

# **Einfluss der Docosahexaensäure und ihren Metaboliten auf den postoperativen Ileus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Maren Bernadette Müller**

aus Düsseldorf

2021

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Wehner
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Dieter Lütjohann

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.12.2020

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

Für meine Familie  
& meinen Freund



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	7
<b>1. Einleitung</b>	9
1.1 Der postoperative Ileus	9
1.2 Pathogenese des POI	10
1.2.1 Neurogene Phase	11
1.2.2 Inflammatorische Phase	12
1.2.3 Auflösungsphase	13
1.3 Therapieoptionen	14
1.4 Immunmodulatorische Lipidmediatoren/n-3 Fettsäuren	14
1.5 Chemisch stabilisierte MUFS und Derivate	18
1.6 Zielsetzung	19
<b>2. Material und Methoden</b>	20
2.1 Versuchstiere	20
2.2 Verwendete Substanzen	20
2.3 Experimentelle Gruppen	20
2.3.1 Pilotversuch	21
2.3.2 Bestimmung der Konzentration der eingesetzten Substanzen	21
2.3.3 Versuchsreihen des DHA-Derivat TP4311	22
2.3.4 Versuchsreihen der Protectin DX-Derivate: TP6211 und TP6212	23
2.4 Versuchsaufbau	24
2.5 Operativer Eingriff	26
2.6 Gastrointestinaler Transit (GIT)	27
2.7 Myeloperoxidase (MPO)-Färbung	28
2.8 Durchflusszytometrische Analyse	29
2.9 Statistische Analyse	30
<b>3. Ergebnisse</b>	31
3.1 Versuchsreihen	31
3.1.1 Vergleich zweier Pufferlösungen auf die postoperative Darmmotilität	31
3.1.2 I.v. appliziertes TP4311 verbessert die postoperative Darmmotilität nicht	33
3.1.3 Enteral appliziertes TP4311 verschlechtert die postoperative Darmmotilität	35
3.1.4 Langzeit-Supplementierung von TP4311 führt zu keiner Entzündungsauflösung	37

3.1.5 Reines Protectin DX, nicht aber TP6211 wirkt sich protektiv auf den Entzündungsverlauf des POI aus	39
3.1.6 TP6212 kann den Verlauf eines POI nicht verhindern	41
<b>4. Diskussion</b>	<b>43</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis</b>	<b>52</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>63</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Anova	Analysis of variance
DHA	Docosahexaensäure
DAMP	Danger-Associated-Molecular Patterns
EPA	Eicosapentaensäure
FACS	Flow Cytometer Analyse
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GC	Geometrisches Zentrum
GIT	Gastrointestinaler Transit
IM	Intestinale Manipulation
KHB	Krebs-Henseleit-Bicarbonat
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
LOX	Lipoxygenase
Ly6C	Lymphozyten Antigen 6 Complex, Locus C
Ly6G	Lymphozyten Antigen 6 Complex, Locus G
ME	Muscularis externa
MPO	Myeloperoxidase
MUFS	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
PBS	Phosphate-buffered saline
POI	Postoperativer Ileus
P38-MAPK	p38 mitogen activated protein kinase

SEM	Standard error of the mean
SPF	Spezifiziert-Pathogen-Frei

# 1. Einleitung

## 1.1 Der postoperative Ileus

Der postoperative Ileus (kurz POI) ist eine temporäre, teilweise sehr schwerwiegende Komplikation nach erfolgten visceralchirurgischen oder anderen Operationen. Der Begriff Ileus stammt aus dem Griechischen und bedeutet wörtlich übersetzt "voll Schlamm". Neben dem Stuhlverhalt zeigt sich die häufig regressive Darmatonie durch ein geblähtes Abdomen und fehlende Darmgeräusche (Goretzki und Müller, 1998). Der Patient klagt über Übelkeit, Erbrechen und im Extremfall krampfartigen starken Schmerzen. Symptomorientierte Maßnahmen umfassen einen verzögerten Kostaufbau mit zunächst parenteraler Gabe von Nährstoffen, Ableitung durch eine Magensonde und dosierter Schmerzmedikation. Die Gefahr der Aspirationspneumonie sowie septische Komplikationen verlängern nicht nur die Liegedauer der betroffenen Patienten, sondern erhöhen die postoperative Morbidität (Vilz et al 2014). Erstaunlicherweise konnte eine klinische Studie zeigen, dass ein prolongierter POI keinen Einfluss auf die 30-Tage - Mortalität hat (Millan et al., 2012).

Insgesamt entwickeln 17,4 % aller Patienten nach kolorektalem Eingriff einen POI, wobei eine Dauer der Darmatonie von bis zu 2 Wochen beobachtet wird (Iyer et al 2009).

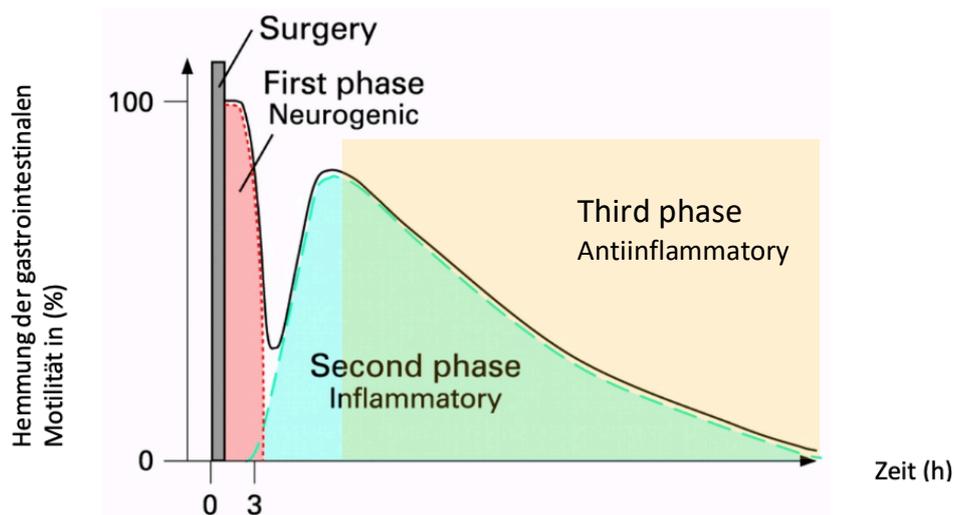
Eine systematische Review- und Metaanalyse von Quiroga-Centeno et al. (2020) zur Frage möglicher Risikofaktoren für die Entstehung eines POI (anhand von 29.736 eingeschlossenen Patienten (2844 entwickelten einen POI)) weist das männliche Geschlecht, Voroperationen sowie kardiologisch bedingte Komorbiditäten auf.

Durch die verlängerte Liegedauer, verbunden mit medizinischer Behandlung, zeigten Berechnungen von Iyer et al (2009) einen dadurch bedingt erhöhten Kostenaufwand von 1,47 Billionen US-Dollar /Jahr allein in den Vereinigten Staaten. Der POI hat daher neben dem Morbiditäts-/Mortalitätsrisiko für den Patienten einen hohen wirtschaftlichen Stellenwert für das Gesundheitssystem, insbesondere da keine evidenzbasierte Prophylaxe zur Verfügung steht.

Im Fokus der Forschung stehen daher Untersuchungen der zugrundeliegenden Pathomechanismen des POI und die Identifizierung möglicher molekularer Schlüsselmechanismen, um daraus sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch wirksame Medikamente oder Verfahren zu etablieren.

## 1.2 Pathogenese des POI

Die Pathogenese des POI ist dadurch gekennzeichnet, dass neurogene und inflammatorische Mechanismen zeitlich ineinander übergehen, ehe in einer dritten Phase (sogenannte Auflösungsphase) der POI überwunden wird (Boeckxstaens und de Jonge, 2009; Bragg et al., 2015; Stakenborg et al., 2017).



**Abb. 1:** Die 3 Phasen des POI: die Initiations- (neurogen, rot), Manifestations- (inflammatorisch, blau) und die Auflösungsphase (gelb). Die neurogene Phase beginnt unmittelbar mit der Operation und endet kurz nach der Operation. Die inflammatorische Phase startet 3-4 h nach der Operation und dauert länger an, sodass sie klinisch von größerer Bedeutung ist. Während der inflammatorischen Phase beginnt die Auflösungsphase, die zur Genesung der Darmdysmotilität beiträgt (Boeckxstaens und de Jonge, 2009).

Ausgelöst wird die Kaskade durch das chirurgische Trauma und die direkte Manipulation am Intestinaltrakt. Dabei besteht eine Korrelation der Ausprägung eines POI zum Ausmaß des stattgehabten Traumas. Minimalinvasive Eingriffe zeigen einen deutlich milderen

Verlauf eines POI als Laparotomien (Kalff et al., 1998). Das perioperative Management (Einsatz von Narkotika (Boeckxstaens und Jonge, 2009), Schmerztherapie und Transfusionen (Chowdhury und Lobo, 2011) und die postoperative Gabe von Schmerzmitteln wie Opioide unterhalten die Hemmung der Darmmotilität (Bauer und Boeckxstaens, 2004).

### 1.2.1 Neurogene Phase

In dieser ersten auch neurogenen Phase werden somatische Nozirezeptoren aktiviert, die über efferente sympathische Nerven zur kurzzeitigen Lahmlegung des Darms führen (Vather et al., 2014). Während der gesamten postoperativen Phase überwiegt die hemmende Aktivität des sympathischen Systems als eine stressinduzierte sympathische Hyperaktivität (Koninger et al., 2006). Dabei wird aus den sympathischen Fasern Noradrenalin als Transmitter ausgeschüttet, welcher sich negativ auf die Darmmotilität ausübt. Noradrenalin erreicht seine Wirkung, indem es die Ausschüttung von Acetylcholin aus parasympathischen Nerven hemmt. Die Aktivierung des sympathischen Systems geschieht reflexartig: Die durch somatische, viszerale Nozirezeptoren aktivierten afferenten Neuronen ziehen zum Knochenmark, um dort direkt auf efferente adrenerge, sympathische Neuronen umgeschaltet zu werden. Diese efferenten Neuronen ziehen dann zum Darm und hemmen die Darmmotilität. Die erste Entdeckung der inhibitorischen spinalen Reflexe am Darm machte Goltz 1872 (Livingston und Passaro, 1990). Holzer zeigt ebenfalls in seiner Studie den Zusammenhang zwischen inhibitorischen spinalen Reflexen und Darmdysmotilität durch subkutane Gabe von nozirezeptor-stimulierendem Capsaicin (Holzer et al., 1992).

Die intestinale Manipulation (IM) führt zudem zu einer Aktivierung supraspinaler Nervenbahnen, insbesondere medulläre, hypothalamische und zum Pons gehörende Nuclei. Mehrere Studien zeigten, dass insbesondere das zentrale Corticotropin-releasing Hormon, welches im kleinzelligen Anteil des Nucleus paraventricularis im Hypothalamus synthetisiert wird, eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des POI spielt. Dessen Genexpression und Ausschüttung steigt unter Stresssituationen, wie chirurgische Eingriffe, und führt zu einer geringeren Motilität im Gastrointestinaltrakt (Barquist et al., 1996; Bonaz et al., 1994; Tache et al., 1993).

Die neurogene Phase endet, sobald die Nozirezeptoren und Mechanorezeptoren am Darm nicht mehr manipuliert werden. Bei einem länger andauernden POI über 6 postoperative Tage sind nach heutigem Kenntnisstand andere Faktoren involviert, die in der zweiten sogenannten inflammatorischen Phase den Zustand der Paralyse aufrechterhalten.

### 1.2.2 Inflammatorische Phase

In den späten 1990er Jahren wurde zum ersten Mal die Beobachtung gemacht, dass ein verlängerter POI mit immunologischen Mechanismen zusammenhängt (Vilz et al., 2014). Die inflammatorische Phase setzt dabei circa 3-4 h nach der Operation ein, wobei die Dauer stark von der Schwere des operativen Eingriffs abhängt (The et al., 2008). Mehrere Studien zeigten dabei die Bedeutung der sogenannten residenten Makrophagen, die physiologisch zwischen der longitudinalen und zirkulären Muscularis externa (ME) lokalisiert sind (Faussone-Pellegrini, 1990; Mikkelsen, 1995). Gewebsmakrophagen weisen neben ihrer phagozytären auch eine Antigen-repräsentierende Funktion auf (Kalff et al., 1998). Genetische und pharmakologische Depletion dieser Makrophagen (Mikkelsen et al. 1999; Wehner et al. 2007) oder die Inaktivierung des proinflammatorischen p38-MAPK-Signalweges in den Makrophagen konnte die Entzündung im POI deutlich vermindern bzw. die Entstehung des POI im Mausmodell sogar verhindern (Wehner et al., 2009).

Aktiviert werden können diese residenten Gewebsmakrophagen durch die nach Gewebsverletzung auftretende Freisetzung sogenannter DAMP`s (damage associated molecular patterns), wie dies nach abdominalen Eingriffen der Fall ist. Daneben auch durch von Monozyten repräsentierten phagozytierten Partikel wie pathogene Erreger und PAMP`s (pathogen associated molecular patterns), die aus dem Darmlumen in die verletzte Mucosa übergetreten sind (Bauer, 2008).

Nach Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen u.a. bewirken die Gewebsmakrophagen die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut in die ME, welche daher erst mehrere Stunden nach der Manipulation eine Rolle im POI spielen (Kalff et al., 1998). Proinflammatorische Lipidderivate, wie Prostaglandine, und Stickstoffmonoxyd sind weitere Mediatoren, die den POI unterhalten (Kalff et al., 2000; Schwarz et al., 2001).

Neuere Studien gehen davon aus, dass ein so genannter neuroimmuner Mechanismus beim POI die entscheidende Rolle spielt.

2005 konnten de Jonge et al. (2005) bereits im POI-Maus-Modell zeigen, dass die Aktivität der Makrophagen in der ME durch exogene Stimulation des Nervus Vagus gedämpft werden kann. Dabei weisen vagale Efferenzen im Plexus myentericus einen engen Kontakt zu cholinergen myenterischen Neuronen auf, jedoch nicht zu den residenten Makrophagen. Dementsprechend beeinflusst die vagale Stimulation zuerst die lokale myenterische neuronale Aktivität, was dann zu einer verminderten Makrophagen-Aktivierung und somit verminderten Inflammation führt (Matteoli et al., 2014). So tragen sowohl die intrinsischen (enterisches Nervensystem) als auch die extrinsischen (vagale Stimulation) Mechanismen zur intestinalen Immunhomöostase bei.

Auf der anderen Seite erweisen sich die residenten Makrophagen als neurosupportiv und werden daher aus noch nicht geklärten Gründen durch enterische Neuronen aufrechterhalten (Muller et al., 2014).

Diese jüngsten Fortschritte zur intestinalen Neuroimmuninteraktion sind für die Regulation der Peristaltik unter physiologischen und pathologischen (POI) Bedingungen wesentlich und sollten bei der Therapiegestaltung zur Behandlung von gastrointestinaler Dysfunktion berücksichtigt werden (Meroni et al., 2019; Verheijden und Boeckxstaens, 2018).

### 1.2.3 Auflösungsphase

Während der inflammatorischen Phase beginnt zeitlich die Auflösungsphase, welche bisher am wenigsten erforscht ist. Obwohl eine Inflammation wichtig zur Auslösung von Abwehrmechanismen, zur Einleitung von Gewebereparatur, zur Eradikation von Krankheitserregern und somit für die Gesundheit unerlässlich ist, kann sie schnell in eine unkontrollierte, andauernde chronische Inflammation übergehen, welche zu schwerwiegenden Erkrankungen wie z.B. POI oder im schlimmsten Fall zur systemischen Sepsis führen kann (Klek, 2016). Bisher galt die Auflösungsphase als ein passiver Prozess, erst seit dem letzten Jahrzehnt wird jedoch von einem biosynthetischen aktiven Prozess ausgegangen, der durch entzündungsauflösende Lipidmediatoren koordiniert wird. Diese Lipidmediatoren nehmen eine Schlüsselrolle in diesem Prozess ein, indem sie das Profil der Entzündung bestimmen, ob anti- oder proinflammatorisch und das Gewebe

zurück zur Homöostase führen. Patienten mit chronischen Darmerkrankungen zeigten in mehreren Studien einen Mangel an antiinflammatorischen Lipidmediatoren und könnten von einer Substitution dieser Mediatoren profitieren (Gobbetti et al., 2017; Ungaro et al., 2017).

