für die Wildtyp-Gruppen, die pharmakologisch depletierten Gruppen und deren entsprechende Kontrolltiere durchgeführt.

Am 5. postoperativen Tag wurde das Darmkonvolut entnommen und das anastomosentragende Kolonsegment auf einer Länge von etwa 3 cm herausgetrennt. Bei den Kontrolltieren wurde entsprechend das Kolon ascendens im Bereich der präsumptiven Anastomose auf einer Länge von etwa 4 cm herausgenommen. Nach Entfernen des Darminhalts durch vorsichtiges Herausdrücken mittels eines Watteträgers wurde die Probe bis zur weiteren Verwendung bei minus 80°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Hydroxyprolin-Konzentration der Anastomose wurde eine modifizierte Methode nach Boigk et al. (1997) und Jamall et al. (1981) angewandt. Diese Methode sah vor, dass zunächst 200 mg Mäusedarm in 4 ml 6N Salzsäure bei 110°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Potters homogenisiert wurde. Während einer Inkubation bei 110°C für 16 Stunden kam es zur Freisetzung des Hydroxyprolins aus dem Gewebe. Nach Filtration des Homogenats mit einem Faltenfilter (595 ½, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) wurde zu 30 µl aus dem Überstand in einer Doppelwertbestimmung jeweils 30 µl Methanol hinzugegeben, um die übrig gebliebene Salzsäure zu entfernen. Die Proben wurden für 20 Minuten unter Stickstoff eingedampft (Reacti-Therm IIITM, Pierce, Rockford, USA) und das entstandene Kristallat wieder in 1 ml 50%igem Isopropanol gelöst. Zeitgleich wurde eine Hydroxyprolin-Standardreihe ebenfalls als Doppelwerte hergestellt, die die Hydroxyprolin-Konzentrationen von 0 µg bis 2,6 µg aufsteigend umfasste. Im Folgenden wurde sowohl zu der Standardreihe als auch zu den Proben 200 µl einer 0,84%igen Chloramin-T Lösung pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, welches zur Oxidation des freigesetzten Hydroxyprolins führte. Weiterhin wurde 1 ml frisch zubereitete Ehrlich's Reagenz Lösung zugegeben und für 90 Minuten bei 50°C inkubiert. Das Oxidationsprodukt bildete mit dem Ehrlich's Reagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd, Sigma S35368-206) ein orange-gelb gefärbtes Kondensationsprodukt mit einem Wellenlängemaximum bei 558 nm. Dieser Chromophor konnte photometrisch bei eben dieser Wellenlänge quantitativ nachgewiesen werden (UV mini 1240 Spectrophotometer,

Shimadzu Corporation, Japan). Es wurde die Absorption für alle Standards und Proben gegen den Leerwert, der aus 50%igem Isopropanol bestand, gemessen und die Hydroxyprolin-Konzentration der Proben mit Hilfe einer linearen Regressionskurve bestimmt.

Die Berechnung dieser Werte erfolgte nach folgender Formel:

[Absorption der Probe : Koeffizienten der Standardkurve] \times 666,7 = μ g Hydroxyprolin/g Darm.

Die Zahl 666,7 ergibt sich aus 200 mg eingesetztem Gewebe und 30 μ l aus 4000 μ l eingesetzter Probe.

3.9 Histochemische und polarisationsoptische Untersuchungen

Für die histochemischen und polarisationsoptischen Untersuchungen wurde das Darmkonvolut 2, 5 und 10 Tage nach Anastomosenanlage entnommen. Die Anastomosenregion wurde jeweils 5 mm proximal und distal herausgetrennt und mit einem Längsschnitt entlang des mesenterialen Ansatzes eröffnet. Der Darminhalt wurde entfernt und das Anastomosenpräparat in 4%igem Paraformaldehyd für mindestens 24 Stunden fixiert. Hiernach wurde es entwässert (Tissue Tek[®] VIP 2000 Model 4622, Miles Scientific, Naperville, USA) und mit Hilfe eines Einbettautomaten (Tissue Tek[®] III Model 4589, Miles Scientific, Naperville, USA) in Paraffin eingebettet. Aus dem Paraffinblock wurden unter Verwendung eines Schlittenmikrotoms (Type HM 325, Mikrom GmbH, Walldorf, Deutschland) 5 μ m dicke Schnitte angefertigt.

Zur Beurteilung der Histomorphologie mittels eines semiquantitativen Heilungs-Scores wurde ein Teil der Schnitte in Standardtechnik HE gefärbt. Hierbei wurden die Schnitte nach Entparaffinierung (Xylol) und Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe zur Kernfärbung für 10 Minuten in Hämalaun gegeben, für 10 Minuten mit warmem Leitungswasser (Bläuen = Erhöhung des pH-Wertes) gespült und danach zur Rotfärbung der azidophilen/ eosinophilen Strukturen (Zytoplasma, Kollagen, u.a.) für 1 Minute in Eosin verbracht. Durch weitere Spülschritte mit Aqua dest. und einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert, bevor sie in Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckt wurden.

Ein erfahrener, unabhängiger Pathologe nahm die Bewertung der Ergebnisse unter Lichtmikroskopie vor. Die Beurteilung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Attard et al. (2005), Biert et al. (1998) und Verhofstad et al. (2001) als semiquantitativer Heilungs-Score. Unter dem Aspekt der transanastomotischen Überbrückung wurde die Summe aus Punkten je von 1 bis 5 (1 = schlecht, 2 = mäßig, 3 = gut, 4 = sehr gut, 5 = exzellent) für die Mukosakontinuität, die Muskulariskontinuität, die Reepithelisierung und das Granulationsgewebe ermittelt. Unter

dem Gesichtspunkt der Entzündungsreaktion wurde entsprechend die Summe aus je 1 bis 3 Punkten (1 = ausbleibend-mild, 2 = mäßig, 3 = dicht) für das Vorhandensein von Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten gebildet. Letztlich konnte mit Hilfe der Auswertung dieser Heilungs-Scores eine Aussage über die Anastomosenheilung in den verschiedenen Gruppen und zu den verschiedenen Zeitpunkten getroffen werden (Abb. 14-16).

Der andere Teil der Schnitte wurde mittels Sirius red in Pikrinsäure gefärbt. Hierbei wurden die Schnitte wiederum entparaffiniert und nach der absteigenden Alkoholreihe für 5 Minuten in Hämatoxylin nach Weigert (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Nach Abspülen in fließend warmem Leitungswasser und kurzem Differenzieren mit HCl-Alkohol, wurden die Schnitte 10 Minuten in warmem Leitungswasser gebläut. Die 0,1%ige Sirius-Rot Lösung wurde für 15 Minuten zugegeben und anschließend mit 100 % Alkohol abgespült. Bevor die Schnitte schließlich mit Entellan eingedeckt wurden, mussten sie für 5 Minuten in Xylol geklärt werden. Am Lichtmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-E, Nikon, Japan) konnten Kollagen I und III unter Verwendung zweier Polarisationsfilter (Polarisator und Analysator) selektiv dargestellt werden. Diese Methode wurde erstmals von Junqueira et al. (1979) beschrieben. Hierbei lässt der Polarisator nur eine Schwingungsrichtung des Lichtes hindurch, während der Analysator, der 90° zum Polarisator gedreht ist, durch Kreuzpolarisation außer den durch die Farbmoleküle gedrehten Lichtwellen kein Licht mehr hindurch lässt. Durch die Färbung mittels Sirius red in Pikrinsäure wird eine Verstärkung der Anisotropie des Kollagens erreicht. Typ I zeigt eine orange-rötliche und Typ III eine gelb-grünliche Farbe. Somit konnte die Kollagenverteilung und letztlich die Anastomosenheilung der einzelnen Versuchsgruppen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten untersucht werden (Abb. 17-19).

3.10 Funktionelle Untersuchungen

Für die funktionellen Untersuchungen erfolgte die Entnahme des Darmkonvoluts am 2., 5. und 10. postoperativen Tag. Die Anastomose wurde aufgesucht und das sie tragende Kolonsegment vom Beginn des Zökums bis etwa 3 cm distal der Anastomose herausgetrennt. Aus dem Lumen distal der Anastomose wurde mit einem Watteträger vorsichtig der Darminhalt entfernt und ein arterieller Katheter (18 G, Leader Cath, Vygon, Ecouen, Frankreich) luminal bis etwa 0,5 cm an die Anastomose heran geschoben. Mit einem Faden der Stärke 6-0 (Vicryl, Ethicon GmbH) wurde der Darm zunächst 1 cm und danach 1,5 cm distal der Anastomose mit dem Katheter verknotet. Proximal der Anastomose am zökalen Ausgang wurde das Darmlumen mit zwei

Ligaturen dicht verschlossen (Abb. 2). Das andere Ende des Katheters wurde in einem in-vitro Organbad Setup (Heiz-Block-Thermostat HBT-2-132, Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland) mit einem Perfusor (Perfusor[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verbunden, durch den die Anastomose unter standardisierten Bedingungen einem ansteigenden luminalen Druck ausgesetzt wurde (Abb. 3). Durch den Katheter wurde KRB mit einer konstanten Rate von 199,8 ml pro Stunde infundiert. Mit Hilfe eines Druckaufnehmers (Biopac Blutdruck-Transducer Typ TSD104A, med-NATIC GmbH, München, Deutschland) wurde der Druckaufbau bis zum Auftreten einer Leckage mit anschließendem Druckabfall online (Biopac AcqKnowledge Demo version 3.8, med-NATIC GmbH) aufgezeichnet (Abb. 4). Der Anastomosen-Berstungsdruck (ABP), gemessen in mmHg, wurde definiert als der Druck, der maximal intraluminal direkt vor dem Auftreten der Leckage erreicht wurde. Somit lässt sich die Anastomosenfestigkeit quantifizieren und gibt einen direkten Aufschluss über den Grad der Anastomosenheilung.



Abbildung 2: Darstellung eines exemplarischen Kolonpräparates im Organbad-Setup. Über einen arteriellen Katheter wurde das an beiden Enden mit Ligaturen verschlossene anastomosentragende Kolon ascendens Segment einem konstant ansteigenden intraluminalen Druck bis zum Auftreten einer Leckage ausgesetzt.

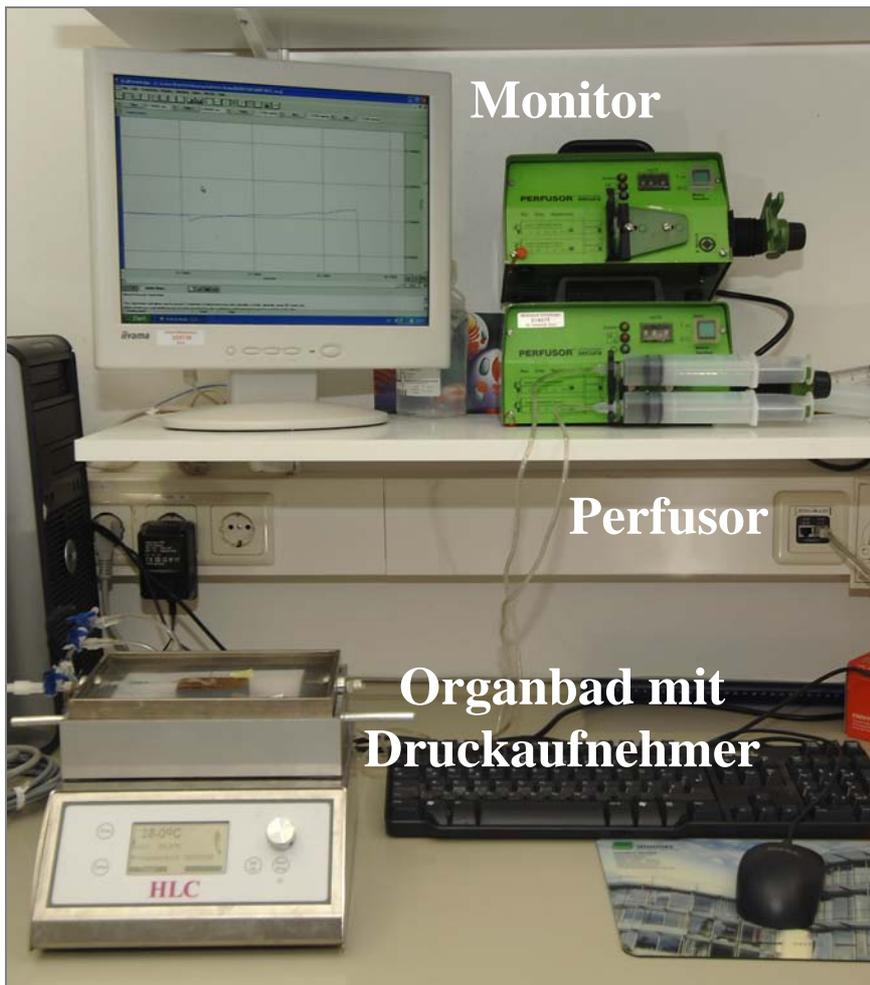


Abbildung 3: Anastomosen-Berstungsdruck-Setup. Mittels des Perfusors wurde das im Organbad eingespannte anastomosentragende Kolonsegment einem kontinuierlich ansteigenden Druck ausgesetzt. Dieser wurde über einen an das Organbad angeschlossenen Druckaufnehmer registriert und als Kurvenverlauf auf dem Monitor dargestellt.

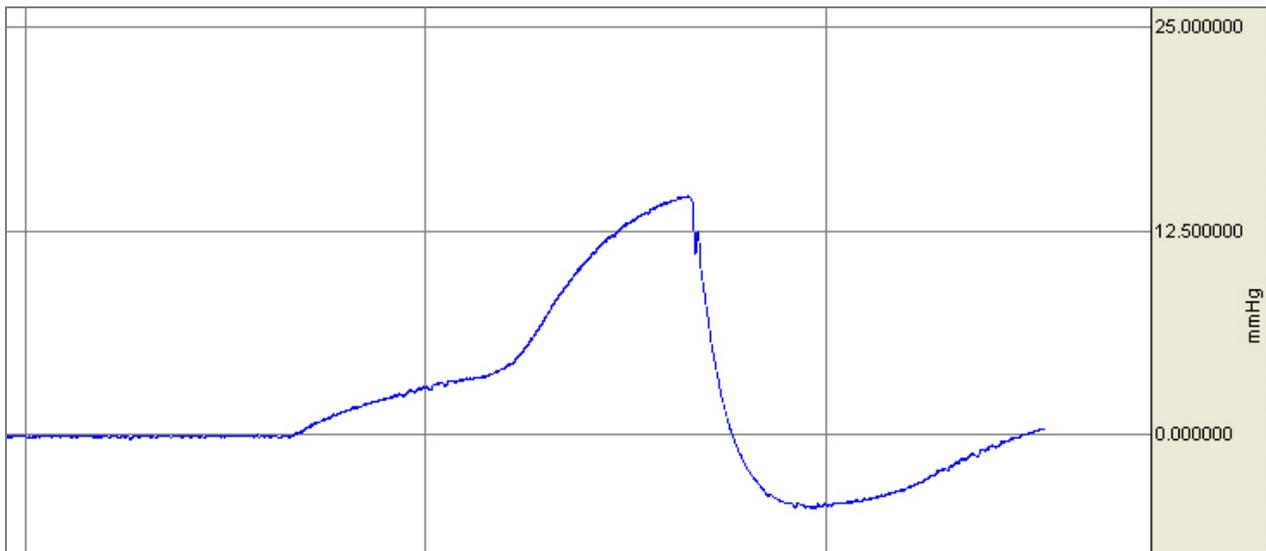


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung eines Kurvenverlaufs bei der Berstungsdruckmessung. Nach zunächst kontinuierlichem Druckanstieg markiert der plötzliche Abfall der Kurve den intraluminalen Druck bei Auftreten der Leckage im Bereich der Anastomose.

3.11 Verwendete Chemikalien

Der KRB wurde selbst hergestellt (Na^+ 120,8 mmol/l, K^+ 5,901 mmol/l, Ca^{2+} 2,497 mmol/l, Mg^{2+} 1,196 mmol/l, Cl^- 134,096 mmol/l, HCO_3^- 15,498 mmol/l, H_2PO_4^- 1,128 mmol/l und Glucose 11,49 mmol/l) und die Lösung anschließend zur Oxygenierung und Einstellung eines pH von 7,3 bis 7,4 mit einem Gasgemisch von 97 % O_2 / 3 % CO_2 begast.

Die 6N Salzsäure wurde gefertigt, indem 49,7 ml 12N 37 % konzentrierte Salzsäure zu 50,3 ml Aqua bidest. gegeben wurde.

Zur Herstellung der Hydroxyprolin-Lösung wurde zunächst 1 mg Hydroxyprolin (trans-4-Hydroxy-L-prolin 99 %, Sigma H5,440-9) in 1 ml 50%igem Isopropanol gelöst. Diese sogenannte Hydroxyprolin-Stammlösung wurde 1:100 mit 50%igem Isopropanol auf eine 10 µg/ml „Working“-Lösung verdünnt, die direkt einsetzbar war.

Die 84%ige Chloramin-T Lösung wurde aus 168 mg Chloramin T hydrate (Sigma C9887), 12,1 ml Chloramin-T Puffer und 7,9 ml Isopropanol gefertigt, so dass ein Endvolumen von 20 ml erreicht wurde. Der Chloramin-T Puffer bestand aus 42 mM Natriumacetat und 3,6 mM Zitronensäure. Der pH wurde mittels eines pH-Meters (Accumet Meter, Denver Instrument Company, Denver, USA) und der eventuellen Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge auf einen Wert von 6,0 eingestellt.

Zur Fertigung der Ehrlich's Reagenz Lösung wurden 248 mg Ehrlich's Reagenz, 270 µl 60%ige Perchlorsäure und 730 µl Isopropanol in einem Becherglas auf einem Magnetrührer vermischt. Die Mengenangaben beziehen sich hierbei auf 1 ml Ehrlich's Reagenz Lösung.

Zur Herstellung der Sirius-Rot Lösung wurden 10 ml 1 % Sirius Chroma 1 A 280, 90 ml gesättigte Pikrinsäure und einige Pikrinsäurekristalle zusammengegeben. Die Lösung war nach einem Tag Ruhe gebrauchsfertig.

Alle anderen Chemikalien wurden, soweit nicht anders verzeichnet, bei der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

3.12 Statistik

Die Ergebnisse des Allgemeinzustands und der Gewichtsverläufe wurden durch Mittelwert und eine Two-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test überprüft. Bei der statistische Auswertung des Adhäsions-Scores wurde Mittelwert und Standardabweichung bestimmt sowie ein Kruskal-Wallis- und Dunn's Multiple Comparison Test durchgeführt. Die statistische Analyse der IHC umfasste Mittelwert und Standardabweichung sowie eine One-Way ANOVA mit einem Bonferroni's Multiple Comparison Test. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der Kollagen Typ I-mRNA-Expression wurden statistisch entsprechend dem Adhäsions-Score dargestellt und überprüft, während die Ergebnisse der Kollagen Typ III-mRNA-Expression mittels One-Way ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test ausgewertet wurden. Bei den biochemischen und histochemischen Ergebnissen wurden die gleichen statistischen Analysen wie bei der Auswertung des Adhäsions-Scores durchgeführt. Für die Berstungsdruck-Messung wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt und die Ergebnisse mittels One-Way ANOVA sowie einem Bonferroni's Multiple Comparison Test analysiert. Statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ festgelegt und Hochsignifikanz bei $p < 0,001$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Postoperative Untersuchungen

4.1.1 Generelle Beobachtungen

Bei der Beobachtung der mit LPS behandelten Tiere waren vor allem in den ersten 2 Tagen ein gesträubtes ungepflegtes Fell und die Lethargie der Tiere auffällig. Außerdem zeigten sich bei mehreren Tieren Sekretverkrustungen an den Augen und Stuhlverkrustungen am Anus. Nach Eröffnung des Abdomens fanden sich gehäuft dilatierte Darmschlingen mit mukoidem Intestinalinhalt.

Die Osteopetrosis-Mäuse wiesen insgesamt einen reduzierten Allgemeinzustand im Vergleich zu den Black-six-Mäusen auf. Sie waren anfälliger für Narkose- und Operationskomplikationen und benötigten eine längere Erholungsphase nach Anastomosenanlage. In Einzelfällen war die intra-peritoneale Bolusgabe von LPS nach ein paar Stunden, also noch vor der Operation, letal.

4.1.2 Letalitäten und deren Ursachen

Insgesamt wurden 290 Tiere operiert, die sich in 219 Black-six-Mäuse und 71 homozygote Osteopetrosis-Mäuse aufteilten. Die Gesamtlethalität lag bei 14,1 %, wobei die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis den größten Anteil mit 28,6 % ausmachten. Die relative Letalität der Osteopetrosis-Mäuse ohne Peritonitis betrug 19,4 %, die der pharmakologisch depletierten Mäuse ohne und mit Peritonitis lag bei 22,2 % und 18,8 %. Bei den Wildtyp-Mäusen ohne Peritonitis verstarb kein Tier und bei jenen mit Peritonitis verstarben 5,4 %. Insgesamt konnte nur einmal eine Stenose als Todesursache identifiziert werden (0,3 %), während je 6 AI und 6 Ischämien zum Versterben führten (je 2,1 %). In insgesamt 9,7 % der Fälle blieb die Todesursache ungeklärt. Die AI-Rate hatte bei den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis einen relativen Anteil von 1,8 %. In der Gruppe der pharmakologisch depletierten Mäusen ohne und mit Peritonitis lag die AI-Rate bei 1,9 % bzw. 6,3 %, die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis zeigten eine Insuffizienzrate von 2,9 % (Tab. 2). Die übrigen Gruppen zeigten keine AI als Todesursache. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im Bezug auf die Insuffizienzraten der Versuchsgruppen als möglicher Parameter für Wundheilungsstörungen erfasst werden.

	Stenose	Insuffizienz	Ischämie	Unklar	Letalität (absolut)	Letalität (relativ, %)	Operationen
WT	0	0	0	0	0	0	61
s-WT	0	1	1	1	3	5,4	56
pMD	0	1	1	10	12	22,2	54
s-pMD	0	3	2	4	9	18,8	48
op^{-/-}	1	0	1	5	7	19,4	36
s-op^{-/-}	0	1	1	8	10	28,6	35
Gesamt	1	6	6	28	41	14,1	290

Tabelle 2: Diese Tabelle zeigt zusammengefasst die Operationsdaten der einzelnen Versuchsgruppen (WT = Wildtyp-Mäuse, s-WT = Wildtyp-Mäuse mit Peritonitis, pMD = pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse, s-pMD = pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse mit Peritonitis, op^{-/-} = Osteopetrosis-Mäuse, s-op^{-/-} = Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis), sowie die absoluten und relativen Letalitäten und deren Ursachen. Ein statistisch signifikanter Unterschied im Bezug auf die Insuffizienzzraten der Versuchsgruppen als möglicher Parameter für Wundheilungsstörungen ergab sich nicht.

4.1.3 Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand der Wildtyp-Mäuse und der pharmakologisch depletierten Mäuse war von Tag -1 bis zum Tag 5 zu jedem Zeitpunkt mit 1 ± 0 zu bewerten, d.h. die Tiere zeigten keine Einschränkungen, waren frei beweglich und konnten die Nahrung ohne Probleme aufnehmen. Die Osteopetrosis-Mäuse erhielten an Tag 1 einen Score von $1,1 \pm 0,3$, während sie zu allen anderen Zeitpunkten ebenfalls mit 1 ± 0 zu bewerten waren. Im Vergleich zeigten die jeweiligen Gruppen mit Peritonitis am Tag der Anastomosenanlage (Tag 0) eine leichte Einschränkung und eine etwas reduzierte Mobilität bei noch normaler Nahrungsaufnahme (2 ± 0). Bis zum 5. Tag erholten sich die Tiere von der LPS-Gabe und dem Operationstrauma. Die Wildtyp- und pharmakologisch depletierten Mäuse mit Peritonitis erlangten wieder einen Score von 1 ± 0 , während die genetisch depletierten Mäuse mit Peritonitis mit einem Score von $1,3 \pm 0,7$ dahinter zurückblieben. Insgesamt bestand weder ein signifikanter Unterschied beim Vergleich aller Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen noch beim Vergleich der pharmakologisch und genetisch depletierten Mäuse mit Peritonitis zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis (Abb. 5).

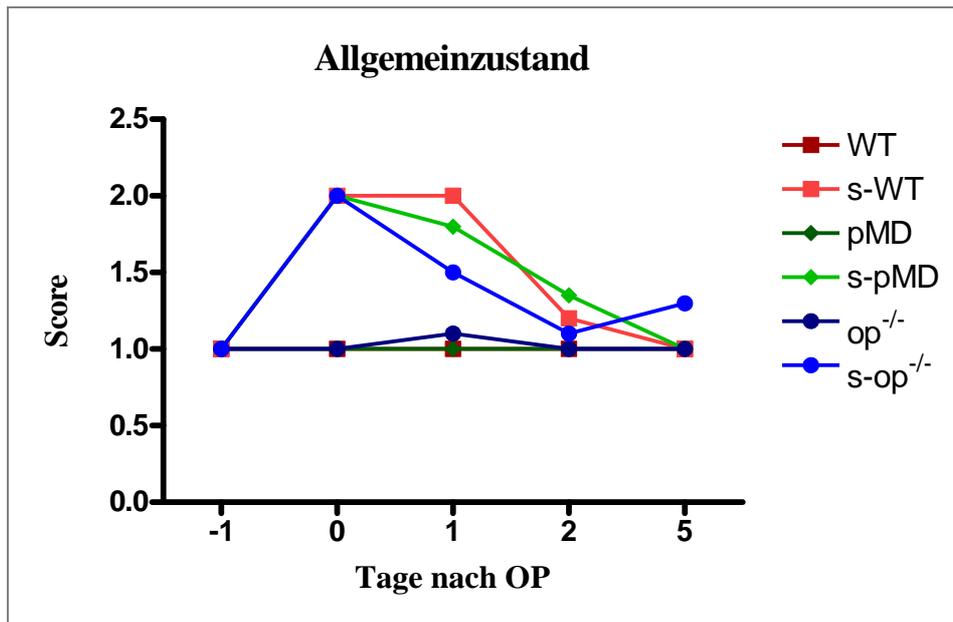


Abbildung 5: Die Grafik stellt den Allgemeinzustand der 6 Versuchsgruppen von Tag -1 bis zu Tag 5 dar (Mittelwert, n = 10). Während es bei den Tieren ohne Peritonitis nicht zu einer Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes kam, zeigten die Tiere mit Peritonitis einen Tag nach der LPS-Gabe einen reduzierten Allgemeinzustand, der sich bis zum 5. postoperativen Tag wieder weitgehend normalisierte. Die statistische Auswertung des Allgemeinzustand-Scores ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede.

4.1.4 Gewichtsverläufe

Bei der Betrachtung der Gewichtsverläufe der Gruppen ohne Peritonitis zeigte sich ein Abfall der Kurven an Tag 1 und 2, der bei den Osteopetrosis-Mäusen (d1: $-0,9 \text{ g} \pm 0,7$; d2: $-1,2 \text{ g} \pm 0,9$) milder verlief als bei den Wildtyp- (d1: $-2,5 \text{ g} \pm 0,6$; d2: $-2,9 \text{ g} \pm 1,2$) und den pharmakologisch depletierten Mäusen (d1: $-1,6 \text{ g} \pm 0,7$; d2: $-1,8 \text{ g} \pm 1,2$). Der Gewichtsverlust der beiden Letztgenannten erholte sich zum 5. Tag (WT: $-1,2 \text{ g} \pm 1,5$; pMD: $-1,4 \text{ g} \pm 1$) hin, während die Osteopetrosis-Mäuse mit $-1,9 \text{ g} \pm 1,5$ hier einen weiteren Gewichtsverlust erlitten. Die pharmakologisch und genetisch depletierten Mäuse wiesen keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Mäusen auf. Bei den Gruppen mit Peritonitis stellte man fest, dass vor allem die Wildtyp- (d0: $-2,1 \text{ g} \pm 0,3$; d1: $-4,1 \text{ g} \pm 0,4$; d2: $-4 \text{ g} \pm 0,3$) und die pharmakologisch depletierten Mäuse mit Peritonitis (d0: $-4,2 \text{ g} \pm 2$; d1: $-6 \text{ g} \pm 1,9$; d2: $-5,9 \text{ g} \pm 1,7$) an Tag 0, 1 und 2 einen stärkeren Gewichtsverlust erlitten als die Wildtyp-Mäuse ohne Peritonitis (d0: $0,2 \text{ g} \pm 0,2$). Auch ihr Gewichtsverlust erholte sich bis zum 5. Tag (s-WT: $-2,5 \text{ g} \pm 1$; s-pMD: $-4 \text{ g} \pm 2,3$) wieder. Der Abfall der Gewichtskurve gestaltete sich bei den Osteopetrosis-Mäusen mit Peritonitis (d0: -

1,8 g \pm 1,2; d1: -2,1 g \pm 1,2; d2: -2,4 g \pm 1,5) schwächer als bei den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis, blieb aber bis zum 5. Tag (-2,3 g \pm 2,2) auf dem gleichen niedrigen Niveau. Die pharmakologisch depletierten Mäuse mit Peritonitis wiesen an Tag 0 einen statistisch signifikanten Gewichtsverlust zu den Wildtyp-Mäusen ohne Peritonitis auf. Der Vergleich der übrigen Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen und der Peritonitis-Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis ließ keine weiteren Signifikanzen erfassen (Abb. 6).

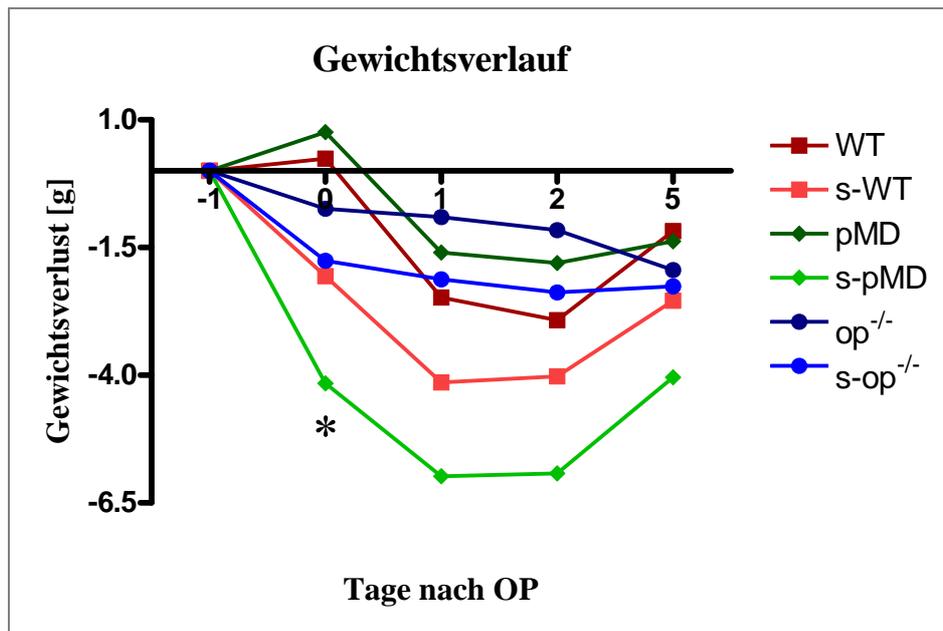


Abbildung 6: Dargestellt sind die Gewichtsverläufe der einzelnen Versuchsgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten (Mittelwert, n = 5, * = p < 0,05). Die statistischen Tests erfassen einen signifikanten Gewichtsverlust (Einheit in g) der pharmakologisch depletierten Mäuse mit Peritonitis im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ohne Peritonitis. Es ergaben sich keine weiteren Signifikanzen.

4.1.5 Adhäsions-Score

Bei Entnahme des gesamten Darmkonvoluts wurde dieses makroskopisch mit Hilfe des Adhäsions-Scores untersucht. Am 2. postoperativen Tag zeigten die Wildtyp-Mäuse einen mittleren Score von $1,2 \pm 0,6$, die pharmakologisch depletierten Mäuse einen Score von $1,5 \pm 0,8$ und die Osteopetrosis-Mäuse einen Score von $1,8 \pm 0,7$. Die entsprechenden Gruppen mit Peritonitis (s-WT: $0,6 \pm 0,7$; s-pMD: $1,2 \pm 0,8$; s-op^{-/-}: 1 ± 1) wiesen weniger Adhäsionen im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe auf. Der Vergleich aller Gruppen gegen den Wildtyp und der Peritonitis-Gruppen gegen die Wildtyp-Gruppe mit Peritonitis ließ aber keine statistischen

Signifikanzen erkennen. Nach 5 Tagen war der Adhäsions-Score der Gruppen ohne Peritonitis leicht angestiegen (WT: $1,4 \pm 0,8$; pMD: $1,8 \pm 0,6$; op^{-/-}: $2 \pm 0,5$). Bei den Gruppen mit Peritonitis (s-WT: $1 \pm 0,7$; s-pMD: $1,5 \pm 0,7$; s-op^{-/-}: $1,6 \pm 0,5$) lag nur noch der Score der Wildtyp-Mäuse mit Peritonitis unter dem der Wildtyp-Gruppe. Die entsprechenden statistischen Tests lieferten keine signifikanten Unterschiede. Am 10. Tag wiesen die Gruppen ohne Peritonitis (WT: $1,3 \pm 0,7$; pMD: $1,8 \pm 0,5$; op^{-/-}: $1,9 \pm 0,4$) weniger Adhäsionen als am 5. Tag auf, während sich bei den Gruppen mit Peritonitis (s-WT: $1,7 \pm 0,5$; s-pMD: $1,6 \pm 0,5$; s-op^{-/-}: $1,8 \pm 0,5$) ein Anstieg im Adhäsions-Score verzeichnen ließ. Für den Vergleich aller Gruppen gegen die Wildtyp-Gruppe und der Peritonitis-Mäuse gegen die Wildtyp-Mäuse mit Peritonitis ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Zusammenhänge (Tab. 3).

A	MW	SD	B	MW	SD	C	MW	SD
WT	1,2	0,6	WT	1,4	0,8	WT	1,3	0,7
s-WT	0,6	0,7	s-WT	1	0,7	s-WT	1,7	0,5
pMD	1,5	0,8	pMD	1,8	0,6	pMD	1,8	0,5
s-pMD	1,1	0,8	s-pMD	1,5	0,7	s-pMD	1,6	0,5
op^{-/-}	1,8	0,7	op^{-/-}	2	0,5	op^{-/-}	1,9	0,4
s-op^{-/-}	1	1	s-op^{-/-}	1,6	0,5	s-op^{-/-}	1,8	0,5

Tabelle 3: Die hier aufgeführten Tabellen zeigen die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des Adhäsions-Scores der 6 Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten 2 (A), 5 (B) und 10 (C) Tage nach Anastomosenanlage (n = 5-10). Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zu den jeweiligen Zeitpunkten.

4.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der pharmakologischen Makrophagendepletion zeigte an Tag 0 eine Reduktion der Makrophagenzahl pro Gesichtsfeld auf 25 % und an Tag 1 auf 10 % der Kontrolle (WT_CTL: $71 \pm 2,6$; pMD_d0: $18 \pm 1,6$; pMD_d1: $7,4 \pm 1,1$). Die statistische Analyse ergab einen hochsignifikanten Abfall sowohl beim Vergleich von Tag 0 zur Kontrolle als auch beim Vergleich von Tag 1 zu Tag 0. Am 3. Tag lag die Makrophagenzahl pro Gesichtsfeld bei 48 % im Vergleich zur Kontrolle (pMD_d3: $34,2 \pm 1,3$). Statistisch konnte ein hochsignifikanter Anstieg der Makrophagenzahl pro Gesichtsfeld im Vergleich zu Tag 1 erfasst werden und damit eine Repopulation der residenten Muskularis-Makrophagen bewiesen werden (Abb. 7 und 8).