### 1.3 Therapieoptionen

Der POI ist in seiner Pathophysiologie -wie oben dargestellt- aufgrund seiner ineinandergreifenden Mechanismen multifaktoriell. Eine geeignete Therapieoption könnte sich durch die Unterstützung bzw. die Beschleunigung der Auflösung der dem POI zugrundeliegenden Entzündungsreaktion bieten.

In dieser Arbeit wird der mögliche Einsatz von entzündungsauflösenden Lipidmediatoren und deren Präkursor, die n-3 Fettsäure, im Mausmodell untersucht. Diese immunmodulatorischen Lipidmediatoren/n-3 Fettsäuren könnten im Rahmen einer Immunonutrition dem Patienten prophylaktisch angeboten werden.

Unter Immunonutrition bezeichnet man eine Therapieform, bei der medizinisch angewandte Ernährungsprodukte zusätzlich zur Pharmako- und evtl. operativen Therapie die Heilung durch Beeinflussung des Immunsystems begünstigen sollen (Celiberto et al., 2018).

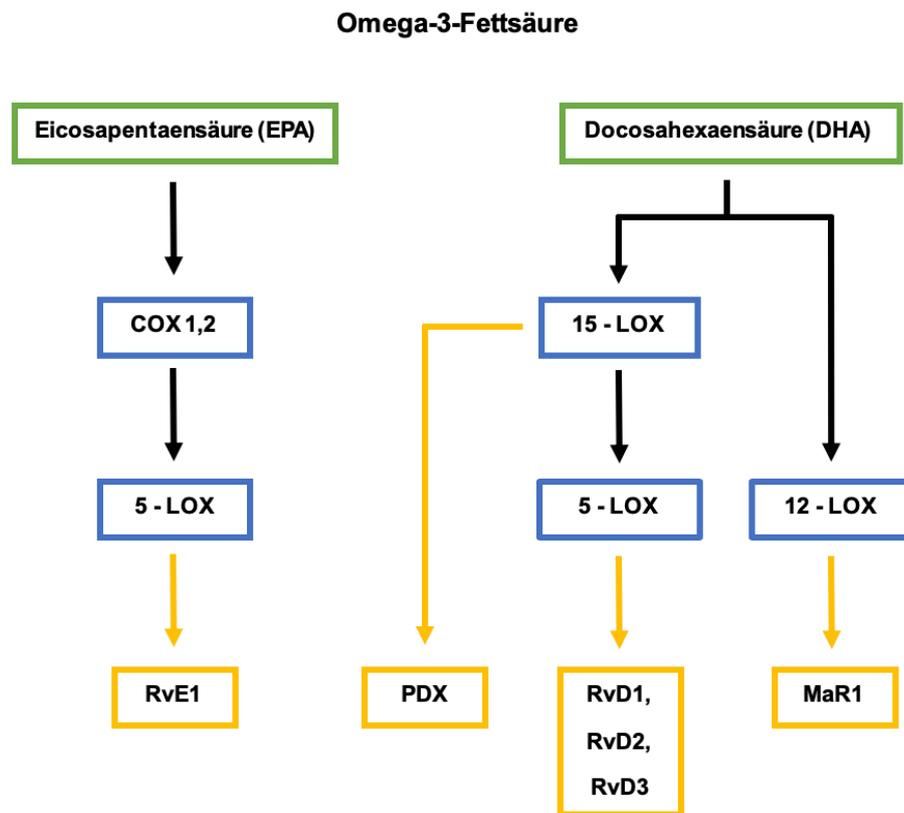
### 1.4 Immunmodulatorische Lipidmediatoren/n-3 Fettsäuren

Charles Serhan war der erste Forscher, der Studien über entzündungsauflösende Lipidmediatoren publizierte. Er konnte zeigen, dass Lipidmediatoren die Inflammation durch Erhöhung der Efferozytoserate der Makrophagen eindämmen, indem die schädlichen Noxen effizienter und schneller beseitigt wurden. Neben der Beseitigung von Organismen und Zelldetritus wird die Infiltration von neutrophilen Granulozyten verhindert, die Inflammation gestoppt (Dalli und Serhan, 2012; Serhan und Chiang, 2013).

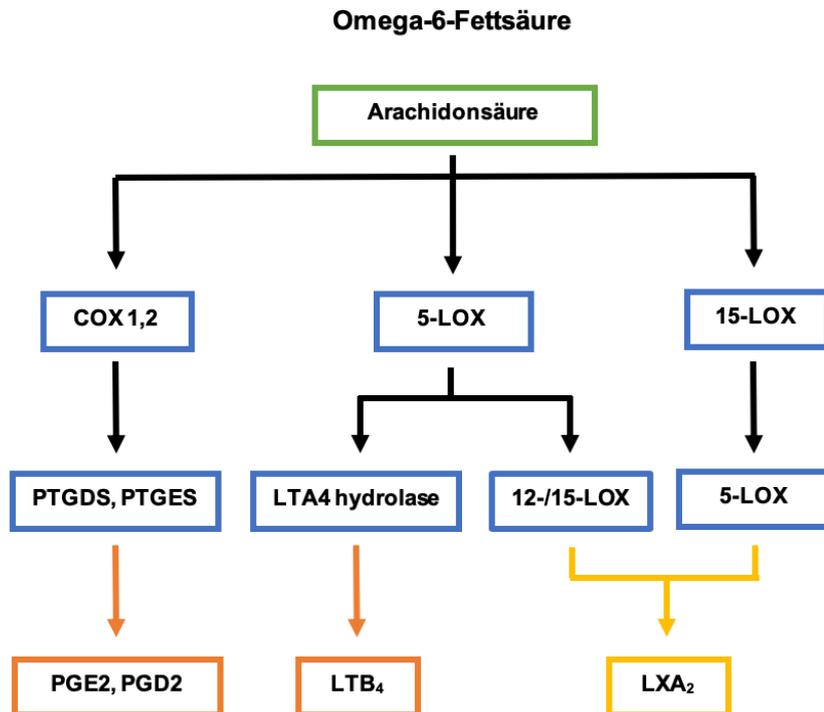
Lipidmediatoren wie Lipoxine, Resolvine der Klasse E und D, Protectin und Maresin werden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren synthetisiert (MUFS) und je nach Lage der ersten Doppelbindung in zwei Gruppen unterteilt: Die Omega (n)-3 und (n)-6 Fettsäure.

Die Omega n-3 Fettsäure selbst untergliedert sich noch einmal in Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). An der enzymatisch gesteuerten Metabolisierung der antiinflammatorischen Lipidmediatoren sind hauptsächlich Lipooxygenasen, insbesondere 5-LOX, 12-LOX und 15-LOX, beteiligt. Im Gegensatz zum Menschen verfügt die Maus über eine 12/15-LOX, die der menschlichen 15 LOX entspricht (Funk et al., 2002).

Die Biosynthese von den Lipidmediatoren der Omega n-3 und n-6 Fettsäure ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb. 2:** Biosynthese der antiinflammatorischen Lipidmediatoren Resolvin (Rv), Protectin DX (PDX) und Maresin (MaR). Diese werden aus den Omega-3-Fettsäuren (EPA, DHA) mithilfe der Enzyme Cyclooxygenase (COX) und Lipooxygenase (LOX) synthetisiert (Orr et al., 2015).



**Abb. 3:** Biosynthese der proinflammatorischen Lipidmediatoren Prostaglandin (PG) und Leukotriene (LT), sowie des antiinflammatorischen Lipidmediators Lipoxin (LX). Diese werden aus der Omega-6 Fettsäure mithilfe der Enzyme Cyclooxygenase (COX), Lipoxygenase (LOX), Prostaglandin D2 Synthase (PTGDS) und Prostaglandin E2 Synthase (PTGES) synthetisiert (Orr et al., 2015).

Die Omega Fettsäuren müssen mit der Nahrung zugeführt werden, da sie vom Körper gar nicht oder nur in geringer Menge produziert werden können. Dabei ist das Verhältnis von n-6 zu n-3 Omega Fettsäuren durch eine bewusste Ernährung beeinflussbar. Veränderte Ernährungsgewohnheiten im Westen führten im Laufe der Jahre zu einem Ungleichgewicht zwischen n-6 und n-3 Fettsäuren, zugunsten der proinflammatorischen n-6 Fettsäure (20:1) (Blasbalg et al., 2011; Scaioli et al., 2017). Diese nutritive Imbalance korreliert mit dem Anstieg der Inzidenz an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Molodecky et al., 2012; Schreiner et al., 2020). So haben Patienten mit einer hohen Konzentration an n-6 Fettsäure im Gewebe ein signifikant höheres Risiko an Colitis ulcerosa zu erkranken (de Silva et al., 2010).

Folglich kann durch eine vermehrte Zufuhr von DHA und EPA das Gleichgewicht mehr zu den n-3 Fettsäuren verschoben werden. Die wichtigste natürliche Nahrungsquelle für

Omega n-3 Fettsäuren sind fettreiche Kaltwasserfische, wie z.B. der Lachs. Da die n-3 Fettsäure nachweislich antiinflammatorische Eigenschaft aufweist, wird sie vermehrt zu therapeutischen Zwecken bei chronischen Immunerkrankungen angewendet wie z.B. beim Asthma (Adams et al., 2018) und der rheumatoiden Arthritis (Li et al., 2019). Beim Asthma z.B. greift die n-3 Fettsäure immunmodulierend ein, indem sie zu einer verringerten Produktion von proinflammatorischen Leukotriene führt, welche bronchokonstriktive Eigenschaften aufweisen.

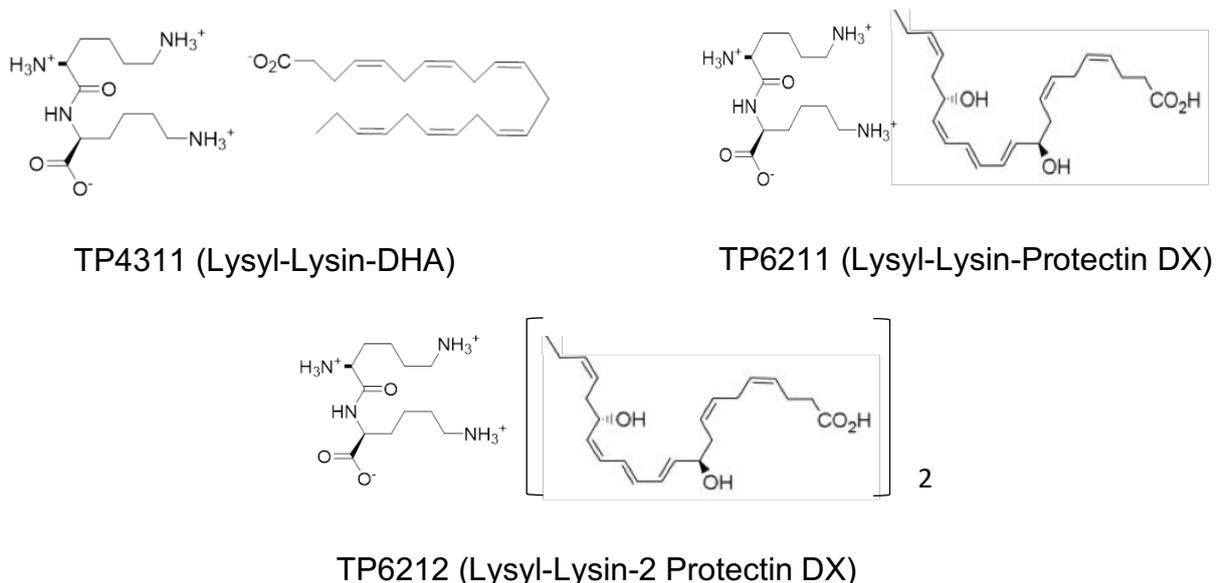
Bei den chronischen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wurde der Einfluss der n-3 Fettsäure auf das Immunsystem ebenso experimentell als auch klinisch untersucht. Einerseits konnte eine vorteilhafte Wirkung der n-3 Fettsäuren, wie eine Reduktion der Entzündung, nachgewiesen werden, andererseits aber konnte die Supplementation keine eindeutige Schutzwirkung vor einem klinischen Rückfall aufweisen (Mozaffari et al., 2019; Scaioli et al., 2017).

Bezogen auf den POI konnten erste Untersuchungen zeigen, dass eine mehrtägige präoperative Supplementierung einer Fischölemulsion im Rattenmodell des POI, die reich an n-3 Fettsäuren ist, zu einer Verbesserung der Darmfunktion führte. Zudem konnte eine vermehrte Inkorporation der n-3 Fettsäuren EPA und DHA in der Muskulatur des Darmes, aber auch in den Blutzellen nachgewiesen werden (Wehner et al., 2012). Eine darauf basierende Folgestudie ergab, dass diese Verbesserung durch das Enzym 12/15-LOX getriggert wird. 12/15-LOX ist ein Enzym, welches von infiltrierenden Leukozyten beim POI vermehrt exprimiert wird. Fehlt dieses Enzym, stellt sich nach Supplementierung einer n-3 angereicherten Fischölemulsion im Mausmodell keine Verbesserung der postoperativen Entzündung ein. Massenspektrometrische Analysen der postoperativen Darmmuskulatur wiesen die größte Veränderung und die höchsten Konzentrationen der Endprodukte der 12/15-LOX- Metabolisierung aus der n-3 Fettsäure DHA auf. Unter den Endprodukten stellte sich Protectin DX als Schlüsselmediator in der Immunmodulation beim POI heraus. Eine perioperative Supplementierung dessen zeigte sich folglich protektiv auf den Entzündungsverlauf. Aus dieser Studie und den anderen erwähnten Studien ergeben sich neue vielsprechende Ansätze zur Therapie des POI durch natürlich vorkommende hochpotente, immunmodulierende Lipidmediatoren (Stein et al., 2016).

Allerdings stellt sich zurzeit das Problem, die vielversprechenden Ansätze der Immunonutrition mit MUFS sowie deren Lipidmediatoren in den klinischen Alltag einzubringen und erste Pilotstudien zu etablieren. Dies liegt zum einen an der Notwendigkeit einer mehrtägigen präoperativen Gabe von MUFS in Form einer Fischölemulsion (Klek, 2016). Dies stellt erstens eine hohe Belastung für die Patienten vor der Operation dar und wäre zweitens für Patienten im akuten Notfall nicht anwendbar. Zum anderen sind die MUFS in reiner Form aufgrund ihrer Doppelbindung und die daraus synthetisierten Lipidmediatoren an der Luft sehr instabil. Eine Synthese wäre damit sehr aufwendig und unwahrscheinlich zu realisieren. Daher liegt der Fokus in der Herstellung von synthetischen Therapeutika, die die Bioverfügbarkeit von DHA und Protectin erhöhen (Scaiola et al., 2017).

### 1.5 Chemisch stabilisierte MUFS und Derivate

Pharmakologisch wurden daher neuartige Amino-Lipid-Verbindungen (TP4311, TP6211, TP6212) hergestellt, die in dieser Arbeit am Mausmodell auf ihre Wirksamkeit im POI getestet wurden.



**Abb. 4:** Strukturformeln der zu testenden Substanzen TP4311, TP6211 und TP6212. TP6212 unterscheidet sich von TP6211 durch ein zusätzliches Protectin DX Molekül. DHA=Docosahexaensäure.

TP4311 ist die Abkürzung für Lysyl-Lysin-DHA und ist ein DHA-Derivat. Es wird durch eine ionische Amino-Lipid-Verbindung stabilisiert. Die Aminogruppe Lysyl-Lysin schützt DHA vor vorzeitiger Reaktion an der Luft, sodass die Lagerung über mehrere Tage von reinem DHA ermöglicht wird. Bei enteraler oder parenteraler Aufnahme diffundiert das DHA-Derivat wieder direkt in seine Ausgangsbestandteile, in DHA und in die Aminogruppe. Die DHA Fettsäure wandert bei intravenöser (i.v.) Applikation zum Ort der Entzündung, wo sie von der Zellmembran aufgenommen wird und dort zur Auflösung der Inflammation durch Zytokine und antiinflammatorische Lipidmediatoren führt.