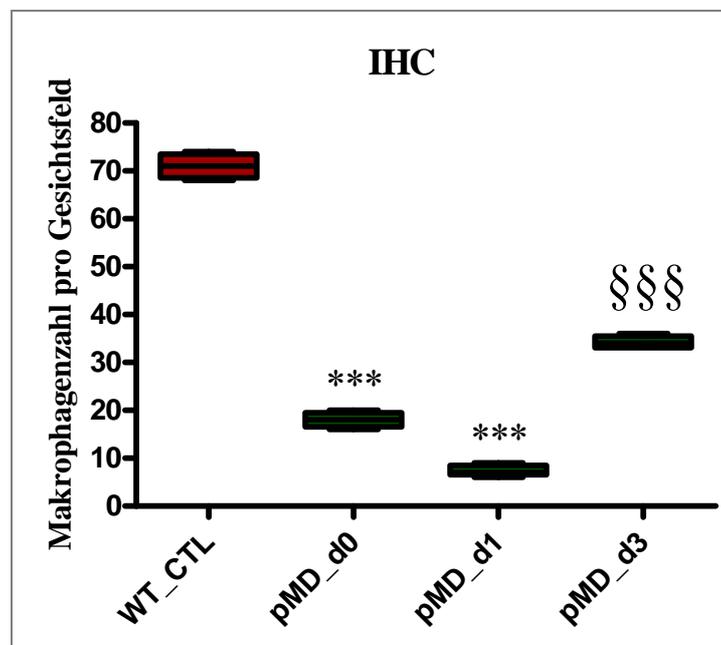


Abbildung 7: Die Grafik veranschaulicht die immunhistochemische Untersuchung der pharmakologischen Depletion (pMD) der residenten Muskularis-Makrophagen an Tag 0, 1 und 3 im Vergleich zur Kontrolle (WT_CTL) (Mittelwert \pm SD, n = 5, ***/ §§§§ = p < 0,001). An Tag 0 und 1 zeigt sich ein hochsignifikanter Abfall der Makrophagenzahl pro Gesichtsfeld im Vergleich zur Kontrolle (***: pMD_d0 vs. WT_CTL und pMD_d1 vs. WT_CTL), während an Tag 3 ein hochsignifikanter Anstieg der Makrophagenzahl pro Gesichtsfeld die Repopulation dieser Zellen veranschaulicht (§§§§: pMD_d3 vs. pMD_d1).

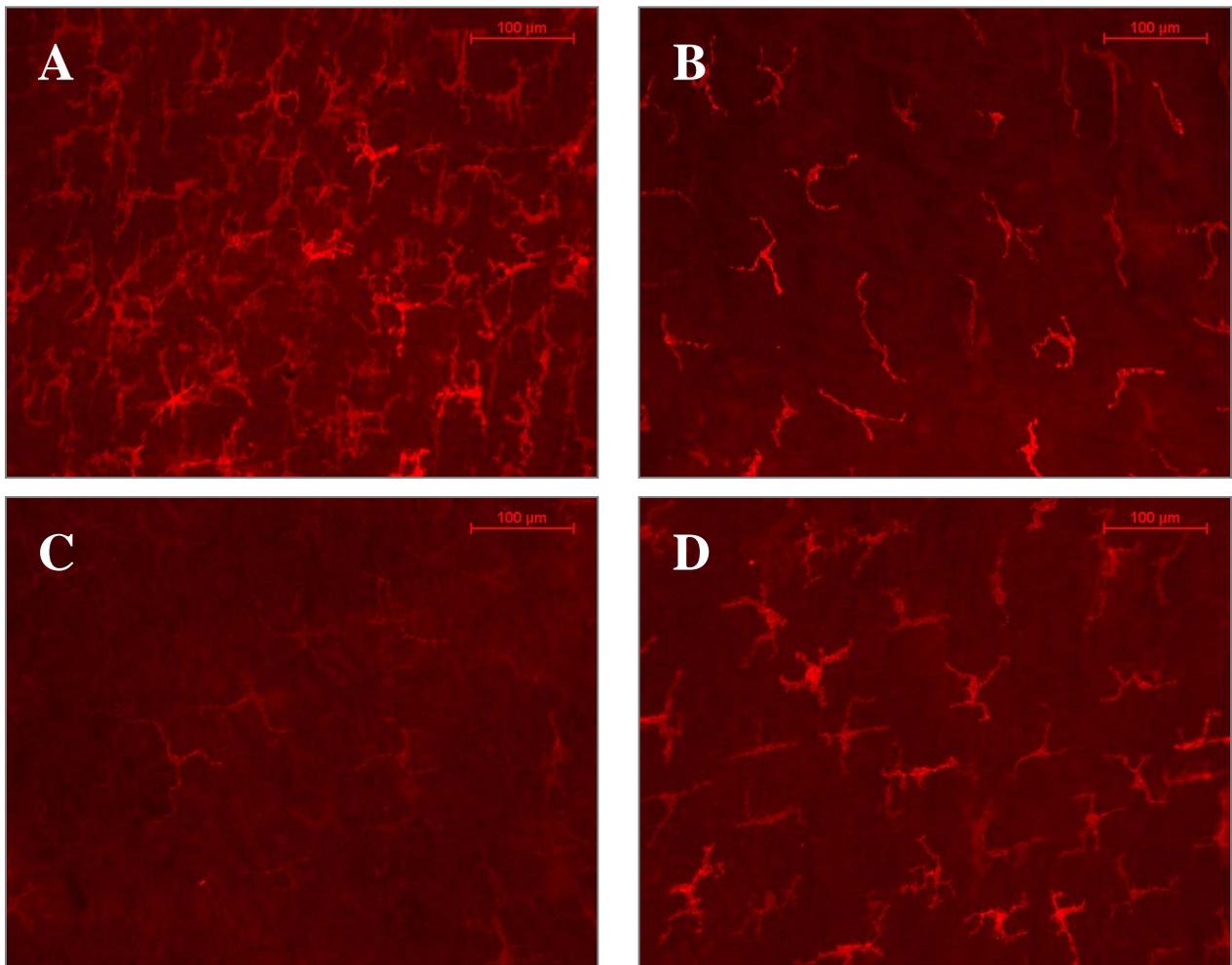


Abbildung 8: Die mikroskopischen Aufnahmen (200-fache Vergrößerung) der Makrophagen verdeutlichen die Ergebnisse der Immunhistochemie. Während in der Wildtyp-Kontrolle (A) ein dichtes Netzwerk aus residenten Makrophagen sichtbar ist, kommt es im Anschluss an die pharmakologische Depletion an Tag 0 (B) und noch deutlicher an Tag 1 (C) zu einer ausgeprägten Reduktion der Muskularis-Makrophagen. An Tag 3 (D) nach der pharmakologischen Depletion ist die zunehmende Repopulation erkennbar.

4.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde die mRNA-Expression von Kollagen Typ I und III zu den Zeitpunkten 12 Stunden, 24 Stunden und 5 Tagen bestimmt. Die Ergebnisse nach 24 Stunden lagen jeweils im Bereich derer nach 12 Stunden und sind aufgrund der großen Datenmenge nicht aufgeführt. Als Kontrolle diente die Col I- bzw. III-mRNA-Expression unbehandelter Darmstücke von je 5 nicht-operierten Wildtyp-Mäusen, pharmakologisch depletierten Mäusen und Osteopetrosis-Mäusen.

Der relative mRNA-Gehalt von Col I lag nach 12 Stunden in den anastomosentragenden Kolonsegmenten insgesamt auf einem signifikant geringeren Niveau im Vergleich zu den Kontrolldarmsegmenten. Am 5. Tag ist es in allen Gruppen zu einer signifikanten Zunahme des relativen mRNA-Gehalts von Col I im Vergleich zu den Wildtyp-Gruppen und den Gruppen nach 12 Stunden gekommen. Die Werte der Kontrolltiere lagen bei $1,1 \pm 0,5$ (Wildtyp), $1,2 \pm 0,5$ (pharmakologisch depletiert) und $1 \pm 0,3$ (Osteopetrosis). Nach 12 Stunden zeigten die Versuchsgruppen einen relativen Kollagen Typ I-mRNA-Gehalt von $0,4 \pm 0,1$ (WT), $0,3 \pm 0,1$ (s-WT), $0,7 \pm 0,2$ (pMD), $0,8 \pm 0,2$ (s-pMD), $0,2 \pm 0,1$ ($op^{-/-}$) und $0,4 \pm 0,1$ (s- $op^{-/-}$). Am 5. Tag ergaben sich folgende Werte: $10,1 \pm 2,9$ (WT), $11,2 \pm 2,7$ (s-WT), $13,4 \pm 4,2$ (pMD), $11,3 \pm 3$ (s-pMD), $10,4 \pm 7,7$ ($op^{-/-}$) und $8,6 \pm 3,3$ (s- $op^{-/-}$). Bei der statistischen Auswertung erbrachte der Vergleich aller Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen ohne Peritonitis und der Gruppen mit Peritonitis zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis der entsprechenden Versuchszeitpunkte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 9).

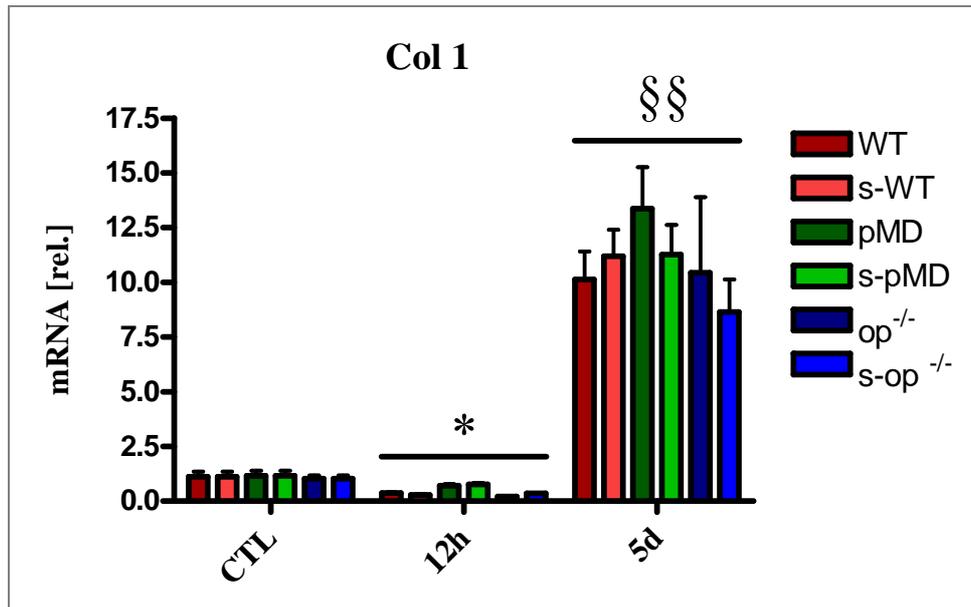


Abbildung 9: Das Histogramm zeigt den relativen Kollagen Typ I-mRNA-Gehalt der Darmsegmente der Kontrolltiere (CTL) und der Versuchsgruppen nach 12 Stunden und 5 Tagen (Mittelwert \pm SD, $n = 5$, * = $p < 0,05$, §§ = $p < 0,01$). Nach 12 Stunden ergibt sich bei allen Versuchsgruppen ein signifikanter Abfall des relativen Kollagen Typ I-mRNA-Gehalts zu den Kontrollgruppen. An Tag 5 ist es zu einer signifikanten Zunahme im Vergleich zu den Kontrollgruppen und den Gruppen nach 12 Stunden gekommen. Es konnten keine weiteren signifikanten Zusammenhänge erfasst werden.

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR der Col III-mRNA-Expression lieferten für die Kontrollgruppen einen relativen mRNA-Gehalt von $1,1 \pm 0,4$ (WT_CTL), $1,2 \pm 0,5$ (pMD_CTL) und $1 \pm 0,3$ (op^{-/-}_CTL). Nach 12 Stunden kam es bei den Wildtyp- und den Osteopetrosis-Gruppen zu einem signifikanten Abfall des mRNA-Gehalts: WT: $0,7 \pm 0,2$, s-WT: $0,5 \pm 0,2$, pMD: $1,2 \pm 0,5$, s-pMD: $0,8 \pm 0,2$, op^{-/-}: $0,3 \pm 0,1$ und s-op^{-/-}: $0,4 \pm 0,1$. Nach 5 Tagen konnte man bei allen Gruppen eine signifikante Zunahme des mRNA-Gehalts von Col III in Relation zu den Kontrollgruppen und den Gruppen nach 12 Stunden feststellen (WT: $3,4 \pm 1,4$; s-WT: $4,3 \pm 1,4$; pMD: $5 \pm 2,2$; s-pMD: $4 \pm 1,7$; op^{-/-}: $3,5 \pm 1,3$; s-op^{-/-}: $2,8 \pm 0,8$). Die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis zeigten am 5. Tag einen signifikanten Abfall im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis. Die weiteren üblichen Vergleiche ergaben keine Signifikanzen (Abb. 10). Es wird deutlich, dass die Aufregulation der mRNA-Expression von Col I am 5. Tag stärker ist als jene von Col III.

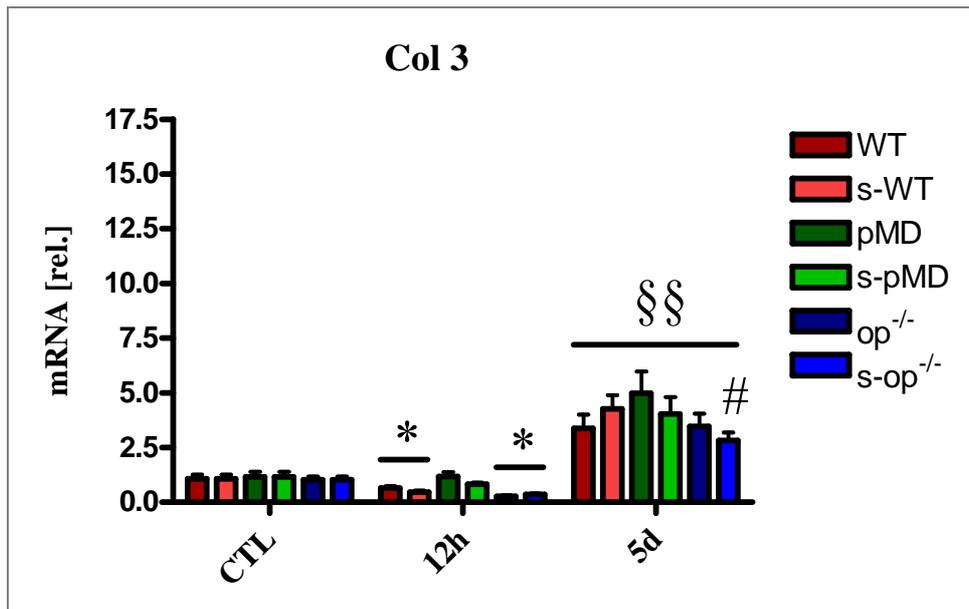


Abbildung 10: Das Histogramm stellt den relativen Kollagen Typ III-mRNA-Gehalt der Darmsegmente der Kontrolltiere (CTL) und der Versuchsgruppen nach 12 Stunden und 5 Tagen dar (Mittelwert \pm SD, $n = 5$, $*/\# = p < 0,05$, $\S\S = p < 0,01$). Nach 12 Stunden ist es zu einem signifikanten Abfall der Col III-mRNA-Expression der Wildtyp- und der Osteopetrosis-Gruppen gekommen. Nach 5 Tagen zeigen alle Versuchsgruppen eine signifikante Zunahme des relativen Kollagen Typ III-mRNA-Gehalts im Vergleich zu den Kontrollgruppen und den Gruppen nach 12 Stunden. Die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis ergaben an Tag 5 einen signifikant niedrigeren Kollagen Typ III-mRNA-Gehalt im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis.

4.4 Biochemische Untersuchungen

Bei der Hydroxyprolin-Messung wurde die Hydroxyprolin-Konzentration der Anastomosenregion nach 5 Tagen mit der Hydroxyprolin-Konzentration eines nicht-operierten Darmstücks verglichen. Dieser Versuch wurde nur für die Wildtyp-Gruppen und die pharmakologisch depletierten Gruppen mit den entsprechenden Kontrolltieren durchgeführt.

Die Hydroxyprolin-Konzentration der Wildtyp-Kontrollgruppe lag bei $1070 \mu\text{g/g} \pm 180,9$ und die der nicht-operierten, pharmakologisch depletierten Gruppe bei $1039,5 \mu\text{g/g} \pm 76,7$. Nach 5 Tagen wurde für die Wildtyp-Mäuse ohne Peritonitis eine Konzentration von $631,6 \mu\text{g/g} \pm 83,7$ gemessen, während sich für die pharmakologisch depletierten Mäuse ein Wert von $792,3 \mu\text{g/g} \pm 162,8$ ergab. Die Hydroxyprolin-Konzentrationen der Gruppen mit Peritonitis lagen bei $563,1 \mu\text{g/g} \pm 150,4$ (s-WT) und $653 \mu\text{g/g} \pm 186,9$ (s-pMD). Nach 5 Tagen zeigte sich eine signifikant erniedrigte Hydroxyprolin-Konzentration in den anastomosentragenden Darmsegmenten der Wildtyp- und pharmakologisch depletierten Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-

darmsegmenten. Der Vergleich der pharmakologisch depletierten Mäuse ohne und mit Peritonitis zu den Wildtyp-Mäusen ohne und mit Peritonitis ließ aber keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 11).