Alternativ besteht die Möglichkeit, die aktiven Lipidmediatoren von DHA in stabilisierter Form ebenfalls als Amino-Lipid-Verbindung zu verabreichen, welche im Körper nicht umgewandelt werden, sondern direkt aktiv sind. Hierbei sind die Protectin DX-Derivate TP6211 und TP6212 zu nennen. Die Aminogruppe ist dieselbe wie bei TP4311. Durch ein zusätzliches zweites Protectin DX unterscheidet sich TP6212 von TP6211.

## 1.6 Zielsetzung

In diesem Projekt soll der präventive sowie therapeutische Effekt des neu entwickelten Moleküls TP4311, eine Amino-Lipid-Verbindung aus DHA und der Aminosäure Lysin (Lysyl-Lysin-DHA) sowie eine ebensolche neu entwickelte Verbindung des Lipidmediators Protectin DX (TP6211 oder TP6212) im POI untersucht werden.

Die Erstellung eines Profils der an der Entzündung im POI maßgeblich beteiligter Leukozyten in der ME sowie die Wirkung auf die Motilität des Darmes im POI dienen als Kriterien, um eine mögliche Wirksamkeit der eingesetzten synthetischen Amino-Lipid-Verbindungen zu zeigen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit männlichen C57BL/6 Mäusen (Janvier Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug das Alter der Tiere 12 Wochen. Die Tiere wurden unter Spezifiziert-Pathogen-Freien (SPF) Bedingungen in einem vollklimatisierten Raum mit 12 h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Die Nahrung bestand aus handelsüblichem autoklaviertem Futter sowie Wasser ad libitum.

Alle Versuche wurden strikt nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren vorab vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt worden.

### 2.2 Verwendete Substanzen

Bei den verwendeten Substanzen handelte es sich um folgende Testsubstanzen:

1. **TP4311** (Lysyl-Lysin DHA)
2. **TP6211** (Lysyl-Lysin-Protectin DX)
3. **TP6212** (Lysyl-Lysin-2 Protectin DX)
4. Kolliphor-Puffer (85 % 1x pH 7,4 PBS mit 3 % Kolliphor EL (w/v), 15 % Propylene Glycol)

### 2.3 Experimentelle Gruppen

Die Versuchstiere werden zunächst nach dem Zufallsprinzip in die Therapiegruppe und in die Kontrollgruppe eingeteilt. Die Kontrollgruppe erhält als Placebogruppe nur die Pufferlösung.

### 2.3.1 Pilotversuch

Vorweg wird ein Pilotversuch durchgeführt, um einen Einfluss des Kolliphor-Puffers der Firma Thetis Pharmaceuticals auf die verschiedenen Versuchssettings auszuschließen.

- **Experiment 1:** 30 min vor IM wird dem Versuchstier PBS oder Kolliphor-Puffer i.v. einmalig verabreicht.

**Tab. 1:** Pilotversuch

Experiment	Wirkstoff	Konzentration	Menge	Art	Zeitpunkt	Häufigkeit	n=Tiere
1	Kolliphor-Puffer / PBS		200 $\mu$ l	i.v.	30 min vor IM	einmalig	3/3

### 2.3.2 Bestimmung der Konzentration der eingesetzten Substanzen

Da die Testsubstanzen erstmalig im Tierversuch eingesetzt wurden, richtete sich die Abschätzung einer Idealkonzentration an Vorversuchen, die zunächst gezeigt hatten, dass TP4311 in einer Konzentration von 50 mg/ml nach einmaliger i.v. Gabe zum Tod der Versuchstiere geführt hatte. In dieser Konzentration präzipitierte das TP4311 bereits in physiologischer Kochsalzlösung, so dass auch ohne durchgeführte Obduktion von einer Fettembolie als Todesursache auszugehen ist. Eine schrittweise Reduzierung der Konzentration (25 mg/ml, 20 mg/ml, 15 mg/ml, 10 mg/ml) ergab, dass das TP4311 in der Konzentration von 10mg/ml am besten intravenös von den Versuchstieren vertragen wurde. Dementsprechend wurden die Versuche in dieser Konzentration als maximale Dosis bei intravenöser Gabe definiert.

Bei einer per os Gabe griffen wir jedoch im weiteren Verlauf auf die maximal lösliche Konzentration von 50 mg/ml TP4311 zurück.

Die Substanz TP6211 sowie TP6212, ein Protectin DX-Derivat, wurde in Analogie zu Vorversuchen mit reinem Protectin DX in einer äquivalenten Konzentration von 1  $\mu$ g untersucht (Stein et al., 2016).

### 2.3.3 Versuchsreihen des DHA-Derivat **TP4311**

Die Therapiegruppe bekommt die zu testende Substanz **TP4311** von der Firma Thetis Pharmaceuticals in drei unterschiedlichen Settings verabreicht:

- **Experiment 2:** 30 min vor IM wird dem Versuchstier **TP4311** 10 mg/ml oder Kolliphor-Puffer i.v. einmalig appliziert.
- **Experiment 3:** 2 Std. vor IM wird dem Versuchstier **TP4311** 50 mg/ml oder Kolliphor-Puffer p.o. (per oral) einmalig verabreicht.
- **Experiment 4:** 30 min vor IM wird dem Versuchstier **TP4311** 50 mg/ml oder Kolliphor-Puffer i.v. an fünf aufeinanderfolgenden Tagen zur selben Zeit gegeben.

**Tab. 2:** Versuchsreihen des DHA-Derivat TP4311

Experiment	Wirkstoff	Konzentration	Menge	Art	Zeitpunkt	Häufigkeit	n = Tiere
2	Kolliphor-Puffer / <b>TP4311</b>	10 mg/ml	200 $\mu$ l	i.v.	30 min vor IM	einmalig	8/8
3	Kolliphor-Puffer / <b>TP4311</b>	50 mg/ml	200 $\mu$ l	p.o.	2 h vor IM	einmalig	7/7
4	Kolliphor-Puffer / <b>TP4311</b>	10 mg/ml	200 $\mu$ l	i.v.	30 min vor IM	fünfmalig	6/5

### 2.3.4 Versuchsreihen der Protectin DX-Derivate: **TP6211** und **TP6212**

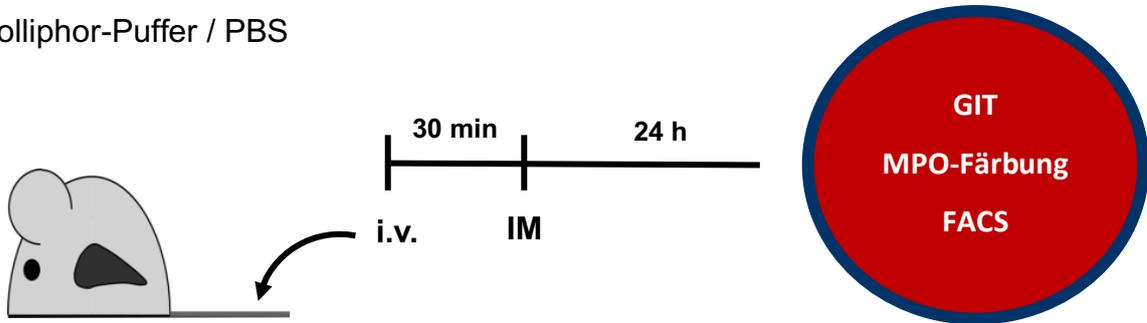
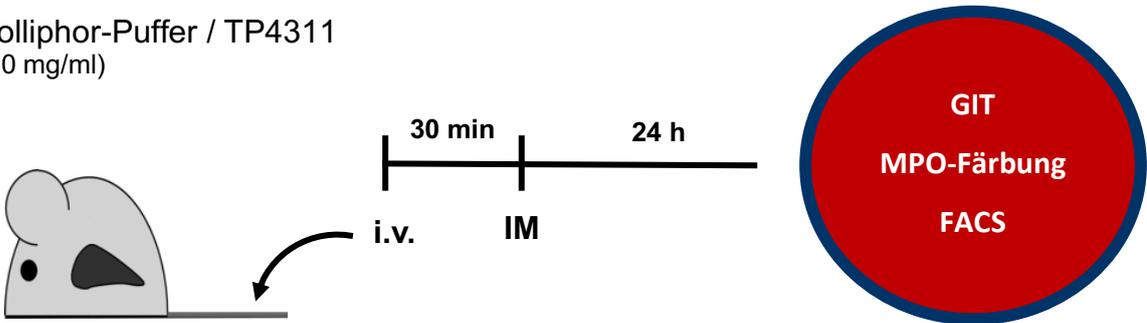
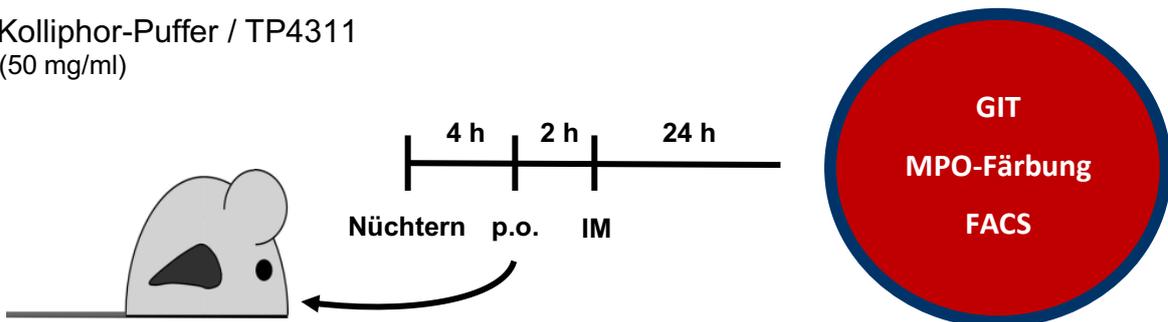
- **Experiment 5:** Unmittelbar nach IM wird dem Versuchstier **TP6211** 1,75  $\mu\text{g}$  (1  $\mu\text{g}$  Protectin DX + 0,75  $\mu\text{g}$  Lysyl-Lysin) oder Kolliphor-Puffer i.p. (intraperitoneal) appliziert. Zusätzlich wird eine Positivkontrolle mit reinem Protectin DX 1  $\mu\text{g}$  per i.p. Gabe durchgeführt.
- **Experiment 6:** 30 min vor IM wird dem Versuchstier **TP6212** in verschiedenen Konzentrationen (10  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 100 ng) oder Kolliphor-Puffer i.v. verabreicht.

**Tab. 3:** Versuchsreihen der Protectin DX-Derivate: TP6211 und TP6212

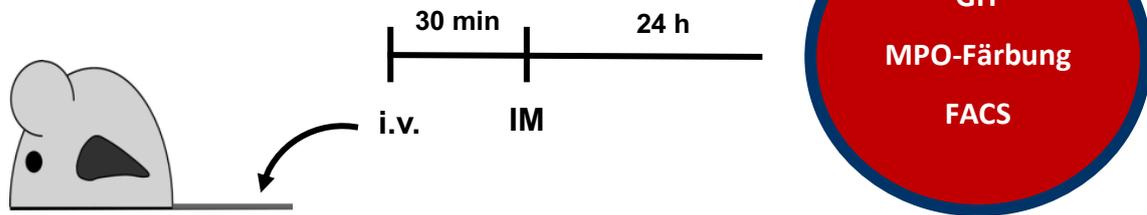
Experiment	Wirkstoff	Konzentration	Menge	Art	Zeitpunkt	Häufigkeit	n = Tiere
5	Kolliphor-Puffer / <b>TP6211</b> / Protectin DX	1,75 $\mu\text{g}$ 1 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{l}$	i.p.	unmittelbar nach IM	einmalig	4/4
6	Kolliphor-Puffer / <b>TP6212</b>	10 $\mu\text{g}$ , 1 $\mu\text{g}$ , 100 ng	200 $\mu\text{l}$	i.v.	30 min vor IM	einmalig	5/5

## 2.4 Versuchsaufbau

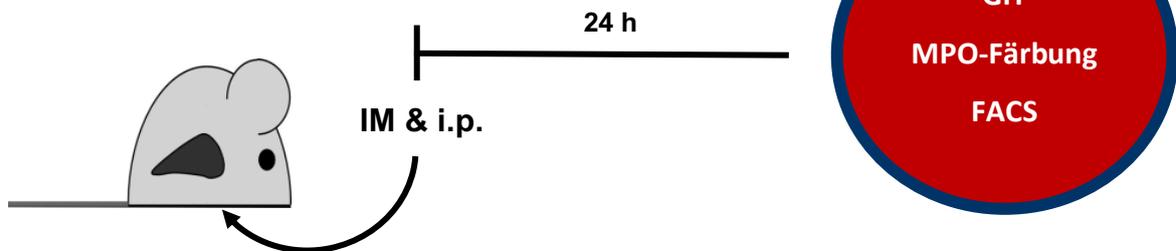
## 1. Kolliphor-Puffer / PBS

2. Kolliphor-Puffer / TP4311  
(10 mg/ml)3. Kolliphor-Puffer / TP4311  
(50 mg/ml)

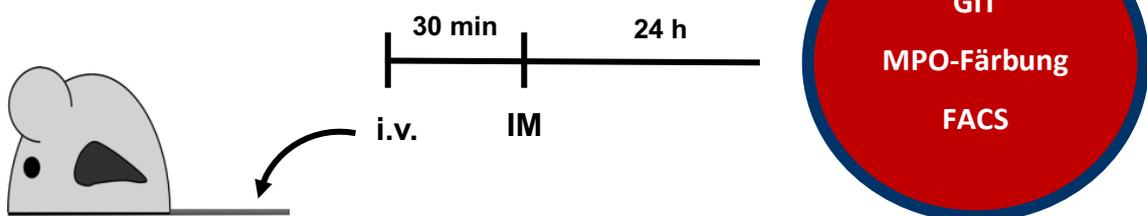
4. Kolliphor-Puffer / TP4311  
(5-tägig 10 mg/ml)



5. Kolliphor-Puffer / TP6211 / Protectin DX  
(1,75 µg/ 1 µg)



6. Kolliphor-Puffer / TP6212  
(100 ng, 1 µg, 10 µg)



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der 6 Versuchsreihen, aufgeteilt in jeweils 2 Gruppen: die eine Gruppe bekommt das Mittel per intravenös (i.v.) / intraperitoneal (i.p.) / per oral (p.o.) verabreicht, während die andere Gruppe als Placebogruppe nur die Kolliphor-Pufferlösung erhält. IM= intestinale Manipulation, GIT= Gastrointestinaler Transit, MPO= Myeloperoxidase, FACS= Flow Cytometer Analyse.

## 2.5 Operativer Eingriff

Die Versuchstiere wurden für die IM durch Inhalationsnarkose mit Isofluran bei einem O<sub>2</sub>-Fluss von 2 l/min sowie einem Isofluran-Anteil von 2-2,5 Vol % (Iso Flo Eickenmeyer, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) anästhesiert. Präoperativ erhielten alle Versuchstiere als Schmerzmittel Tramal subkutan und zusätzlich einmalig postoperativ im Trinkwasser. Nach Desinfektion des Abdomens mit Ethanol 70 % erfolgte die mediane Laparotomie. Die IM wurde von einer Person durchgeführt. Das Darmkonvolut wurde dabei vorsichtig und ohne Zug aus dem Abdomen eventriert und auf Natriumchlorid befeuchteten Kompressen vor das Abdomen verlagert. Daraufhin wurde der ganze Dünndarm mit zwei sterilen befeuchteten Wattestäbchen von proximal nach distal jeweils zweimal durch gerichtete Rollbewegungen leicht komprimiert, wodurch der Darminhalt ins Caecum verlagert wurde. Anschließend erfolgten eine anatomisch gerechte Rückverlagerung des Darmkonvoluts sowie der Verschluss des Abdomens mit einer fortlaufenden Naht. Nach dem Eingriff erholten sich die Tiere unter einer Wärmelampe. Die IM ist eine langjährig etablierte und bewährte Methode zur Provokation einer postoperativen Darmatonie (Stein et al., 2016; Wehner et al., 2005, 2007, 2009, 2012).



**Abb. 6:** Darstellung einer intestinalen Manipulation, bei der man durch das Entlangrollen mit Wattestäbchen einen leichten Druck auf die Darmwand ausübt, die zur Lahmlegung des Darms führen kann.

## 2.6 Gastrointestinaler Transit (GIT)

Die Wirkung auf die Darmmotorik nach Gabe der Testsubstanzen/Kolliphor-Puffer wurde 24 h nach IM mit Hilfe eines GIT gemessen.

Dazu erhielten die Versuchstiere über einen Ernährungstubus (Gavage) mithilfe einer Knopfkanüle jeweils 0,1 ml nicht resorbierbares Dextran (Floureszeinisothiocyanat (FITC)-Dextran, 70.000 MW, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), an welchem der Fluoreszenzstoff (FITC) gebunden war.

Die Tiere wurden nach 90 min Wartezeit mit Isofluran narkotisiert und getötet. Nach Eingang über die mediane Laparotomiewunde erfolgte eine Durchtrennung des gastroösophagealen Überganges, des Colon descendens, der Mesenterialwurzel sowie des Treitz'schen Bandes. Das Darmkonvolut wurde daraufhin entnommen und den anatomischen Segmenten entsprechend in 15 Darmsegmente bestehend aus Magen (1), Dünndarm (2-11), Caecum (12) und Colon (13-15) zerschnitten.

Anschließend wurde der Darminhalt jedes einzelnen Darmsegments mit 1 ml Krebs-Henseleit-Biocarbonate (KHB, eigenständig im Labor angesetzt: NaCl, KCL, NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Glucose, 2(H<sub>2</sub>O) CaCl<sub>2</sub> (Stock-Lsg.), 6(H<sub>2</sub>O)MgCl<sub>2</sub> (Stock-Lsg.)) ausgespült und in 2 ml Eppendorf-Cups überführt. Die Eppendorf-Cups wurden bei 3000 U/min 5 min zentrifugiert, der dabei entstehende Überstand abgetragen und in 1,5 ml Eppendorf-Cups weitere 5 min bei 12000 U/min zentrifugiert.

Zur Messung des Fluoreszenzmarkers FITC-Dextran wurden 100 µl des Überstandes auf eine 96-well Platte aufgetragen und im Mikroplatten Reader (Safire, Tecan GmbH) mit einer Anregungswelle von 494 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm gemessen.

Anhand folgender Formel ließ sich das geometrische Zentrum (GC) aus den ermittelten Werten errechnen, um eine Aussage über die motorische Darmfunktion zu treffen:

$$GC = \sum \frac{\text{Anteil eines Segmentes an der Gesamtfluoreszenz [\%]} * \text{Segmentnummer}}{100}$$

GC stellt das Darmsegment dar, welches die höchste Konzentration an Fluoreszenzstoff aufweist. Je weiter der Fluoreszenzstoff in Richtung Colon vorgedrungen war, desto besser war die Darmpassage und somit die muskuläre Funktion des Darmes zu bewerten.

## 2.7 Myeloperoxidase (MPO)-Färbung

Die Anzahl von in die Darmwand infiltrierenden Leukozyten nach IM wurde indirekt mit Hilfe der von ihnen exprimierten MPO quantitativ nachgewiesen.

Dazu wurde ein 2 cm langer Dünndarmabschnitt von jedem getötetem Versuchstier entnommen - wie in 2.6 beschrieben - und in eine mit KHB gefüllten Sylgard-Schale überführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde darauf geachtet, möglichst den gleichen Dünndarmabschnitt für die Analyse zu gewinnen.

Unter dem Präparationsmikroskop (Leica MZ8, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) erfolgte die Fixierung des Dünndarmmesenteriums mit kleinen Nadeln auf der Sylgard-Schale. Anschließend wurde das Präparat längs und zwar nahe des Mesenteriums aufgeschnitten und mit weiteren kleinen Nadeln so aufgespannt, dass es sowohl in der Länge als auch in der Breite leicht gedehnt war.

Der so vorbereitete Dünndarmabschnitt wurde mit 100 % Ethanol für 10 min fixiert. Nach zweimaligem Ausspülen mit KHB konnte die Mucosa leicht von der ME abgezogen werden, sodass die aufgespannte ME auf der Sylgard-Schale zurückblieb. Nach Färbung mit Haker Yates (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) für 10 min, sowie zweimaligem Auswaschen der Färbelösung mit KHB, wurde das Präparat vorsichtig auf einen Objektträger gezogen und mit Hilfe des Eindeckmediums Aquatex (Microscopy Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einem Deckglas eingedeckt.

Unter einem Präparationsmikroskop (TE-2000, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) wurden die MPO exprimierenden Zellen quantitativ ausgezählt. Diese Auszählung erfolgte aus 5 Gesichtsfeldern 1600 px x 1200 px bei 100-facher Vergrößerung. Durch folgende Formel ließ sich die Anzahl an MPO positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> abschätzen:

$$\frac{\text{MPO+ Zellen}}{\text{mm}^2} = \frac{\text{MPO+ Zellen}}{\text{Gesichtsfelder} * 0,17 \text{ mm}^2}$$

## 2.8 Durchflusszytometrische Analyse

Mithilfe der Durchflusszytometrie (engl. Flow Cytometer Analyse/ FACS) konnten die Leukozyten in der ME präziser nach Größe, Struktur und Granularität quantitativ bestimmt und in Neutrophile, Monozyten sowie den Rest gegliedert werden.

Für die Analyse der Leukozyten wurde nach Organentnahme die ME mit einem Wattestäbchen von der Mucosa gestrippt. Anschließend wurde die ME abgewogen, zerkleinert und in 20 ml KHB gelegt (50 ml Eppendorf Röhrchen). Nach 5 min Zentrifuge bei 500 g Umdrehung und 4 °C erfolgte die Verdauung des Überstandes mit einem Enzymmix im Wasserbad für 35 min bei 37 °C. Der Enzymmix setzte sich zusammen aus 0,1 % Collagenase Typ II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA), 2,4 mg/ml Dispasell (La Roche), 1 mg/ml BSA (Appllichem) und 0,7 mg/ml Trypsin Inhibitor (Appllichem). Nach 40-minütiger Wartezeit wurde die Zellsuspension durch eine 70 µm Gaze gefiltert und mit 20 ml PBS nachgespült. Nach weiteren 5 min Zentrifuge bei 500 g Umdrehung und 4 °C erfolgte eine Auffüllung des Überstand mit 1 ml FACS Puffer (50 ml PBS und 200 µl Ethylendiamintetraessigsäure), eine Überführung in Flow Cytometry Tubes und eine weitere 7-minütige Zentrifugation. Der Überstand inkubierte daraufhin für 35 min bei 4 °C mit einer Fc-Blocking Lösung (clone 2.4G2, Institut der Molekular Medizin, Bonn Deutschland) sowie mit Fluoreszenz gekoppelten, monoklonalen Antikörper gegen Oberflächenmarker Ly6C (PE-Cy7, HK1.4, Biolegend, San Diego, CA, USA) und Ly6G (APC, 1A8, Biolegend). Anschließend wurden die Tubes mit jeweils 1 ml FACS Puffer gewaschen und 7 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden Beads (10 µl/Probe) hinzugefügt. Zur Abschätzung der Beadszahl erfolgte eine Auszählung von 10 µl Beadsmastermix, bestehend aus FACS Puffer und Beads, auf einer Zählkammer unter einem Lichtmikroskop.

Kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse am FACS Canto I/III (BD Biosence) wurden jeweils 5 µl Propidiumiodid hinzugefügt. Eingemessen wurden 3000 Beads pro 300 µl Probe. Da die Konzentration der Beads und das Volumen des durch das FACS Canto I/III fließende Zellmedium bekannt waren, konnte die Gesamtzellzahl in jeder Probe errechnet werden:

$$\frac{\text{Zell – Event}}{\text{Beads – Event}} * \frac{\text{gezählte Beads pro } 10 \mu\text{l}}{\text{Volumen der Probe}}$$

Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mithilfe einer FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

## 2.9 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde ein 1-way ANOVA mit Bonferroni post hoc test angewendet. Ebenso wurden Mittelwerte und Standardabweichungen (SEM) berechnet und analysiert.

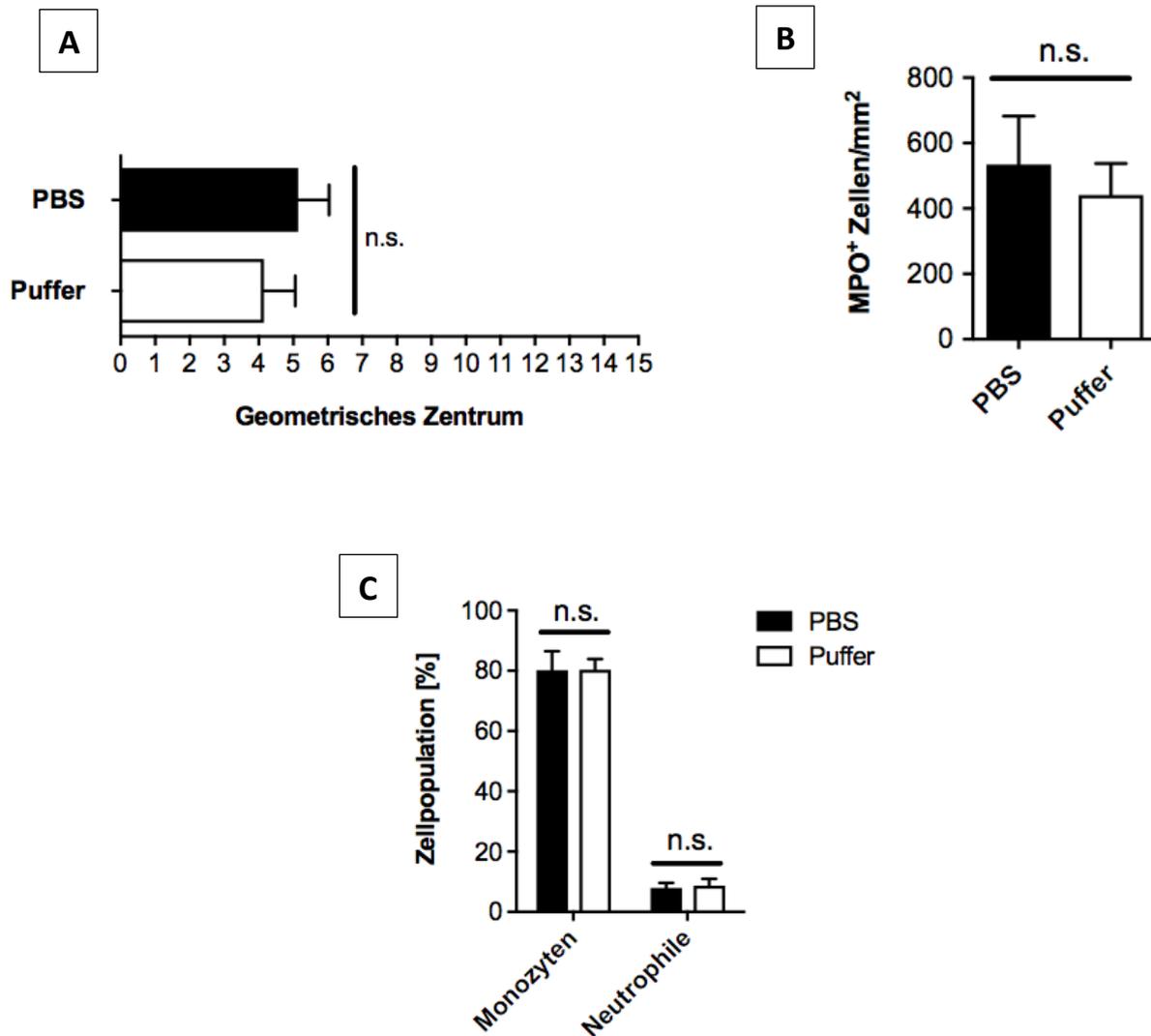
### 3. Ergebnisse

Die Daten von insgesamt 65 Versuchstieren der Gattung C57BL/6 Maus konnten entsprechend der Zielsetzungen erhoben und analysiert werden. Die Einteilung in die Versuchs- vs. Placebogruppe sowie der unterschiedlichen Testsubstanzen und Konzentrationen erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

#### 3.1 Versuchsreihen

##### 3.1.1 Vergleich zweier Pufferlösungen auf die postoperative Darmmotilität

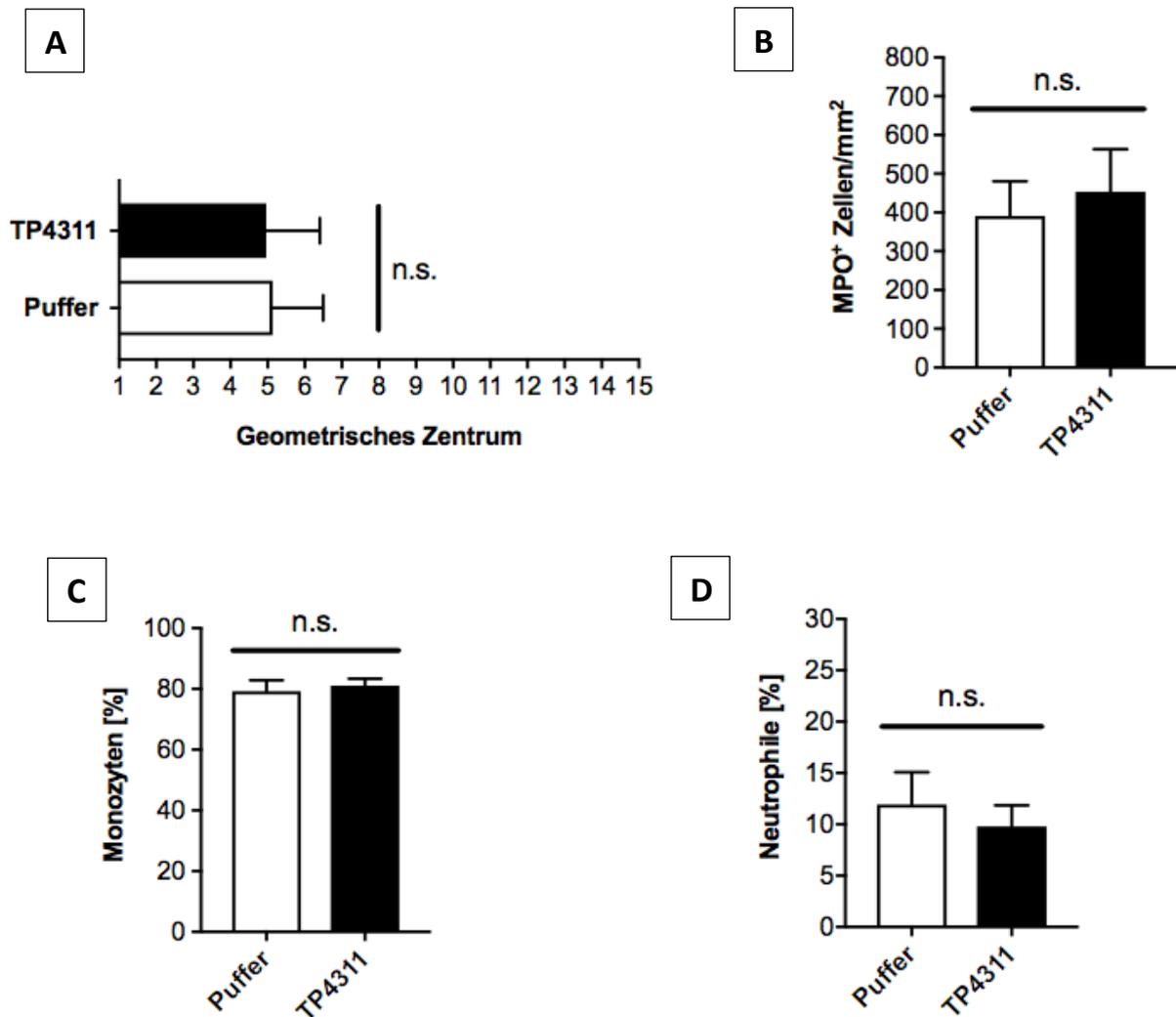
Das Ergebnis des Pilotversuches ergab, dass kein signifikanter Unterschied in der Beurteilung der Darmfunktion der mit Kolliphor-Puffer behandelten Tiere (GC:  $4,2 \pm 1$ ) im Vergleich zur mit PBS behandelten Gruppe (GC:  $5,2 \pm 1$ ) vorlag. Ebenso verhielt es sich mit der MPO-Färbung: die mit Kolliphor-Puffer behandelten Tiere wiesen mit  $450 \pm 100$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup> keine signifikant höhere Infiltration an Leukozyten in die ME auf als die mit PBS-Puffer behandelten Tiere ( $550 \pm 150$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup>). Bei der durchflusszytometrischen Analyse lag auch kein signifikanter Unterschied zwischen Kolliphor-Puffer und PBS vor. Beide wiesen im Mittel  $80 \% \pm 5$  Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und  $10 \% \pm 2$  Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Neutrophile auf.