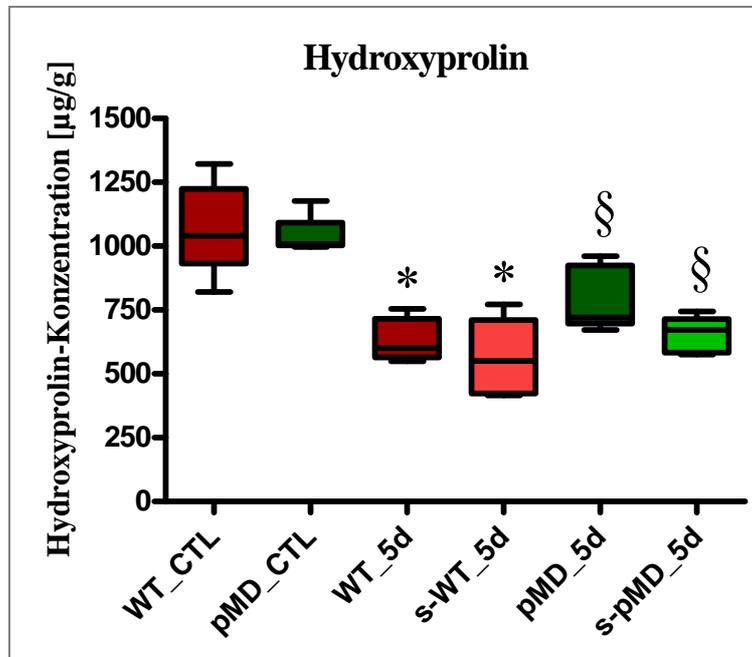


Abbildung 11: In diesem Diagramm sind die Ergebnisse der Hydroxyprolin-Messung dargestellt, die für die Wildtyp-Gruppen ohne und mit Peritonitis (WT und s-WT) und die pharmakologisch depletierten Gruppen ohne und mit Peritonitis (pMD und s-pMD) nach 5 Tagen sowie deren Kontrollgruppen (WT_CTL und pMD_CTL) durchgeführt wurden (Mittelwert \pm SD, n = 5, * / § = p < 0,05). Nach 5 Tagen zeigte sich bei allen Gruppen eine signifikant erniedrigte Hydroxyprolin-Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die weiteren Vergleiche waren nicht signifikant.

4.5 Histochemische Untersuchungen

Die histochemischen Untersuchungen erfolgten am 2., 5. und 10. postoperativen Tag und die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines semiquantitativen Heilungs-Scores (AHS) beschrieben. Im Bezug auf die transanastomotische Überbrückung wurde in allen Gruppen eine Zunahme des Heilungs-Scores von Tag 2 über Tag 5 zu Tag 10 deutlich. Am 2. Tag lagen die Scores der Versuchsgruppen relativ homogen auf einem Niveau (WT: $5 \pm 1,4$; s-WT: $4,8 \pm 0,8$; pMD: $5 \pm 0,7$; s-pMD: $4,8 \pm 0,5$; op^{-/-}: $5 \pm 0,6$; s-op^{-/-}: $5,6 \pm 2,6$). Nach 5 und 10 Tagen wurden folgende Werte erzielt: 5d: WT: $8,4 \pm 1,3$, s-WT: $9,2 \pm 1,8$, pMD: $8,6 \pm 1,3$, s-pMD: $8 \pm 2,6$, op^{-/-}: $8,4 \pm 1,7$, s-op^{-/-}: $8,6 \pm 3,5$ und 10d: WT: $12,4 \pm 3,8$, s-WT: $12,6 \pm 1,7$, pMD: $14,2 \pm 1,1$, s-pMD: $14,4$

$\pm 1,1$, $op^{-/-}$: $12,3 \pm 3,2$, $s-op^{-/-}$: $9 \pm 2,8$. Der Vergleich aller Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen und der Peritonitis-Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis ließ keine Signifikanzen erkennen. Einzig die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis wiesen am 10. Tag einen signifikant niedrigeren Score im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ohne und mit Peritonitis auf (Abb. 12).

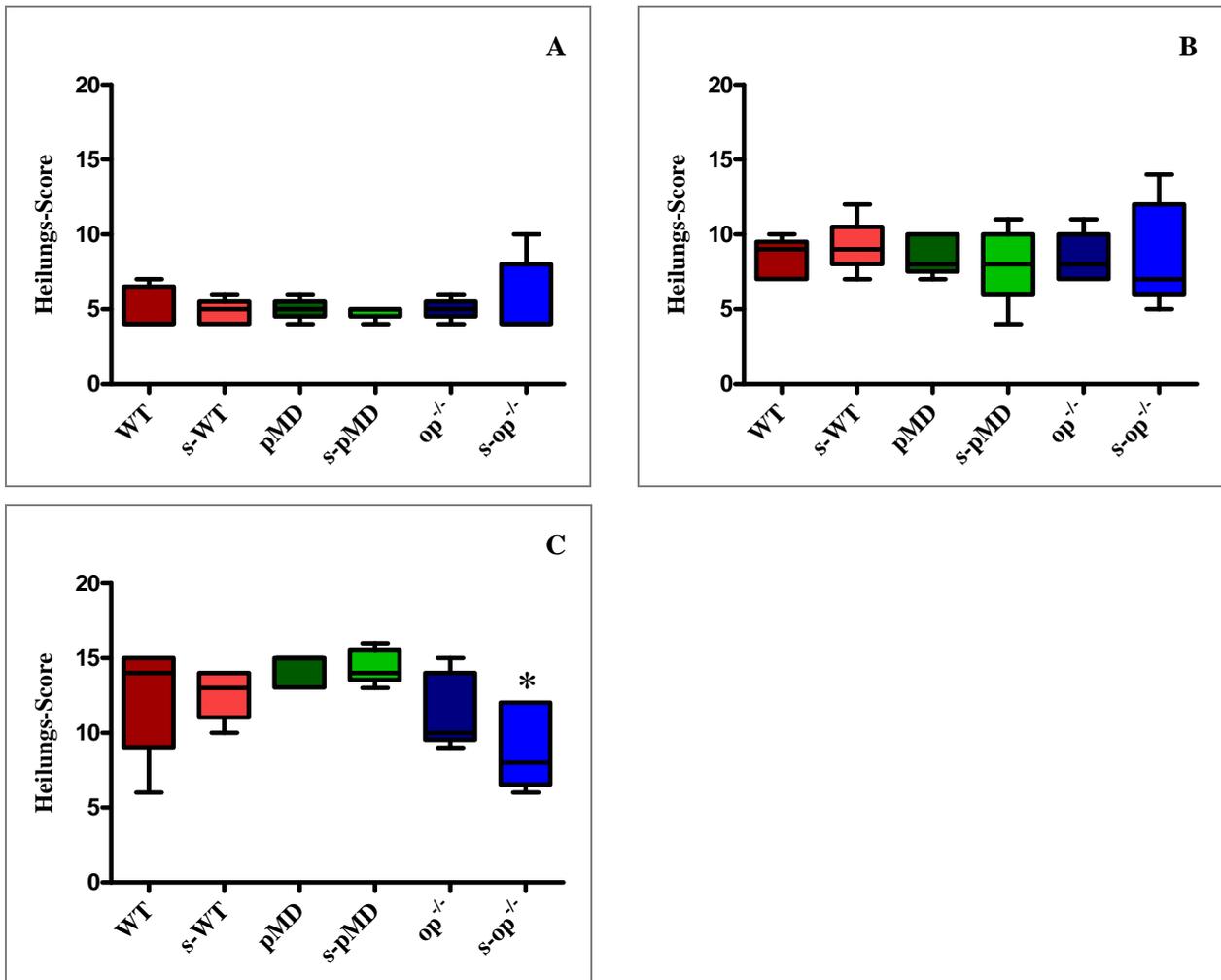


Abbildung 12: Die Diagramme zeigen den Heilungs-Score (AHS) der 6 Gruppen in Bezug auf die transanastomotische Überbrückung nach 2 (A), 5 (B) und 10 (C) Tagen (Mittelwert \pm SD, $n = 5-6$, * = $p < 0,05$). Die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis ließen als einzige einen signifikant niedrigeren AHS an Tag 10 im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ohne und mit Peritonitis erfassen.

Bei der Ermittlung des Scores für die Entzündungsreaktion zeigten sich nach 2 Tagen bei den 6 Versuchsgruppen annähernd gleiche Ergebnisse: WT: $6,4 \pm 0,6$; s-WT: $6 \pm 0,7$; pMD: $6,4 \pm 0,6$; s-pMD: $6,6 \pm 0,9$; $op^{-/-}$: $6,7 \pm 0,5$; $s-op^{-/-}$: $6 \pm 0,7$. Nach 5 Tagen lag der Score für die

Entzündungsreaktion bei allen Gruppen auf einem leicht erhöhten Niveau, nur die Wildtyp-Mäuse mit Peritonitis zeigten einen konstanten Wert (WT: $7,2 \pm 1,1$; s-WT: $6 \pm 0,7$; pMD: $7,8 \pm 0,8$; s-pMD: $7,2 \pm 0,8$; op^{-/-}: $7,8 \pm 1,1$; s-op^{-/-}: $7,4 \pm 1,1$). Am 10. Tag war die Entzündungsreaktion bei allen Versuchsgruppen außer den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis und den pharmakologisch depletierten Mäusen mit Peritonitis rückläufig (WT: $6,6 \pm 0,9$; s-WT: $6,2 \pm 1,3$; pMD: $6,8 \pm 1,1$; s-pMD: $7,4 \pm 0,9$; op^{-/-}: $7,4 \pm 1,3$; s-op^{-/-}: $6,8 \pm 0,8$). Zu allen Zeitpunkten erbrachte der Vergleich aller Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen und der Peritonitis-Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis keine signifikanten Unterschiede (Abb. 13).

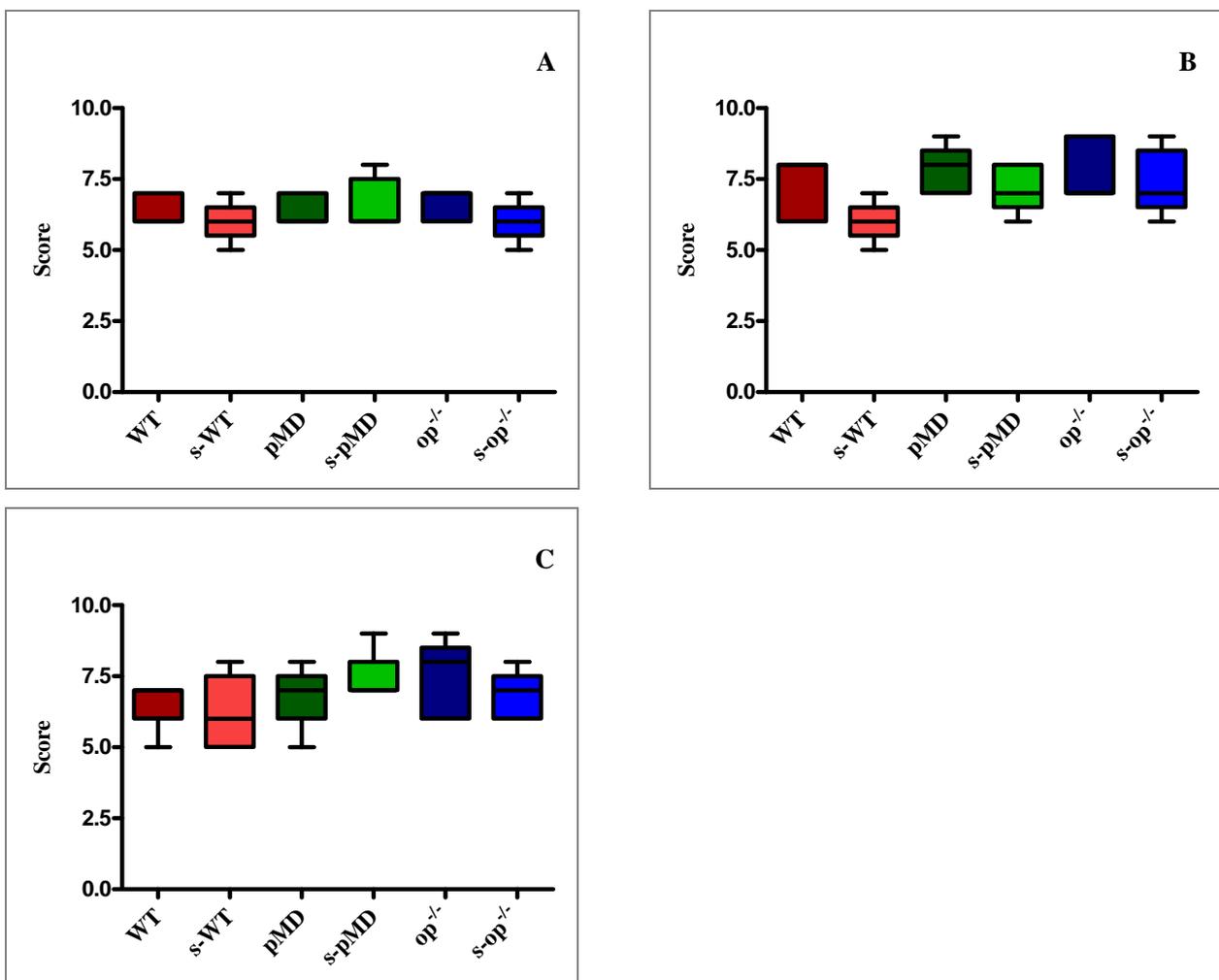


Abbildung 13: Zur Darstellung kommt der Score der verschiedenen Versuchsgruppen als Maß für die Entzündungsreaktion nach 2 (A), 5 (B) und 10 (C) Tagen (Mittelwert \pm SD, $n = 5-6$). Der Vergleich aller Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen und der Peritonitis-Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis zeigte zu allen Zeitpunkten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Anhand exemplarischer Fotos HE gefärbter Präparate der einzelnen Versuchsgruppen konnte nicht nur die Wundheilung modellhaft nachvollzogen werden, sondern auch die bezüglich des Heilungs-Scores getroffenen Aussagen verifiziert werden. Die Versuchszeitpunkte repräsentieren die drei oben genannten Phasen der Wundheilung. Insgesamt zeigte sich vom 2. über den 5. bis zum 10. Tag eine zunehmende Wundheilung. In den frühen Phasen (Tag 2 und 5) ist die Naht für die Stabilität der Anastomose von entscheidender Bedeutung, da das neu entstandene Granulationsgewebe diese noch nicht gewährleisten kann. Am 10. Tag war eine zunehmende Reepithelisierung neben dem Umbau des Granulationsgewebes zu definitivem Narbengewebe erkennbar. Der Prozess der Reepithelisierung war bei den Osteopetrosis-Mäusen mit Peritonitis am wenigsten weit fortgeschritten. Die übrigen Versuchsgruppen ließen zu keinem Zeitpunkt Wundheilungsstörungen erkennen. Die Anastomose liegt jeweils in der Bildmitte und die Mukosa ist nach oben gerichtet (Abb. 14-16).

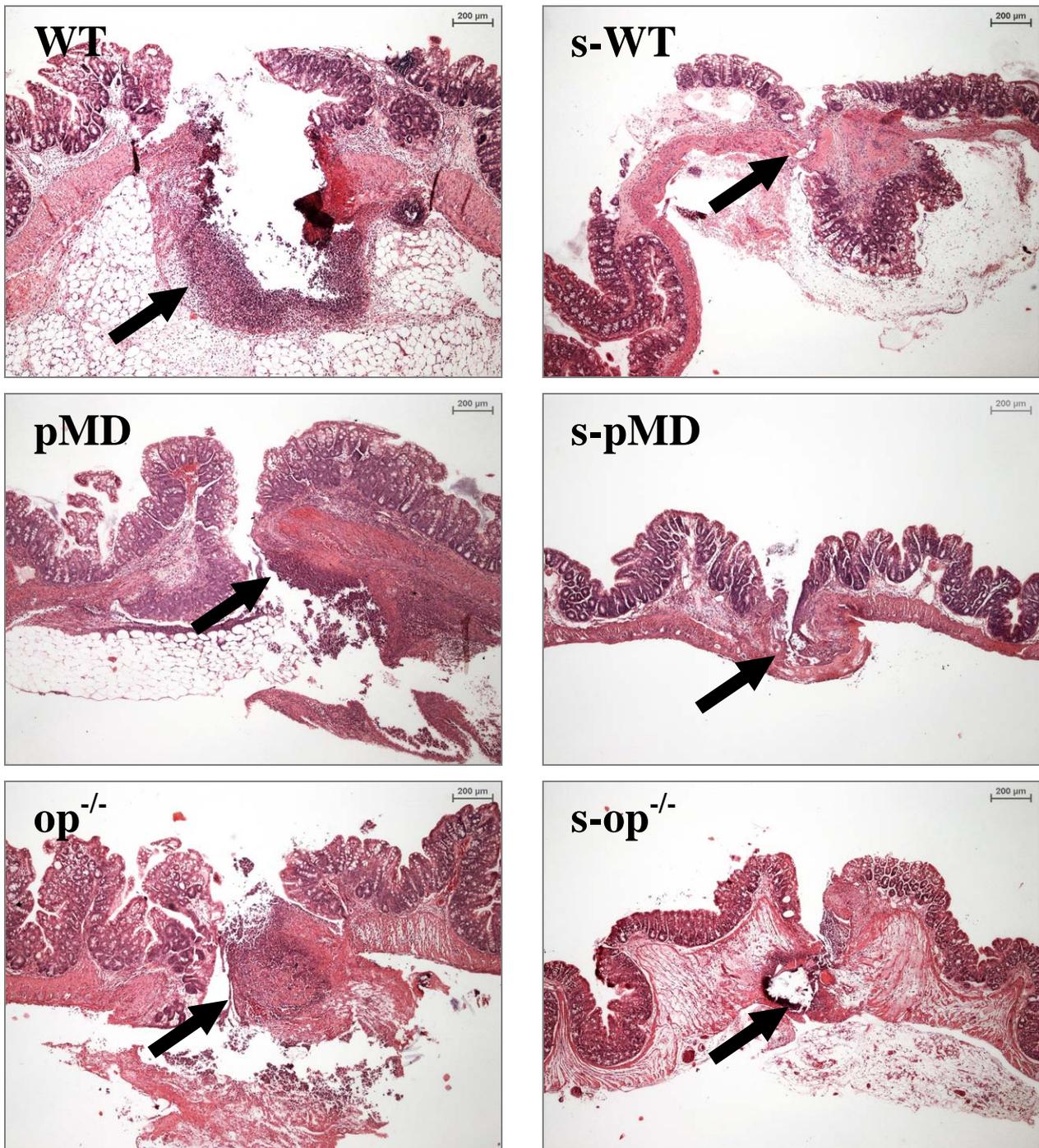


Abbildung 14: Die mikroskopischen Aufnahmen (40-fache Vergrößerung) veranschaulichen die Anastomosenheilung der jeweiligen Versuchsgruppen. Nach 2 Tagen ist die exsudative Phase der Wundheilung (0. - 4. Tag) im vollen Gange. Es kommt zur Migration verschiedener Zellpopulationen (Makrophagen, Thrombozyten, Granulozyten) in die Anastomosenregion, was deutlicher bei den Gruppen ohne Peritonitis zu sehen ist (s. Markierungen). Ansonsten werden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen augenscheinlich. Es ist also ein provisorischer Wundverschluss entstanden, der die Anastomose zu diesem frühen Zeitpunkt zusammen mit der Naht vor mechanischen Einwirkungen und Infektionen schützt.