**Abb. 7:** Vergleich zweier Pufferlösungen auf die postoperative Darmmotilität. Für die folgenden Ergebnisse bekamen die C57BL/6 Mäuse 30 min vor intestinaler Manipulation PBS (n=3) oder Kolliphor-Puffer (n=3) intravenös verabreicht. 24 h danach wurde der Darm entnommen und die Muscularis externa (ME) der Darmwand für die nachfolgenden Analysen isoliert und aufgearbeitet. (A) Bestimmung des gastrointestinalen Transits durch die prozentuale Verteilung von FITC-Dextran in 15 Segmenten, bestehend aus Magen (0-1), Dünndarm (2-11), Caecum (12) und Colon (13-15). (B) Auszählung der Myeloperoxidase (MPO) positiven Zellen in der postoperativen ME. (C) Durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und der Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen in der postoperativen ME. Sowohl beim gastrointestinalen Transit als auch bei der MPO-Färbung und der durchflusszytometrischen Analyse zeigt der Kolliphor-Puffer der Firma Thetis Pharmaceuticals keinen signifikanten Unterschied zum isotonen PBS-Puffer. Somit eignet sich der Kolliphor-Puffer als Lösungsmittel für unsere Versuchsreihen. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001), n.s.= nicht signifikant.

### 3.1.2 I.v. appliziertes TP4311 verbessert die postoperative Darmmotilität nicht

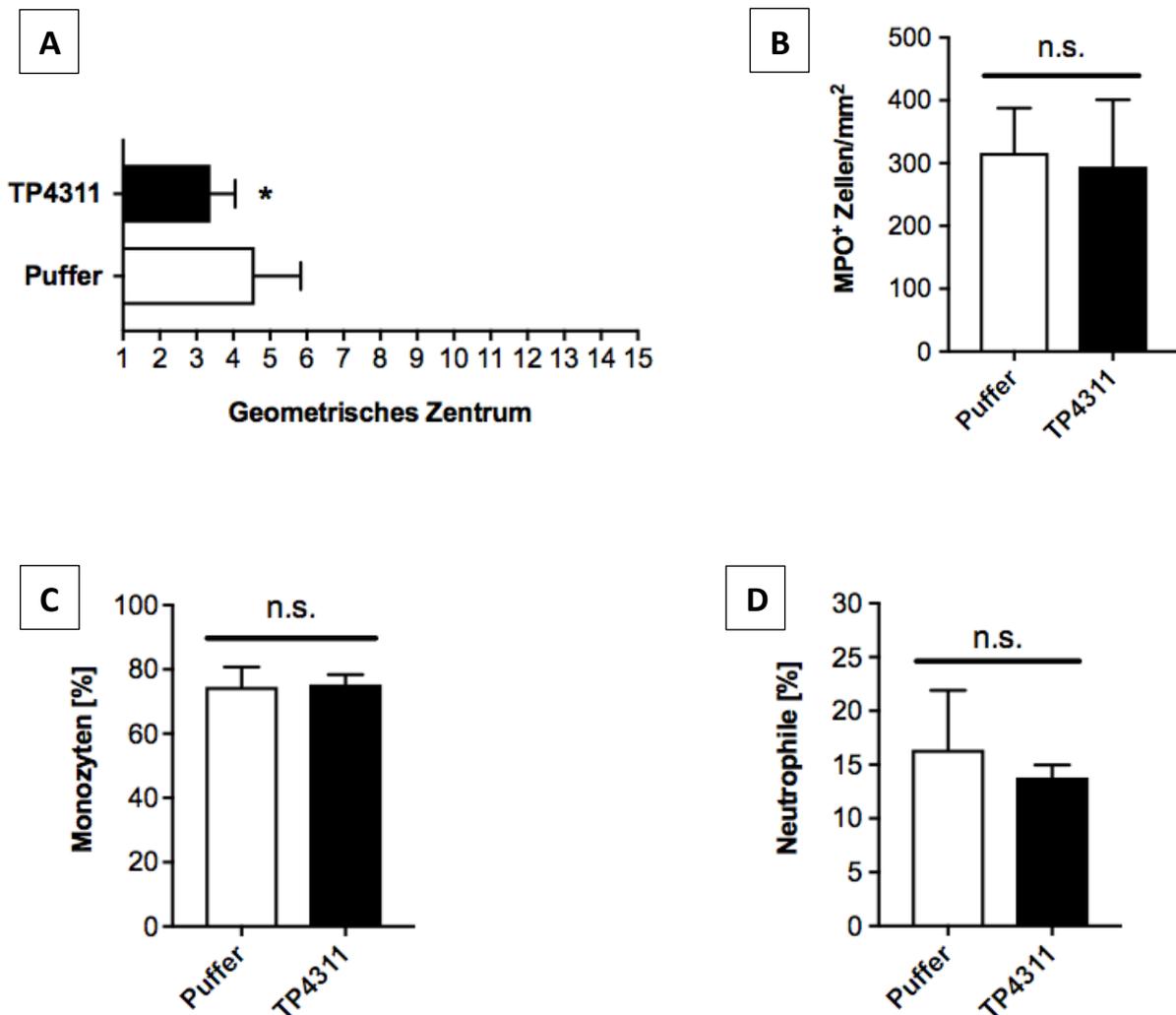
Im Experiment zwei untersuchten wir zuerst die Funktion des Darms durch die Berechnung des GC. Dabei zeigte sich durch die parenterale Behandlung mit TP4311 (10 mg/ml) keine Besserung der Darmfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mit TP4311 behandelten Tiere wiesen ein GC von  $5 \pm 1,5$  auf, welches sich als nicht signifikant zur Kontrollgruppe darstellte (GC:  $5,2 \pm 1,3$ ). Um festzustellen, ob die verzögerte Darmpassage der TP4311 behandelten Gruppe in eine verstärkte Entzündungsreaktion resultierte, untersuchten wir die Infiltration der Leukozyten in der postoperativen ME. Hierbei zeigten die TP4311 behandelten Tiere ein leicht vermehrtes Infiltrat an MPO+ Leukozyten ( $450 \pm 100$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup>) als die Kontrollgruppe ( $400 \pm 80$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup>). Dies spiegelte sich ebenfalls in der Bestimmung der prozentualen Leukozytenverteilung in der Darmmuskulatur mittels Durchflusszytometrie wieder: die TP4311 behandelten Tiere wiesen gleich viele Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Neutrophile 24 h nach Darmmanipulation ( $10 \% \pm 5$  Neutrophilen und  $79 \% \pm 5$  Monozyten) wie die Kontrollgruppe auf ( $12 \% \pm 3$  Neutrophilen und  $80 \% \pm 4$  Monozyten).



**Abb. 8:** I.v. appliziertes TP4311 verbessert die postoperative Darmmotilität nicht. Für die folgenden Ergebnisse bekamen die C57BL/6 Mäuse 30 min vor intestinaler Manipulation TP4311 (10 mg/ml) oder Kolliphor-Puffer intravenös (i.v.) verabreicht. 24 h danach wurde der Darm entnommen und die Muscularis externa (ME) der Darmwand für die nachfolgenden Analysen isoliert und aufgearbeitet, je Gruppe 8 Tiere. (A) Bestimmung des gastrointestinalen Transits durch die prozentuale Verteilung von FITC-Dextran in 15 Segmenten, bestehend aus Magen (0-1), Dünndarm (2-11), Caecum (12) und Colon (13-15). (B) Auszählung der Myeloperoxidase (MPO) positiven Zellen in der postoperativen ME. (C-D) Durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden  $Ly6C^+ Ly6G^-$  Monozyten und der  $Ly6C^+ Ly6G^+$  Neutrophilen in der postoperativen ME. Eine einmalige i.v. Gabe von TP4311 (10 mg/ml) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur mit Kolliphor-Puffer behandelten Kontrollgruppe. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), n.s.= nicht signifikant.

### 3.1.3 Enteral appliziertes TP4311 verschlechtert die postoperative Darmmotilität

Im Experimentansatz drei haben wir versucht, die Konzentration auf 50 mg/ml zu erhöhen, welches nach den Vorversuchen nur durch enterale Gabe 2 h vor IM zu erreichen war. Jedoch zeigte die p.o. Behandlung mit TP4311 (50 mg/ml) ganz im Gegenteil eine deutlich verschlechterte Darmfunktion gegenüber der mit Kolliphor-Puffer behandelten Kontrollgruppe. Die mit TP4311 behandelten Tiere wiesen ein weiter proximal im Dünndarm liegendes GC von  $3,4 \pm 1$  auf im Vergleich zur Kontrollgruppe (GC:  $4,5 \pm 1,5$ ) (\* $p < 0,05$ ). Bei der Bestimmung der Infiltration an MPO+ Leukozyten konnte jedoch eine unveränderte Entzündungsreaktion in der Darmmuskulatur im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden: die TP4311 behandelte Gruppe wies  $300 \pm 110$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup> auf, während bei der Kontrollgruppe  $320 \pm 70$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup> gezählt wurden. Ebenso verhielt es sich bei der durchflusszytometrischen Analyse: kein signifikanter Unterschied konnte zwischen der p.o. Behandlung mit TP4311 (14 %  $\pm$  1 Neutrophilen und 77 %  $\pm$  3 Monozyten) und der Kontrollgruppe (16 %  $\pm$  7 Neutrophilen und 75 %  $\pm$  6 Monozyten) festgestellt werden.



**Abb. 9:** Oral appliziertes TP4311 verschlechtert die postoperative Darmmotilität. Für die folgenden Ergebnisse bekamen die C57BL/6 Mäuse 2h vor intestinaler Manipulation TP4311 (50 mg/ml) oder Kolliphor-Puffer per oral (p.o.) verabreicht. 24 h danach wurde der Darm entnommen und die Muscularis externa (ME) der Darmwand für die nachfolgenden Analysen isoliert und aufgearbeitet, je Gruppe 7 Tiere. (A) Bestimmung des gastrointestinalen Transits durch die prozentuale Verteilung von FITC-Dextran in 15 Segmenten, bestehend aus Magen (0-1), Dünndarm (2-11), Caecum (12) und Colon (13-15). (B) Auszählung der Myeloperoxidase (MPO) positiven Zellen in der postoperativen ME. (C-D) Durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und der Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen in der postoperativen ME. Die p.o. Applikation von TP4311 (50 mg/ml) führte im Vergleich zur mit Kolliphor-Puffer behandelten Kontrollgruppe zu einem verschlechterten gastrointestinalen Transit: das geometrische Zentrum lag bei der TP4311 behandelten Gruppe weiter proximal im Dünndarm, als bei der Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ ). Dagegen waren keine signifikanten Unterschiede sowohl bei der MPO-Färbung als auch bei der durchflusszytometrischen Analyse zwischen beiden Gruppen zu beobachten. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), n.s. = nicht signifikant.

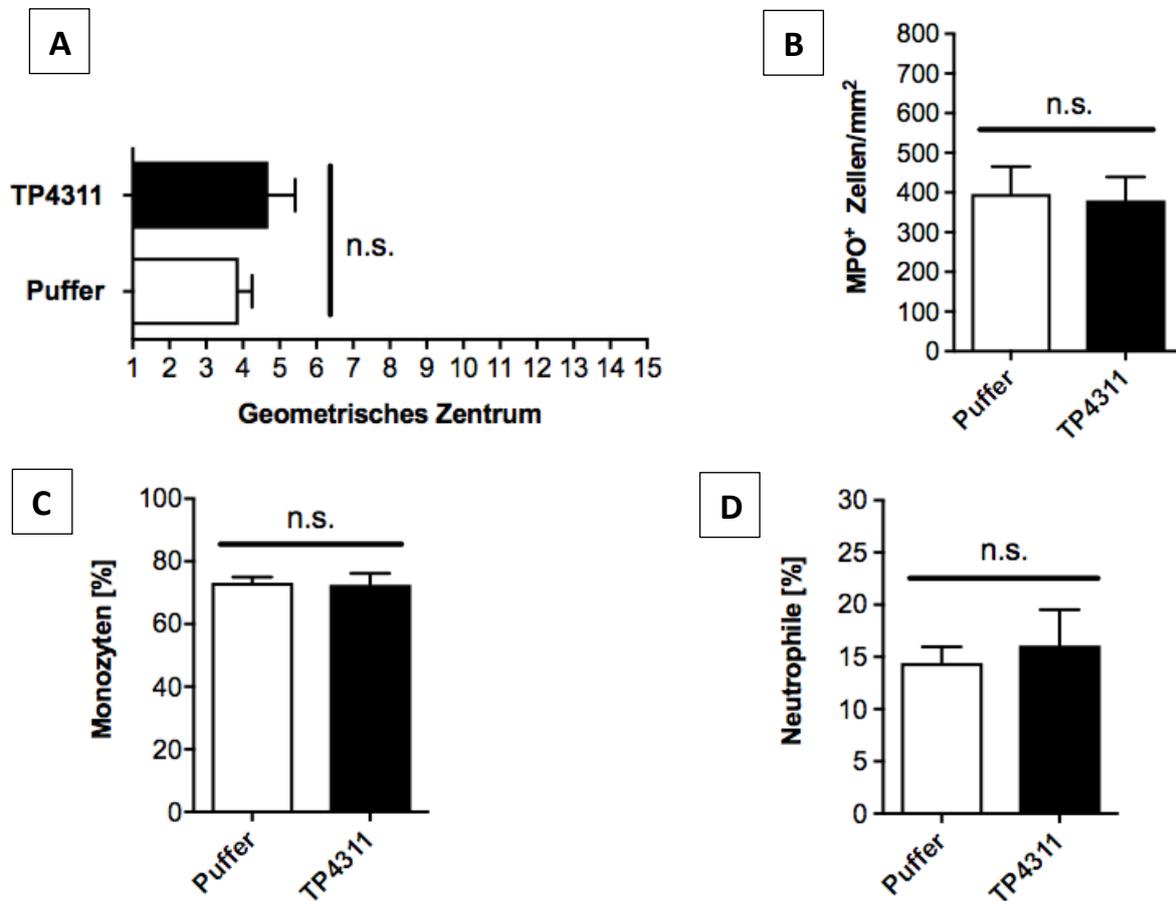
### 3.1.4 Langzeit-Supplementierung von TP4311 führt zu keiner Entzündungsauflösung

Bei der Bestimmung des GIT konnte trotz des mehrmaligem Applizieren von TP4311 an 5 aufeinanderfolgenden Tagen kein signifikanter Unterschied bei der Beurteilung der motorischen Darmfunktion zwischen der mit TP4311 behandelten Gruppe (GC:  $4,7 \pm 1$ ) und der mit Kolliphor-Puffer behandelten Kontrollgruppe (GC:  $3,9 \pm 0,5$ ) nachgewiesen werden.

Auch bei der Auszählung infiltrierender Leukozyten in die postoperative ME zeichnete sich kein signifikanter Unterschied zwischen der mit TP4311 behandelten Gruppe ( $380 \pm 70$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup>) und der Kontrollgruppe ( $400 \pm 80$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup>) ab.

Die prozentuale Zellverteilung in der Darmmuskulatur mittels Durchflusszytometrie wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen mit TP4311 behandelten Tieren ( $72 \% \pm 5$  Monozyten und  $16 \% \pm 4$  Neutrophile) und der Kontrollgruppe ( $73 \% \pm 2$  Monozyten und  $14 \% \pm 2$  Neutrophile) auf.

Darüber hinaus beobachteten wir, dass die Versuchstiere, die mit TP4311 behandelt wurden (n=5), nach dem 5. Tag offene Wunden an der Injektionsstelle aufwiesen, während die Kontrollgruppe (n=6), welche über 5 Tage Kolliphor-Puffer erhalten hat, keine offenen Wunden aufwies.



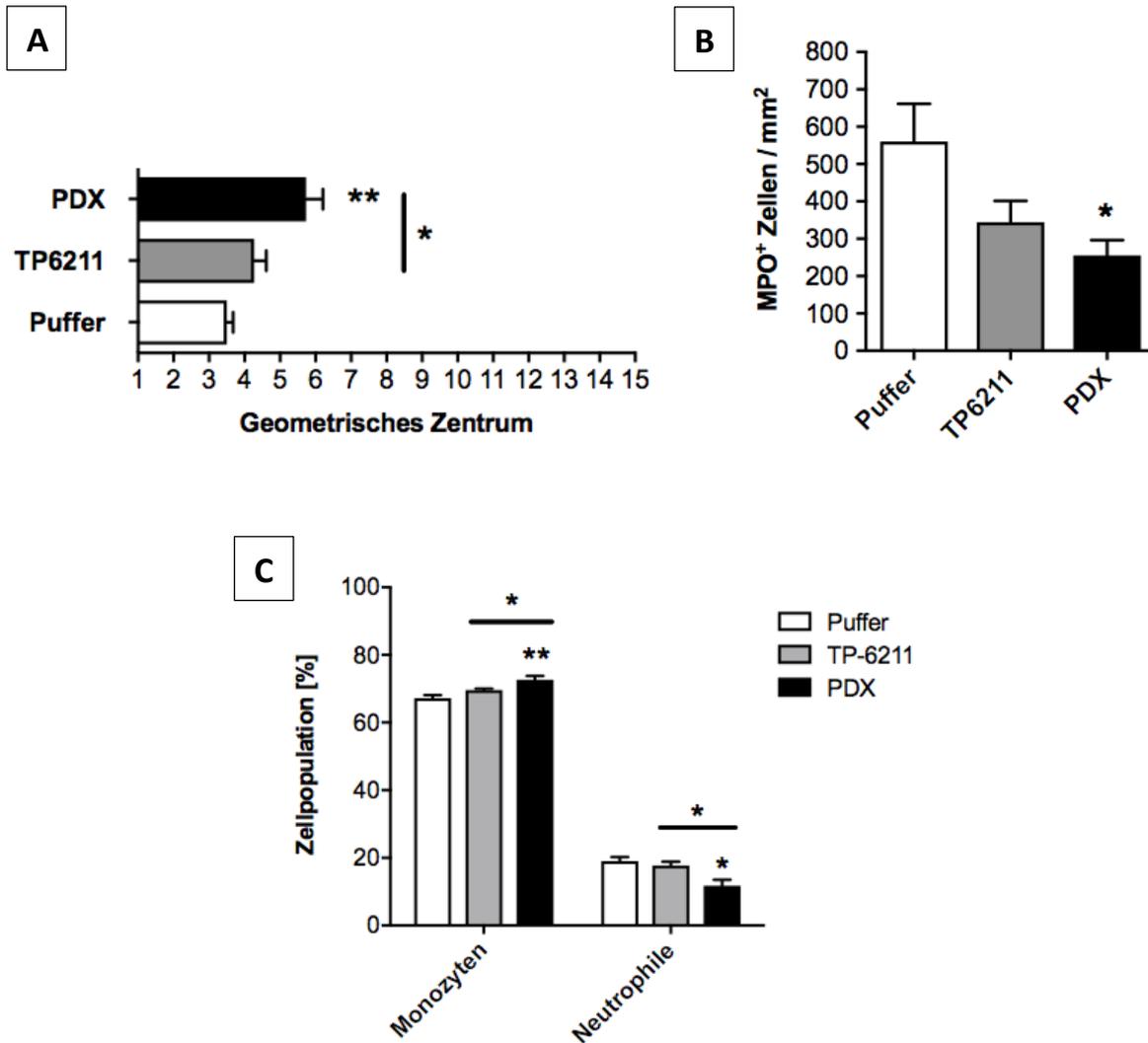
**Abb. 10:** Langzeit-Supplementierung von TP4311 führt zu keiner Entzündungsauflösung. Für die folgenden Ergebnisse bekamen die C57BL/6 Mäuse 30 min vor intestinaler Manipulation TP4311 (10 mg/ml) oder Kolliphor-Puffer über 5 Tage intravenös (i.v.) verabreicht. 24 h danach wurde der Darm entnommen und die Muscularis externa (ME) der Darmwand für die nachfolgenden Analysen isoliert und aufgearbeitet, je Gruppe 5-6 Tiere. (A) Bestimmung des gastrointestinalen Transits durch die prozentuale Verteilung von FITC-Dextran in 15 Segmenten, bestehend aus Magen (0-1), Dünndarm (2-11), Caecum (12) und Colon (13-15). (B) Auszählung der Myeloperoxidase (MPO) positiven Zellen in der postoperativen ME. (C-D) Durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und der Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen in der postoperativen ME. Die mit TP4311 (10 mg/ml) über 5 Tagen i.v. behandelten Tiere zeigten sowohl beim gastrointestinalen Transit als auch bei der MPO-Färbung und der Durchflusszytometrie keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), n.s. = nicht signifikant.

### 3.1.5 Reines Protectin DX, nicht aber TP6211 wirkt sich protektiv auf den Entzündungsverlauf des POI aus

Wie zu erwarten wies das reine Protectin DX als Positivkontrolle bei der Bestimmung der Darmfunktion einen deutlich beschleunigten GIT auf (GC von  $5,8 \pm 0,5$ ) im Gegensatz zu der mit Kolliphor-Puffer behandelten Kontrollgruppe (GC:  $3,5 \pm 0,2$ ) (\*\* $p < 0,01$ ). Unsere neue Substanz TP6211 zeigte jedoch im Vergleich zur Positivkontrolle eine signifikant verzögerte Darmpassage mit einem GC von  $4,3 \pm 0,5$ .

Diese verschlechterte Darmpassage durch die Behandlung mit TP6211 resultierte in einer vermehrte Entzündungsreaktion in der Darmmuskulatur: die TP6211 behandelten Tiere ( $350 \pm 80$  MPO+ Zellen/ $\text{mm}^2$ ) unterschieden sich von der Anzahl infiltrierender Leukozyten nicht signifikant von der Kontrollgruppe ( $550 \pm 100$  MPO+ Zellen/ $\text{mm}^2$ ). Während die Positivkontrolle ein signifikant vermindertes Infiltrat an MPO+ Zellen aufwies ( $250 \pm 60$  MPO+ Zellen/ $\text{mm}^2$ , \* $p < 0,05$ ).

Bei der Durchflusszytometrie konnte bei den TP6211 behandelten Tieren ( $70 \% \pm 2$  Monozyten und  $17 \% \pm 2$  Neutrophile) ebenso kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden ( $66 \% \pm 3$  Monozyten und  $18 \% \pm 2$  Neutrophile). Wo hingegen die Positivkontrolle eine deutlich signifikante Reduktion der Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilenzahl ( $10 \% \pm 3$ ) aufwies (\* $p < 0,05$ ). Während die Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilenzahl anteilig sank, stieg zugleich signifikant die Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozytenzahl mit  $70 \% \pm 2$  im Vergleich zur Kontrollgruppe an (\*\* $p < 0,01$ ).



**Abb. 11:** Reines Protectin DX, nicht aber TP6211 wirkt sich protektiv auf den Entzündungsverlauf des POI aus.

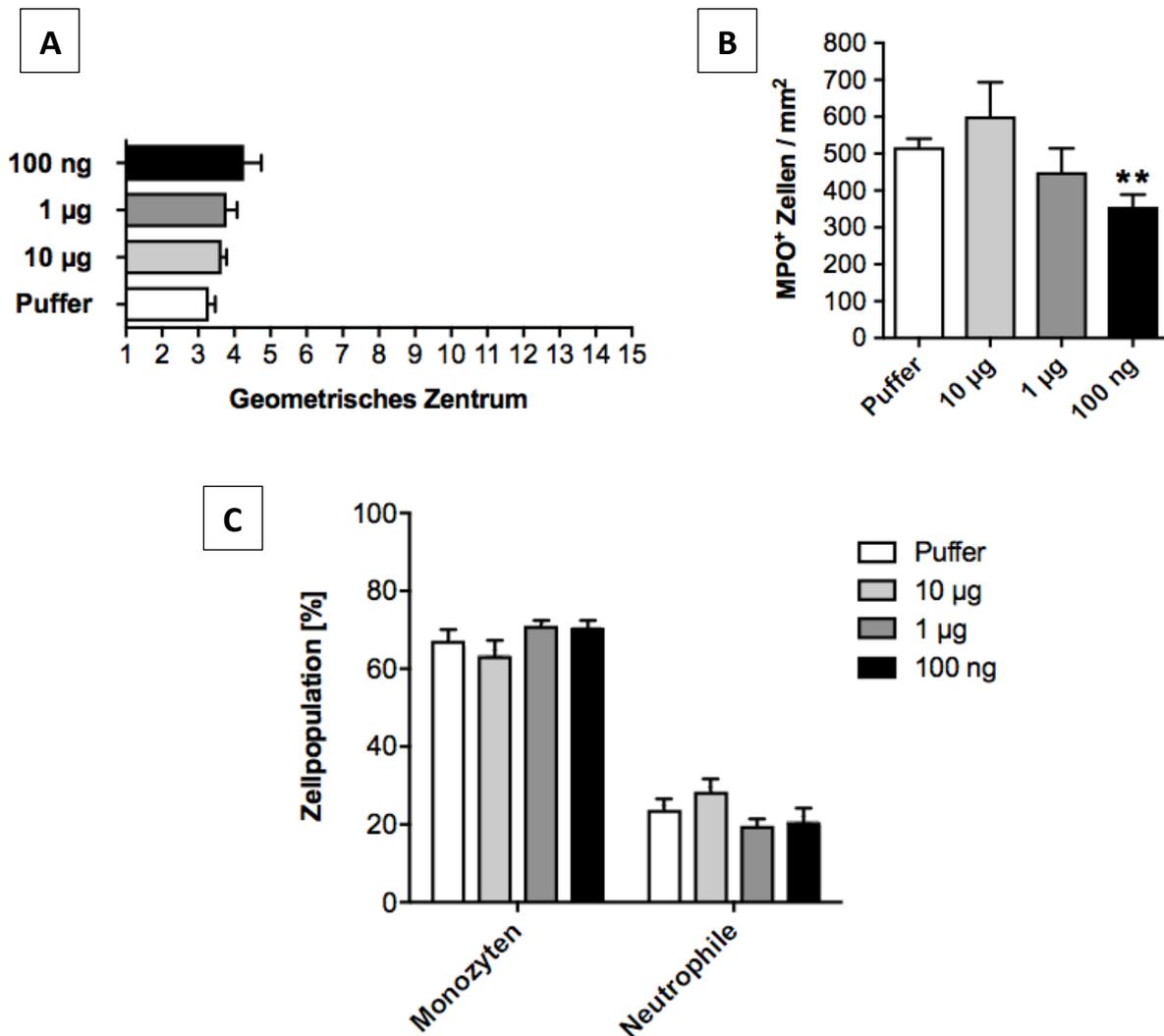
Für die folgenden Ergebnisse bekamen die C57BL/6 Mäuse unmittelbar nach intestinaler Manipulation TP6211 (1,75 µg) oder reines Protectin DX (PDX, 1 µg) als Positivkontrolle oder Kolliphor-Puffer intraperitoneal verabreicht. 24 h danach wurde der Darm entnommen und die Muscularis externa (ME) der Darmwand für die nachfolgenden Analysen isoliert und aufgearbeitet, je Gruppe 4 Tiere. (A) Bestimmung des gastrointestinalen Transits durch die prozentuale Verteilung von FITC-Dextran in 15 Segmenten, bestehend aus Magen (0-1), Dünndarm (2-11), Caecum (12) und Colon (13-15). (B) Auszählung der Myeloperoxidase (MPO) positiven Zellen in der postoperativen ME. (C) Durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und der Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen in der postoperativen ME. TP6211 zeigte keine signifikanten Unterschiede zur mit Kolliphor-Puffer behandelten Kontrollgruppe. Während die Positivkontrolle im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlich verbesserten gastrointestinalen Transit (\*\*p<0,05), verminderte MPO Zellen (\*p<0,05) sowie vermehrte Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten (\*\*p<0,01) und reduzierte Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen (\*p<0,05) in der ME aufwies. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

### 3.1.6 TP6212 kann den Verlauf eines POI nicht verhindern

Trotz verschiedener Konzentrationen war in dieser Versuchsreihe beim GIT kein Unterschied zwischen dem Protectin DX-Derivat TP6212 und der mit Kolliphor-Puffer behandelten Kontrollgruppe zu vermerken. TP6212 mit der geringsten Konzentration (100 ng) zeigte das am weitesten distal liegende GC mit  $4,3 \pm 0,6$ , welches nicht signifikant zur Kontrollgruppe war (GC:  $3,2 \pm 0,2$ ).

Obwohl sich die Funktion der Darmmotilität bei den TP6212 behandelten Tieren kaum von der Kontrollgruppe unterschied, zeigte die geringste Konzentration von TP6212 eine Reduktion der infiltrierenden Leukozyten in der ME, 24 h nach Manipulation: bei den TP6212 behandelten Tieren mit der Konzentration von 100 ng wurden  $350 \pm 50$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup> gezählt, während bei der Kontrollgruppe  $500 \pm 20$  MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup> gemessen wurden (\*\*p<0,01).

Als nächstes untersuchten wir mithilfe der Durchflusszytometrie, ob die Verringerung der MPO+-Zellen durch die TP6212-Behandlung (100 ng) auf eine prozentuale Reduktion monozytärer oder neutrophiler Leukozyten in der postoperativen ME beruhte. Durch die Behandlung mit TP6212 in den Konzentrationen 100 ng und 1 µg waren die Leukozyten in ihrer Anzahl jedoch nur geringfügig im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert bzw. vermindert. Im Mittel wiesen die TP6212 Gruppen mit den verschiedenen Konzentrationen und die Kontrollgruppe 70 % Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und 25 % Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Neutrophile auf. Dies heißt aber nicht, dass kein qualitativer Unterschied zwischen den eingewanderten Leukozyten bei den mit TP6212 behandelten Tieren und der Kontrollgruppe bestehen könnte.



**Abb. 12:** TP6212 kann den Verlauf eines POI nicht verhindern.

Für die folgenden Ergebnisse bekamen die C57BL/6 Mäuse 30 min vor intestinaler Manipulation TP6212 (10 µg, 1 µg, 100 ng) oder Kolliphor-Puffer intravenös verabreicht. 24 h danach wurde der Darm entnommen und die Muscularis externa (ME) der Darmwand für die nachfolgenden Analysen isoliert und aufgearbeitet, je Gruppe 5 Tiere. (A) Bestimmung des gastrointestinalen Transits durch die prozentuale Verteilung von FITC-Dextran in 15 Segmenten, bestehend aus Magen (0-1), Dünndarm (2-11), Caecum (12) und Colon (13-15). (B) Auszählung der Myeloperoxidase (MPO) positiven Zellen in der postoperativen ME. (C-D) Durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und der Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen in der postoperativen ME. Die Behandlung durch TP6212 zeigt trotz verschiedener Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied sowohl beim gastrointestinalen Transit als auch bei der Durchflusszytometrie im Vergleich zur mit Kolliphor-Puffer behandelten Kontrollgruppe. Lediglich konnten die TP6212 Tiere mit der geringsten Konzentration (100 ng) ein signifikant vermindertes Infiltrat an MPO+ Zellen in der Darmmuskulatur aufweisen (\*\*p<0,01). Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

## 4. Diskussion

Ist die gerichtete Funktion des Gastrointestinaltraktes nach abdominalen Eingriffen gestört, kommt es zum klinischen Bild eines POI und zwar nicht nur direkt am Eingriffsort, sondern im Bereich des gesamten Gastrointestinaltraktes (Schwarz et al., 2004). Durch das Fehlen evidenzbasierter prophylaktischer Maßnahmen stellt der POI im klinischen Alltag ein permanent bestehendes Problem dar (Mao et al., 2019). Der dadurch bedingt erhöhte Kostenaufwand verbunden mit erhöhtem Risiko für den betroffenen Patienten begründen die Notwendigkeit nach wirksamen Therapeutika zu suchen (Iyer et al., 2009). Im Fokus der Forschung stehen daher Untersuchungen der zugrundeliegenden Pathomechanismen des POI und die Identifizierung möglicher molekularer Schlüsselmechanismen. Boeckxstaens und de Jonge beschrieben vier Signalwege, die für die Ausbildung bzw. mangelnde Auflösung des POI identifiziert wurden. Der unter 4 aufgeführte pharmakologische Signalweg ist klar definiert und getrennt von den anderen zu bewerten und nur der Vollständigkeit halber aufgeführt (Boeckxstaens und de Jonge, 2009):

1. neurogener Signalweg (inhibitorische adrenerge Reflexe nach abdominellem Eingriff)
2. hormoneller Signalweg (über das Corticotropin-Releasing Hormon)
3. inflammatorischer Signalweg (Entzündungsreaktion in der ME)
4. pharmakologischer Signalweg (Opiate)

Keiner der aufgeführten Pathomechanismen ist isoliert für die Funktionseinschränkung im POI verantwortlich zu machen, im Wesentlichen greifen sie im Rahmen eines multifaktoriellen Geschehens ineinander über. Derzeit haben sich insbesondere der neurogene und inflammatorische Signalweg als Schlüsselereignisse für die Entwicklung und Dauer des POI herauskristallisiert (Boeckxstaens und de Jonge, 2009).