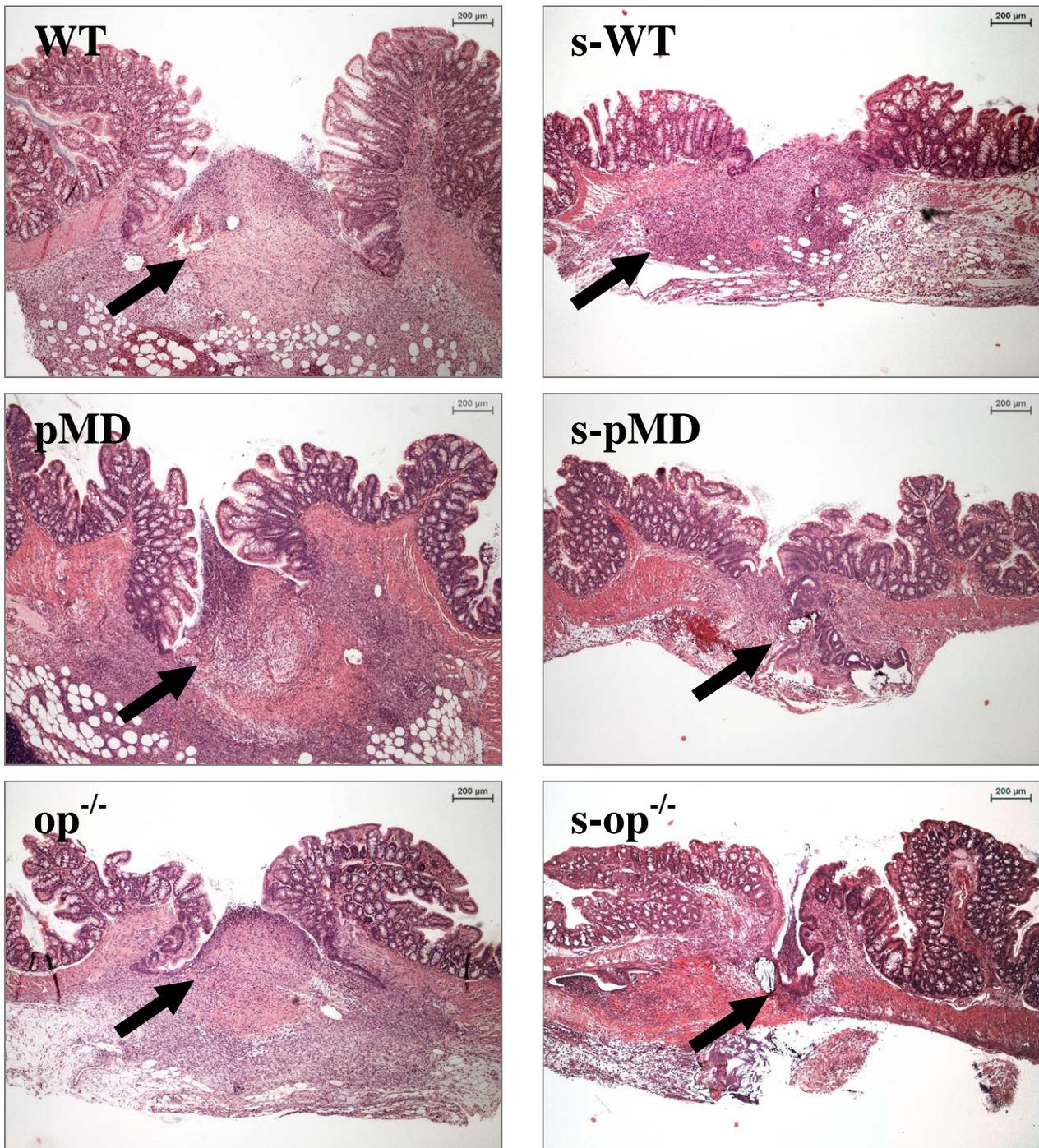


Abbildung 15: Nach 5 Tagen zeigen die mikroskopischen Fotos (40-fache Vergrößerung) der HE Präparate eine fortgeschrittene Phase der Wundheilung, die proliferative Phase (3. – 14. Tag). Vorherrschend ist das im Vergleich zum 2. Tag nun stärker ausgeprägte Granulationsgewebe, welches eine Übergangsmatrix mit hoher Zelldichte und ohne epitheliale Oberfläche darstellt. Allerdings scheinen die Mäuse mit Peritonitis auf diesen exemplarischen Bildern weniger Granulationsgewebe aufzuweisen als die Mäuse ohne Peritonitis (s. Markierungen). Es lassen sich aber keine mikroskopisch fassbaren Heilungsstörungen feststellen.

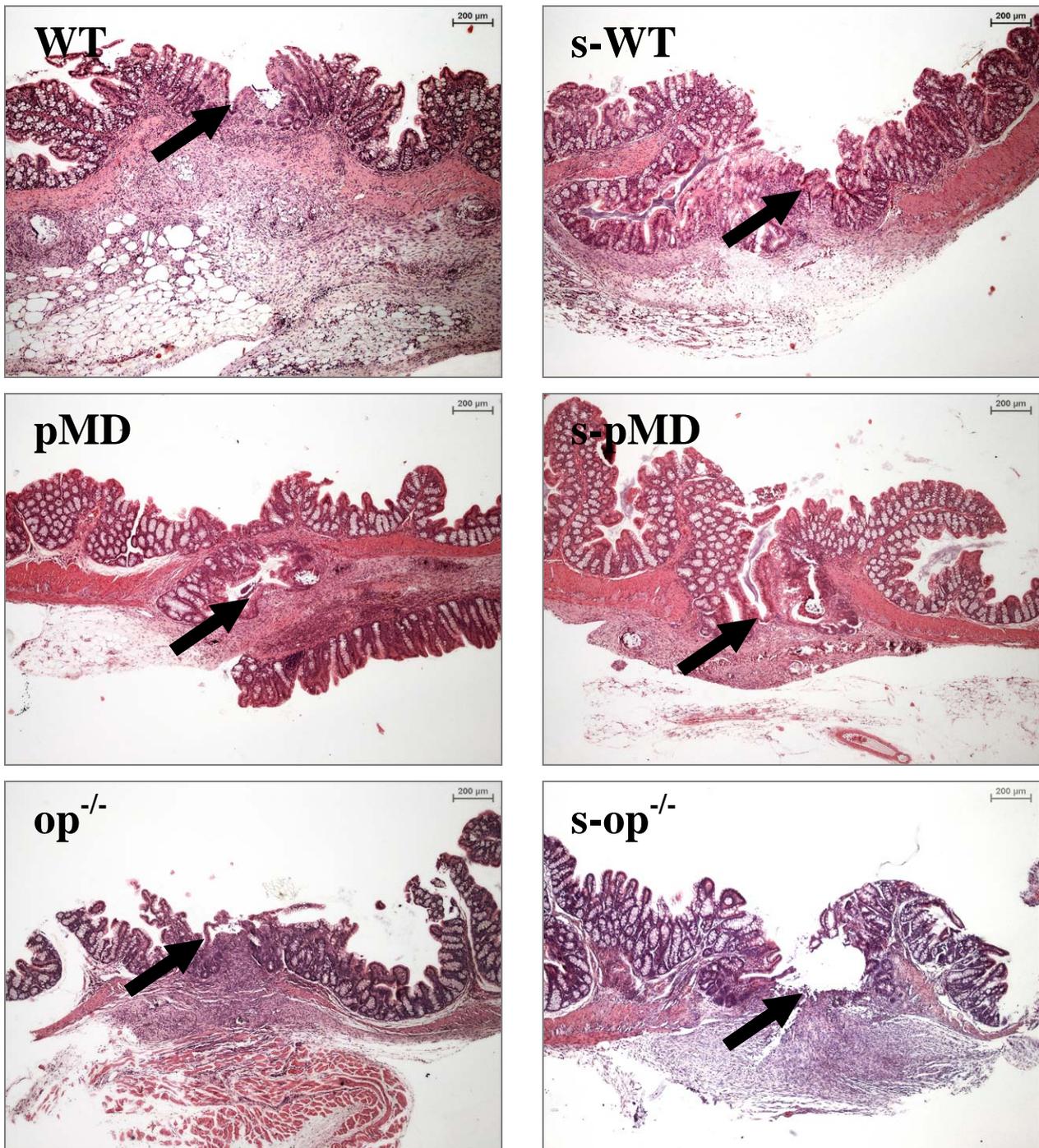


Abbildung 16: Die mikroskopischen Aufnahmen (40-fache Vergrößerung) der HE gefärbten Darmwand veranschaulichen die Anastomosenheilung der entsprechenden Gruppen nach 10 Tagen. An diesem Tag überschneidet sich die proliferative mit der reparativen Wundheilungsphase (10. – 80. Tag). Das Granulationsgewebe mit seiner hohen Zellzahl nimmt fortwährend ab und wird durch das definitive Narbengewebe ersetzt. Im Vergleich zum 5. Tag ist eine beginnende Reepithelisierung erkennbar. Dieser Prozess scheint bei den Osteopetrosis-Tieren mit Peritonitis am wenigsten weit fortgeschritten (s. Markierungen). Es zeigen sich keine weiteren Heilungsstörungen.

4.6 Polarisationsoptische Untersuchungen

Mit Hilfe der Sirius-Färbungen und deren polarisationsoptischen Aufnahmen konnte die Anastomosenheilung ergänzend zu den HE-Färbungen vor allem im Hinblick auf den Kollagenstoffwechsel nachvollzogen werden. Hierzu wurden exemplarische Präparate der einzelnen Versuchsgruppen und der verschiedenen Zeitpunkte ausgewählt und unter Kreuzpolarisationsmikroskopie betrachtet und fotografiert.

Insgesamt konnte man feststellen, dass es vom 2. über den 5. bis zum 10. Tag zu einer Zunahme von Kollagen Typ I (orange-rötlich) und III (gelb-grünlich) kommt. Ein dichtes Muster der Kollagendeposition zeigte sich vor allem in der Tela submucosa. Die Wundheilung konnte in allen Versuchsgruppen ohne augenscheinliche Heilungsstörungen im Hinblick auf den Kollagenstoffwechsel ihren Lauf nehmen. Die Anastomose liegt jeweils in der Bildmitte und die Mukosa ist nach oben gerichtet (Abb. 17-19).

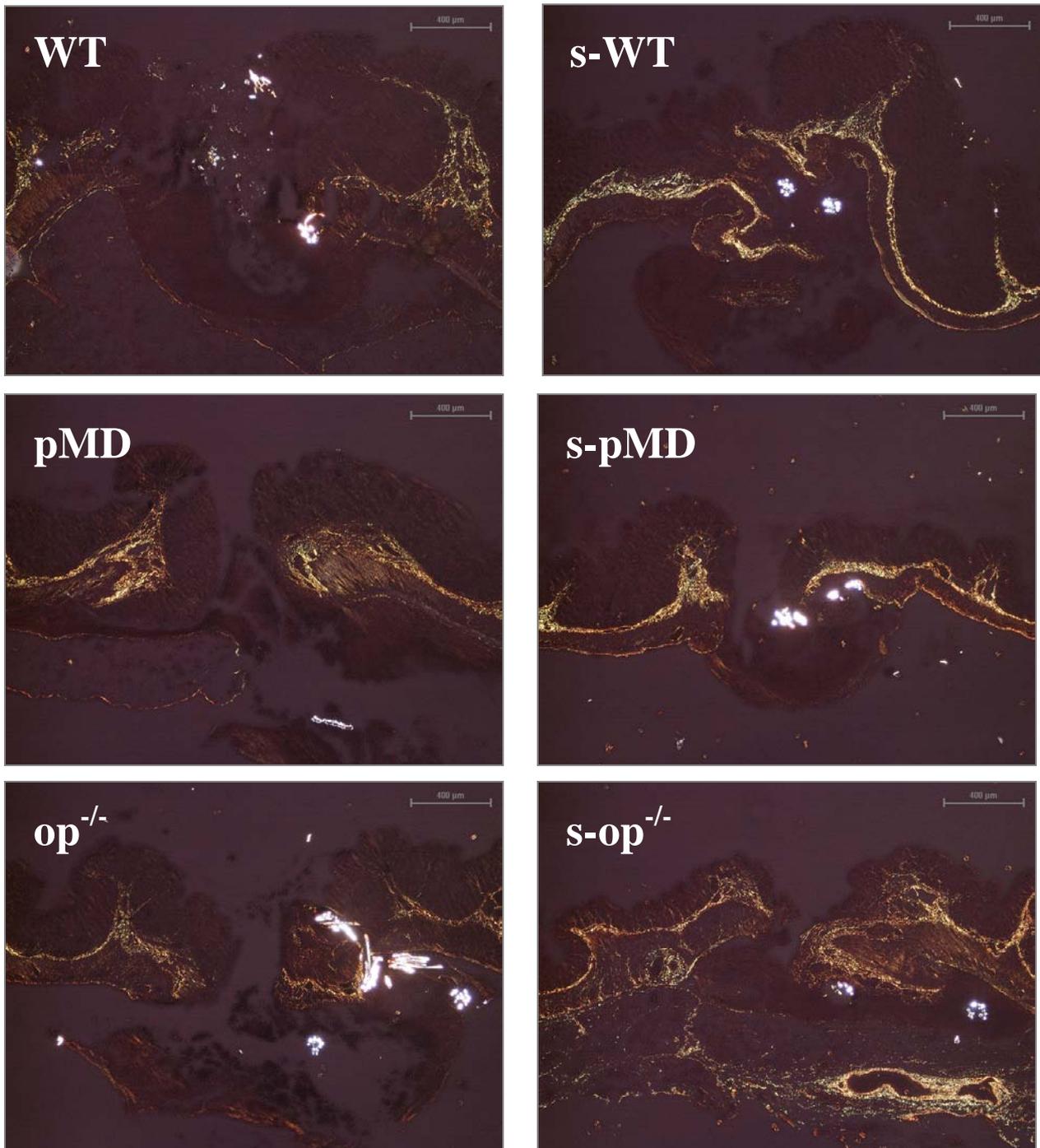


Abbildung 17: Die polarisationsoptischen Aufnahmen (40-fache Vergrößerung) zeigen die Kollagen Typ I- und III-Verteilung nach 2 Tagen. Die Anastomose befindet sich hier in der Phase, in der es zur Ausbildung eines Ödems und zur maximalen Reduktion von Kollagen Typ I und III kommt. Die Kollagenolyse erreicht am 3. Tag ihr Maximum und ist in den Wundrändern besonders stark ausgeprägt. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen lassen sich keine mikroskopisch fassbaren Unterschiede erkennen.