Für dieses Zusammenspiel sprechen neuere Studien, die zeigen, dass ein neuroimmuner Mechanismus insbesondere durch den Nervus vagus und den entzündungsaflösenden Lipidmediatoren besteht, der sogenannte „vagus proresolving Reflex“. Stimuliert man den Nervus vagus ex vivo, wird auf direktem Wege die Synthese von spezifischen antiinflammatorischen Lipidmediatoren initiiert (Serhan et al., 2018 b; 2019).

Die Bedeutung der Lipidmediatoren und deren möglicher Einsatz ist Thema dieser Arbeit. Basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde untersucht, ob es mit Hilfe einer Immunonutrition von synthetisch hergestellten stabilen Amino-Lipidverbindungen gelingt, die prolongierte Form des POI im Mausmodell zu verhindern.

Dazu wurde die synthetisch hergestellte Amino-Lipid-Verbindung der n-3 Fettsäure DHA (TP4311) oder des Lipidmediators Protectin DX (TP6211 oder TP6212) eingesetzt. Die Entscheidung, einen Molekülverband aus einer Aminosäure mit DHA bzw. Protectin DX synthetisch herzustellen und anzuwenden, basiert auf dem Wissen, dass ein direkter Einsatz einer essentiellen Fettsäure oder deren Lipidmediatoren aufgrund der Instabilität und der Notwendigkeit einer mehrtägigen präoperativen Gabe in Form von Fischölemulsionen beim akuten Notfall sowie in der präoperativen Versorgung des Patienten nicht in Frage kommt. Durch die Stabilisierung der n-3 Fettsäuren sollte die Wirkung der Präparate gesteigert werden und zu einem kürzeren Behandlungsintervall führen, womit die Möglichkeit des Akuteinsatzes gegeben wäre.

Diese vorliegende Arbeit ist insofern eine Pilotstudie, da die hergestellten Amino-Lipid-Verbindungen erstmalig zur Beantwortung ihrer Wirksamkeit auf die Beeinflussung der Entzündungskaskade in einem iatrogen ausgelösten POI im Mausmodell getestet wurden. Vergleiche mit vorliegenden Studien sind daher nur indirekt möglich.

Die Dosierung der Testsubstanzen sowie deren Applikation (i.v. vs. p.o. /i.p.) wurde nach ersten vorliegenden Auswertungen entsprechend verändert.

Die Auswertung der Testsubstanz TP4311 ergab in keiner der Testreihen einen signifikanten Unterschied zwischen der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. Eine Auflösung bzw. Verbesserung der Darmmotilität nach Etablierung des POI konnte daher nicht gezeigt werden. Mögliche Gründe könnten in einer nicht ausreichenden Bioverfügbarkeit der Substanz liegen sowie in der Interaktion auch neuraler/hormonaler Signalwege bedingt sein. Das Modell selbst ist jedoch valide, da bei beiden Gruppen ein vermehrter Influx an Leukozyten als Zeichen der Entzündungsreaktion in der Darmmuskulatur zu beobachten war (Kalff et al., 1998).

Bezogen auf das TP4311 zeigte sich keine Abnahme der Inflammation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien, die zeigen konnten, dass eine Substitution von Fischöl, welches die n-3 Fettsäure DHA und EPA enthält, die Inflammation bei chronischen Darmerkrankungen reduziert und die Prognose verbessert (Calder et al., 2008; Hillier et al., 1991; Trebble et al., 2004): Hillier et al. (1991) konnten so z.B. zeigen, dass durch die Gabe von 3 Fischölkapseln am Tag über 12 Wochen vermehrt n-3 Fettsäuren in Lipidmembranen der Darmmucosa eingebaut werden und diese dadurch Einfluss auf die Synthese proinflammatorischer Lipidmediatoren nehmen. Schließlich konnte nach 12 Wochen Behandlung mit Fischöl eine verminderte Anzahl an entzündungsfördernden Thromboxane und Prostaglandine gemessen und somit eine Verbesserung der Symptome bei chronisch darmkranken Patienten erzielt werden. Ebenso konnten Wehner et al. (2012) im standardisierten Mausmodell des POI nachweisen, dass eine parenterale Gabe von Fischöl nur 5 präoperative Tage benötigt, um antiinflammatorische Effekte zu zeigen.

Möglicherweise zeigt in unserer Studie das DHA-Derivat TP4311 keine Wirkung, da es im Gegensatz zu Fischöl keine Antioxidantien wie Vitamin E enthält, welche die Lipide vor der Peroxidation schützen konnten. Die Bedeutung der Antioxidantien wurde in klinischen Studien gezeigt, in denen kritisch kranke Patienten von parenteralen Infusionen mit Antioxidantien profitieren und dadurch die Dauer eines POI verkürzt wurde (Luo et al., 2008; Ohno et al., 2009). Allerdings wurde umgekehrt diese Bedeutung der Antioxidantien jedoch von Wehner et al (2012) nicht bestätigt. Hier zeigte sich im Endotoxämie-Modell, dass Fischöl auch ohne Zusatz eines Antioxidans einen antiinflammatorischen Effekt aufweist. Weitere Studien dazu stehen noch aus.

Vielmehr führte eine Langzeit-Supplementierung von TP4311 zu infizierten offenen Wunden an der Injektionsstelle. Da diese Beobachtungen sowohl in Vorversuchen mit Fischölemulsionen als auch bei der Kontrollgruppe nicht gemacht werden konnten, können unsauberes Arbeiten, technische Fehler sowie gegenseitiges Beißen als Ursache ausgeschlossen werden. Hingegen ist die Pathogenese der offenen Wunden auf eine Akkumulation von TP4311 durch ein zu langsames Abtransportieren in der Schwanzvene zurückzuführen.

Eine andere Ursache für die fehlende signifikante Wirkung im POI dieser Testsubstanz könnte am Fehlen des EPA liegen. So hatte eine Studie bei Patienten mit der Diagnose einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP) mit einer synthetisch hergestellten Amino-Lipid-Verbindung von derselben Firma zu positiven Ergebnissen geführt. Das eingesetzte Präparat TP252 bestand dabei aus zwei EPA und der Aminosäure Magnesium L-Lysin (Nakanishi et al., 2018). Selbst EPA alleine zeigte antineoplastische Aktivität bei FAP Patienten (Courtney et al., 2007; Oshima et al., 1995; West et al., 2010). Da EPA ebenso wie DHA in ihrer chemischen Struktur sehr instabil sind, sorgte die Amino-Lipid-Verbindung vom TP252 für Stabilität. Die Behandlung mit TP252 zeigte einen geringeren Anteil an Arachidonsäure in der Darmmucosa von Mäusen. Dafür konnte ein vermehrter Anteil an EPA und dessen antiinflammatorischen Lipidmediatoren in der Darmmucosa gemessen werden, welches wahrscheinlich zur Unterdrückung des Tumorwachstums führte. Jedoch zeigte Stein et al. (2016), dass das Enzym LOX 5, welches u.a. EPA metabolisiert, im unbehandelten Darm nachweisbar ist und weniger während der POI Pathogenese.

Neben dem TP252 zeigte auch eine weitere synthetisch hergestellte Amino-Lipid-Verbindung TP113, welche aus DHA, der Glutamat-Aminosäure und Metformin besteht, in Versuchen beim Typ II Diabetes, dass antiinflammatorische Lipidmediatoren der DHA eine entscheidende Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielen (Mitchell et al., 2017). Insbesondere erweist sich Protectin DX als ein wichtiger Regulator der Glukogenese und der Insulinresistenz (White et al., 2014). Zwar beruht diese Studie auf einem anderen Krankheitsmechanismus, jedoch führte die Amino-Lipid-Verbindung von TP113 zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit von DHA und in Kombination mit Metformin zu einer verbesserten Insulinsensitivität, als eine Therapie mit Metformin allein. Bereits eine einzelne enterale Gabe von TP113 mit der höchsten Konzentration (200mg/kg) führte nach 2h zu erhöhter Konzentration an DHA und Protectin DX im Skelettmuskel bei Diabetes Mäusen. Auch diesbezüglich bliebe zu klären, ob im POI Modell TP4311 die Konzentration an DHA und Protectin DX in der Darmmuskulatur erhöht.

2016 konnten Stein et al (2016) nachweisen, dass bei Gabe einer DHA reichen n-3 Fettsäureemulsion erhöhte Konzentrationen vom Lipidmediator Protectin DX in der Darmmuskulatur vorlagen und somit dem Protectin DX eine entscheidende Rolle in der

Auflösung der Inflammation beim POI zugesprochen wird. Diese Beobachtung stellte man auch beim Protectin DX Isomer: Protectin D1 fest. Protectin D1 senkt das Entstehungsrisiko einer Peritonitis, indem es die Einwanderung an Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten reduziert (Serhan et al., 2006). Ebenso zeigt eine weitere Studie, dass eine Protectin DX Behandlung zu einer geringeren Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies sowie zu einer geringeren MPO Freilassung aus menschlichen Neutrophilen führt. Auf diese Weise kann sich keine chronische Inflammation aufbauen (Liu et al., 2014).

Entgegen der vorhin genannten Studien konnten wir aber keinen antiinflammatorischen Effekt bei den Amino-Lipid-Verbindungen des Lipidmediators Protectin DX (TP6211, TP6212) im POI Modell nachweisen. Sowohl TP6211 als auch TP6212 führten zu einer verschlechterten Darmaktivität 24 h nach IM.

Ob es nun alleine an der Amino-Lipid-Verbindung liegt oder an einem übergreifenden Mechanismus von noch unbekanntem intrazellulären Signalwegen, bleibt letztendlich offen. Im Gegensatz zum Protectin DX sind die an der Auflösung der Inflammation beim POI beteiligten involvierten Rezeptoren der anderen Lipidmediatoren Lipoxin A4, Resolvin E1 und Resolvin D1 bekannt (Arita et al., 2007; Krishnamoorthy et al., 2010; Kytikova et al., 2019; Rogerio et al., 2012). Demnach werden weitere Studien benötigt, um den genauen Wirkungsmechanismus von Protectin DX, vor allem den Rezeptor, näher zu charakterisieren (Serhan und Levy, 2018 a). Damit könnte man Unterschiede nur minimal veränderter Lipidverbindungen, wie den hier eingesetzten Testsubstanzen, erklären.

Zur Selbstkritik sei zu nennen, dass keine eigene Qualitätskontrolle der Mittel TP4311, TP6211, TP6212 durchgeführt wurde. Dass diese Mittel die vorgegebenen Konzentrationen an DHA oder Protectin DX tatsächlich enthalten haben, wurde vorausgesetzt. In diesem Kontext hätte den Versuchsreihen möglicherweise eine massenspektrometrische Analyse der Lipide in der postoperativen ME und der Blutzellen vorausgehen müssen. Damit hätte man ausschließen können, dass ein Wirkungsverlust durch eine veränderte Aufnahmefähigkeit der Substanzen oder durch fehlende Bindung am Rezeptor, z.B. durch Veränderung der sterischen Konformation, eingetreten ist. Bezüglich der Aufnahme in die Darmmuskulatur gingen wir in Analogie zu

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe davon aus, dass die Bioverfügbarkeit der Testsubstanzen denen der bereits getesteten Substanzen (DHA reiche Fischölemulsion und reines Protectin DX) entspricht bzw. sogar verbessert sein könnte (Stein et. al, 2016; Wehner et. al, 2012).

Der Wirkungsverlust der Testsubstanzen (TP4311, TP6212, TP6211) mag durch die Wahl des Stabilisators begründet sein. Testreihen müssen zeigen, ob diese eingebrachten Aminosäuren zu einem Wirkungsverlust führen, da die bereits getesteten Substanzen (DHA reiche Fischölemulsion und reines Protectin DX) sowie die Positivkontrolle im Experiment 5 ohne die Aminosäure als Stabilisator eine prolongierte Form des POI verhindern konnten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass trotz der vielversprechenden Vorversuche TP4311, TP6211 und TP6212 keinen Effekt im Sinne einer Präventionstherapie zur Vermeidung eines POI im Tiermodell gezeigt hatten. Insbesondere der zu erwartende antiinflammatorische Effekt auf die Darmmuskulatur nach Manipulation blieb aus, es kam darüber hinaus eher zu einer Verschlechterung der Darmmotilität.

## 5. Zusammenfassung

Der postoperative Ileus (POI) ist charakterisiert durch eine reflektorisch nach operativen Eingriffen entstehende, regrediente Darmatonie des gesamten Intestinaltraktes. Das hohe Morbiditäts-Mortalitätsrisiko für den Patienten sowie die wirtschaftlichen Kosten für das Gesundheitssystem stellen ein weitreichendes Problem dar. Eine evidenzbasierte valide Therapie oder prophylaktische Maßnahmen dieser gefürchteten Komplikation stehen nicht zur Verfügung.

Pathogenetisch steht die durch intraoperative Manipulation ausgelöste komplexe Entzündungsreaktion in der Darmmuskulatur im Fokus mehrerer Studien.

Vielversprechend ist daher der Ansatz, die Entzündungsauflösung über wichtige Bestandteile der Phospholipidschicht der Zellmembranen und daraus generierter Lipidmediatoren positiv zu beeinflussen. Im Rahmen einer Immunonutrition könnten so enteral/parenteral zugeführte mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die einen wichtigen Bestandteil der Phospholipidmembran darstellen, die Auflösung der Entzündung beschleunigen und das Entstehen eines prolongierten POI verhindern.

Eine Wirksamkeit dieser Zufuhr von ungesättigten Fettsäuren wurde für die Therapie von Gicht, rheumatoider Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen bereits unter Beweis gestellt.

Der Einsatz ungesättigter Fettsäuren im POI ist jedoch aufgrund der Notwendigkeit einer mehrtägigen Einnahme präoperativ gerade im Notfall nicht möglich. Da ihre Verfügbarkeit – insbesondere aufgrund der hohen Herstellungskosten – eingeschränkt ist, wurden in Analogie stabile Amino-Lipid-Verbindungen synthetisch hergestellt.

In dieser Arbeit wurden erstmals am POI-Mausmodell die synthetisch hergestellte Amino-Lipid-Verbindung der n-3 Fettsäure DHA (TP4311) sowie ebensolche Verbindungen des Lipidmediators Protectin DX (TP6211, TP6212) untersucht.

Die Wirkung der Testsubstanzen auf die Darmmotorik sowie die Auswertung der an der Entzündung beteiligten Leukozyten standen im Fokus der Auswertung. Hierzu wurden männliche C57BL/6 Mäuse vor oder während einer Manipulation mit den synthetisch hergestellten Substanzen (TP4311, TP6211, TP6212) oder mit Puffer behandelt. Im Anschluss wurden die Darmpassage in vivo und die Leukozyteninfiltration in der

Darmmuskulatur bestimmt. Zur weiteren Charakterisierung der beteiligten Zelltypen wurden durchflusszytometrische Analysen genutzt.

Während der Nachweis eingewanderter Leukozyten in die Darmmuskulatur das Modell des POI als solches bestätigte, konnte weder eine statistisch signifikante Veränderung der Darmmotilität noch eine Entzündungsabnahme im Vergleich behandelter zu mit Placebo behandelten Tieren gezeigt werden. Ebenso konnte keine statistisch signifikante Veränderung der prozentualen Leukozytenverteilung nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse zeigen somit keinen antiinflammatorischen Effekt der synthetisch hergestellten Amino-Lipid-Verbindungen auf den POI.