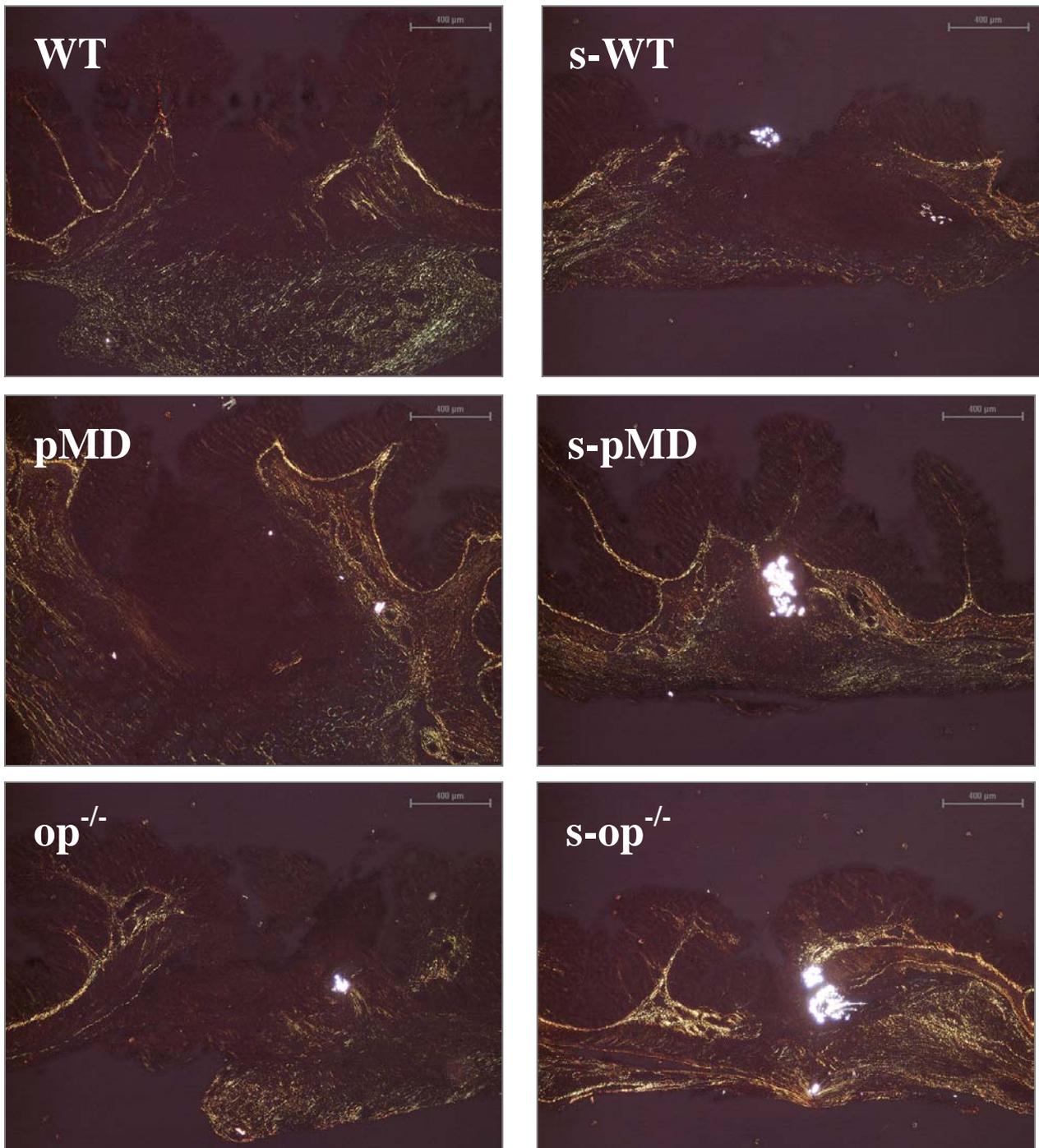


Abbildung 18: Nach 5 Tagen veranschaulichen die polarisationsoptischen Fotos (40-fache Vergrößerung) der Siriusgefärbten Präparate eine fortgeschrittene Phase der Wundheilung. Im Vergleich zum 2. postoperativen Tag ist neues Kollagen Typ I und III entstanden, was man an der Zunahme der orange-rötlichen und gelb-grünlichen Fasern auch in den Anastomosenbereich hinein erkennen kann. Es lassen sich weiterhin keine Wundheilungsstörungen beim Vergleich der verschiedenen Gruppen erfassen.

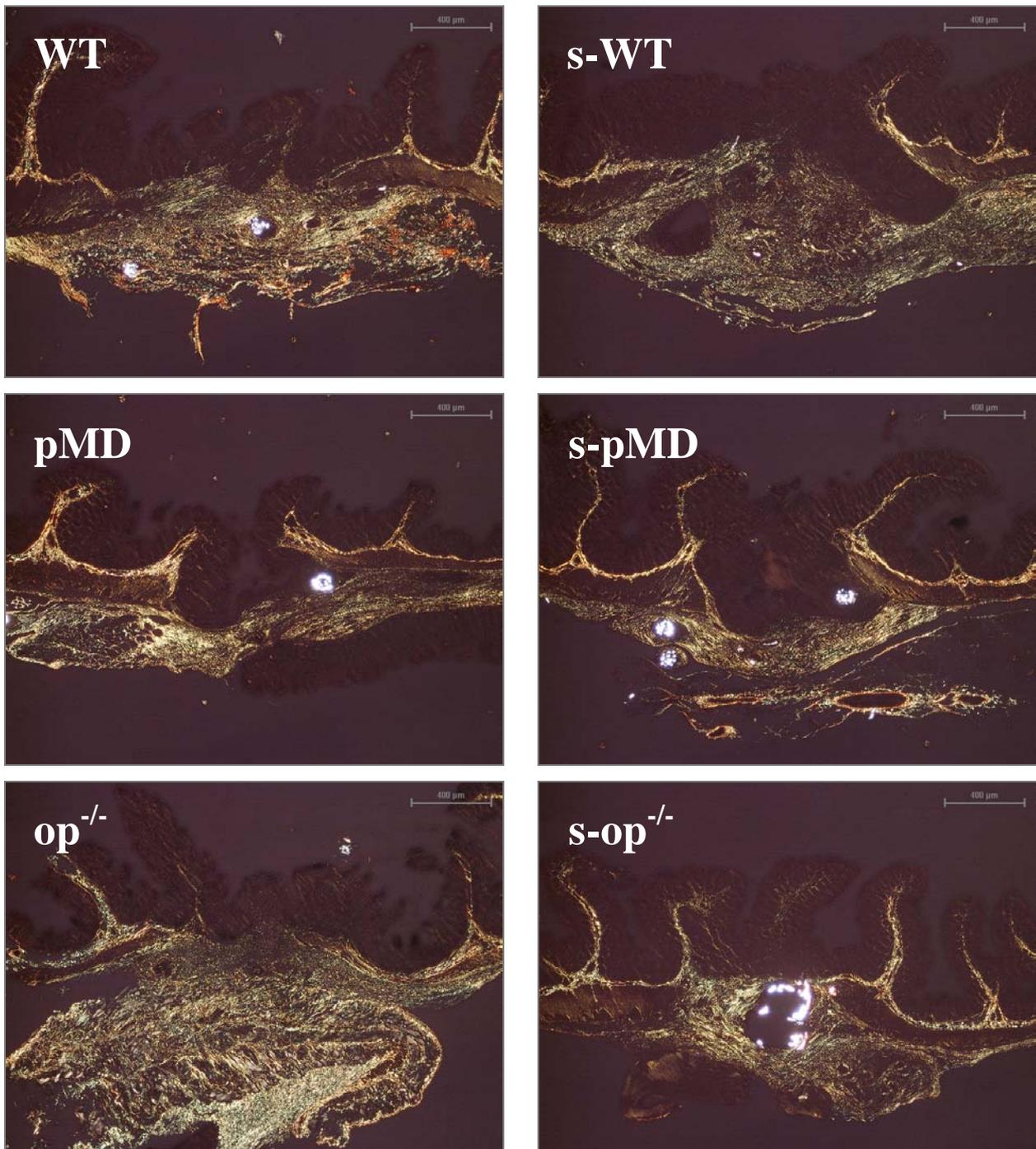


Abbildung 19: Die polarisationsoptischen Aufnahmen (40-fache Vergrößerung) der Sirius-gefärbten Präparate zeigen die Anastrophenheilung der Versuchsgruppen im Hinblick auf den Kollagenstoffwechsel. Nach 10 Tagen wird deutlich, dass durch die in der proliferativen Phase überwiegende Kollagenbiosynthese ein definitiver Wundverschluss entstanden ist. Es findet eine zunehmende Quervernetzung des Kollagens statt und das bis jetzt im Granulationsgewebe vorherrschende mechanisch instabile Kollagen Typ III (gelb-grünlich) wird zum mechanisch festeren Kollagen Typ I (orange-rötlich) umgewandelt. Mikroskopisch sind keine eindeutigen Wundheilungsstörungen fassbar.

4.7 Funktionelle Untersuchungen

Zur Messung der mechanischen Festigkeit wurde der Anastomosen-Berstungsdruck (ABP) nach 2, 5 und 10 Tagen ermittelt. Insgesamt zeigte sich eine Zunahme des ABP aller Versuchsgruppen im Verlauf der drei Zeitpunkte. Nach 2 Tagen erreichte der mittlere ABP folgende Werte (in mmHg): WT: $12,7 \pm 2,1$, s-WT: $13 \pm 2,4$, pMD: $14,1 \pm 2,7$, s-pMD: $10,7 \pm 2$, $op^{-/-}$: 9 ± 2 und $s-op^{-/-}$: $11,8 \pm 1,5$. Der Vergleich aller Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen und der Peritonitis-Gruppen zu den Wildtyp-Mäusen mit Peritonitis ließ keine signifikanten Unterschiede feststellen. Nach 5 Tagen erzielten die Versuchsgruppen folgende Werte (in mmHg): WT: $15,2 \pm 2,7$, s-WT: $17,1 \pm 2,5$, pMD: $18,6 \pm 5,7$, s-pMD: $23,2 \pm 6,1$, $op^{-/-}$: $16,2 \pm 5,4$ und $s-op^{-/-}$: $16,1 \pm 3,8$. Die entsprechenden statistischen Tests ergaben keine signifikanten Unterschiede. Am 10. Tag erreichten die Gruppen folgende Ergebnisse (in mmHg): WT: $26,6 \pm 3,4$, s-WT: $28,3 \pm 5,5$, pMD: $31,4 \pm 6$, s-pMD: $32,1 \pm 5,9$, $op^{-/-}$: $26,1 \pm 1$ und $s-op^{-/-}$: $18,3 \pm 3,2$. Beim Vergleich der Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis zu den Wildtyp-Mäusen ohne und mit Peritonitis wurde statistische Signifikanz erreicht. Die weiteren Vergleiche erfassten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 20).

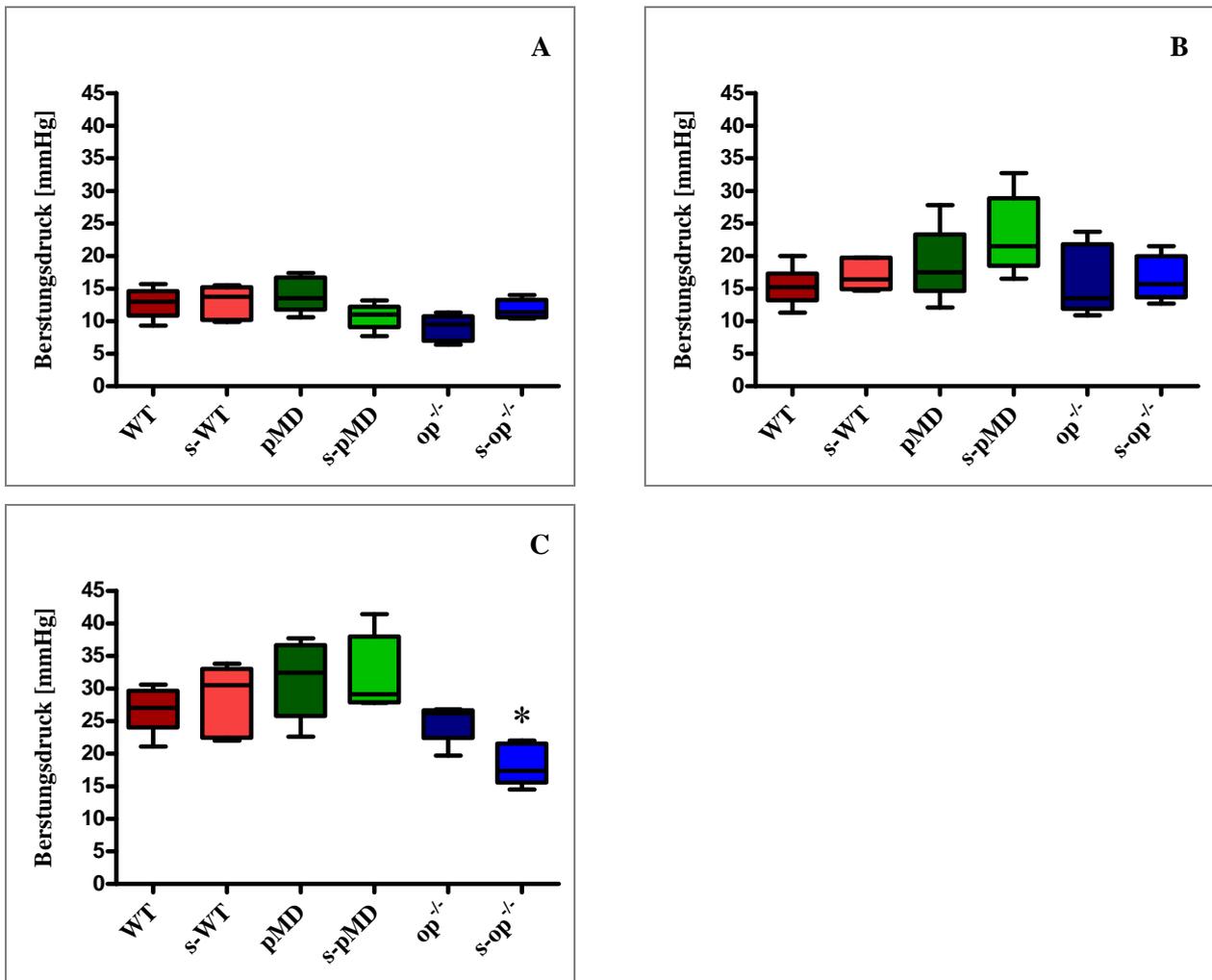


Abbildung 20: Dargestellt sind die Anastomosen-Berstungsdruck-Messungen (ABP) [mmHg] der einzelnen Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten 2 (A), 5 (B) und 10 (C) Tagen (Mittelwert \pm SD, $n = 5-11$, * = $p < 0,05$). Es zeigte sich insgesamt eine Zunahme des ABP aller Versuchsgruppen im Verlauf der drei Zeitpunkte. An Tag 10 (C) wurde ein signifikant niedrigerer ABP für die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis zu den Wildtyp-Mäusen ohne und mit Peritonitis erreicht. Darüber hinaus konnten zu keinem Zeitpunkt weitere Signifikanzen erhoben werden.

5 Diskussion

Die postoperative, intestinale Entzündungsreaktion, an deren initialer Entstehung die residenten Makrophagen der Tunica muscularis entscheidend beteiligt sind, wird als maßgeblicher pathophysiologischer Mechanismus des POI angesehen (Kalff et al., 1998b; Schwarz et al., 2004; Wehner et al., 2005). Eine perioperative pharmakologische Inhibition dieser Zellen ist daher ein potentieller Ansatz zur Prophylaxe postoperativer Darmmotilitätsstörungen (Wehner et al., 2007). Eine Problematik könnte sich durch die mögliche negative Auswirkung der Makrophagen-Depletion auf die gastrointestinale Anastomosenheilung ergeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern die pharmakologische Depletion und Inaktivierung bzw. das genetisch bedingte Fehlen der residenten Muskularis-Makrophagen die Heilung von Dickdarmanastomosen auch in Anwesenheit eines zweiten Schädigungsparameters, der Peritonitis und Endotoxinämie, negativ beeinflusst. Die Anastomosenheilung wurde mittels klinischer und experimenteller Parameter beurteilt. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die perioperative pharmakologische Makrophagendepletion und -inhibition in den ersten 10 postoperativen Tagen keine Beeinträchtigung der Anastomosenheilung am Dickdarm weder unter „normalen“ Bedingungen noch in Anwesenheit des „second-hit“-Parameters Peritonitis zur Folge hat. Das genetisch bedingte, dauerhafte Fehlen der residenten Muskularis-Makrophagen resultiert hingegen nach 10 Tagen in einer gestörten Anastomosenheilung.

Zur Induktion einer Peritonitis und Endotoxinämie stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. In den Versuchen dieser vorliegenden Arbeit haben wir die intraabdominellen LPS-Injektion gewählt. Alternativ sind im Mausmodell auch die sog. zökale Ligatur und Punktion (Cecal Ligation and Puncture, CLP) oder die Stentung des Kolon ascendens (Colon Ascendens Stent Peritonitis, CASP) etabliert. Diese führen zu einem standardisierten Austritt von Stuhl in die Bauchhöhle über mehrere Tage und hierdurch zu einer polymikrobiellen kotigen Peritonitis und Sepsis mit hoher Letalität (Maier et al., 2004; Teke et al., 2007). Die intraabdominelle LPS-Injektion ist eine im Rahmen vieler Sepsisstudien im Tierversuch häufig angewandte und standardisierte Methode zur Peritonitisinduktion (Ishimura et al., 2002; Thornton et al., 1997). Vorteile sind die einfache technische Durchführbarkeit, die geringe Störanfälligkeit und die relativ niedrige Sterblichkeit, sodass die Versuche zur Anastomosenheilung auch im Langzeitverlauf (> 3 Tage) möglich werden. Zudem lässt sich diese Methode gewichtsadaptiert einsetzen, was gerade für die Osteopetrosis-Mäuse im Hinblick auf ihre schlechtere Konstitution von großer

Bedeutung ist. Nachteil der CLP-Methode für unseren Versuchsansatz ist die hohe Variabilität des Ausmaßes der inflammatorischen Reaktion, welche abhängig von der Anzahl der Punktionen, der Nadelgröße sowie dem Abstand zwischen Bauhin'scher Klappe und Lokalisation der Ligatur ist (Otero-Antón et al., 2001; Singleton und Wischmeyer, 2003). Bei der CASP-Methode, bei der kontinuierlich endoluminale Bakterien in die Peritonealhöhle gelangen, ist das Ausmaß der Peritonitis vom Stentdurchmesser abhängig (Maier et al., 2004). Das CLP- und das CASP-Modell immitieren zwar prinzipiell die qualitativen und quantitativen Abläufe der Entzündungsreaktion bei Vorliegen einer Peritonitis besser, sind jedoch in unserem Modell vor allem aus Gründen der Reproduzierbarkeit und des zusätzlichen operativen Traumas verbunden mit einer hohen Letalität der induzierten kotigen Peritonitis selbst weniger geeignet (Overhaus et al., 2004).

Hauptziel unserer experimentellen Studie war ferner nicht, die Anastomosenheilung in einem Peritonitismodell zu untersuchen. Im Zusammenhang solcher „Peritonitisstudien“ muss zudem Ursache und Wirkung genauer definiert werden: 1. Erfolgt die Anastomosenanlage bei Vorliegen einer Peritonitis oder 2. bedingt eine Anastomoseninsuffizienz eine nachfolgende Peritonitis oder 3. hat der Patient eine Sepsis anderer Genese und eine Kolonresektion mit Anastomosenanlage wird notwendig. In unserem Modell steht vielmehr die Rolle der residenten Muskularis-Makrophagen bei der Anastomosenheilung nicht nur unter ungestörten Wundheilungsbedingungen, sondern auch bei Vorliegen eines zweiten Schädigungsparameters im Vordergrund. In Anlehnung an eine auch in der Klinik häufige Konstellation (Anastomosenheilung bei Patienten mit Infektionen) haben wir in unserer Studie den „second-hit“-Parameter Peritonitis hinzugezogen.

Die Rolle inflammatorischer Zellen bei der Wundheilung ist bisher vor allem anhand von Hautwunden untersucht worden. Ihre Funktion als Schlüssel zu einer regelhaften Wundheilung wird kontrovers diskutiert. Verschiedene Autoren schreiben den Makrophagen eine entscheidende Rolle bei den komplexen und hochdifferenzierten Vorgängen der Wundheilung zu (Park und Barbul, 2004; Pull et al., 2004). So zeigten schon Untersuchungen in den 70er Jahren, dass die Depletion von Makrophagen mit Antiserum und Steroiden einen negativen Einfluss auf die Heilung von Hautwunden hat (Leibovich und Ross, 1975). Portera et al. (1997) unterstützen diese Ergebnisse mit der Beobachtung, dass eine immunmodulatorisch gesteigerte Makrophagenfunktion die Zugfestigkeit von experimentellen Haut- und Kolonwunden erhöht. Außerdem konnten sie eine positive Korrelation zwischen der gesteigerten Makrophagenfunktion, der

Kollagenbiosynthese und der Zugfestigkeit herstellen. Compton et al. (1996) beschreiben entsprechende Ergebnisse bei der Heilung von Dünndarmanastomosen im Rattenmodell.

Entgegen diesen Resultaten konnten Martin et al. (2003) bei der Untersuchung von Hautwunden an makrophagenlosen Mäusen eine in Dauer und Verlauf regelhafte Wundheilung unter ungestörten Heilungsbedingungen (Antibiotikaprophylaxe) nachweisen. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte diese Beobachtung anhand eines intestinalen Wundheilungsmodells bestätigen. Sowohl die perioperative pharmakologische Depletion als auch das genetisch bedingte Fehlen der residenten Muskularis-Makrophagen führten in den ersten zwei Wochen nach Anastomosenanlage nicht zu einer Beeinträchtigung der Heilung von Dünndarmanastomosen (Pantelis et al., 2010). Andere Arbeitsgruppen konnten sogar zeigen, dass die Depletion der Entzündungszellen eine gesteigerte Wundheilung bedingt (Dovi et al., 2003; Martin und Leibovich, 2005).

Die Rolle der Makrophagen im Rahmen der Wundheilung wurde bisher insbesondere unter ungestörten Heilungsbedingungen untersucht. Heilungsstörungen nach intestinaler Anastomosenanlage werden jedoch vor allem bei Anwesenheit eines zweiten Schädigungsparameters, wie der Peritonitis und Endotoxinämie, beschrieben. Ishimura et al. (1998) wiesen nach, dass die inflammatorische Reaktion, die für eine erfolgreiche Wundheilung notwendig ist, unter diesen Umständen unterdrückt ist. Laut Rico et al. (2001) sind sowohl die entzündlichen als auch die proliferativen Prozesse der Wundheilung bei Vorliegen einer systemischen Infektion verändert. Heilungsstörungen können demnach zu einer erhöhten Rate von AI führen, was letztlich in einer erhöhten Morbidität und Mortalität endet. Daher wurden neben experimentellen auch klinische Parameter zur Beurteilung der Anastomosenheilung herangezogen. Untersucht wurden die Letalitäten und deren Ursachen sowie der Allgemeinzustand, die Gewichtsverläufe und die intra-abdominellen Adhäsionen. Die Untersuchungszeitpunkte, vor allem die der histochemischen und mechanischen Parameter, wurden so gewählt, dass sie die einzelnen Phasen der Wundheilung repräsentieren. Der 2. postoperative Tag entspricht der exsudativen Phase, der 5. Tag der proliferativen Phase und der 10. Tag der reparativen Phase der Anastomosenheilung. So konnte nicht nur untersucht werden, ob es zu Heilungsstörungen kommt, sondern auch in welcher Heilungsphase diese auftreten und welche Rolle die Makrophagen in den unterschiedlichen Phasen spielen.

Im klinischen postoperative Verlauf zeigte sich, dass die pharmakologisch und genetisch depletierten Gruppen erhöhte Sterberaten im Vergleich zu den Wildtyp-Gruppen aufwiesen. Eine

Erklärung für die höhere Letalität der pharmakologisch depletierten Gruppen könnte ein zusätzlicher immunsupprimierender Effekt sein, der durch die Depletion weiterer phagozytär aktiver Zellpopulationen entsteht (Naito et al., 1996). Die erhöhte Sterblichkeit der Osteopetrosis-Mäuse lässt sich durch die allgemeine Immunschwäche aufgrund der systemischen Makrophagen-Armut erklären (Mikkelsen und Thuneberg, 1999). Im Bezug auf die Ursachen der Letalitäten konnte entgegen den Postulierungen von Ishimura et al. (1998) und Rico et al. (2001) weder unter ungestörten Wundheilungsbedingungen noch in Gegenwart der Endotoxinämie ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die AI-Raten erfasst werden. Der klinische Effekt der Endotoxinämie zeigte sich wie erwartet anhand eines reduzierten Allgemeinzustands und des Gewichtsverlusts der Gruppen mit Peritonitis in den ersten 2 Tagen nach LPS-Injektion. Somit bestätigen unsere Beobachtungen die von Ishimura et al. (2002) beschriebenen Effekte der intraperitonealen LPS-Gabe auf den Gewichtsverlauf. Auch vor dem Hintergrund der von uns verwendeten deutlich höheren LPS-Dosierung rechtfertigt sich die Anwendung unserer Methode zur Peritonitis-Induktion. Die Auswertung des Adhäsions-Scores erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen und komplettiert als letzter Parameter die klinischen Untersuchungen. Bei der Bewertung postoperativer intraabdomineller Adhäsionen existieren neben dem von uns gewählten rein beschreibenden Vorgehen Methoden für eine zusätzliche quantitative Auswertung, die eine präzisere Beurteilung ermöglichen (Junge et al., 2009). Da in unserer Studie jedoch der Fokus auf der Anastomosenheilung lag und die Adhäsionsbildung lediglich einen ergänzenden Faktor darstellt, haben wir uns auf die oben beschriebene qualitative Auswertung nach van der Ham (1993) beschränkt.

Wie bei Wehner et al. (2007) beschrieben, konnten wir die pharmakologische Makrophagen-Depletion mit einer Rate von 90 % und im Besonderen auch die Repopulation der residenten Muskularis-Makrophagen an Tag 3 mittel IHC nachweisen. Der Zeitverlauf korreliert mit der Intention einer perioperativen pharmakologischen Inhibition dieser Zellen zur Prophylaxe des POI. Zur Komplettierung der Untersuchungen wurde das genetische Makrophagen-Depletions-Modell hinzugezogen, um ebenfalls eine Aussage über Heilungsstörungen bei permanenter Abwesenheit der Muskularis-Makrophagen treffen zu können.

Im Bezug auf die experimentellen Parameter sollte auf molekularer Ebene untersucht werden, ob die Makrophagendepletion einen Einfluss auf die Genexpression von Komponenten der

extrazellulären Matrix wie Kollagen I und III hat. Neben diesen sind noch andere Faktoren, wie Proteoglykane, die Familie der Matrixmetalloproteinasen und die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) am Wiederaufbau der extrazellulären Matrix beteiligt, aber Stumpf et al. (2005) stellen den Kollagenmetabolismus bei der Beurteilung einer adäquaten Wundheilung in den Vordergrund. Alle Gruppen zeigten zunächst einen Abfall des Kollagen Typ I- und III-mRNA-Gehalts nach 12 und 24 Stunden. Erst nach 5 Tagen wurde ein Anstieg auf das Vielfache der Kontrollwerte erreicht. Entsprechend den vorgenannten Prinzipien der Wundheilung war dieser bei Kollagen Typ I stärker als bei Typ III. Wie schon Pantelis et al. (2010) nachweisen konnten, zeigten die makrophagendepletierten Gruppen ohne Peritonitis keine signifikanten Unterschiede zu der Wildtyp-Gruppe ohne Peritonitis. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Arendt et al. (1996) und Thornton et al. (1996), die bei Ratten mit intraabdomineller Infektion eine erniedrigte Kollagen Typ I- und III- Genexpression festgestellt haben, ließen die pharmakologisch depletierten Mäuse mit Peritonitis keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Gruppen erkennen. Dagegen scheint die „second-hit“-Konstellation Osteopetrosis-Mäuse und Endotoxinämie nach 5 Tagen die Kollagen I- und in noch deutlicherem Umfang die Kollagen III-mRNA-Expression negativ zu beeinflussen.

Zur weiteren Beurteilung des für die Wundheilung entscheidenden Kollagenmetabolismus wurde die Hydroxyprolin-Messung durchgeführt. Die Hydroxyprolin-Konzentration der Anastomosenregion stellt hierbei ein Maß für die Kollagenbiosynthese dar (Ishimura et al., 1998). Das Strukturprotein Kollagen dient vor allem in der frühen Phase der Anastomosenheilung als Nahtlager (de Hingh et al., 2006). Erstaunlicherweise war in unseren Untersuchungen nach 5 Tagen eine signifikant erniedrigte Hydroxyprolin-Konzentration der Anastomosenregion sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den pharmakologisch depletierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrolldarmsegmenten messbar. Entgegen der Studie von Ishimura et al. (2002), die am 7. Tag nach Kolonanastomosenanlage eine signifikant niedrigere Hydroxyprolin-Konzentration in der LPS-Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren feststellten, zeigte sich in unseren Untersuchungen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit Peritonitis im Vergleich zu den Wildtyp-Gruppen. Arbeiten von Rico et al. (2001) und Arendt et al. (1996) beschreiben ebenfalls signifikant erniedrigte Hydroxyprolin-Konzentrationen bei der Wundheilung von Mäusen bzw. Ratten unter septischen Bedingungen.

Die Auswertung der molekularbiologischen und biochemischen Parameter zeigt konsistente Ergebnisse. Der Anstieg des Kollagen Typ I- und III-mRNA-Gehalts korreliert am 5. Tag mit der

zu diesem Zeitpunkt noch erniedrigten Hydroxyprolin-Konzentration in der Anastomosenregion. Der Anstieg der Hydroxyprolin-Konzentration ist zeitversetzt zu einem späteren Zeitpunkt zu erwarten und seine Kenntnis würde eine weitere Präzision des zeitlichen Ablaufs der Heilung von Kolonanastomosen ermöglichen.

Die Anastomosenheilung wurde zudem mit Hilfe eines semiquantitativen Heilungs-Scores beurteilt. Mit dessen Hilfe lässt sich eine Aussage über die transanastomotische Überbrückung und die Entzündungsreaktion treffen. Im Hinblick auf die Überbrückung der Anastomose mit neuem Gewebe zeigte sich im Zeitverlauf ein Anstieg des Heilungs-Scores, was auf eine ungestörte Wundheilung schließen lässt. Die perioperativ makrophagendepletierten Tiere ohne und mit Peritonitis ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Wie schon die molekularbiologischen Untersuchungen, zeigten die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis anders als die entsprechenden Tiere ohne Peritonitis nach 10 Tagen einen signifikant erniedrigten Heilungs-Score im Vergleich zu den Wildtyp-Gruppen. Die Entzündungsreaktion zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse des AHS konnten anhand HE gefärbter Präparate der einzelnen Versuchsgruppen nachvollzogen werden und bestätigten die eben getroffenen Aussagen. Nach 2 und 5 Tagen ist die Naht für die Wundstabilität von entscheidender Bedeutung, da das zu diesen Zeitpunkten gebildete Granulationsgewebe nicht ausreicht um die Integrität der Anastomose zu gewährleisten (Linder, 1982). In dieser frühen Phase der Wundheilung, die laut Kasperk et al. (2000) und Sorensen et al. (1999) aufgrund erhöhter Insuffizienzzraten eine kritische Zeitspanne umfasst, lassen sich anhand unserer Präparate keine Heilungsstörungen feststellen. Am 10. Tag ist der Prozess der Reepithelisierung in Korrelation zum AHS bei den Osteopetrosis-Tieren mit Peritonitis am wenigsten weit fortgeschritten.

Für die Integrität der intestinalen Wand spielt das Strukturprotein Kollagen eine entscheidende Rolle (Mastboom et al., 1989). Die Anastomosenfestigkeit beruht auf Menge und Qualität des Kollagens, welches vornehmlich in der Submukosa gebildet wird. Diese gewährleistet initial in ihrer Funktion als Nahtlager die mechanische Stabilität der Darmwand (Jonsson et al., 1983). In der reparativen Phase der Wundheilung findet eine zunehmende Quervernetzung des Kollagens statt und das im Granulationsgewebe vorherrschende mechanisch instabile Kollagen Typ III wird zum mechanisch stabilen Kollagen Typ I des definitiven Narbengewebes. Das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III bestimmt die Reißkraft und mechanische Stabilität sowohl des Bindegewebes als auch der entstehenden Narbe (Friedman et al., 1993).

In der Kreuzpolarisationsmikroskopie der Sirius-gefärbten Präparate konnte keine deutliche Störung der Kollagendeposition der makrophagendepletierten Gruppen im Vergleich zu den Wildtyp-Gruppen festgestellt werden. Die Ablagerung des Kollagens fand überwiegend in der Submukosa statt, wie schon bei Mastboom et al. (1989) und Jonsson et al. (1983) beschrieben. Am 2. Tag wurde eine Reduktion der Kollagen Typ I- und III-Fasern, vor allem in den Wundrändern, augenscheinlich. Wie schon von Brasken et al. (1991) beschrieben, geht dies mit einem deutlichen Stabilitätsverlust einher. Nach 5 Tagen war vor allem das noch unreife Kollagen Typ III zu sehen, während sich wie zu erwarten am 10. Tag das Kollagen Typ I- zu III-Verhältnis zugunsten von Kollagen Typ I verändert hatte. Die Methode der Kreuzpolarisation lässt in dieser Form nur eine Beschreibung der Ergebnisse zu. Für weitere Untersuchungen wäre eine quantitative Messung der Kollagen-Subtypen eine interessante Möglichkeit Heilungsstörungen zu erfassen. Stumpf et al. (2005) konnten z.B. unter Zuhilfenahme einer digitalen Image Software den Kollagen I/III-Quotient, also die Kollagenratio, bestimmen.

Als wichtigsten Parameter zur Beurteilung einer regelhaften Anastomosenheilung wurde der Anastomosen-Berstungsdruck gemessen. Diese Methode wird in zahlreichen Studien zur quantitativen Bestimmung der Reißfestigkeit von Anastomosen eingesetzt. Mit Hilfe des ABP lässt sich genau bestimmen, ob und wie weit die Wundheilung fortgeschritten ist und dem intraluminalen Druck standhalten kann. Andere Autoren wie Compton et al. (1996) und Portera et al. (1997) verwenden anstelle des ABP die Zugfestigkeit („tensile strength“), die den Widerstand einer Wunde gegen longitudinal gerichtete Kräfte misst. Im Vergleich entspricht diese aber nicht den in-vivo Bedingungen, denn die Anastomose muss intraluminalen Kräften einen Widerstand bieten (Hendriks und Mastboom, 1990).

Entsprechend dem AHS kam es auch beim ABP zu einer Zunahme desselben im Zeitverlauf. Die makrophagendepletierten Gruppen ohne Peritonitis zeigten in den ersten 10 Tagen keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Mäusen, was auf eine uneingeschränkte Anastomosenheilung schließen lässt. Dieses Ergebnis ist schon von Pantelis et al. (2010) anhand von Dünndarmanastomosen beschrieben worden und konnte an dieser Stelle an Dickdarm-anastomosen bestätigt werden. Studien von Ishimura et al.(2002) und Diller et al. (2009) ergaben bei Mäusen nach intraperitonealer LPS-Injektion signifikant niedrigere Berstungsdruckwerte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Entgegen diesen Ergebnissen ließen die pharmakologisch depletierten Mäuse mit Peritonitis keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Gruppen erkennen. Dagegen zeigten die Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis am 10. Tag

einen signifikant erniedrigten ABP. Die „second-hit“-Konstellation genetische Makrophagen-Depletion und Endotoxinämie lässt also wie schon beim AHS und der Kollagen Typ I- und III-Genexpression eine Beeinträchtigung der Anastomosenheilung, vor allem in den späteren Phasen der Wundheilung, erkennen. Die ausschließlich perioperative Depletion der Makrophagen, die für die Prophylaxe des POI interessant ist, hat keinen negativen Einfluss auf die Anastomosenheilung.

Unser Modell der Makrophagen-Depletion und -Inhibition durch die alternierende Gabe von Clodronat-Liposomen und Gadoliniumchlorid ist für den klinischen Gebrauch nicht geeignet. Der Beginn der Behandlung 4 Tage präoperativ ist weder praktikabel noch ökonomisch und ein systemischer immunsupprimierender Effekt durch die Depletion weiterer Phagozyten ist nicht auszuschließen. An dieser Stelle kommt die makrophagen-spezifische Inhibition des p38 MAPK-Signalweges durch Semapimod als vielversprechende Strategie in Frage. In einer Studie von Wehner et al. (2009) konnte Semapimod als möglicher pharmakologischer Wirkstoff zur Prophylaxe des POI identifiziert werden. Erste Ergebnisse der Berstungsdruck-Messung von Kolonanastomosen deuten darauf hin, dass eine regelrechte Wundheilung unter normalen Bedingungen stattfindet. Weitere Untersuchungen, vor allem im Hinblick auf gestörten Wundheilungsbedingungen wie im Modell der Peritonitis, stehen aus.