Auch wenn diese Ergebnisse somit keinen Effekt im POI Mausmodell zeigten, heißt dies nicht, dass die Möglichkeit einer Immunonutrition mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren falsch ist. Die Auswahl anderer Stabilisatoren, Erkenntnisse über die entsprechenden Rezeptoren sowie Analysen des Metabolismus der eingesetzten Fettsäuren könnten die primär hoffnungsvollen Ansätze der Immunonutrition als Therapieoption bestärken.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die 3 Phasen des POI	10
Abbildung 2: Biosynthese der antiinflammatorischen Lipidmediatoren Resolvin (Rv), Protectin DX (PDX) und Maresin (MaR)	15
Abbildung 3: Biosynthese der proinflammatorischen Lipidmediatoren Prostaglandin (PG) und Leukotriene (LT), sowie des antiinflammatorischen Lipidmediators Lipoxin (LX)	16
Abbildung 4: Strukturformeln der zu testenden Substanzen TP4311, TP6211 und TP6212	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der 6 Versuchsreihen	24
Abbildung 6: Darstellung einer intestinalen Manipulation	26
Abbildung 7: Vergleich zweier Pufferlösungen auf die postoperative Darmmotilität	32
Abbildung 8: I.v. appliziertes TP4311 verbessert die postoperative Darmmotilität nicht	34
Abbildung 9: Oral appliziertes TP4311 verschlechtert die postoperative Darmmotilität	36
Abbildung 10: Langzeit-Supplementierung von TP4311 führt zu keiner Entzündungsauflösung	38
Abbildung 11: Reines Protectin DX, nicht aber TP6211 wirkt sich protektiv auf den Entzündungsverlauf des POI aus	40
Abbildung 12: TP6212 kann den Verlauf eines POI nicht verhindern	42

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pilotversuch	21
Tabelle 2: Versuchsreihen des DHA-Derivat TP4311	22
Tabelle 3: Versuchsreihen der Protectin DX-Derivate: TP6211 und TP6212	23

## 8. Literaturverzeichnis

Adams S, Lopata AL, Smuts CM, Baatjies R, Jeebhay MF. Relationship between Serum Omega-3 Fatty Acid and Asthma Endpoints. *Int J Environ Res Public Health*. 2018, 16

Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2007, 178: 3912-3917

Barquist E, Bonaz B, Martinez V, Rivier J, Zinner MJ, Tache Y. Neuronal pathways involved in abdominal surgery-induced gastric ileus in rats. *The American journal of physiology*. 1996, 270: R888-R894

Bauer AJ. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. *Neurogastroenterology and motility. The official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2008, 20 Suppl 1: 81-90

Bauer AJ, Boeckstaens GE. Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2004, 16 Suppl 2:54-60

Blasbalg TL, Hibbeln JR, Ramsden CE, Majchrzak SF, Rawlings RR. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr*. 2011, 93: 950-962

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

Bonaz B, Plourde V, Tache Y. Abdominal surgery induces Fos immunoreactivity in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*. 1994, 349: 212-222

Bragg D, El-Sharkawy AM, Psaltis E, Maxwell-Armstrong CA, Lobo DN. Postoperative ileus: Recent developments in pathophysiology and management. *Clinical nutrition* (Edinburgh, Scotland). 2015, 34: 367-376

Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2008, 52: 885-897

Celiberto LS, Graef FA, Healey GR, Bosman ES, Jacobson K, Sly LM, Vallance BA. Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome. *Immunology*. 2018, 155: 36-52

Chowdhury AH, Lobo DN. Fluids and gastrointestinal function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011, 14: 469-476

Courtney ED, Matthews S, Finlayson C, Di Pierro D, Belluzzi A, Roda E, Kang JY, Leicester RJ. Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces crypt cell proliferation and increases apoptosis in normal colonic mucosa in subjects with a history of colorectal adenomas. *International Journal of Colorectal Disease*. 2007, 22: 765-776

Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*. 2012, 120: e60-e72

De Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nature immunology*. 2005, 6: 844-851

De Silva PS, Olsen A, Christensen J, Schmidt EB, Overvaad K, Tjønneland A, Hart AR. An association between dietary arachidonic acid, measured in adipose tissue, and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2010, 139: 1912-1917

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

Funk CD, Chen XS, Johnson EN, Zhao L. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2002, 68-69: 303-312

Gobbetti T, Dalli J, Colas RA, Federici Canova D, Aursnes M, Bonnet D, Alric L, Vergnolle N, Deraison C, Hansen TV, Serhan CN, Perretti M. Protectin D1<sub>n-3</sub>DPA and resolvin D5<sub>n-3</sub>DPA are effectors of intestinal protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017, 114: 3963-3968

Goretzki PE, Müller FP. Ileus. In: Röher H-D, Encke A, Hrsg. München-Wien-Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1998: 829-842

Hillier K, Jewell R, Dorrell L, Smith CL. Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1991, 32: 1151-1155

Holzer P, Lippe IT, Amann R. Participation of capsaicin-sensitive afferent neurons in gastric motor inhibition caused by laparotomy and intraperitoneal acid. *Neuroscience*. 1992, 48: 715-722

Iyer S, Saunders WB, Stemkowski S. Economic burden of postoperative ileus associated with colectomy in the United States. *Journal of Managed Care Pharmacy*. 2009, 15: 485-494

Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology*. 2000, 118: 316-327

Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Annals of surgery*. 1998, 228: 652-663

Klek S. Omega-3 Fatty Acids in Modern Parenteral Nutrition: A Review of the Current Evidence. *Journal of clinical medicine*. 2016, 5

Koninger J, Gutt CN, Wente MN, Friess H, Martin E, Buchler MW. [Postoperative ileus. Pathophysiology and prevention]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*. 2006, 77: 904-912

Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings National Academy of Science of the United States America*. 2010, 107: 1660-1665

Kytikova O, Novgorodtseva T, Denisenko Y, Antonyuk M, Gvozdenko T. Pro-Resolving Lipid Mediators in the Pathophysiology of Asthma. *Medicina (Kaunas)*. 2019, 55: 284

Li X, Bi X, Wang S, Zhang Z, Li F, Zhao AZ. Therapeutic Potential of w-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Human Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2019, 10: 2241

Liu M, Boussetta T, Makni-Maalej K, Fay M, Driss F, El-Benna J, Lagarde M, Guichardant M. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. *Lipids*. 2014, 49: 49-57

Livingston EH, Passaro EP Jr. Postoperative ileus. *Digestive diseases and sciences*. 1990, 35: 121-132

Luo M, Fernandez-Estivariz C, Jones DP, Accardi CR, Alteheld B, Bazargan N, Hao L, Griffith DP, Blumberg JB, Galloway JR, Ziegler TR. Depletion of plasma antioxidants in surgical intensive care unit patients requiring parenteral feeding: effects of parenteral nutrition with or without alanyl-glutamine dipeptide supplementation. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, California). 2008, 24: 37-44

Mao H, Milne TGE, O'Grady G, Vather R, Edlin R, Bissett I. Prolonged Postoperative Ileus Significantly Increases the Cost of Inpatient Stay for Patients Undergoing Elective Colorectal Surgery: Results of a Multivariate Analysis of Prospective Data at a Single Institution. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2019, 62: 631-637

Matteoli G, Gomez-Pinilla PJ, Nemethova A, Di Giovangiulio M, Cailotto C, van Bree SH, Michel K, Tracey KJ, Schemann M, Boesmanns W, Vandne Berghe P, Boeckxstaens GE. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut*. 2014, 63: 938-948

Meroni E, Stakenborg N, Viola MF, Boeckxstaens GE. Intestinal macrophages and their interaction with the enteric nervous system in health and inflammatory bowel disease. *Acta Physiologia* (Oxford, England). 2019, 225: e13163

Mikkelsen HB. Macrophages in the external muscle layers of mammalian. *Histology and histopathology*. 1995, 10: 719-736

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 and tissue research*. 1999, 295: 485-493

Millan M, Biondo S, Fraccalvieri D, Frago R, Golda T, Kreisler E. Risk Factors for Prolonged Postoperative Ileus After Colorectal Cancer Surgery. *World Journal of Surgery*. 2012, 36: 179-185

Mitchell PL, Nachbar R, Lachance D, St-Pierre P, Trottier J, Barbier O, Marette A. Treatment with a novel agent combining docosahexaenoate and metformin increases protectin DX and IL-6 production in skeletal muscle and reduces insulin resistance in obese diabetic db/db mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2017, 19: 313-319

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012, 142: 46-54

Mozaffari H, Daneshzad E, Larijani B, Bellissimo N, Azadbakht L. Dietary intake of fish, n-3 polyunsaturated fatty acids, and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *European Journal Nutrition*. 2019

Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres ML, Hashimoto D, Mortha A, Leboeuf M, Li XM, Mucida D, Stanley ER, Dahan S, Margolis K, Gershon MD, Merad M, Bogunovic M. Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. *Cell*. 2014, 158:1210

Nakanishi M, Hanley MP, Zha R, Igarashi Y, Hull MA, Mathias G, Sciavolino F, Grady JJ, Rosenberg DW. A novel bioactive derivative of eicosapentaenoic acid (EPA) suppresses intestinal tumor development in *ApcDelta14/+* mice. *Carcinogenesis*. 2018, 39: 429-438

Ohno T, Mochiki E, Ando H, Fukasawa T, Toyomasu Y, Ogata K, Aihara R, Asao T, Kuwano H. Glutamine decreases the duration of postoperative ileus after abdominal surgery: an experimental study of conscious dogs. *Digestive diseases and sciences*. 2009, 54:1208-1213

Orr SK, Butler KL, Hayden D, Tompkins RG, Serhan CN, Irimia D. Gene Expression of Proresolving Lipid Mediator Pathways Is Associated With Clinical Outcomes in Trauma Patients. *Critical Care Medicine*. 2015, 43: 2642-2650

Oshima M, Takahashi M, Oshima H, Tsutsumi M, Yazawa K, Sugimura T, Nishimura S, Wakabayashi K, Taketo MM. Effects of docosahexaenoic acid (DHA) on intestinal polyp development in Apc delta 716 knockout mice. *Carcinogenesis*. 1995, 16: 2605-2607

Quiroga\_Centeno AC, Jerez-Torra KA, Martin-Mojica PA, Castaneda-Alfonso SA, Castillo-Sánchez ME, Calvo-Corredor OF, Gómez-Ochoa SA. Risk Factors for Prolonged Postoperative Ileus in Colorectal Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *World Journal of Surgery*. 2020

Rogerio AP, Haworth O, Croze R, Oh SF, Uddin M, Carlo T, Pfeffer MA, Priluck R, Serhan CN, Levy BD. Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 promote resolution of allergic airways responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2012, 189: 1983-1991

Scaioli E, Liverani E, Belluzzi A. The Imbalance between n-6/n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review and Future Therapeutic Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18

Serhan CN, Chiang N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Current opinion in pharmacology*. 2013, 13: 632-640

Serhan CN, de la Rosa X, Jouvencé C. Novel mediators and mechanisms in the resolution of infectious inflammation: evidence for vagus regulation. *Journal of International Medicine*. 2019, 3: 240-258

Serhan CN, de la Rosa X, Jouvencé C. Cutting Edge: Human Vagus Produces Specialized Proresolving Mediators of Inflammation with Electrical Stimulation Reducing Proinflammatory Eicosanoids. *The Journal of Immunology*. 2018 b, 201: 3161-3165

Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan SP, Petasis NA. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2006, 176: 1848-1859

Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *The Journal of Clinical Investigation*. 2018 a, 128: 2657-2669

Stakenborg N, Gomez-Pinilla PJ, Boeckxstaens GE. Postoperative Ileus: Pathophysiology, Current Therapeutic Approaches. *Gastrointestinal Pharmacology*. 2017, 239: 39-57

Stein K, Stoffels M, Lysson M, Schneiker B, Dewald O, Krönke G, Kalff JC, Wehner S. A role for 12/15-lipoxygenase-derived proresolving mediators in postoperative ileus: protectin DX-regulated neutrophil extravasation. *Journal of leukocyte biology*. 2016, 99: 231-239

Schreiner P, Martinho-Gruerber M, Studerus D, Vavricka SR, Tilg H, Biedermann L. Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*. 2020, 10: 1-16

Schwarz NT, Kalff JC, Türler A, Engel BM, Watkins SC, Billiar TR, Bauer AJ. Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology*. 2001, 121: 1354-1371

Schwarz NT, Kalff JC, Türler A., Speidel N, Grandis JR, Billiar TR, Bauer AJ. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. *Gastroenterology*. 2004, 126: 159-169

Tache Y, Monnikes H, Bonaz B, Rivier J. Role of CRF in stress-related alterations of gastric and colonic motor function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993, 697: 233-243

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

Trebble TM, Arden NK, Wootton SA, Calder PC, Mullee MA, Fine DR, Stroud MA. Fish oil and antioxidants alter the composition and function of circulating mononuclear cells in Crohn disease. *The American Journal Clinical Nutrition*. 2004, 80: 1137-1144

Ungaro F, Rubbino F, Danese S, D'Alessio S. Actors and Factors in the Resolution of Intestinal Inflammation: Lipid Mediators As a New Approach to Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*. 2017, 8: 1331

Vather R, O'Grady G, Bissett IP, Dinning PG. Postoperative ileus: mechanisms and future directions for research. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2014, 41: 358-370

Verheijden S, Boeckxstaens GE. Neuroimmune interaction and the regulation of intestinal immune homeostasis. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2018, 314: G75-G80

Vilz TO, Wehner S, Pantelis D, Kalff JC. Immunomodulatory aspects in the development, prophylaxis and therapy for postoperative ileus. *Zentralblatt für Chirurgie*. 2014, 139: 434-444

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

Wehner S, Behrendt FF, Lyutenski BN, Lysson M, Bauer AJ, Hirner A, Kalff JC. Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut*. 2007, 56: 176-185

Wehner S, Straesser S, Vilz TO, Pantelis D, Sielecki T, de la 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

Wehner S, Meder K, Vilz TO, Alteheld B, Stehle P, Pech T, Kalff JC. Preoperative short-term parenteral administration of polyunsaturated fatty acids ameliorates intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Langenbeck's archives of surgery*. 2012, 397: 307-315

West NJ, Clark SK, Phillips RK, Hutchinson JM, Leicester RJ, Belluzzi A, Hull MA. Eicosapentaenoic acid reduces rectal polyp number and size in familial adenomatous polyposis. *Gut*. 2010, 59: 918-925

White PJ, St-Pierre P, Charbonneau A, Mitchell PL, St-Amand E, Marcotte B, Marette A. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver gluco-regulatory axis. *Nature Medicine*. 2014, 20: 664-669

## 9. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. rer. nat. Sven Wehner für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, für die Anstellung als studentische Hilfskraft, für die permanente Unterstützung und für die professionelle, wissenschaftliche Betreuung.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Kalff bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung anfertigen zu dürfen und für die Bereitstellung einer wissenschaftlichen Stelle.

Meine Betreuerin Dr. rer. nat. Kathy Stein hat mich liebevoll in die Thematik eingearbeitet und mich an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt. Ihre professionelle, aber auch herzliche und zuvorkommende Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente waren unvergleichbar.

Bei allen Mitarbeitern des Labors der Immunpathophysiologie erfuhr ich während der ganzen Zeit eine gute kollegiale Zusammenarbeit und ein sehr harmonisches, ja freundschaftliches Miteinander. Stellvertretend möchte ich Mariola Lysson für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Auswertung meiner Versuche nennen. Vielen herzlichen Dank an alle!

Besonders hervorheben möchte ich meine Tante Frau Prof. Dr. Annegret Müller-Dornieden für ihre unermüdliche Beratung und Unterstützung.

Die sehr guten Erfahrungen und Begegnungen, die ich während der Durchführung und Anfertigung meiner Arbeit machen durfte, haben mich ermutigt, meine berufliche Karriere an einer Universität zu beginnen.

Zu guter Letzt widme ich die Doktorarbeit meiner Familie und meinem Freund Rene Katemann für deren bedingungslose, soziale und mentale Unterstützung.