6 Zusammenfassung

Der postoperative Ileus (POI), an dessen initialer Entstehung die residenten Makrophagen der Tunica muscularis maßgeblich beteiligt sind, stellt bis heute eine der häufigsten Komplikationen nach chirurgischen Eingriffen dar und führt letztlich zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität. Eine perioperative pharmakologische Depletion der intestinalen Muskularis-Makrophagen ist daher ein potentieller Ansatz zur Prophylaxe der postoperativen Darmatonie, wenn die Depletion dieser Zellen nicht zu einer Beeinträchtigung wichtiger lokaler und immunologischer Schutz- und Reparaturfunktionen führt.

Die vorliegende Arbeit sollte die Fragestellung klären, ob die perioperative pharmakologische Depletion bzw. das genetisch bedingte, dauerhafte Fehlen der residenten Muskularis-Makrophagen negative Auswirkungen auf die Heilung von Dickdarmanastomosen auch in Anwesenheit eines zweiten Schädigungsparameters, der Peritonitis, hat. Die pharmakologische Depletion erfolgte hierbei durch die alternierende intravenöse Gabe von Clodronat-Liposomen und Gadoliniumchlorid ab dem 4. Tag präoperativ. Als genetisches Makrophagen-Depletionsmodell diente die Osteopetrosis-Maus, eine natürlich vorkommende Mutante, die eine verminderte Anzahl funktioneller Makrophagen im gesamten Organismus bei kompletter Abwesenheit der Makrophagen in der Tunica muscularis aufweist. Zur Induktion der Peritonitis und Endotoxinämie wurde den Tieren 24 Stunden vor Anastomosenanlage Lipopolysaccharid (LPS) intraperitoneal verabreicht, so dass sich folgende Versuchsgruppen ergaben: Gruppe 1: Wildtyp-Mäuse (WT), Gruppe 2: Wildtyp-Mäuse mit Peritonitis (s-WT), Gruppe 3: pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse (pMD), Gruppe 4: pharmakologisch makrophagendepletierte Mäuse mit Peritonitis (s-pMD), Gruppe 5: Osteopetrosis-Mäuse ($op^{-/-}$) und Gruppe 6: Osteopetrosis-Mäuse mit Peritonitis (s- $op^{-/-}$). Zur Untersuchung der Anastomosenheilung wurden neben klinischen Parametern wie den Letalitäten und deren Ursachen, dem Allgemeinzustand, dem Gewichtsverlust und dem Adhäsions-Score, experimentelle Parameter zu definierten Zeitpunkten hinzugezogen. Diese umfassten auf molekularbiologischem Niveau die quantitative RT-PCR zur Bestimmung der Kollagen Typ I- und III-mRNA-Expression, auf biochemischer Ebene die Hydroxyprolin-Messung als Maß für die Kollagenbiosynthese, histochemisch den Anastomosen-Heilungsscore (AHS) und die polarisationsoptischen Beobachtungen sowie den Anastomosen-Berstungsdruck (ABP) als entscheidenden, mechanischen Parameter.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen unter klinischen Gesichtspunkten eine erhöhte Sterberate der pharmakologisch und genetisch depletierten Mäuse, die bei den pharmakologisch depletierten Mäusen wahrscheinlich auf dem immunsupprimierenden Effekt durch die Depletion auch anderer Phagozyten im Organismus beruht, während dies bei den Osteopetrosis-Mäusen wohl auf die systemische Makrophagen-Armut zurückzuführen ist. Die Induktion der Peritonitis hat vor allem bei den Osteopetrosis-Mäusen mit Peritonitis einen Teil der Letalitäten verursacht, führt aber auch bei den anderen Peritonitis-Gruppen initial zu einem reduzierten Allgemeinzustand und zu Gewichtsverlusten. Im Hinblick auf die Anastomoseninsuffizienzrate als möglichen Parameter für Wundheilungsstörungen ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Auswertung der experimentellen Parameter zeigt, dass die makrophagendepletierten Gruppen ohne Peritonitis in den ersten 10 Tagen keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Mäusen aufweisen, was auf eine uneingeschränkte Anastomosenheilung schließen lässt. Die Kombination genetische Makrophagendepletion und Endotoxinämie ergibt entgegen den nur perioperativ makrophagendepletierten Mäusen mit Peritonitis sowohl auf molekularer Ebene als auch bei AHS und ABP eine Beeinträchtigung der Heilung von Dickdarmanastomosen, vor allem in den späteren Phasen der Wundheilung. Da im klinischen Alltag aber nur eine kurzzeitige Makrophagen-Depletion von Interesse ist, sprechen unsere Ergebnisse nicht gegen eine perioperative pharmakologische Inhibition dieser Zellen zur möglichen Prophylaxe postoperativer Darmmotilitätsstörungen.

Unser Modell der pharmakologischen Depletion genügt des weiteren natürlich nicht den klinischen Ansprüchen aufgrund seiner aufwendigen und teuren Applikationsform. Daher stellt die makrophagen-spezifische Inhibition proinflammatorischer Signalwege eine vielversprechende Option zur Prophylaxe der postoperativen Darmatonie unter der Prämisse einer ungestörten intestinalen Wundheilung sowohl unter normalen Bedingungen als auch in Anwesenheit eines zweiten Schädigungsparameters, der Peritonitis, dar.

7 Literaturverzeichnis

1. Adding LC, Bannenberg GL, Gustafsson LE. Basic experimental studies and clinical aspects of gasolinium salts and chelates. *Cardiovasc Drug Rev* 2001; 19: 41-56
2. Attard JA, Raval MJ, Martin GR, Kolb J, Afrouzian M, Buie WD, Sigalet DL. The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1460-1470
3. Basse L, Jakobson DH, Bardram L, Billesballe 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
4. Bauer AJ, Boeckxstaens GE. Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 54-60
5. Betzler M, Schmidt C. Standard und Risiko von Kolonanastomosen. *Viszeralchirurgie* 2005; 40: 8-11
6. Biert J, Seifert WF, Verhofstad AA, Wobbles T, de Man BM, Hoogenhout J, Hendriks T. A semiquantitative histological analysis of repair of anastomoses in the rat colon after combined preoperative irradiation and local hyperthermia. *Radiat Res* 1998; 149: 372-377
7. Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *J Hepatol* 1997; 26: 643-649
8. Braskén P. Healing of experimental colon anastomosis. *Eur J Surg Suppl* 1991; 556: 1-51
9. Bueno L, Ferre JP, Ruckebusch Y. Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. *Digest Dis Sci* 1978; 23: 690-695
10. Cetinkaya K, Dinc S, Gulcelik MA, Renda N, Ustun H, Caydere M, Alagol H. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor improves impaired anastomotic wound healing in rats treated with intraperitoneal mitomycin-C. *Surg Today* 2005; 35: 290-294
11. Compton R, Williams D, Browder W. The beneficial effect of enhanced macrophage function on the healing of bowel anastomoses. *Am Surg* 1996; 62: 14-18
12. De Hingh IH, van Goor H, de Man BM, Lomme RM, Bleichrodt RP, Hendriks T. Selective cyclo-oxygenase 2 inhibition affects ileal but not colonic anastomotic healing in the early postoperative period. *Br J Surg* 2006; 93: 489-497

13. De Jonge WJ, The FO, Van der Coelen D, Bennink RJ, Reitsma PH, Van Deventer SJ, Van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2004; 127: 535-545
14. De Winter BY, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA. Effect of adrenergic and nitrenergic blockade on experimental ileus in rats. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 464-468
15. Diller R, Stratmann U, Minin E, Von Eiff C, Bäumer G, Huismans H, Helmschmied T, Becker K, Spiegel HU. AT III attenuates endotoxemia induced healing impairment in the colon. *J Surg Res* 2009; 157: 4-13
16. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112: 321-329
17. Dinc S, Ozbirecikli B, Gulcelik MA, Ergeneç D, Kuru B, Erdem E, Caydere M, Alagol H. The effects of locally injected granulocyte macrophage-colony stimulating factor on the healing of intraoperatively irradiated intestinal anastomoses in rats. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23: 77-82
18. Dovi JV, Li-Ke He, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 448-455
19. Ehrlich HP. Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye* 1988; 2: 149-157
20. Espat NJ, Cheng G, Kelley MC, Vogel SB, Sninsky CA, Kocking MP. Vasoactive intestinal peptide and substance P receptor antagonists improve postoperative ileus. *J Surg Res* 1995; 58: 719-723
21. Friedman DW, Boyd C, Mackenzie JW, Norton P, Olson RM, Deak SB. Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J Surg Res* 1993; 55: 214-218
22. Golub R, Golub RW, Cantu R Jr., Stein HD. A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomoses. *J Am Coll Surg* 1997; 184: 364-372
23. Hallböök O, Sjødahl R. Anastomotic leakage and functional outcome after anterior resection of the rectum. *Br J Surg* 1996; 83: 60-62
24. Halsted WS. Circular suture of the intestine – an experimental study. *Am J Sci* 1887; 94: 436-361
25. Hamilton TA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 1987; 8: 151-158

26. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Col Rect* 1990; 33: 891-901
27. Hernandez-Richter HJ, Struck H. New concepts on the theory of wound healing. *Hippocrates* 1971; 42: 332-345
28. Ishimura K, Tsubouchi T, Okano K, Maeba T, Maeta H. Wound healing of intestinal anastomosis after digestive surgery under septic conditions: participation of local interleukin-6 expression. *World J Surg* 1998; 22: 1069-1076
29. Ishimura K, Moroguchi A, Okano K, Maeba T, Maeta H. Local expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 on wound healing of intestinal anastomosis during endotoxemia in mice. *J Surg Res* 2002; 108: 91-97
30. Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 1981; 112: 70-75
31. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. *Am J Surg* 1980; 139: 398-405
32. Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. *Am J Surg* 1983; 145: 800-803
33. Junge K, Binnebösel M, Rosch R, Jansen M, Kämmer D, Otto J, Schumpelick V, Klinge U. Adhesion formation of a polyvinylidene fluoride/polypropylene mesh for intra-abdominal placement in a rodent animal model. *Surg Endosc* 2009; 23: 327-333
34. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11: 447-455
35. Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Leukocyte derived nitric oxide mediates postoperative circular smooth muscle dysfunction. *Dig Dis Sci* 1998a; 43: 1586
36. Kalff JC, Wolfgang HS, Simmons RL, Bauer AJ. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg* 1998b; 228: 652-663
37. 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
38. Kasperk R, Phillips B, Vahrmeyer M, Willis S, Schumpelick V. Risk factors for anastomosis dehiscence after very deep colorectal and coloanal anastomosis. *Chirurg* 2000; 71: 1365-1369

39. Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P. Medizinische Mikrobiologie (11. Auflage). Stuttgart - New York: Thieme, 2005
40. Kostic LL. Sutures in digestive surgery. *Acta Chir Jugosl* 1994; 41: 211-220
41. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78: 71-100
42. Linder J. Morphologie und Biochemie der Wundheilung. *Langenbecks Arch Chir* 1982; 358: 153-160
43. Livingston EH, Passaro EP. Postoperative ileus. *Digest Dis Sci* 1990; 35: 121-132
44. Löffler G. Basiswissen Biochemie (5. Auflage). Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2003
45. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke KD. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004; 21: 505-511
46. Makela JT, Kiviniemi H, Laitinen S. Risk factors for anastomotic leakage after left-sided colorectal resection with rectal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 653-660
47. Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR. Wound healing in the PU.1 null mouse – tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* 2003; 13: 1122-1128
48. Martin P, Leibovich SP. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 599-607
49. Mastboom WJ, Hendriks T, de Boer HH. Collagen changes around intestinal anastomoses in germ-free rats. *Br J Surg* 1989; 76: 797-801
50. Meyer G, Lang RA, Schildberg FW. Anastomosenheilung. *Viszeralchirurgie* 2000; 35: 153-165
51. Meyer G, Lang RA, Prodinger PM, Stier C. Grundlagen und Biologie der Anastomosenheilung. *Viszeralchirurgie* 2007; 42: 134-144
52. Mikkelsen HB. Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histol Histopathol* 1995; 10: 719-736
53. 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

54. 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
55. Naito M, Nagai H, Kawano S, Umezue H, Zhu H, Moriyama H, Yamamoto T, Takatsuka H, Takei Y. Liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate induces macrophage apoptosis in vivo and in vitro. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 337-344
56. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319-326
57. Onodera H, Ikeuchi D, Nagayama S, Imamura M. Weakness of anastomotic site in diabetic rats is caused by changes in the integrity of newly formed collagen. *Dig Surg* 2004; 21: 146-151
58. Otero-Antón E, González-Quintela A, López-Soto A, López-Ben S, Llovo J, Pérez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001; 33: 77-79
59. Overhaus M, Tögel S, Pezzone MA, Bauer AJ. Mechanisms of polymicrobial sepsis-induced ileus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 685-694
60. Pantelis D, Kabba MS, Kirfel J, Kahl P, Wehner S, Buettner R, Hirner A, Kalff JC. Transient perioperative pharmacological inhibition of muscularis macrophages as a target for prophylaxis of postoperative ileus does not affect anastomotic healing in mice. *Surgery* 2010; 148: 59-70
61. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 2004; 187: 11-16
62. Platell C, Barwood N, Dorfmann G, Makin G. The incidence of anastomotic leaks in patients undergoing colorectal surgery. *Colorectal Dis* 2007; 9: 71-79
63. Portera CA, Love EJ, Memore L, Zhang L, Muller A, Browder W, Williams DL. Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *Am Surg* 1997; 63: 125-131
64. Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 99-104

65. Reisine T, Pasternak G. Opioid analgesics and antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill Co; 1996
66. Rico RM, Ripamonti R, Burns AL, Gamelli RL, DiPietro LA. The effect of sepsis on wound healing. *J Surg Res* 2002; 102: 193-197
67. Scheuerlein H, Kube R, Gastinger I, Köckerling F. Prospektive multizentrische Vergleichsstudie zur Peritonitisbehandlung. *Zentralbl Chir* 2000; 2: 199-204
68. Schonlau F, Schlesiger C, Ehrchen J, Grabbe S, Sorg C, Sunderkotter C. Monocyte and macrophage functions in M-CSF-deficient op/op mice during experimental leishmaniasis. *J Leucoc Biol* 2003; 73: 564-573
69. Schumpelick V, Bleese NM, Mommsen U. *Chirurgie (5. Auflage)*. Stuttgart: Enke Verlag, 2000
70. Schwarz NT, Kalff JC, Turler A, Engel BM, Watkins SC, Biliar TR, Bauer AJ. Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology* 2001; 121: 1354-1371
71. 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
72. Senagore A, Milsom JW, Walshaw RK, Dunstan R, Mazier WP, Chaudry ICH. Intramural pH: a quantitative measurement for predicting colorectal anastomotic healing. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 175-179
73. Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Tissue oxygen tension as a predictor of colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 867-871
74. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782
75. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res* 2003; 35: 486-491
76. Sorensen LT, Jorgensen T, Kirkeby LT, Skovdal J, Vennits B, Wille-Jorgensen P. Smoking and alcohol abuse are major risk factors for anastomotic leakage in colorectal surgery. *Br J Surg* 1999; 86: 927-931

77. Stark MB, Bauer AJ, Szurszewski JH. Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. *J Physiol* 1991; 444: 743-761
78. Stumpf M, Klinge U, Mertens PR. Anastomosenheilung – Prognostische Faktoren. *Chirurg* 2004; 75: 1056-1062
79. Stumpf M, Klinge U, Wilms A, Zabrocki R, Rosch R, Junge K, Krones C, Schumpelick V. Changes of the extracellular matrix as a risk factor for anastomotic leakage after large bowel surgery. *Surgery* 2005; 137: 229-234
80. Taché Y, Monnikes 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
81. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11: 443-451
82. Taxi J. Contribution à l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. *Ann Sci Nat Zool* 1965; 7: 413-674
83. Teke Z, AYTEKIN FO, AYDIN C, KABAY B, YENISEY C, SACAR S, SIMSEK NG, TEKIN K. Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on healing of colonic anastomoses in the cecal ligation and puncture model of intraperitoneal sepsis in rats. *World J Surg* 2007; 31: 200-209
84. Thornton FJ, Ahrendt GM, Schäffer MR, Tantry US, Barbul A. Sepsis impairs anastomotic collagen gene expression and synthesis: a possible role for nitric oxide. *J Surg Res* 1997; 69: 81-86
85. Van der Ham AC, Kort WJ, Weijma IM, Jeekel H. Transient protection of incomplete colonic anastomoses with fibrin sealant: an experimental study in the rat. *J Surg Res* 1993; 55: 256-260
86. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 1994; 174: 83-93
87. Van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 1996; 193: 93-99
88. Verhofstad MH, Lange WP, van der Laak JA, Verhofstad AA, Hendriks T. Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 423-431

89. Vignali A, Gianotti L, Braga M, Milsom JW, Church JM, Hull TL, Strong SA, Oakley JR. Altered microperfusion at the rectal stump is predictive for rectal anastomotic leak. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 76-82
90. 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
91. 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
92. Wehner S, Straesser S, Vilz TO, Pantelis D, Sielecki T, Cruz VF, Hirner A, Kalff JC. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase pathway as prophylaxis of postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2009; 136: 619-629
93. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433
94. 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
95. Zittel TT, Lloyd KCK, Tothenhofer I, Wong H, Walsh JH, Raybould HE. Calcitonin gene-related peptide and spinal afferents partly mediate postoperative colonic ileus in the rat. *Surgery* 1998; 123: 518-527